INSTITUTO AGRONÔMICO

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA TROPICAL E SUBTROPICAL

Formação de Mudas e Microtubérculos de Batata (*Solanum tuberosum* L.) em Sistemas Biorreatores

Cristiana Karin Wu

Orientador: Newton do Prado Granja

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre** em: Agricultura Tropical e Subtropical Área de Concentração em Tecnologia de Produção Agrícola

Campinas, SP

Abril 2007

Aos meu pais **Wu e Lee,**

Aos meus avós paternos **Wu Han Wei Hsin e Wu Kuan Yao (in Memorian),**

Aos meus avós maternos **Lee Lu Ming Gno e Lee (in Memorian),**

Aos meus irmãos **Cecília, Cinthia, Eric e Alessandra,**

Às minhas tias **Ming e Chung,**

A vozinha e vozinho **Hilda e Paul Schnel.**

DEDICO

A **José Vitor Salvi,**

ao meu afilhado, **Gabriel Antonio Salvi**

e a toda a sua família, **OFEREÇO**

“A maior recompensa pelo esforço de uma pessoa não é o que ela ganha com isso, mas o que ela se torna através dele.”

John Ruskinz

AGRADECIMENTOS

— Ao PqC. Dr. Newton do Prado Granja pela orientação, ensinamentos, estímulos, incentivos e pelo auxílio à realização desse trabalho, sem a qual não teria sido realizado;

— Aos técnicos Paulo Sérgio Coelho e Sidisnei Quinalha, CAPTA Horticultura – Lab. de Raízes e Tubérculos, pelo auxílio, incentivos e pela convivência;

— Ao Prof. Dr. Paulo César Tavares de Melo, ESALQ-USP, pelos ensinamentos, estímulos e incentivos;

— Ao PqC. Dr. Walter José Siqueira, do CPD-Recursos Genéticos e Vegetais, pelos conselhos, estímulos e incentivos para a realização desse trabalho;

— Ao Engº Agrº Sandro Blay e ao Téc. Agric. Luciano Brito, da Agrícola Wehrmann Ltda. (Cristalina, GO), pelo incentivo, amizade, e fornecimento das mudas matrizes utilizadas para repicagem na parte final dos experimentos;

— Aos PqC. Dr. Teresa Lousada Valle, PqC. Hilário da Silva Miranda Filho e PqC. Dr. Antônio Carlos Feltran, do CAPTA Horticultura – Raízes e Tubérculos, pelos ensinamentos da vida, estímulos, amizade e convivência;

— Aos PqC. Dr. Odair Alves Bovi e PqC. Dr. Nilson Borlina Maia, do CAPTA Horticultura – Plantas Aromáticas e Medicinais, pelas sugestões, incentivos e pela convivência;

— À Sra. Rauly M. R. Moretti, técnica do CPD-Recursos Genéticos e Vegetais - Lab. De Cultura de Tecidos, pelos ensinamentos, amizade, apoio e incentivo;

— À Sra. Alba Tereza Junqueira, secretária do CAPTA Horticultura, pela amizade, companheirismo e convivência;

— Aos Eng. Agrônomos André Boldrin Beltrame e Oscar César Muller Queiróz, pelo apoio, conselhos, amizade e convívio;

— Ao casal Eng. Agrônomos Marcos e Marina Matos, pela amizade e convívio;

— Aos Eng. Agrônomos Rafael von Zuben Previtalli e João Manuel Galera , pela amizade, apoio e convívio;

— Aos pesquisadores e funcionários do IAC a qual tive convívio nesse período;

— Aos companheiros da Pós-Graduação, pela convivência e companheirismo;

— E à todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE QUADROS vii
ÍNDICE DE TABELAS vii
ÍNDICE DE FIGURAS viii
RESUMO xi
ABSTRACT xii
1. INTRODUÇÃO 1
2. REVISÃO DE LITERATURA 2
2.1 Produção de Batata-Semente 2
2.2 Micropropagação 3
2.2.1 Meios de cultivo 4
2.2.1.1 Cultivo em meio sólido 5
2.2.1.2 Cultivo em Meio Líquido 6
2.3 Biorreatores 7
2.3.1 Contaminação 10
2.3.1.1 Métodos de Esterilização 11
2.3.2 Produção de Mudas Micropropagadas 11
2.3.2.1 Carboidratos como fontes de energia 12
2.3.3 Produção de Microtubérculos 13
2.3.3.1 Tuberização *in vitro* 14
2.3.3.2 Fonte de energia luminosa 15
2.3.3.3 Carboidratos no meio de cultivo 16
2.3.3.4 Relação Carbono - Nitrogênio 17
2.3.3.5 Temperatura 17
2.3.3.6 Reguladores de crescimento para a indução de tuberização 18
2.3.4 Vitrificação 18
3. MATERIAL E MÉTODOS 19
3.1 Material Vegetativo 19
3.2 Experimentos da etapa preliminar 20
3.2.1 Avaliação de tipos de explantes e indução à tuberização em meio líquido e meio sólido 20
3.2.2 Desenvolvimento e avaliação dos sistemas bioreatores 21
3.3 Experimentos da etapa final 22
3.3.1 Análise dos resultados 23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 25
4.1 Multiplicação de mudas e microtuberização *in vitro* 25
4.1.1 Formação de Mudas *in vitro* de Batata 25
4.1.1.1 Desenvolvimento de Explantes de Ápices Caulinares. 25
4.1.1.2 Enraizamento de Explantes de Ápices Caulinares. 27

4.1.1.3 Notas do Enraizamento de Explantes de Ápices Caulinares. 27
4.1.1.4 Notas de Vitrificação de Explantes de Ápices Caulinares. 28
4.1.1.5 Desenvolvimento de Explantes de Segmentos Nodais. 29
4.1.1.6 Enraizamento de Explantes de Segmentos Nodais. 29
4.1.1.7 Nota de Enraizamento de Explantes de Segmentos Nodais 30
4.1.1.8 Nota de Vitrificação de Explantes de Segmentos Nodais 30
4.1.2 Formação de Microtubérculos 48
4.2 Ajuste das variáveis a uma função contínua 49
4.2.1 Desenvolvimento de ápices caulinares e segmentos nodais 49
4.2.2 Enraizamento de ápices caulinares e segmentos nodais 50
4.2.3 Notas de Enraizamento de ápices caulinares e segmentos nodais 51
4.2.4 Notas de vitrificação de ápices caulinares e segmentos nodais 52
5. CONCLUSÕES 54
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 55
7. GLOSSÁRIO 69
8 ANEXOS 70

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 Descrição da escala de notas para NTR..... 24
Quadro 2 Descrição da escala de notas para NTV 24

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 Tratamentos do delineamento fatorial fracionado 1/5 x 5^3 com as dosagens aplicadas por litro de meio. 22
Tabela 2 Resumo da análise da variância e da análise da regressão da variável DES, para o cultivo de ápices. 32
Tabela 3 Resumo da análise da variância e da análise da regressão da variável ENR, para o cultivo de ápices. 34
Tabela 4 Resumo da análise da variância e da análise da regressão da variável NTR, para o cultivo de ápices. 36
Tabela 5 Resumo da análise da variância e da análise da regressão da variável NTV, para o cultivo de ápices 38
Tabela 6 Resumo da análise da variância e da análise da regressão da variável DES, para o cultivo de segmentos. 40
Tabela 7 Resumo da análise da variância e da análise da regressão da variável ENR, para o cultivo de segmentos. 42
Tabela 8 Resumo da análise da variância e da análise da regressão da variável NTR, para o cultivo de segmentos. 44
Tabela 9 Resumo da análise da variância e da análise da regressão da variável NTV, para o cultivo de segmentos. 46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Esquema de biorreator de imersão permanente. 9

Figura 2 Esquema de Biorreator de Imersão Temporária. 10

Figura 3 Biorreator de imersão temporária por gravidade 21

Figura 4 Superfícies de Resposta da variável DES, para o cultivo de ápices, aos 24 DAP, incluindo os valores estimados para os níveis de S = S: A) Para S1; B) Para S2; C)Para S3; D)Para S4 e E)Para S5. 33

Figura 5 Superfícies de Resposta da variável ENR, para o cultivo de ápices, aos 24 DAP, incluindo os valores estimados para os níveis de S = S: A) Para S1; B) Para S2; C)Para S3; D)Para S4 e E)Para S5. 35

Figura 6 Superfícies de Resposta da variável NTR, para o cultivo de ápices, aos 24 DAP, incluindo os valores estimados para os níveis de S = S: A) Para S1; B) Para S2; C) Para S3; D) Para S4 e E) Para S5. 37

Figura 7 Superfícies de Resposta da variável NTV, para o cultivo de ápices, aos 24 DAP, incluindo os valores estimados para os níveis de S: A) Para S1; B) Para S2; C) Para S3; D) Para S4 e E) Para S5. 39

Figura 8 Superfícies de Resposta da variável DES, para o cultivo de segmentos, aos 24 DAP, incluindo os valores estimados para os níveis de S: A) Para S1; B) Para S2; C) Para S3; D) Para S4 e E) Para S5. 41

Figura 9 Superfícies de Resposta da variável ENR, para o cultivo de segmentos, aos 24 DAP, incluindo os valores estimados para os níveis de S: A) Para S1; B) Para S2; C)Para S3; D)Para S4 e E)Para S5. 43

Figura 10 Superfícies de Resposta da variável NTR, para o cultivo de segmentos, aos 24 DAP, incluindo os valores estimados para os níveis de S: A) Para S1; B) Para S2; C)Para S3; D)Para S4 e E)Para S5. 45

Figura 11 Superfícies de Resposta da variável NTV, para o cultivo de segmentos, aos 24 DAP, incluindo os valores estimados para os níveis de S: A) Para S1; B) Para S2; C)Para S3; D)Para S4 e E)Para S5. 47

Figura 12 Médias dos experimentos com o cultivo de ápices caulinares em datas sucessivas de avaliação: A) DES; B) ENR; C) NTR e D) NTV 50

Figura 13 Médias dos experimentos com o cultivo de segmentos nodais em datas sucessivas de avaliação: A) DES; B) ENR; C) NTR e D) NTV 51

Figura 14 Tratamentos: A) Ápices. B) Segmentos e ápices C) Ápices e segmentos. Tecidos vitrificados. D) Tubérculos obtidos através de ápices..... 53
Figura 15 Mudas de batata cultivados em (A) Meio Líquido e (B) Meio Solidificado..... 72
Figura 16 Esquema de Biorreator de imersão temporária com bomba submersa..... 73
Figura 17 Biorreator de imersão temporária com compressor ar..... 74
Figura 18 Biorreator de imersão temporária de bomba injetora..... 74
Figura 19 Biorreator de imersão temporária por gravidade..... 75
Figura 20 Caracteristicas dos biorreatores: A) Bomba Submersa, B) Compressor de Ar; C) Bomba injetora e D) Por Gravidade..... 76

SIGLAS UTILIZADAS

B: BAP, 6-Benzilaminopurina

BIT: Biorreator de Imersão Temporária

BIP: Biorreator de Imersão Permanente

DAP: Dias Após o Plaqueamento

DES: Desenvolvimento

ENR: Enraizamento

ML: Meio Líquido

MS: Meio nutritivo de Murashige & Skoog (1962)

MSO: Meio Sólido

N: Nit, NH_4NO_3, Nitrato de Amônia

NTR: Nota de enraizamento

NTV: Nota de vitrificação

S: Sac, sacarose

Wu, Cristiana Karin. **Formação de Mudas e Microtubérculos de Batata (*Solanum tuberosum* L.) em Sistemas Biorreatores.** 2007. 95f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia da Produção Agrícola) – Pós Graduação – IAC.

RESUMO

A batata-semente é o principal fator de custo e qualidade da produção da batata, os produtores vêm buscando novas tecnologias para a produção de sementes devido ao alto custo de produção e a baixa rentabilidade da cultura. O custo elevado das mudas *in vitro* reprime a sua demanda. O objetivo desse trabalho foi desenvolver e adaptar métodos para o estabelecimento de uma tecnologia de produção de mudas e de microtubérculos de batata em sistemas biorreatores de imersão temporária, a fim de incrementar o rendimento, a eficiência e a segurança dos processos de manipulação dos propágulos, comparativamente ao protocolo atualmente empregado. Foram desenvolvidos quatro protótipos de biorreator com mecanismos diferentes de transferência da solução nutritiva. A partir de experimentos preliminares, selecionou-se para experimentação o sistema biorreator formado por um par de frascos plásticos PET em que um deles se destina ao cultivo e o outro serve como depósito da solução nutritiva, com rega por gravidade. Foram implantados em seguida dois experimentos, um com o cultivo de ápices caulinares e outro com segmentos nodais, ambos seguindo o delineamento fatorial fracionado 1/5 de 5x5x5, com duas repetições. Os fatores analisados foram: a) concentração de nitrogênio na forma de NH_4NO_3 (Nit); b) sacarose (Sac) e c) 6-Benzyl-aminopurina (BAP). Com a aplicação de doses igualmente espaçadas em cinco níveis, com Nit variando de 0 a 3,22 $g.L^{-1}$ de NH_4NO_3; Sac variando de 0 a 80 $g.L^{-1}$, e BAP variando de 0 a 10 $mg.L^{-1}$. Os resultados obtidos indicam forte interação entre o NH_4NO_3 e a sacarose, com melhores rendimentos na combinação Nit igual a 1,960 $g.L^{-1}$ de NH_4NO_3 e Sac igual a 48 $g.L^{-1}$ para o cultivo de ápices caulinares e para o cultivo de segmentos nodais com Nit igual a 2,820 $g.L^{-1}$ de NH_4NO_3 e Sac igual a 70 $g.L^{-1}$. O BAP prejudicou o desenvolvimento das mudas de batata. Os microtubérculos obtidos dos tratamentos: 254, 342, 421 e 532 não foram suficientes para a determinação, a partir de análises estatísticas, um meio específico para a produção de microtubérculos em sistema biorreator.

Palavras Chaves: Imersão temporária, meio líquido, micropropagação

Wu, Cristiana Karin. **Production of potato (Solanum tuberosum L.) plantlets and microtubers in bioreactors.** 2007. 95f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia da Produção Agrícola) – Pós Graduação – IAC.

ABSTRACT

The potato seed is the main cost and quality factor of the potato crop and potato producers are looking for new technologies of seed production due to the higher costs and low earnings. Potato plantlets are the beginning of the nuclear stocks formed in greenhouses and its higher prices limitis the adoption of this technology. The objective of this work was to develop a protocol better than those in use, to produce potato plantlets and microtubers in bioreactors in order to incresase the income, the efficiency and the quality of the propagules. It was developed four prototypes of bioreator, each one possessing different mechanisms to transfer the nutrient solution. Sume preliminary experiments led to a bioreactor system formed by two PET vessels, one to the cultivation and the other to the nutrient solution, gravity driven. From this moment on, it was conducted experiments with two propagules types, haulm apex and two node cuttings. Both of them in a fractional factorial 1/5 (5x5x5), with two replications and three factors: nitrogen concentration as NH_4NO_3(Nit); sucrose (Sac) and 6-Benzylaminopurine (BAP). Doses equally spaced were applied in five levels, with N varying from 0 to 3.22 $g.L^{-1}$ of NH_4NO_3; sucrose varying from 0 to 80 $g.L^{-1}$, and BAP varying form 0 to 10 $mg.L^{-1}$. The results showed strong interaction between nitrogen and sucrose, with better results for the cultivation od apex propagules when Nit is equal to 1.960 $g.L^{-1}$ and Sac is 48 $g.L^{-1}$.The two node cuttings culture was maximum when. Nit is equal to 2.820 $g.L^{-1}$ and Sac is 70 $g.L^{-1}$. The BAP was prejudicial to the development of potato plantlets. Microtuber formation in response to treatments 524, 342, 421 and 532 were not sufficient to perform statistical analysis.

Key Words: Temporary immersion, liquid media., micropropagation

1. INTRODUÇÃO

A batataticultura é uma das atividades mais importantes do mundo sob o ponto de vista econômico e social, produzindo-se anualmente 300 milhões de toneladas dos seus tubérculos em 19 milhões de hectares. O Brasil é o maior produtor da América do Sul, com 2,9 milhões de toneladas-ano em 162 mil ha, seguido de Peru, Colômbia e Argentina, sendo esses quatro países responsáveis por 75% da produção sul-americana (AGRIANUAL, 2004 e OSAKI, 2003).

A produção brasileira de batata concentra-se nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina. A exploração do cultivo tem ocupado áreas com clima mais favorável, como o Triângulo Mineiro, o cerrado de Goiás e da Bahia, mantendo-se a área total cultivada pouco alterada, alcançando porém maior produtividade e maior rentabilidade (AGRIANUAL, 2004 e OSAKI, 2003).

O cultivo da batata se dá através do plantio dos tubérculos convenientemente brotados, denominados de batata-semente. Elevadas produções exigem o uso de batata-semente com alta qualidade fitossanitária, fisiológica e genética. Com a ocorrência do declínio da produção devido ao acúmulo de patógenos na batata-semente após plantios consecutivos em campo (DANIELS et al., 2002).

O Brasil situa-se em região climática marginalmente adaptada para a produção de batatas-semente e havia até por volta de 1995, a dependência de importações de sementes de países como Holanda, Canadá, Chile e França (PAES & SILVA, 2003).

A semente constitui o principal fator de custo e qualidade na produção da batata brasileira e, para superar tal adversidade, foram desenvolvidas uma série de técnicas de acompanhamento e controle da produção para a obtenção de sementes de qualidade, reduzindo com isso a necessidade da importação de sementes. Atualmente, as importações de batata-semente destinam-se à formação do estoque básico, após o que, são multiplicadas sucessivamente no campo, visando relações custo-benefício mais favoráveis (PAES & SILVA, 2003).

O elevado custo de produção da batata e da batata-semente exige dos produtores a adoção de novas tecnologias na produção de sementes, visando a redução do custo de produção (FERREIRA & BITTENCOURT, 2003 e AGRIANUAL, 2004). E dentre as técnicas utilizadas, aquela que estabelece a formação de um matrizeiro indexado *in vitro* como base para a produção de micro-estacas *in vitro*, seguida por seu cultivo em

ambiente protegido para a produção de tubérculos-semente, se apresenta como a mais empregada.

Apesar da expansão dessa tecnologia, observa-se ainda uma certa repressão na demanda por mudas micropropagadas de batata devido ao seu custo alto. O preço elevado da muda é consequência dos elevados custos laboratoriais (tais como a mão-de-obra especializada, energia elétrica, reagentes, agentes gelificantes e da baixa eficiência multiplicativa da micropropagação). Ainda que não existam estatísticas sobre o assunto, estima-se que a produção brasileira de mudas micropropagadas de batata não cubra sequer 10% do mercado potencial.

Neste trabalho foram conduzidos experimentos para avaliar a produção de mudas e de microtubérculos *in vitro* em sistemas biorreatores, utilizando meios autotróficos e heterotróficos, de forma a proporcionar maiores rendimentos e eficiência na produção de mudas em laboratório e no cultivo subseqüente em casa de vegetação, comparados à tecnologia atual de formação do estoque básico de batata-semente.

Procurou-se adaptar e desenvolver a técnica de cultivo *in vitro* em meio líquido praticada na maioria dos laboratórios de forma estacionária, para condições de biorreatores de imersão temporária. O protótipo biorreator utilizado nos experimentos foi escolhido devido a sua facilidade de construção e de manuseio, assim como os resultados obtidos nos experimentos preparatórios desenvolvidos no Centro de Horticultura do IAC.

Este trabalho teve como principais objetivos otimizar e adaptar o cultivo e a produção de mudas micropropagadas e de microtubérculos de batata em sistemas biorreatores de imersão temporária. Adotou-se tecnologias e material de baixo custo, visando maior retorno econômico da produção em escala, com redução de mão-de-obra nas operações de repicagens e manutenção de matrizeiros, visando sua aplicação no cotidiano dos laboratórios de pesquisa e de produção de batatas-semente.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção de Batata-Semente

A batateira apresenta como característica evolutiva, uma ampla e diversificada capacidade de adaptação às formas de propagação vegetativa. Além da semente botânica são funcionais para a propagação vegetativa as estacas caulinares apicais,

segmentos caulinares, ápices e segmentos estoloníferos, folhas, tubérculos, brotos caulinares e brotos destacados dos tubérculos (MIRANDA FILHO et al., 2003).

A legislação brasileira compreende as classes Genética, Básica, Registrada e Certificada de batata-semente. A Semente Genética é aquela oriunda de melhoramento genético; a Semente Básica resulta da multiplicação da Genética e comporta diversas Sub-Classes, em que a mais elevada se utiliza de técnicas de micropropagação *in vitro* e o cultivo em ambiente protegido (casa de vegetação); Semente Registrada é aquela produzida a partir da batata-semente importada; Semente Certificada é aquela obtida pela multiplicação no campo, das Classes Básica ou Registrada (BRASIL, 2005).

A produção de batata-semente Básica com alta qualidade genética, fisiológica e fitossanitária, prevê a formação de mudas *in vitro* e o seu cultivo em ambiente protegido, utilizando tecnologias modernas como o isolamento e cultivo de meristemas *in vitro*, indexação das mudas contra viroses, micropropagação de mudas *in vitro*, cultivo de mudas em ambiente protegido (FERREIRA & BITTENCOURT, 2003).

A tecnologia mais freqüentemente adotada no Brasil envolve o plantio de mudas micropropagadas *in vitro* e cultivadas em ambiente protegido contra vetores de vírus e outros patógenos. Partindo dessas mudas, forma-se um matrizeiro que após sucessivas repicagens irá fornecer estacas para a formação dos lotes de semente Básica. Devido à baixa taxa de multiplicação da batata, a quantidade de sementes necessária para o plantio dos campos de cultivo só é alcançada após duas a três multiplicações sucessivas diretamente no campo (MIRANDA FILHO et al., 2003).

2.2 Micropropagação

A tecnologia de micropropagação da batata encontra-se bem estabelecida, podendo fazer uso de meristemas, ápices caulinares, segmentos nodais e gemas laterais para obtenção de mudas geneticamente idênticas e com alta qualidade sanitária. Pode-se também direcionar o cultivo *in vitro* para a formação de calos capazes de regenerar mudas para o melhoramento genético da batata (SCHILDE-RENTSCHLER & SCHMIEDICHE 1984; BOXUS & DRUART, 1986 citados por WANG & HU, 1982).

Diversas variações dos meios de cultivo são utilizados para os diferentes tipos de propagação *in vitro,* desde a utilização do meio básico MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), além de variações (PEREIRA & FORTES, 2003), como também outros meios

desenvolvidos para situações específicas tais como: multiplicação rápida, (DODDS & ROBERTS, 1985), manutenção de germoplasmas (HUSSEY & STACEY, 1984) e obtenção de microtubérculos (WANG & HU, 1982; WANG & HU, 1985; TAKAYAMA,1991 , DONNELLY, et al, 2003).

As principais técnicas de cultura de tecidos utilizadas na batata envolvem a eliminação de vírus, bactérias e fungos endofíticos por intermédio da cultura de meristemas, desenvolvendo-se mudas através da organogênese direta e indireta para aumento e para a conservação de germoplasma (BAJAJ, 1986 e BAJAJ, 1987)

Através da cultura de calos obtém-se maior número de plantas, mas essa técnica tem uso restito ao melhoramento para a obtenção de novas variedades devido ao elevado índice de variação somaclonal (BAJAJ, 1986 e BAJAJ, 1987).

Para cada tipo de propágulo é empregada metodologia específica de multiplicação e dentre eles, o cultivo em ambiente protegido, cultivo em campo isolado para produção de tubérculos comerciais, micropropagação para obtenção de mudas, microtuberização *in vitro*, multiplicação de brotos retirados da batata-semente, cultivo hidropônico por filme de nutrientes, cultivo hidropônico com substrato, cultivo em túneis diretamente no campo e muitas outras variações (DODDS & ROBERTS,1995; GAMBORG & PHILLIPS, 1995 e TORRES et al, 1998).

De acordo com ZOBAYED et al. (2000), as limitações da micropropagação convencional são decorrentes do isolamento do frasco de cultivo que restringe as trocas gasosas com o ambiente, resultando em: a) baixa produtividade pela restrição ao sequestro de CO_2; b) acúmulo de etileno em níveis elevados; c) umidade relativa demasiado elevada no interior do frasco; d) baixa taxa de crescimento; e) baixa taxa de aclimatação das plantas micropropagadas, devido aos estresses acumulados com o mau funcionamento dos estômatos, desorganização do tecido palissádico e de camadas de mesofilo esponjoso, deficiência de clorofila, vitrificação dos tecidos.

2.2.1 Meios de cultivo

Na cultura de tecidos os explantes regeneram-se em condições assépticas e em ambiente próximo do ideal. Há contudo, necessidade do fornecimento de nutrientes de forma balanceada e de fontes de energia essenciais para o desenvolvimento, e que, em grande parte, controlam o padrão de crescimento *in vitro* (CALDAS et. al., 1998).

Para cada espécie e mesmo ao nível de genótipo, há uma necessidade específica de nutrientes e substâncias essenciais. O meio de cultivo de plantas *in vitro* inclui um agente solidificante, com funções de sustentação das plantas, aeração radicular e o controle osmótico (GAMBORG & PHILLIPS, 1995 e TORRES et al, 1998).

Nos anos recentes tem havido um aumento das referências na bibliografia internacional à utilização de cultivo em meio líquido, por proporcionar melhor desenvolvimento das plantas, redução nos custos de mão-de-obra e do agente gelificante, e maior facilidade na aclimatação das plantas.

2.2.1.1 Cultivo em meio sólido

O meio de cultivo solidificado é o mais utilizado na micropropagação convencional. Composto por água, nutrientes e um agente solidificante que pode ser ágar, phytagel, ou algum derivado de amido, algas ou substâncias sintetizadas para esse fim (CALDAS et al., 1989; DODDS & ROBERTS,1995 e GAMBORG & PHILLIPS, 1995).

As principais características que os agentes solidificantes conferem ao cultivo são: a) suporte para o sistema radicular das plantas *in vitro*; b) favorecimento de trocas gasosas no sistema radicular, assim como entre o meio de cultivo e o interior do frasco de cultivo; c) favorece o controle osmótico do meio sobre o explante cultivado, evitando a vitrificação por excesso de umidade (CALDAS et al., 1989; DODDS & ROBERTS,1995 e GAMBORG & PHILLIPS, 1995).

Alguns fatores são limitantes para o cultivo em meio sólido: a) o elevado custo do gel; b) alta demanda por de mão-de-obra, devido à elevada frequência de subcultivos; c) formação de um gradiente de nutrientes à medida que o tecido absorve o nutriente; d) acúmulo de substâncias fitoalelopáticas e de exudados radiculares que podem prejudicar a absorção de nutrientes e o desenvolvimento e crescimento (LEVIN, et al.,1997; CID et al.,2002; TEIXEIRA,2002).

Plantas e mudas micropropagadas em meio de cultivo sólido têm o custo inflacionado pelo preço do agente solidificante e pela limitação da área de cultivo dentro do frasco. Soma-se a isso a dificuldade de automatizar a substituição do meio nutritivo esgotado para a otimização do processo (KOZAI, 1991a; ZIV, 1995 ; LEVIN, et al.,1997 e CID et al., 2002).

Quanto maior a quantidade de plantas cultivadas por frasco, maior a eficiência econômico-financeira do empreendimento. Enquanto o frasco utilizado com meio de cultivo sólido situa-se ao redor de 500ml, no cultivo em meio líquido, chega-se até 5000 ml em escala industrial (LEVIN, et al.,1997; CID et al.,2002; ETTIENE & BERTHOULY,2002e TEIXEIRA,2002).

2.2.1.2 Cultivo em Meio Líquido

A micropropagação convencional em meio solidificado tem apresentado ganhos de eficiência com sua adaptação ao meio líquido e já vem sendo utilizado em diversas espécies como o café e a cana de açúcar (LORENZO et al.,1998), banana (LEVIN, et al.,1997 e LEMOS, et al., 2001), abacaxi (ESCALONA, 2003), morango e até mesmo batata (AKITA & TAKAYAMA, 1988).

O cultivo em meio líquido é muito semelhante ao cultivo em meio solidificado, exceto pela necessidade de oxigenação do meio de cultivo para prevenção da morte de células por asfixia. No cultivo em meio líquido, deve-se tomar cuidados para evitar hipoxia (baixas concentrações de O_2) que estão associadas com a vitrificação ou hiperhidratação do tecido (HVOLSLEF – EIDE et al., 2003).

As vantagens dos meios de cultura líquidos, de acordo com AITKEN–CHRISTIE & DAVIES, 1988 e ZIV (1995) são: a) o contato físico entre a planta (explante) e o meio de cultivo é melhorado; b) há uma queda na restrição de trocas gasosas para as raízes; c) proporciona um melhor controle da composição do meio e de trocas gasosas; d) o crescimento das plantas é mais homogêneo.

A principal desvantagem do cultivo em meio líquido resulta da baixa pressão osmótica do meio, em que a planta tende a absorver mais líquidos, reduzindo assim as trocas gasosas. Esse problema pode ser solucionado adicionando-se um sistema de oxigenação (KOZAI, 1991a; ZIV (1995); LEVIN, et al.,1997; TEIXEIRA, 2002).

Altos rendimentos de microtubérculos de batata são obtidos com a hidroponia *in vitro,* que consiste na tuberização de segmentos nodais dispostos em suporte de algodão e papel filtro, nutrindo o explante com o meio líquido. (NHUT et al, 2006).

Não existem relatos na literatura brasileira da utilização de meio líquido em sistemas de biorreatores para a produção em larga escala, embora esta técnica seja

empregada rotineiramente em diversos países como a Estados Unidos, Coréia, Cuba e Taiwan para a produção industrial (WANG & HU, 1982, JIMENEZ et. al., 1999).

2.3 Biorreatores

Os biorreatores são sistemas de cultivo *in vitro* cuja função básica é promover condições ótimas de crescimento através da regulação de fatores químicos e, ou, físicos. São compostos por um meio de cultivo líquido, um mecanismo de oxigenação (opcional) e um mecanismo de suporte ou fixação para o organismo a ser cultivado (opcional) (CID et al., 2002; TEIXEIRA,2002).

Foram derivados dos tanques de fermentação utilizados na produção de bebidas a partir de substrato (mosto) e nutrientes e, inicialmente adaptados para a cultura de células *in vitro* e na produção de metabólitos secundários. E depois, otimizados para a formação de mudas, pelo cultivo de gemas e microestaquias (HALE et al., 1992; CID et al., 2002).

Os principais argumentos para a adaptação dos biorreatores para o cultivo de células e plantas foram: a) necessidade do cultivo em larga escala, com maior taxa de crescimento e desenvolvimento; b) redução de custos com agentes solidificantes, repicagens sucessivas e mão-de-obra; c) automatização do cultivo (AITKEN – CHRISTIE & DAVIES, 1988; PREIL, 1991; CID et al., 2002 e TEIXEIRA,2002).

Isso só foi possível com adoção de estratégias para a diminuição de custos de produção *in vitro* a partir da introdução de novos materiais como substratos artificiais, frascos de cultivo, de lâmpadas mais apropriadas, substituição da sacarose (principal fator contaminante do cultivo *in vitro*), injeção de CO_2, melhor controle ambiental, para a promoção do crescimento autotrófico das plantas *in vitro* e para delimitar desordens fisiológicas durante os estágios de multiplicação e preparação (KOZAI 1991a; HALE et al., 1992; BUDDENDORF-JOOSTEN & WOLTERING, 1995; PAEK et al., 2001; ETIENNE & BERTHOULY, 2002 e GRIGORIANDOU & LEVENTAKIS, 2003).

Os diversos tipos de biorreatores são classificados de acordo com o mecanismo de renovação do meio de cultivo, tipo de aeração, funcionamento e exposição do explante, de acordo com as exigências da espécie, do tipo de célula ou órgão a ser propagado (ETIENNE, 2002; TAKAYAMA, 1991, PREIL, 1991).

Os sistemas biorreatores podem ser divididos em quatro categorias, de acordo com o funcionamento: mesas inclinadas e agitadores, imersão completa do material vegetativo com renovação do meio nutritivo; imersão parcial com mecanismo de renovação do meio de cultivo; imersão completa por mecanismo pneumático de transferência do meio de cultivo sem renovação do meio (ETIENNE, 2002).

Os principais tipos de biorreatores para a cultura de tecidos descritos na literatura, (TAKAYAMA, 1991; TEISSON et al. 1996; LEVIN et al.,1997 e TEIXEIRA, 2002) compreendem:

a) Biorreator do tipo aerador agitador (Aeration agitation bioreactor), em que o meio líquido é agitado por uma hélice localizada na parte inferior do frasco de cultura, esse tipo de biorreator é mais parecido com os fermentadores convencionais;
b) Biorreator tipo Tambor rotatório (Roller drum bioreactor), utilizado no trabalho de microtuberização de AKITA & OHTA, 1998. Onde foram colocados explantes de batata para a indução de microtuberização;
c) Biorreatores do tipo borbulhamento (Air Driven bioreactor), onde no fundo do frasco possui um tubo, que promove o borbulhamento e homogeneização do meio de cultura;
d) Biorreatores de aeração simples e coluna de bolha (Bubble column bioreactor), desenvolvido por TAKAYAMA (1991), onde se cultivavam hastes, bulbos cormos e tubérculos de plantas;
e) Biorreatores com levantamento de ar (airlift bioreactor), são biorreatores desenvolvidos para suprir a necessidade de aeração e estresse por excesso de umidade. Funcionam com bolhas de ar que suspendem o meio de cultura, promovendo a aeração, homogeneização e poucos danos ao material em cultivo.

O sistema de biorreator de imersão temporária resultou da adaptação de diversos biorreatores visando melhorar as condições de oxigenação da solução nutritiva para o cultivo de plantas, no qual o explante fica imerso ou em contato com o meio, por um curto espaço de tempo (TEISSON et al., 1996 e LEVIN et al., 1997).

Alguns biorreatores de imersão temporária utilizam um mecanismo pneumático para transferência do meio de cultivo do frasco de estoque para o frasco de cultivo, esse procedimento melhora as trocas gasosas e o arejamento do meio de cultura, além de evitar que as raízes fiquem em constante contato com o meio, evitando-se assim a

vitrificação dos tecidos cultivados (TEISSON et al., 1996; TEIXEIRA, 2002; TAKAYAMA, 1991).

A principal vantagem desse sistema é facilitar as trocas gasosas, o que reduz a incidência de vitrificação dos explantes, causada pelo estresse hídrico e falta de aeração. Geralmente nesse tipo de biorreator é acoplado um filtro tipo cerâmico de 0,22 micra.

O biorreator desenvolvido a partir desse sistema e patenteado por TEISSON et al. 1999, é denominado RITA. Esse sistema utiliza material nobre e tem custo bastante elevado. Entre suas principais vantagens está a facilidade de utilização, a economia de espaço (pois o reservatório do meio nutritivo fica dentro do frasco de cultivo) e facilidade para sua esterilização uma vez que todos os componentes que têm contato direto ou indireto com a cultura são autoclaváveis.

Foram desenvolvidos no Brasil, pelo menos dois sistemas de biorreatores para o cultivo de plantas, o biorreator de imersão temporária e o de imersão permanente, ambos desenvolvidos pela Embrapa, utilizando diversos tipos de plantas e explantes (CID et al., 2002 e TEIXEIRA, 2002). No entanto, não se tem notícia do uso dessas técnicas em laboratórios privados na produção de mudas de batata.

O sistema biorreator de imersão permanente adotado por CID et al. (2002), mostrado na Figura 1, é utilizado para a produção de mamão, abacaxi, café, morango, álamo e orquídea. Este sistema é composto por frascos de 500 a 1000 ml, com as tampas adaptadas para entrada e saída de ar, acoplados em filtros milipore (0,2 µm) ligados a um microcompressor de ar (aproximadamente 3 L/min) por meio de tubos de silicone até o fundo do frasco, onde produzirão bolhas de ar no meio de cultivo líquido.

Fonte: Cid et al. 2002

Figura 1. Esquema de biorreator de imersão permanente.

JIMENEZ et al, 1999, descrevem a construção de um biorreator de imersão temporária contendo um compressor de ar, tubos de PVC de 10 mm de diâmetro, 1

regulador de pressão, válvulas solenóides, timer, tubos de silicone autoclaváveis de 6 mm de diâmetro, filtros de ar e frascos para o cultivo e para o meio de cultura, conforme a Figura 2.

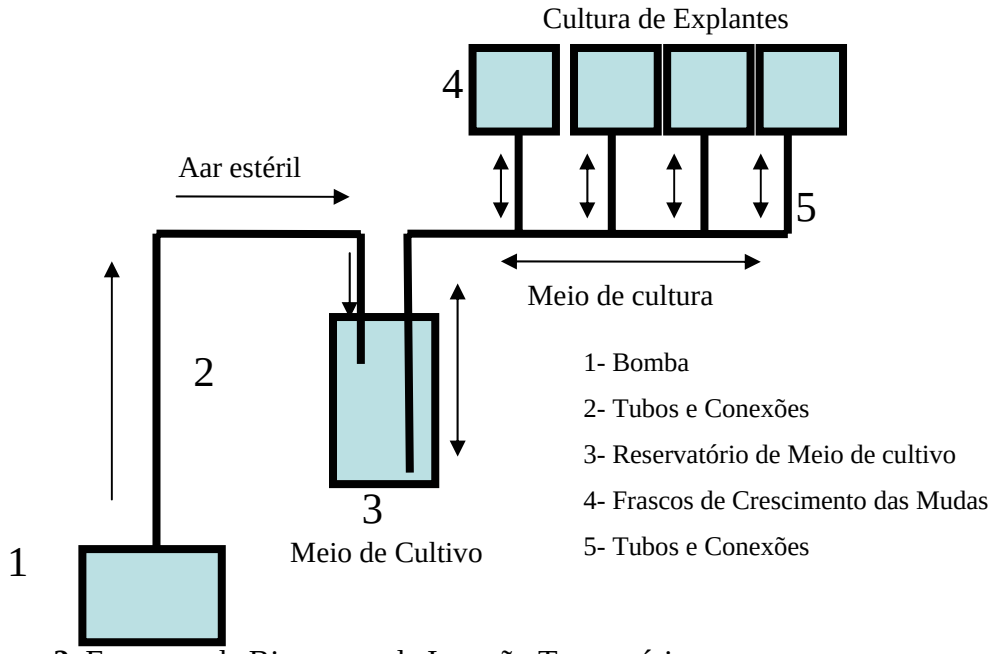


Figura 2. Esquema de Biorreator de Imersão Temporária.

Diversas outras metodologias estão disponíveis para a produção de mudas de batata através da micropropagação por biorreatores, conforme KOZAI (1991b), KITAYA et al. (1995a), KITAYA et al. (1995b), NIU et al. (1996), ROCHE et al.(1996), WOLF et al. (1998) e ZOBAYED et al. (2000).

2.3.1 Contaminação

A contaminação é o principal fator limitante na cultura de tecidos. Mesmo sem potencial fitopatogênico e sem desenvolver além do cultivo *in vitro*, compete com os cultivos por nutrientes, CO_2, luz, espaço, trocas gasosas e outros fatores do crescimento de plantas (DEBERGH et al., 1988; CASSELLS, 1991 e CASSELLS, 2001).

2.3.1.1 Métodos de Esterilização

Para que a esterilização seja eficiente, são necessários cuidados com a higiene do local e na manipulação dos materiais (GAMBORG & PHILLIPS, 1995). A esterilização pode ser feita a seco, com temperaturas em torno de 160 a 190 ºC (por 45 a 1,5 min, respectivamente). A esterilização por calor úmido envolve o uso de autoclave, em que o tempo e a temperatura são dependentes do volume do objeto a ser esterilizado, normalmente para volumes de até 50 cm^3 utiliza-se pressão de 103,4 kPa a temperatura de 121^oC por 15 min (DODDS & ROBERTS, 1985; GAMBORG & PHILLIPS, 1995 e TORRES et al., 1998).

Para a esterilização de objetos que são degradados pelo calor, pode se utilizar substâncias químicas para a esterilização, como o álcool etílico 70% (v/v), soluções saturadas de hipoclorito de sódio e cloro e misturas contendo essas substâncias. Para substâncias líquidas que são instáveis na presença de calor, pode se utilizar o método da ultrafiltragem com poros de 0,22 μm (DODDS & ROBERTS, 1985; GAMBORG & PHILLIPS, 1995 e TORRES et al., 1998).

2.3.2 Produção de Mudas Micropropagadas

Uma das vantagens da produção de mudas em laboratório consiste na otimização do escalonamento na multiplicação dos propágulos em casa de vegetação, o que permite produzir durante o ano todo (DODDS & ROBERTS, 1985; GAMBORG & PHILLIPS, 1995 e TORRES et al., 1998).

As principais razões para a utilização da micropropagação *in vitro*, segundo TAKAYAMA, (1991) estão relacionadas ao fato de que as plantas obtidas são geneticamente homogêneas, potencialmente livres de viroses e de outros patógenos causadores de declínio.

Algumas desvantagens têm que ser consideradas, como a variação somaclonal que ocorre quando se expõe a muda a um elevado número de repicagens, especialmente sob radiação elevada e na presença de reguladores vegetais. Utiliza-se a micropropagação por estacas na obtenção das mudas destinadas à produção de semente básica de batata, o que confere maior segurança em termos de fitossanidade, qualidade genética e controle de produção (PRUSKI et al., 2003).

Na produção de mudas *in vitro* de batata, a técnica mais utilizada é a micro-estaquia, que utiliza segmentos de ápices caulinares e segmentos nodais com gemas definidas. Isso agiliza o processo de resposta do explante, pelo fato das células já estarem diferenciadas, ter tamanho relativamente maior e serem menos afetadas pelo estresse da repicagem. Obtém-se assim, maior quantidade de mudas num curto espaço de tempo (GAMBORG & PHILLIPS, 1995; BAJAJ, 1987 e DODDS & ROBERTS, 1995).

2.3.2.1 Carboidratos como fontes de energia

Células, tecidos e plantas cultivadas *in vitro,* na maioria das vezes não encontram condições ótimas de iluminação e concentração de CO_2 para o seu desenvolvimento, gerando plantas com baixos teores de clorofila, insuficientes para realizar fotossíntese capaz de sustentar o crescimento. Por esse motivo, todo meio de cultivo requer uma fonte de carbono e de energia, que é dado pela sacarose. Que atua não só como fonte de carboidrato mas também como regulador do potencial osmótico do meio (DODDS & ROBERTS, 1985 e CALDAS et. al., 1998).

Cultivos heterotróficos são aqueles que dependem do fornecimento de fontes de carboidratos como os açúcares para síntese de energia, dependendo também da energia luminosa para formação de compostos energéticos. Cultivos fotoautotróficos são capazes de produzir os compostos energéticos através da captura de CO_2 atmosférico a partir dos nutrientes fornecidos, e utilizando energia da luz (PUGA et al., 1991).

Os carboidratos fornecem energia metabólica e esqueletos carbônicos para a biossíntese de aminoácidos e proteínas, polissacarídeos estruturais como a celulose, enfim, todos os compostos orgânicos necessários para o crescimento das células (CALDAS et. al., 1998).

As principais fontes de carbono utilizadas na cultura de tecidos estão relacionadas com o suprimento de CO_2 e são carboidratos como a sacarose, frutose e glicose e outras substancias orgânicas. A sacarose é a principal fonte de carbono no crescimento heterotrófico *in vitro* (DODDS & ROBERTS, 1985 e CALDAS et. al., 1998).

As plantas na micropropagação convencional se desenvolvem como organismo heterotrófico, ou seja, presença de sacarose como principal fonte de carbono, realizando

pouca ou nenhuma fotossíntese, para a produção de carboidratos (KOZAI, 1991b e KITAYA et al., 1995).

Na micropropagação fotoautotrófica, em função do fornecimento de CO_2 e da maior intensidade luminosa, a planta consegue desenvolver num sistema que reduz a evapotranspiração, formando maior quantidade de estômatos (ZOBAYED et al. 2000).

Toda planta ou explante *in vitro* tem poder fotoautotrófico, contanto que existam clorofilas fotossinteticamente ativas e concentrações adequadas de CO_2, intensidade luminosa e fotoperíodo (KITAYA et al., 1995a; DESJARDINS, 1995 e NIU et al, 1996).

A suplementação de CO_2 no frasco da cultura de tecidos se dá pelo incremento das trocas gasosas através de filtros membranosos ou do aumento da concentração do CO_2 atmosférico no ambiente exterior ao frasco (KITAYA et al.,1995b)

A contribuição da fotossíntese para o aumento de matéria seca em mudas de batata pela elevação da concentração de CO_2 de 350 a 1000µMol.Mol é mais visível que a resposta pelo aumento da concentração de sacarose (FUJIWARA et al. 1995).

Aceita-se a hipótese de que a contribuição da fotossíntese para o ciclo completo do metabolismo do carbono de cultura de tecidos é limitado por causa da baixa intensidade luminosa e pelo esgotamento do CO_2 causado pelo fechamento do frasco.

Os baixos índices de sobrevivência e da taxa de crescimento de plantas no estágio de aclimatação, segundo KOZAI (1991a), estão relacionados com: a) baixa taxa fotossintética das plantas *in vitro*; b) ciclo autotrófico incompleto; c) alta taxa de transpiração combinada com uma fina parede cuticular, baixa resistência cuticular e funcionamento anormal dos estômatos; d) enraizamento incompleto; e) desordens fisiológicas como vitrificação e estiolamento.

2.3.3 Produção de Microtubérculos

A aplicação da técnica de cultura de tecidos para produção de microtubérculos de batata, em escala comercial, já é utilizada em diversos países, destacando-se a Europa Ocidental, Taiwan e nos Estados Unidos (WANG & HU, 1982, DONNELY et al.,2003). Nesses países, os laboratórios de produção de mudas de batata *in vitro* surgiram a partir de associações com produtores e viveiristas que tinham como objetivos a produção de mudas livre de doenças ou de acelerar os métodos convencionais de

propagação vegetativa. No Brasil a aplicação dessa técnica é relativamente recente e, são poucas as empresas que trabalham nessa área e ainda são poucos os laboratórios associados aos produtores, porém com tendência de crescimento (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Os benefícios da utilização de microtubérculos *in vitro* para a propagação estão relacionadas ao fato de serem obtidos em condições assépticas e por se poder produzir o ano todo em condições ambientais controladas. Após a quebra da dormência, podem ser transplantados diretamente para o campo, sem a necessidade de passar por processo de aclimatação e multiplicação em estufas, são conservados mais facilmente e proporcionam maior facilidade de transporte e planejamento (AKITA & TAKAYAMA, 1988; AKITA & OHTA, 1998).

Microtubérculos são tubérculos de pequeno tamanho, produzidos através de explantes de segmentos nodais ou ápices caulinares cultivados *in vitro* em meios de cultivo específicos (PRUSKI, 2003). A produção é feita em duas etapas (AKITA & OHTA, 1998; TAKAYAMA, 1991, HULSHER et al., 1996). A primeira delas consiste na multiplicação das estacas micropropagadas em meio MS líquido contendo 30g.l^{-1} de sacarose, sob imersão contínua e fotoperíodo de 16 horas. A segunda etapa consiste na adição de meio MS com 90 g.l^{-1} de sacarose, no escuro.

A adoção da produção de microtubérculos em frascos convencionais se restringe pela pequena quantidade de microtubérculos formados e pelo seu reduzido tamanho e vigor que limitam seu transplante para o campo (NHUT, 2006).

Segundo PIAO et. al.(2003), a produção de microtubérculos em biorreatores envolve duas etapas: a) Inoculação da planta matriz em meio de crescimento e multiplicação, composto por Meio MS, 3% sacarose, pH 5.8, imersão de 12 vezes ao dia e 60 min por vez, 25 ºC; 100 µmol.$m^{-2}s^{-1}$ PPFD, fotoperíodo de 16h; b) Transferência após quatro semanas, para o meio de indutor da tuberização, alterando a sacarose para 8%, com ou sem BAP (4,44 µM = 1,00 mg.L^{-1}), no escuro, colhendo após 8 semanas.

2.3.3.1 Tuberização *in vitro*

Para a indução à tuberização *in vitro* da batata diversos aspectos são relevantes, como fatores ambientais, físicos e químicos, dadas pela concentração de nitrogênio, potássio, sacarose, variação de fotoperíodo, intensidade luminosa, temperatura,

concentração de reguladores de crescimento endógenos e externos. (HUSSEY & STACEY, 1984; GOPAL, 1998; KERBAUY, 2004)

São três as etapas de tuberização *in vitro*: a) indução por fotoperíodo, sem modificações morfológicas; b) iniciação da tuberização, marcada pela parada do alongamento do estolão e alteração do plano de divisão celular na região subapical do estolho; c) divisões celulares e acúmulo de reservas. O tubérculo é um caule modificado, com nós, entrenós e um eixo muito curto e espessado, onde ocorre o acúmulo de amido nos plastídios especiais, os amiloplastos (CUTTER, 1992; FIGUEIREDO – RIBEIRO et al., 2006).

A tuberização *in vitro* é afetada por uma combinação de fatores, como o volume do meio de cultivo, a taxa de aeração do frasco de cultivo, o tempo de exposição dos explantes aos fatores indutivos, periodicidade de emergência dos explantes (quando em sistemas de biorreatores imersos), renovação de meio de cultivo (HUSSEY & STACEY, 1984; GARNER & BLAKE, 1989; HULSCHER et al. 1996 e GOPAL & MINOCHA,1998), onde a maior limitação para a produção de microtubérculos está na escolha de indutores de tuberização *in vitro* (DONELLY, 2003).

Os principais agentes de indução de microtuberização *in vitro* estão relacionados a fatores exógenos como a temperatura, fotoperíodo e luminosidade, além de fatores endógenos de ação hormonal (produzidos pelas folhas e translocados) e fontes de carboidratos como sacarose, frutose e lactose que podem induzir modificações morfofisiológicas, que resultariam em tuberização da planta (HUSSEY & STACEY, 1984; FORTI, 1991; EWING, 1995 e FIGUEIREDO – RIBEIRO et al., 2006).

2.3.3.2 Fonte de energia luminosa

Conforme COLEMAN & COLEMAN (2000), a indução à microtuberização é mais efetiva quando a planta é submetida ao fotoperíodo de 8h ao invés do escuro total, reduzindo-se assim o período de dormência dos microtubérculos. A concentração de sacarose também tem efeito sobre a dormência dos microtubérculos, quando se aumenta a concentração de sacarose, conservando o fotoperíodo de 8h luz, reduz-se a dormência.

Indução da microtuberização em dias curtos tem mais eficiência que a indução em condição de escuro completo, e nem sempre a indução por meio de mudança de fotoperíodo é eficaz. Noites longas são favorecedoras da indução à tuberização (planta

de dias curtos). Em fotoperíodo longo há um maior crescimento das porções aéreas, e maior número de estolões e ramificações, gerando assim um atraso na tuberização. Há necessidade da indução por estímulo, com a adição de altas concentrações de sacarose e citocininas (GARNER & BLAKE, 1989 e EWING, 1995).

A microtuberização pode ser mais rápida em condições de escuro, mas a porcentagem de gemas induzidas em relação à quantidade de microtubérculos produzidos é baixa. A presença de luz na microtuberização pode influenciar a formação dos olhos nos microtubérculos, assim como diminuir o período de dormência (DONNELLY et al. 2003).

Fotoperíodo longo causa atraso na tuberização *in vitro,* aumenta o crescimento da parte aérea, o número de estolões e a quantidade de ramificações. A indução pode estar relacionada a um estímulo produzido pelas folhas onde um grupo de folhas já expandidas pode ser a fonte de indução para um grupo de estolões. Estolões de idades diversas possuem diferentes níveis de sensibilidade aos hormônios, síntese de giberelinas em diferentes períodos e diferentes tempos de indução.(KERBAUY, 2004)

O estímulo produzido pelas folhas, que apresentam idades diversas e diferentes potenciais, resulta na síntese de giberelinas em diferentes períodos e acarreta diferentes tempos de indução de tuberizações. A folha que é o sítio receptivo, quando recebe um ou mais estímulos, são translocados para os locais de resposta (EWING, 1995).

2.3.3.3 Carboidratos no meio de cultivo

Culturas *in vitro* apresentam geralmente uma baixa taxa fotossintética, por isso precisam dispor de uma fonte de carboidratos, que geralmente é a sacarose e dependem da luz, que é fundamental para a morfogênese (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). A sacarose é a fonte de carboidrato mais utilizada, pois suporta maiores taxas de crescimentos na maioria das espécies (CALDAS et al.1998).

De acordo com DONELLY et al (2003), que cita diversos autores, o estímulo mais crítico se dá com a presença de sacarose no meio de cultivo, pois interfere na pressão osmótica, é a principal fonte de energia e em altas concentrações induz a formação de microtubérculos. Geralmente a indução ocorre com o aumento da concentração de sacarose de 2 a 3% para 8 a 9%, enquanto maiores aumentos não trazem efeito na indução à microtuberização (KHURI & MOORBY, 1995).

O crescimento dos tubérculos segundo YU et al. (2000), se dá com a disponibilidade de sacarose no meio de cultura, e a sacarose contida no meio nutritivo é hidrolisado rapidamente em glucose e frutose, dificultando a desempenho da multiplicação *in vitro*.

Fatores predisponentes a uma tuberização mais eficiente segundo (XU et al., 1998), compreendem: a) aumento da relação C/N; b) aumento da concentração de sacarose no meio de cultivo para concentração superior a 2%; c) concentração de sacarose a 8% produzem tubérculos maiores, onde a sacarose regula a formação de tubérculos influenciando o nível de giberelina endógeno.

2.3.3.4 Relação Carbono - Nitrogênio

A batata tuberiza em condições de elevada relação C/N, o que justifica a adição de agentes reguladores de crescimento para essa indução (DONELLY et al.,2003).

O aumento do fornecimento de nitrogênio favorece o crescimento das ramas, inibindo a tuberização num sistema competitivo de relações fonte-dreno. A adição de citocinina no meio de cultivo, inibe o crescimento das ramas e estimula o desenvolvimento de estolões. Em contrapartida, o fornecimento de nitrogênio pode suprir a ausência de estímulo por fotoperíodo abaixo do crítico (KRAUSS, 1985 e EWING, 1995).

2.3.3.5 Temperatura

Em cultura de tecidos, a temperatura utilizada em câmaras de crescimento varia de acordo com as espécies cultivadas, sendo que na cultura *in vitro* da batata, a temperatura é em torno de 25ºC e para a indução da microtuberização, a temperatura recomendada por autores citados por DONELLY et al (2003) varia de 15-18ºC, que pode interferir na disponibilidade de sacarose e agentes reguladores de crescimento como auxinas e citocininas endógenas.

Temperatura e fotoperíodo são variáveis de acordo com cada cultivar, mas de modo geral, temperaturas altas durante o dia, aumenta a taxa fotossintética e a diminuição da temperatura, induz o começo da translocação de solutos produzidos. A amplitude térmica desempenha papel fundamentaç nesse processo (EWING, 1995).

A batata necessita de temperaturas em torno de 17º C para tuberizar. Sendo que a interação temperatura e fotoperíodo são dependentes da irradiância sob a qual a planta está crescendo. Altas temperaturas favorecem a produção de giberelinas nas gemas em maior proporção que nas folhas, inibindo a tuberização (EWING, 1995).

2.3.3.6 Reguladores de crescimento para a indução de tuberização

As giberelinas estão relacionadas com a multiplicação celular e o elongamento dos estolões. Redução da concentração de giberelina na planta dá início ao processo de indução da tuberização. As giberelinas têm correlação negativa com concentração de sacarose. A giberelina é um regulador dominante em relação a formação de tubérculos, que age interagindo com o ABA (XU et al., 1998).

Citocininas exógenas não afetam o elongamento de estolões e a formação de tubérculos. BAP induz a formação de grande número de brotos e alta taxa de multiplicação em sistemas de micropropagação (CALDAS et al., 1998). As citocininas são responsáveis pelo estímulo das divisões celulares, que é a primeira alteração morfo-fisiológica da tuberização (KERBAUY, 2004).

De acordo com COLEMAN & COLEMAN (2000), o uso de retardadores do crescimento no meio de cultivo, como a 6-benzilaminopurina (BAP) e o cycocel (CCC), tem a capacidade de acelerar a microtuberização, e diminuir o tempo de dormência.

De acordo com GOPAL et al.(1998) há um aumento na quantidade e peso dos microtubérculos obtidos a partir do cultivo com BAP sob condições de baixa temperatura e fotoperíodo curto.

2.3.4 Vitrificação

A vitrificação se caracteriza por mudanças morfo-fisiológicas relacionadas com o acúmulo de água intercelular nos tecidos, e que resulta de diferentes condições de estresse (SAHER, et al.,2005) como: a) alterações nos meios de cultivo; b) utilização do meio líquido (alta umidade relativa interna do frasco de cultivo); c) altas concentrações de NH_4, sacarose e BAP (ZIV, 1991); d) altas concentrações de sais; e) desbalanço de nutrientes; f) concentrações inadequadas de hormônios e reguladores de crescimento vegetal.

As desordens fisiológicas são manifestadas principalmente nas folhas, afetando a maior parte dos processos metabólicos destes locais, como a fotossíntese e a troca gasosa (DEBERGH et al.,1981 e DEBERGH et al., 1992). Os principais sintomas visuais são o espessamento de caule e folhas que se tornam quebradiças, deformadas e com aparente oleosidade. Associados a esses sintomas, pode ocorrer necrose em ápices meristemáticos e folhas, desenvolvimento de calos e em casos extremos a morte do tecido (DEBERGH et al.,1981; CASSELLS et al., 2003).

Plantas vitrificadas podem apresentar perda de funções estomáticas, cutículas finas e baixa competência fotossintética, resultando em perdas na aclimatação de mudas micropropagadas (CASSELLS et al., 2003).

A vitrificação está associada com elevadas taxas de crescimento dos explantes e baixa absorção de cálcio. Esse efeito é compensado pelo favorecimento de trocas gasosas no frasco, que permitem a transpiração dos explantes, de forma a promover o pleno funcionamento dos estômatos e o movimento de auxinas, que regulam a absorção de cálcio pelos explantes (JACKSON, 2003; CASSELLS et al., 2003).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Todo o trabalho de desenvolvimento dos protótipos biorreatores, adequação do cultivo de batata nesses sistemas, o cultivo de plantas *in vitro*, assim como os experimentos, foi conduzido na Unidade de Propagação *in vitro* do Setor de Raízes e Tubérculos, do Centro de Horticultura do Instituto Agronômico de Campinas, no período de março de 2005 a dezembro de 2006.

A experimentação foi realizada em duas etapas, sendo a primeira destinada a adequação dos explantes em meio líquido e ao desenvolvimento dos sistemas biorreatores (Experimentos preliminares) e a segunda para a condução dos experimentos que compõem este trabalho.

3.1 Material Vegetativo

Os ápices e segmentos nodais utilizados nos experimentos foram retirados de brotos formados em tubérculos das variedades Agata e Cupido, com esterilização de superfície por lavagem em água corrente, imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1% por dez minutos e tríplice enxágue com água estéril em câmara de isolamento.

Utilizou-se o meio MS modificado com pantotenato de cálcio (2 $mg.L^{-1}$), glicina (2 $mg.L^{-1}$), sacarose (30 $g.L^{-1}$) e ágar (5,8 $g.L^{-1}$), sem adição de fitormônios, pH ajustado a 5,8 e autoclavado por 20 minutos. Os explantes foram mantidos em câmara de crescimento, sob fotoperíodo de 16 horas e temperatura média de 25 ºC.

Na segunda etapa de experimentação utilizou-se a variedade Agata. Nessa ocasião, devido à indisponibilidade de matrizes próprias do IAC, foram repicadas mudas matrizes cedidas pela empresa Agrícola Wehrman, até a obtenção da quantidade de explantes necessária para a implantação dos experimentos.

3.2 Experimentos da etapa preliminar

Foram realizados uma série de experimentos experimentos exploratórios para a verificação da viabilidade do cultivo de mudas e microtubérculos *in vitro* de batata em sistemas biorreatores.

O primeiro grupo de experimentos teve como objetivo avaliar os tipos de explante (ápices caulinares e segmentos nodais com uma ou duas gemas), sua adaptação e desenvolvimento no cultivo em meio líquido. O segundo grupo de experimentos destinou-se a desenvolver e avaliar a eficiência de protótipos biorreatores de imersão temporária.

3.2.1 Avaliação de tipos de explantes e indução à tuberização em meio líquido e meio sólido

As principais conclusões e recomendações deste primeiro grupo de experimentos direcionaram os futuros experimentos para adotarem os seguintes procedimentos: a) utilização de explantes formados por ápices caulinares e segmentos nodais contendo duas gemas; b) uso de algodão hidrófílo para a sustentação dos explantes; c) posicionar os explantes com as gemas voltadas para cima; d) o nível de solução nutritiva deve ser o suficiente para o molhamento do substrato; e) evitar o turbilhonamento da solução nutritiva para que não haja a movimentação dos explantes; f) o turno de molhamento dos explantes depende da evapotranspiração das mudas *in vitro*, mas não deve ser superior a uma semana, para evitar deficiência de nutrientes; g) a temperatura da câmara

de crescimento não deve ultrapassar a 25 ºC (±3). Os principais resultados e conclusões desse grupo de experimentos são apresentados no Anexo I.

3.2.2 Desenvolvimento e avaliação dos sistemas bioreatores

Após a verificação da adaptabilidade dos explantes no cultivo em meio líquido, e escolhido o tipo de explante a ser utilizado, a etapa seguinte foi o desenvolvimento, a avaliação e a adaptação dos biorreatores. Para isso os protótipos de biorreatores foram desenvolvidos e otimizados a partir daqueles descritos e idealizados por AKITA & TAKAYAMA (1988), HALE et al (1992), HULSHER et al (1996), TEIXEIRA (2002), CID et al (2002), HVOSLEF-EIDE et al (2003), NHUT (2003), PIAO et al (2003) e RODRIGUES et al (2006).

Descreve-se no Anexo II os protótipos desenvolvidos para estes experimentos. Dentre os quatro protótipos desenvolvidos, três deles foram considerados aptos à rotina de produção de mudas micropropagadas de batata em escala industrial. O Protótipo IV foi escolhido para uso nos experimentos da segunda fase deste trabalho devido à facilidade de manuseio e de aplicação dos tratamentos.

O Protótipo IV utiliza um par de potes plásticos PET com 2900 ml e 1000 ml, bicos nebulizadores com filtro milipore de 0,22 µm em seu interior, conectores de irrigação e tubos de silicone de 6mm de diâmetro, conforme esquema da Figura 3. A rega e drenagem é feita por gravidade, com a inversão dos frascos.

O sistema biorreator foi esterilizado com hipoclorito de sódio a 0,01% por contato, durante 72 horas, e enxaguados por três vezes em câmara de fluxo com água destilada autoclavada. O enxágüe foi realizado através da circulação de água destilada autoclavada nos sistemas.

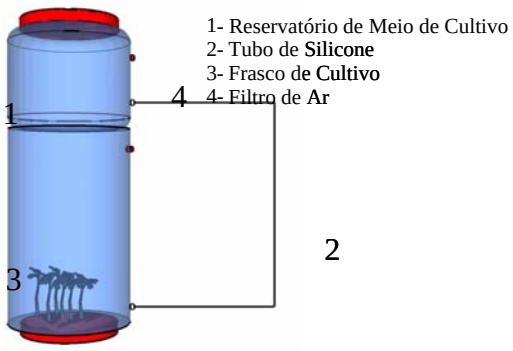


Figura 3. Biorreator de imersão temporária por gravidade

3.3 Experimentos da etapa final

Foram instalados dois experimentos inteiramente casualizados em arranjo fatorial fracionado 1/5 x 5^3, com duas repetições, para avaliar a formação *in vitro* de mudas de batata e a produção de microtubérculos.

O cultivo foi feito em meio MS líquido, utilizando como fatores as concentrações de sacarose, BAP e nitrogênio. A variação das doses de nitrogênio limitou-se apenas à mudança na concentração de NH_4NO_3. As parcelas foram formadas por um conjunto biorreator do Protótipo IV, contendo 10 ápices caulinares num experimento e 10 segmentos com duas gemas axilares no outro.

A formação do fatorial fracionado adotou o conjunto básico de 25 tratamentos (do tipo I-III-V) conforme descrito por CONAGIN & JORGE (1977). O teor de sacarose variou de 0 a 80 $g.L^{-1}$, o nitrato de amônio variou de 0 a 3220 $mg.L^{-1}$ e o de BAP variou de 0,0 a 10,0 $mg.L^{-1}$, conforme a Tabela 1.

Tabela 1 Tratamentos do delineamento fatorial fracionado 1/5 x 5^3 com as dosagens aplicadas por litro de meio.

Tratamento do Fatorial Fracionado	Quantidade para 1L de Meio		
	Sacarose	NH_4NO_3	BAP
	g	mg	mg
111	0	0	0,0
125	0	805	10,0
134	0	1610	7,5
143	0	2415	5,0
152	0	3220	2,5
213	20	0	5,0
222	20	805	2,5
231	20	1610	0,0
245	20	2415	10,0
254	20	3220	7,5
315	40	0	10,0
324	40	805	7,5
333	40	1610	5,0
342	40	2415	2,5
351	40	3220	0,0
412	60	0	2,5
421	60	805	0,0
435	60	1610	10,0
444	60	2415	7,5
453	60	3220	5,0
514	80	0	7,5
523	80	805	5,0
532	80	1610	2,5
541	80	2415	0,0
555	80	3220	10,0

Utilizou-se para cultivo o meio MS acrescido de 2 $mg.L^{-1}$ de pantotenato de cálcio e 2 $mg.L^{-1}$ de glicina. Cada biorreator recebeu 500 ml desse meio, como o pH ajustado para 5,8 e autoclavados a 121 ºC por 20 min.

Os explantes foram plaqueados no biorreator IV, em câmara de fluxo laminar de ar estéril, vertendo logo após o meio líquido no frasco reservatório. O plaqueamento foi realizado sobre algodão hidrófilo, na posição correta para a manutenção da polaridade, visando sua sustentação e manutenção do contato com o meio, sem que este fique inteiramente mergulhado na solução nutritiva.

A primeira rega dos explantes foi realizada logo após o plaqueamento, elevando o reservatório de solução acima do frasco de cultivo, promovendo-se em seguida a drenagem. As demais regas tiveram intervalo semanal.

Realizaram-se avaliações aos 4, 10, 17, 24 e 32 DAP, quando foram verificados o desenvolvimento (variável DES), que foi a contagem de gemas de ápices e segmentos caulinares em desenvolvimento (brotação de desenvolvimento de gemas axilares e de ápices caulinares); o enraizamento (variável ENR), a contagem dos explantes que apresentaram enraizamento; foram dadas notas individuais para a qualidade do enraizamento (variável NTR) e para a ocorrência de vitrificação (variável NTV). Atribuiu-se notas de 1 a 8 para a qualidade do enraizamento (NTR), conforme critérios descritos no Quadro 1. Atribuiu-se também notas que variaram de 1 a 8 para a ocorrência de vitrificação (NTV), cujos critérios encontram-se descritos no Quadro 2.

3.3.1 Análise dos resultados

Os dados foram tabulados em MS-Excell e a análise estatística realizada com o auxílio do programa SAS v8.0. Utilizou-se o procedimento GLM (General Linear Model) com soma de quadrados do tipo I para a análise da variância e o procedimento REG (Regression) com a diretiva MAXR (Máximo Coeficiente de Determinação) para a análise da regressão polinomial múltipla (Anexo III e Anexo IV).

As superfícies de resposta foram geradas pela transcrição da função-resposta obtida pelo SAS para o programa Mathcad v.13. O ajuste das médias de avaliações sucessivas a uma função contínua foi realizado com o programa Curve Expert v.1.3.

Procurou-se ajustar funções características do comportamento de cada uma das variáveis estudadas, realizando assim um ajuste “dentro de tratamentos”, agrupando

todas as datas de avaliações. Esse tipo de ajuste propicia uma melhor distribuição do erro experimental e permite substituir as médias observadas de cada tratamento por suas respectivas médias ajustadas. Uma vantagem adicional seria permitir a avaliação dos resultados em qualquer data dentro do intervalo estudado no experimento.

Nota	Critério
1	Ausência de raízes de modo geral;
2	Inicio de enraizamento (circunferência basal inferior a 0,2 cm) e ausência de raízes aéreas;
3	Enraizamento com circunferência basal entre 0,2 - 0,5 cm e ausência de raízes aéreas;
4	Enraizamento com circunferência basal entre 0,5 – 1,0 cm e ausência de raízes aéreas;
5	Enraizamento com circunferência basal entre 1,0 – 1,5 cm e ausência de raízes aéreas;
6	Enraizamento com circunferência basal maior que 1,5 -2,0 cm e relação entre raízes normais e aéreas menor que 1:3;
7	Enraizamento com circunferência basal maior que 2,0 e relação entre raízes normais e aéreas de 1:2;
8	Normal, ocupando a base do frasco e relação entre raízes normais e aéreas de 3:4;

Quadro 1. Descrição da escala de notas para NTR

Nota	Critério
1	Tamanho de folhas variáveis com ausência de vitrificação e caules sem intumescimento;
2	Tamanho de folhas variáveis com ausência de vitrificação e caules pouco intumescidos;
3	Tamanho de folhas variáveis com ausência de vitrificação caules intumescidos;
4	Tamanho de folhas variáveis com início aparente de vitrificação, caules intumescidos;
5	Tamanho de folhas variáveis com aparência de vitrificação, caules intumescidos;
6	Tamanho de folhas variáveis com muita aparência de vitrificação e caules intumescidos;
7	Tamanho de folhas variáveis com muita aparência de vitrificação e caules muito intumescidos;
8	Tamanho de folhas variáveis com muita aparência de vitrificação e caules muito intumescidos e inicio de desenvolvimento de calos.

Quadro 2 Descrição da escala de notas para NTV

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Multiplicação de mudas e microtuberização *in vitro*

O ajuste dentro de tratamentos indicou, frequentemente, funções cujo sentido biológico inexiste (polionômios de terceiro grau) e em diversos outros casos não ocorreu significância do ajuste a qualquer função. Conseqüentemente, o uso dessa ferramenta ficou prejudicado, restando como alternativa a discussão dos resultados da análise da variância e da regressão polinomial múltipla em uma única data característica, aos 24 DAP (quarta avaliação).

Nas tabelas 2 até 9 são apresentados os resumos das análises da variância das variáveis DES, ENR, NTR e NTV, para o cultivo de segmentos e de ápices nas cinco datas de avaliação.

As discussões dos dados que serão apresentados em seguida correspondem à quarta avaliação, realizada aos 24 DAP, em que são também apresentadas as superfícies de resposta e suas respectivas projeções e os valores estimados dessas mesmas variáveis.

4.1.1 Formação de Mudas *in vitro* de Batata

Essa primeira parte da discussão compreende os resultados obtidos das variáveis DES, ENR, NTR e NTV de acordo com os níveis de Nit, BAP e Sac, relacionados com a formação de mudas *in vitro* de batata nos sistemas BIT.

4.1.1.1 Desenvolvimento de Explantes de Ápices Caulinares.

A análise da variável DES no cultivo de ápices caulinares, apresentou na análise da variância (Tabela 2) um modelo (regressão linear) altamente significativo, com F = 0,006, elevado coeficiente de determinação, com R^2 = 0,727 e média igual a 8,16 para um coeficiente de variação de 51%. Esses valores podem ser considerados como perfeitamente adequados para esse tipo de análise, ressaltando ainda que o valor

aparentemente elevado do coeficiente de variação corresponde à amplitude de respostas aos níveis dos tratamentos

A análise da regressão polinomial múltipla apresentou uma equação de resposta altamente significativa no *step* (passo) de número quatro, indicando quatro parâmetros (BAP, SacNit, BAP^2 *e* Sac^2Nit^2) significativos além do termo independente.

As superfícies de resposta e as suas respectivas projeções encontram-se na Figura 4. São apresentados cinco gráficos contendo a projeção no plano horizontal das interações entre os fatores Nit e BAP, com suas respectivas isolinhas. Cada gráfico corresponde a um dos cinco níveis de Sac. Ao lado de cada gráfico são apresentadas as estimativas de DES para cada cruzamento dos níveis de Nit e de BAP, de modo a facilitar a visualização dos resultados. Essa forma de apresentação repete-se ao longo deste trabalho.

O maior valor estimado para DES foi igual a 18,956 ápices desenvolvidos, atingido com Sac igual a 3,65, Nit igual a 3,65 e BAP igual a 1. Estabelecendo-se um intervalo de confiança ao nível de 10%, estima-se o valor crítico de 17,06 ápices desenvolvidos, que podem ser alcançados com várias combinações de Nit e Sac, como Sac2-Nit5, Sac3-Nit3, Sac3-Nit4, Sac3-Nit5, Sac4-Nit3, Sac4-Nit4, Sac4-Nit5, Sac5-Nit2, Sac5-Nit3 e Sac5-Nit4. Quaisquer dessas combinações podem levar à região de máximo desenvolvimento dos ápices.

O efeito médio de BAP, considerando-se o conjunto das interações dos outros dois fatores, foi decrescente, variando de 15,0 em B1 até 4,8 em B4, expressando o efeito negativo do acréscimo de BAP ao meio de cultivo.

O efeito médio de Sac, considerando o conjunto das interações dos outros dois fatores, foi crescente, com ponto de máxima igual a 9,89 para Sac igual a 3,99.

O efeito médio de Nit, considerando sempre o conjunto das interações dos outros dois fatores, foi crescente, com ponto de máxima igual a 9,89 para Sac igual a 3,99.

Percebe-se pelos parâmetros da equação que os efeitos de BAP linear e quadrático são independentes de Sac e de Nit, daí as estimativas coincidentes para os efeitos médios de Nit e de Sac. Observa-se também que a resultante de BAP linear e quadrático é sempre negativa, contribuindo unicamente para a redução da resposta so desenvolvimento dos ápices.

4.1.1.2 Enraizamento de Explantes de Ápices Caulinares.

A análise da variável ENR no cultivo de ápices caulinares, apresentou na análise da variância (Tabela 3) um modelo altamente significativo, com F = <0,0001, elevado coeficiente de determinação, com R^2 = 0,835 e média igual a 1,84 para um coeficiente de variação de 104%. A média do experimento demonstra que o número de explantes perfeitamente enraizados foi pequeno até os 24 DAP mas conforme será mostrado a seguir, algumas combinações de tratamentos foram mais eficientes nesse aspecto.

A análise da regressão mostrou-se altamente significativa (F<0,0001) e elevado coeficiente de determinação (0,821), levando a uma equação composta por cinco parâmetros (SacNit, NitBAP, SacNitBAP, $NitSac^2$ e $SacNitBAP^2$).

O efeito médio de BAP, na média das interações de Sac e Nit, foi decrescente, com máximo igual a 6,6 na dose 1 e próximo a zero nas doses 3,4 e 5. Esse resultado indica o efeito de inibição do enraizamento pelo BAP.

O efeito médio de Nit ajustou-se a uma função linear, com máximo igual a 3,0 na dose 5. Esses resultados indicam que o acréscimo de Nit pode contrapor ao menos em parte o efeito depressivo do BAP.

O efeito médio de Sac ajustou-se a uma função quadrática com máximo no nível 3,41 valor próximo ao da concentração de sacarose utilizada no protocolo de cultivo em meio gelificado.

O ponto de máxima foi igual a 13,126 ápices caulinar enraizados, correspondente às doses Sac-Nit-BAP iguais a 4,23-5-1. Considerando-se o intervalo de 10% desse máximo, identificou-se como mais eficientes as combinações dos seguintes níveis dos fatores Nit e Sac, na dose zero de BAP: Sac3-Nit5, Sac4-Nit5 e Sac5-Nit5 (Figura 5).

4.1.1.3 Notas do Enraizamento de Explantes de Ápices Caulinares.

A análise da variância (Tabela 4) das notas de enraizamento de ápices caulinares apresentou modelo altamente significativo (F = 0,001) aos 24 DAP, com média igual a 1,92 em uma escala que variou de 1 a 8. O coeficiente de variação de 62,4% indica uma grande amplitude das médias e a possibilidade de identificar os tratamentos superiores.

A análise da regressão levou ao *step* seis a uma equação com cinco parâmetros (BAP, SacNit, BAP^2, SacNitBAP e $SacNitBAP^2$), altamente significativa ($F < 0,0001$) e com coeficiente de determinação igual a 77,5%, cujas superfícies de resposta encontram-se na Figura 6.

O efeito médio de Sac mostrou-se crescente, ajustando-se a uma reta com máxima observada em Sac5, com nota 2,2.

O efeito médio de BAP mostrou influência negativa sobre a qualidade do enraizamento, enquanto o ponto de máxima, igual a 4,8 foi alcançado na dose BAP1, ou seja, na ausência de BAP. O efeito mais depressivo se deu nos níveis BAP4 e BAP5, inferiores a 1,0.

O efeito médio de Nit ajustou-se a uma função sigmoidal (crescente) com máxima igual a 2,2 nos níveis Nit4 e Nit5.

O ponto mais elevado da superfície de resposta foi igual a 8,3 e foi alcançado no tratamento Sac5Nit5BAP1. A presença de BAP foi sempre prejudicial à qualidade do enraizamento. As respostas de Nit e de Sac foram crescentes, obedecendo cada qual a uma função linear. Considerando o nível de 10% da resposta máxima, seleciona-se além da combinação Sac5-Nit5, os tratamentos Sac4-Nit5 e Sac5-Nit4, ambos com resposta igual a 7,4.

4.1.1.4 Notas de Vitrificação de Explantes de Ápices Caulinares.

O resumo da análise da variância da variável NVR (Nota de vitrificação) nas cinco datas de avaliação é apresentado na Tabela 5. Observa-se elevada significância do modelo ($F = 0,028$) e coeficiente de variação ($CV = 42,9\%$), para uma média igual a 3,40 (em uma escala que variou de 1 a 8).

A análise da regressão polinomial múltipla revelou no *step* sete um coeficiente de determinação (R^2) igual a 57,0%, considerado adequado para fins de ajuste. As significâncias encontradas são listadas na Tabela 5. Selecionou-se uma equação de resposta com quatro parâmetros (Nit^2, $NitSac^2$, SacNitBAP e $SacNitBAP^2$) cujas superfícies de resposta são apresentadas na Figura 7.

O ponto mais elevado das superfícies de resposta, igual a 7,8 foi observado com Nit e Sac iguais a 5 e BAP na dose 3,335. Doses mais elevadas de BAP originaram calos, diminuindo consequentemente a vitrificação.

Considerou-se que a nota 3,0 corresponde a um nível aceitável de vitrificação, no qual os explantes conseguem retomar o desenvolvimento sem a formação de calos. Esses valores foram observados em todas as combinações das doses de BAP1, nas combinações de BAP2, BAP3, BAP4 e BAP5 associadas com Sac1, independentemente do nível de Nit e nas combinações de BAP5 com Nit1 independente das doses de Sac.

4.1.1.5 Desenvolvimento de Explantes de Segmentos Nodais.

As análises da variância da variável DES são apresentadas na Tabela 6, onde se observa efeito significativo do modelo (F = 0,027) e média de 8,36 explantes desenvolvidos, com coeficiente de variação igual a 68,1%. A média obtida é muito próxima daquela alcançada com o cultivo de ápices.

A análise da regressão mostrou no step seis, um modelo altamente significativo (F < 0,0001), formado por quatro parâmetros (BAP, BAP^2, SacNit e Sac^2Nit^2) com as correspondentes superfícies de resposta apresentadas na Figura 8. Pela equação, percebe-se que o fator BAP não interage com os outros dois e que este apresentou efeito depressivo ao desenvolvimento dos explantes.

O ponto de maior resposta foi igual a 20,78 segmentos nodais desenvolvidos, quando Sac = 4,68; Nit = 4,67; BAP =1. Considerando-se o intervalo de 10% desse máximo, identificou-se o valor de 18,70 e selecionou-se as seguintes combinações de tratamentos como os mais responsivos, todos eles situados no nível BAP1: (Nit2-Sac5, Nit3-Sac3, Nit3-Sac4, Nit3-Sac5, Nit4-Sac3, Nit4-Sac4 e Nit5-Sac3).

4.1.1.6 Enraizamento de Explantes de Segmentos Nodais.

A análise da variância da variável ENR cultivada por segmentos mostrou-se significativa ao nível de 18,7%, média igual a 2,20 e elevado coeficiente de variação (180%). Os valores obtidos na avaliação aos 24 DAP foram considerados como representantes de uma fase de transição, onde os explantes têm uma retomada do desenvolvimento e do enraizamento, daí a variação observada (Tabela 7).

Porém, não houve impedimento para a realização da análise da regressão, que mostrou no step quatro uma equação com quatro parâmetros (Sac, BAP, Sac^2 e BAP^2) e coeficiente de determinação igual a 41% (Tabela 7 e Figura 9).

Obteve-se para ENR de segmentos uma equação composta por quatro parâmetros (Sac, BAP, Sac^2 e BAP^2) , independente portanto do fator Nit.

O ponto de máximo foi igual a 7,84 foi alcançado com Sac = 3,67 e BAP = 1. Considerando o intervalo de 10% para o máximo, identificou-se os tratamentos a partir de Sac = 2,20 e até 3,67 como os mais eficientes para o enraizamento.

Nota-se que a adição de BAP foi sempre prejudicial ao enraizamento, o que restringiu os estudos à variação das doses de sacarose dentro do nível 1 de BAP.

4.1.1.7 Nota de Enraizamento de Explantes de Segmentos Nodais.

A análise da variância para as notas de qualidade do enraizamento apresentou modelo altamente significativo (F = 0,003) média de 1,88 e coeficiente de variação igual a 60,7%. A média alcançada é próxima daquela obtida com o cultivo de ápices caulinares (1,92), conforme mostra a Tabela 8.

A análise da regressão mostrou no step seis um modelo altamente significativo (F<0,0001), coeficiente de determinação igual a 77,5% e cinco parâmetros significativos (BAP, SacNit, BAP^2, SacNitBAP e $SacNitBAP^2$). O ponto de máxima igual a 7,9 obtida na combinação de fatores Nit-Sac-BAP igual a 5-5-1 (Figura 10).

Os fatores Nit e Sac ajustaram-se a uma função linear, sugerindo que doses mais elevadas poderiam conduzir a notas ainda mais favoráveis.

4.1.1.8 Nota de Vitrificação de Explantes de Segmentos Nodais.

A Tabela 9 contém um resumo das análises da variância para a nota de vitrificação. Aos 24 DAP obteve-se um modelo significativo ao nível de 3,84%, com média de 3,36 e coeficiente de variação igual a 45,0%. A exemplo das variáveis anteriormente estudadas, a média obtida com o cultivo de segmentos mostrou-se próxima daquela resultante do cultivo de ápices (3,40).

A regressão mostrou no step três, coeficiente de determinação de 44,8% e uma equação composta por três parâmetros (SacNit, SacNitBAP e $SacNitBAP^2$), com máxima de 8,53 obtida quando Sac igual a 5; Nit igual a 5 e BAP igual a 3,27.

A região de máxima vitrificação, situada a 10% do máximo, corresponde a médias superiores a 7,68 e compreende os tratamentos Sac e Nit no nível 5 e níveis de BAP superiores a 2,45 (Figura 11).

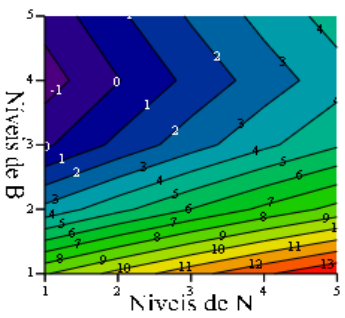
A exemplo do cultivo de ápices caulinares, foi estabelecido como favoráveis as combinações de tratamento que produziram notas de vitrificação inferiores a 3,0. Esses resultados são alcançados em todas as combinações de Nit e Sac com ausência de BAP e pelas combinações de Nit1 com Sac3, Sac4 e Sac5 quando BAP é igual a 2, 3, 4 e 5.

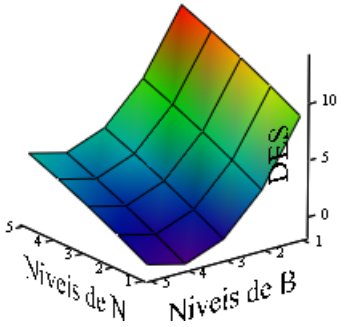
Os tratamentos mais indicados seriam portanto combinações das doses Nit e de Sac, na ausência de BAP. Caso seja interessante por algum motivo acrescentar BAP ao meio de cultivo, deve-se tomar o cuidado de adotar baixos níveis de Nit combinados com doses médias de sacarose para evitar a vitrificação.

Tabela 2 Resumo da análise da variância e da análise da regressão da variável DES, para o cultivo de ápices.

	Avaliação 1	Avaliação 2	Avaliação 3	Avaliação 4	Avaliação 5
GLM					
Significância do modelo	0,087	0,385	0,038	0,006	0,001
Coef.de Determinação	0,567	0,410	0,626	0,727	0,807
Coef. de Variação	51,1	9,8	33,0	51,0	50,5
Média	6,32	9,72	9,28	8,16	8,52
Fonte de Variação (F)					
S	-	0,05510	0,01890	0,05570	0,04640
B	0,07920	-	0,03570	0,00040	<0,0001
N	0,10020	-	-	0,11650	-
SB^2	0,04380	-	-	-	-
S^2	0,02550	0,09920	0,00760	0,01550	0,00260
B^2	-	-	-	0,08580	0,04190
REG					
STEP	6	7	6	4	10
Coef. de Determinação	0,511	0,451	0,630	0,666	0,888
Significâncias (F)					
Modelo	0,005	0,064	0,001	0,0001	<0,0001
Interseção	0,001	<0,0001	0,226	0,00210	0,15270
S	-	0,0740	0,001	-	-
B	0,006	-	0,0052	0,00770	-
SN	-	0,4138	-	0,00310	<0,0001
NB	-	-	0,1281	-	<0,0001
SN^2	-	-	-	-	0,00610
SB^2	-	0,3739	-	-	-
NS^2	0,016	-	-	-	<0,0001
NB^2	-	-	0,0627	-	-
SNB	0,002	-	-	-	0,07550
B^2	-	-	-	0,04030	-
S^2	-	0,0325	0,0017	-	-
SN^2B^2	0,015	-	-	-	-
N^2B^2	-	-	-	-	0,00020
S^2N^2	-	-	-	0,01190	-
S^2B^2	-	0,3897	-	-	-
SBN^2	-	0,3853	-	-	-
Coef. da Equação					
Interceção	7,759	9,088	4,110	15,150	3,169
S	-	1,332	8,152	-	-
B	-2,178	-	-2,166	-8,852	-
SN	-	-0,073	-	1,584	5,897
NB	-	-	-0,543	-	-2,392
SB^2	-	-0,022	-	-	-
SN^2	-	-	-	-	-0,280
NS^2	-0,116	-	-	-	-0,700
NB^2	-	-	0,155	-	-
SBN^2	-	0,004	-	-	-
SNB	0,474	-	-	-	-0,149
B^2	-	-	-	1,079	-
S^2	-	-0,276	-1,184	-	-
SN^2B^2	-0,103	-	-	-	-
N^2B^2	-	-	-	-	0,084
S^2N^2	-	-	-	-0,054	-
S^2B^2	-	0,006	-	-	-

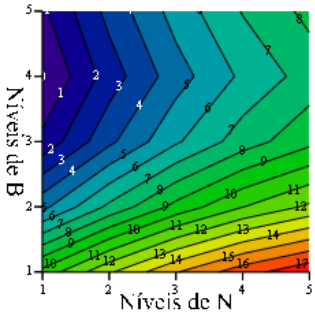
A)

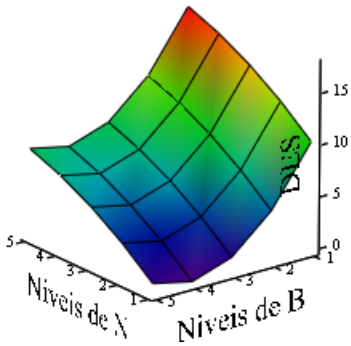




$$y1^T = \begin{pmatrix} 8.90567 & 10.32695 & 11.63993 & 12.84461 & 13.94099 \\ 3.28942 & 4.7107 & 6.02368 & 7.22836 & 8.32474 \\ -0.16937 & 1.25191 & 2.56489 & 3.76957 & 4.86595 \\ -1.4707 & -0.04942 & 1.26356 & 2.46824 & 3.56462 \\ -0.61457 & 0.80671 & 2.11969 & 3.32437 & 4.42075 \end{pmatrix}$$

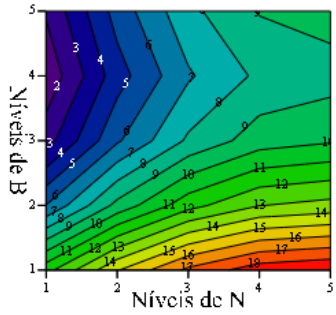
B)

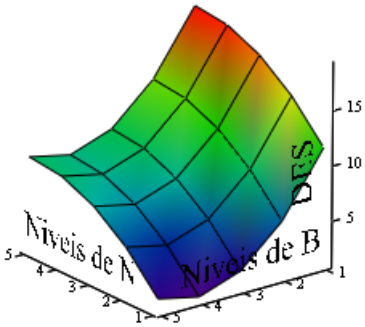




$$y2^T = \begin{pmatrix} 10.32695 & 12.84461 & 14.92907 & 16.58033 & 17.79839 \\ 4.7107 & 7.22836 & 9.31282 & 10.96408 & 12.18214 \\ 1.25191 & 3.76957 & 5.85403 & 7.50529 & 8.72335 \\ -0.04942 & 2.46824 & 4.5527 & 6.20396 & 7.42202 \\ 0.80671 & 3.32437 & 5.40883 & 7.06009 & 8.27815 \end{pmatrix}$$

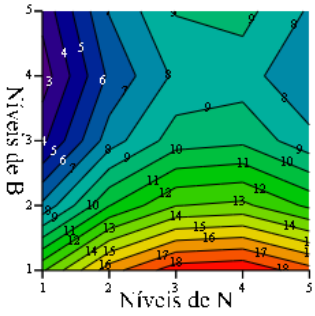
C)

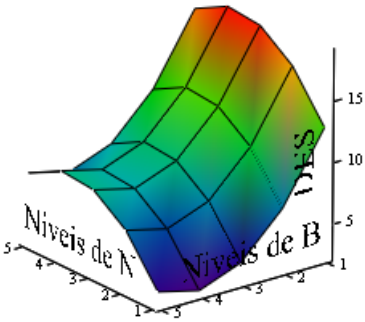




$$y3^T = \begin{pmatrix} 11.63993 & 14.92907 & 17.24351 & 18.58325 & 18.94829 \\ 6.02368 & 9.31282 & 11.62726 & 12.967 & 13.33204 \\ 2.56489 & 5.85403 & 8.16847 & 9.50821 & 9.87325 \\ 1.26356 & 4.5527 & 6.86714 & 8.20688 & 8.57192 \\ 2.11969 & 5.40883 & 7.72327 & 9.06301 & 9.42805 \end{pmatrix}$$

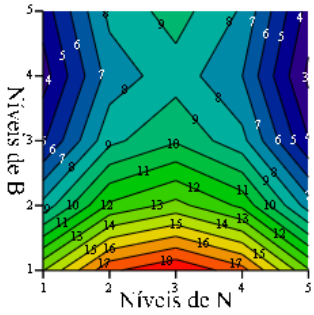
D)

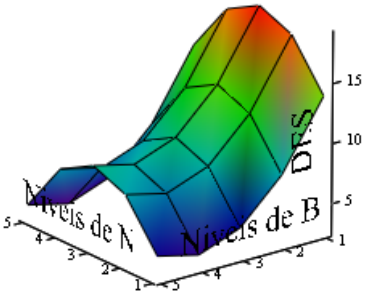




$$y4^T = \begin{pmatrix} 12.84461 & 16.58033 & 18.58325 & 18.85337 & 17.39069 \\ 7.22836 & 10.96408 & 12.967 & 13.23712 & 11.77444 \\ 3.76957 & 7.50529 & 9.50821 & 9.77833 & 8.31565 \\ 2.46824 & 6.20396 & 8.20688 & 8.477 & 7.01432 \\ 3.32437 & 7.06009 & 9.06301 & 9.33313 & 7.87045 \end{pmatrix}$$

E)





$$y5^T = \begin{pmatrix} 13.94099 & 17.79839 & 18.94829 & 17.39069 & 13.12559 \\ 8.32474 & 12.18214 & 13.33204 & 11.77444 & 7.50934 \\ 4.86595 & 8.72335 & 9.87325 & 8.31565 & 4.05055 \\ 3.56462 & 7.42202 & 8.57192 & 7.01432 & 2.74922 \\ 4.42075 & 8.27815 & 9.42805 & 7.87045 & 3.60535 \end{pmatrix}$$

Figura 4 Superfícies de Resposta da variável DES, para o cultivo de ápices, aos 24 DAP, incluindo os valores estimados para os níveis de S = S: A) Para S1; B) Para S2; C)Para S3; D)Para S4 e E)Para S5.

Tabela 3 Resumo da análise da variância e da análise da regressão da variável ENR, para o cultivo de ápices.

	Avaliação 1	Avaliação 2	Avaliação 3	Avaliação 4	Avaliação 5
GLM					
Significância do modelo	0,378	0,031	0,005	<0,0001	0,009
Coef.de Determinação	0,413	0,640	0,909	0,835	0,703
Coef. de Variação	377,1	180,0	97,2	104,2	120,2
Média	0,52	1,28	2,08	1,84	2,24
Fonte de Variação (F)					
B	0,08040	0,00780	0,00010	<0,0001	0,00050
NB	-	0,09110	-	-	-
SN^2	-	-	0,07150	-	-
SB^2	-	-	0,07190	-	-
S^2	-	-	0,09100	0,09060	0,10400
B^2	-	0,00880	0,00120	0,00030	0,00950
N^2	-	-	-	0,12580	-
REG					
STEP	5	4	4	7	4
Coef. de Determinação	0,292	0,610	0,707	0,821	0,620
Significâncias (F)					
Modelo	0,1242	0,00060	< 0,0001	<0,0001	0,00050
Interseção	0,0090	0,15310	0,00440	0,27830	0,01050
S	-	-	0,03450	-	-
N	-	0,01060	-	-	0,13290
B	0,0297	0,01110	0,00040	-	0,00100
SN	-	-	-	<0,0001	-
NB	-	0,03840	-	0,03810	-
N^2	-	-	-	-	0,16290
B^2	0,0730	0,00330	0,00090	-	0,00660
SNB	0,3036	-	-	<0,0001	-
NS^2	-	-	-	0,0120	-
BS^2	-	-	0,07310	-	-
SNB^2	-	-	-	<0,0001	-
S^2N^2	0,2279	-	-	-	-
Coef. da Equação					
Interseção	5,971	4,260	10,363	0,915	10,000
S	-	-	1,692	-	-
N	-	1,940	-	-	3,023
B	-3,482	-4,591	-7,826	-	-7,443
SN	-	-	-	1,864	-
NB	-	-0,460	-	-0,315	-
N^2	-	-	-	-	-0,457
B^2	0,433	0,829	1,129	-	0,957
SNB	0,042	-	-	-0,668	-
NS^2	-	-	-	-0,152	-
BS^2	-	-	-0,070	-	-
SNB^2	-	-	-	0,100	-
S^2N^2	-0,007	-	-	-	-

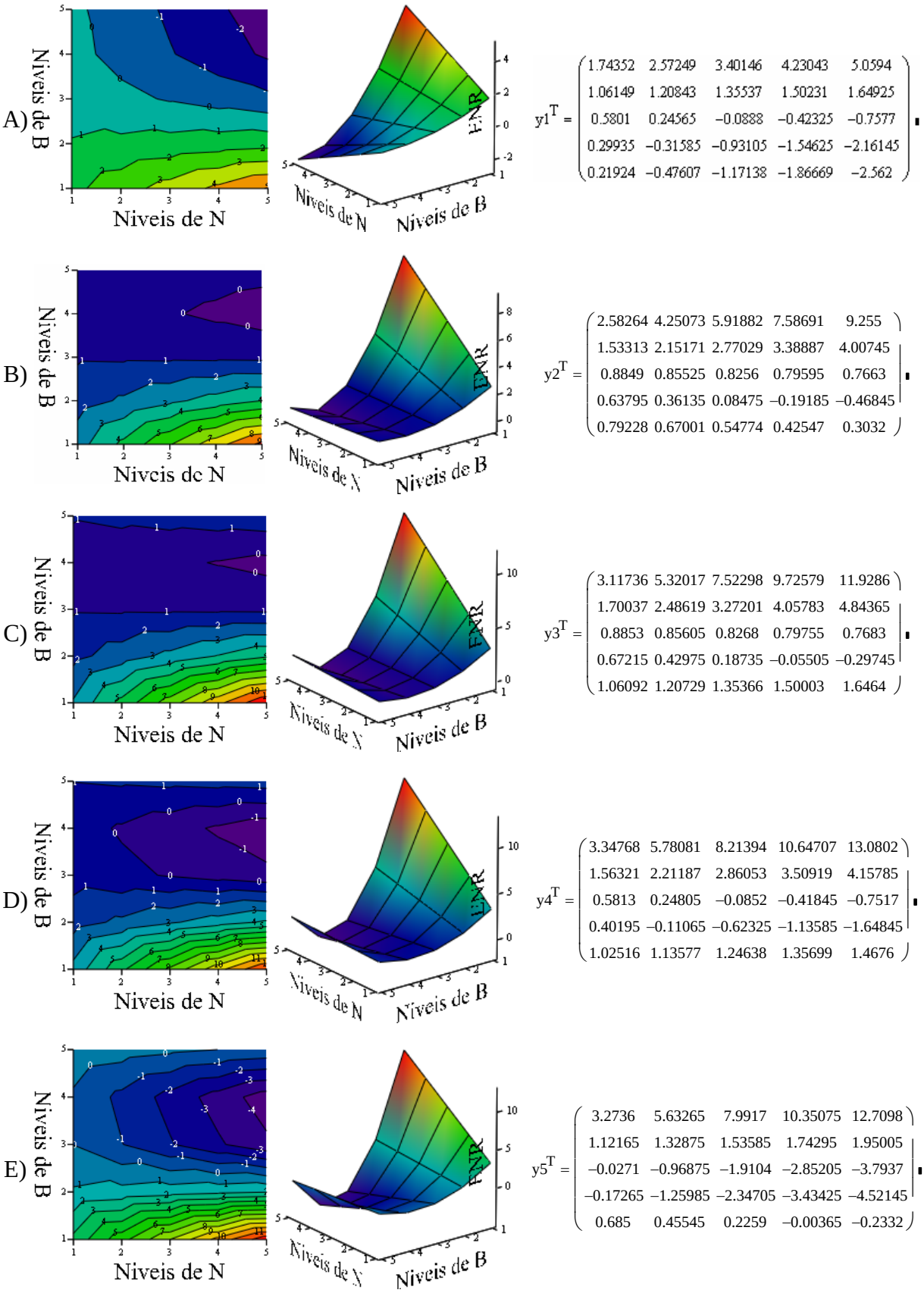


Figura 5 Superfícies de Resposta da variável ENR, para o cultivo de ápices, aos 24 DAP, incluindo os valores estimados para os níveis de S = S: A) Para S1; B) Para S2; C)Para S3; D)Para S4 e E)Para S5.

Tabela 4. Resumo da análise da variância e da análise da regressão da variável NTR, para o cultivo de ápices.

	Avaliação 1	Avaliação 2	Avaliação 3	Avaliação 4	Avaliação 5
GLM					
Significância do modelo	0,054	0,073	0,048	0,001	0,108
Coef.de Determinação	0,603	0,581	0,835	0,789	0,549
Coef. de Variação	25,7	80,0	68,0	62,4	65,0
Média	1,16	1,48	1,68	1,92	1,60
Fonte de Variação (F)					
N	-	-	0,07900	-	-
B	0,07730	0,01180	0,00480	<0,0001	0,00520
NB	-	0,09860	0,05020	-	-
SN^2	-	-	0,10170	-	-
NB^2	-	-	0,04870	-	-
N^2	0,02960	-	-	-	-
B^2	0,00590	0,02860	0,01680	0,00060	0,03630
REG					
STEP	5	4	4	7	9
Coef. de Determinação	0,47390	0,51250	0,58240	0.7752	0,688
Significâncias (F)					
Modelo	0,00930	0,00460	0,00110	<.0001	0,0008
Interseção	<0,0001	0,07070	0,10230	0.0244	0,2119
N	-	0,04140	0,01130		0,0006
B	0,00110	0,03850	0,03440	0.1568	0,0395
SN	-	-	-	0.0131	-
NB	-	0,08580	0,03890		0,0004
B^2	0,00280	0,17400	0,01260	0.2231	-
N^2	-	-	-		0,0030
SNB	-	-	-	0.0615	-
NBS^2	0,05800	-	-		0,0845
SNB^2	-	-	-	0.1242	-
N^2B^2	-	-	-		0,0004
BS^2N^2	0,06210	-	-		-
Coef. da Equação					
Interseção	2,232	2,920	2,890	4.58068	-1,706
N	-	0,800	1,130		3,744
B	-0,849	-1,937	-2,190	-2.09283	0,809
SN	-	-	-	0.44051	-
NB	-	-0,200	-0,270		-1,008
B^2	0,123	0,343	0,400	0.28769	-
N^2	-	-	-		-0,396
SNB	-	-	-	-0.25084	-
NBS^2	0,004	-	-		-0,003
SNB^2	-	-	-	0.03255	-
N^2B^2	-	-	-	-	0,028
BS^2N^2	-0,001	-	-	-	-

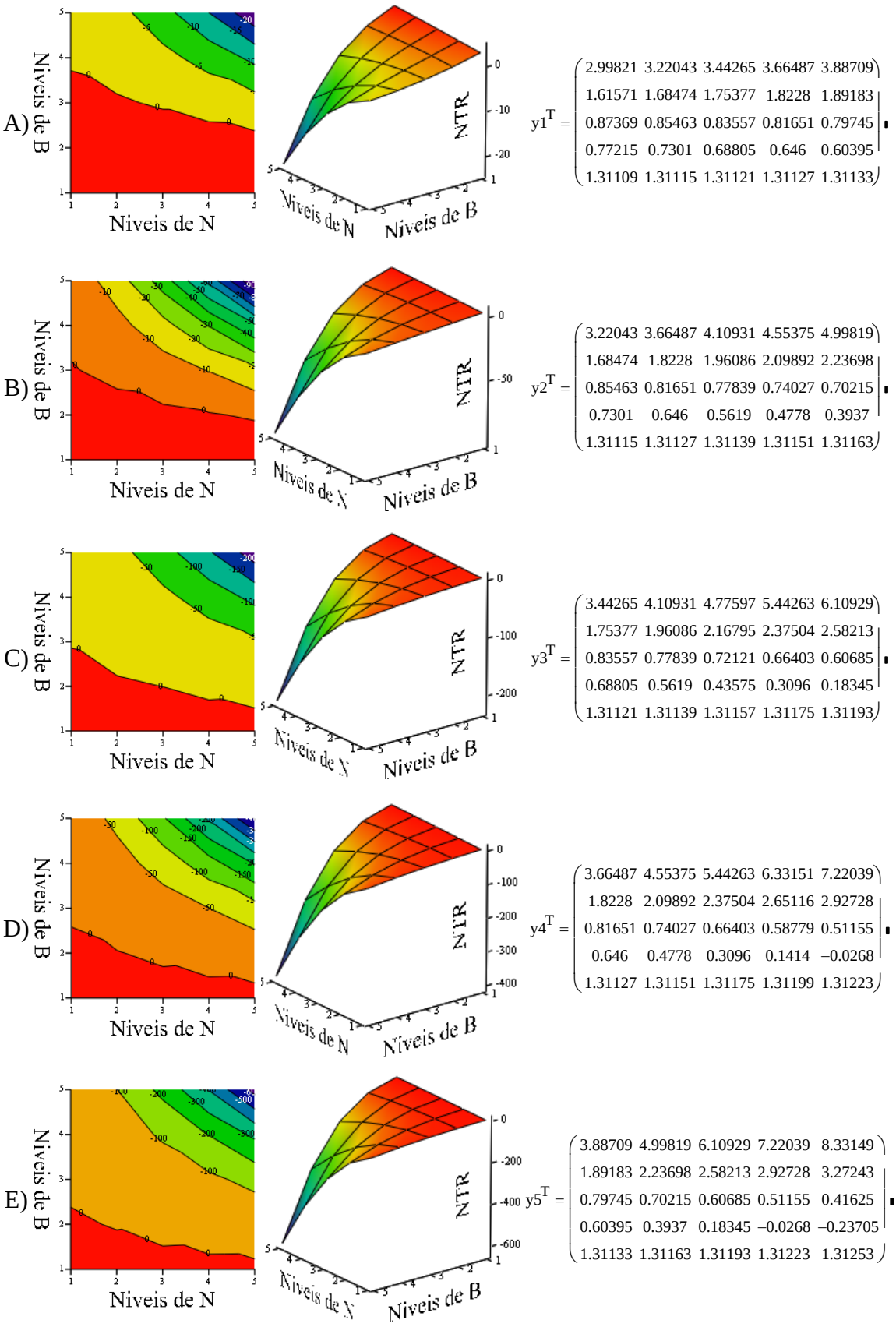
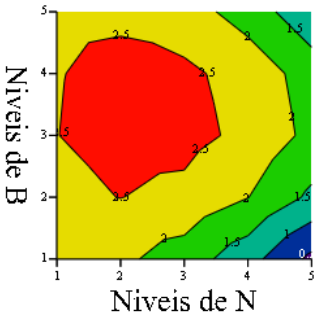


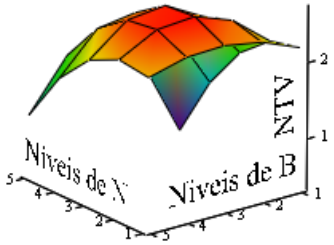
Figura 6 Superfícies de Resposta da variável NTR, para o cultivo de ápices, aos 24 DAP, incluindo os valores estimados para os níveis de S = S: A) Para S1; B) Para S2; C) Para S3; D) Para S4 e E) Para S5.

Tabela 5 Resumo da análise da variância e da análise da regressão da variável NTV, para o cultivo de ápices.

	Avaliação 1	Avaliação 2	Avaliação 3	Avaliação 4	Avaliação 5
GLM					
Significância do modelo	0,111	0,023	0,035	0,028	0,041
Coef.de Determinação	0,547	0,657	0,631	0,645	0,621
Coef. De Variação	35,9	45,1	42,2	42,9	39,7
Média	1,32	3,00	4,20	3,40	3,00
Fonte de Variação (F)					
S	-	0,00680	0,00720	0,08550	0,11690
B	0,05410	0,03620	0,01890	0,12030	-
N	-	-	-	-	0,07660
NB	0,08530	-	-	-	-
SN	-	0,00670	-	0,02980	0,05470
S^2	0,09780	-	-	0,07920	0,12890
B^2	-	-	-	0,00600	0,01960
REG					
STEP	13	6	4	7	15
Coef. De Determinação	0,7679	0,6801	0,6669	0,5696	0,7541
Significâncias (F)					
Modelo	0,0001	< 0,0001	0,0001	0,0015	0,0011
Interseção	< 0,0001	0,0002	0,0287	0,0007	0,0345
S	-	0,0735	-	-	0,0194
N	-	0,001	-	-	-
SB	-	-	-	-	0,0513
S^2	0,0002	-	-	-	-
N^2	-	-	-	0,0105	-
B^2	0,0002	-	-	-	0,0961
SN^2	-	-	0,1096	-	-
SB^2	< 0,0001	-	-	-	-
NS^2	0,0004	-	-	0,0072	-
SNB	-	0,0006	0,0005	0,0002	0,0009
S^2N^2	0,0057	-	-	-	-
S^2B^2	-	-	0,2509	-	-
SNB^2	-	0,0032	-	0,0005	-
SBN^2	-	-	-	-	0,0028
NBS^2	0,0001	-	-	-	-
NS^2B^2	-	-	-	-	0,0023
SN^2B^2	-	-	0,0038	-	-
Coef. Da Equação					
Interseção	0,81392	4,31318	1,39667	2,05254	1,7581
S	-	-0,52563	-	-	-0,96712
N	-	-1,08268	-	-	-
SB	-	-	-	-	0,28623
S^2	0,13069	-	-	-	-
N^2	-	-	-	-0,11916	-
B^2	0,08608	-	-	-	-0,09306
SN^2	-	-	-0,02994	-	-
SB^2	-0,04176	-	-	-	-
NS^2	-0,07711	-	-	-0,05429	-
SNB	-	0,27183	0,23902	0,37152	0,46320
S^2N^2	0,00924	-	-	-	-
S^2B^2	-	-	-0,00473	-	-
SNB^2	-	-0,03820	-	-0,05570	-
SBN^2	-	-	-	-	-0,07810
NBS^2	0,00931	-	-	-	-
NS^2B^2	-	-	-	-	-0,02262
BS^2N^2	-	-	-	-	0,00654
SN^2B^2	-	-	-0,00554	-	-
$S^2N^2B^2$	-	-	-	-	0,00272

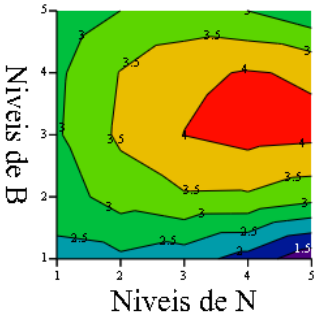
A)

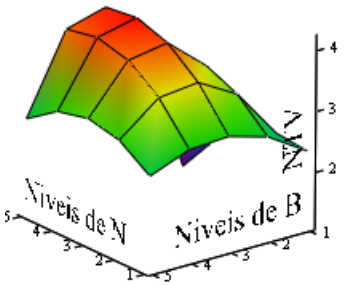




$$y1^T = \begin{pmatrix} 2.19491 & 2.09896 & 1.76469 & 1.1921 & 0.38119 \\ 2.39933 & 2.5078 & 2.37795 & 2.00978 & 1.40329 \\ 2.49235 & 2.69384 & 2.65701 & 2.38186 & 1.86839 \\ 2.47397 & 2.65708 & 2.60187 & 2.30834 & 1.77649 \\ 2.34419 & 2.39752 & 2.21253 & 1.78922 & 1.12759 \end{pmatrix}$$

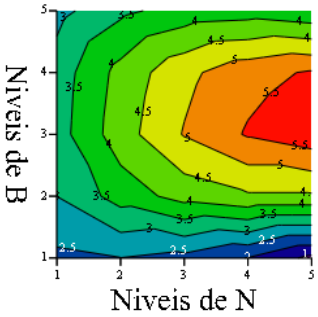
B)

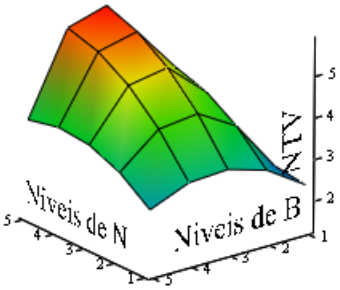




$$y2^T = \begin{pmatrix} 2.34786 & 2.40486 & 2.22354 & 1.8039 & 1.14594 \\ 2.7567 & 3.22254 & 3.45006 & 3.43926 & 3.19014 \\ 2.94274 & 3.59462 & 4.00818 & 4.18342 & 4.12034 \\ 2.90598 & 3.5211 & 3.8979 & 4.03638 & 3.93654 \\ 2.64642 & 3.00198 & 3.11922 & 2.99814 & 2.63874 \end{pmatrix}$$

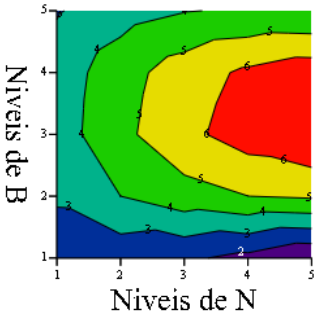
C)

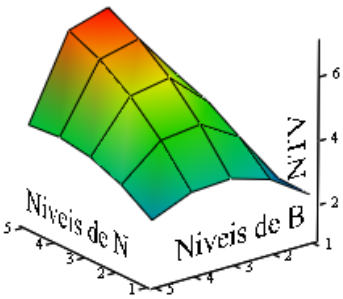




$$y3^T = \begin{pmatrix} 2.39223 & 2.4936 & 2.35665 & 1.98138 & 1.36779 \\ 3.00549 & 3.72012 & 4.19643 & 4.43442 & 4.43409 \\ 3.28455 & 4.27824 & 5.03361 & 5.55066 & 5.82939 \\ 3.22941 & 4.16796 & 4.86819 & 5.3301 & 5.55369 \\ 2.84007 & 3.38928 & 3.70017 & 3.77274 & 3.60699 \end{pmatrix}$$

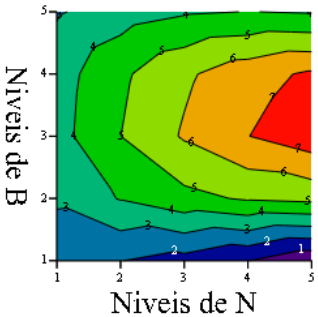
D)

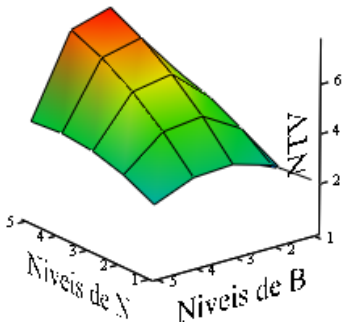




$$y4^T = \begin{pmatrix} 2.32802 & 2.36518 & 2.16402 & 1.72454 & 1.04674 \\ 3.1457 & 4.00054 & 4.61706 & 4.99526 & 5.13514 \\ 3.51778 & 4.7447 & 5.7333 & 6.48358 & 6.99554 \\ 3.44426 & 4.59766 & 5.51274 & 6.1895 & 6.62794 \\ 2.92514 & 3.55942 & 3.95538 & 4.11302 & 4.03234 \end{pmatrix}$$

E)





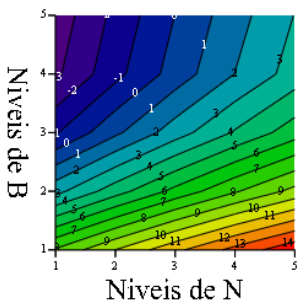
$$y5^T = \begin{pmatrix} 2.15523 & 2.0196 & 1.64565 & 1.03338 & 0.18279 \\ 3.17733 & 4.0638 & 4.71195 & 5.12178 & 5.29329 \\ 3.64243 & 4.994 & 6.10725 & 6.98218 & 7.61879 \\ 3.55053 & 4.8102 & 5.83155 & 6.61458 & 7.15929 \\ 2.90163 & 3.5124 & 3.88485 & 4.01898 & 3.91479 \end{pmatrix}$$

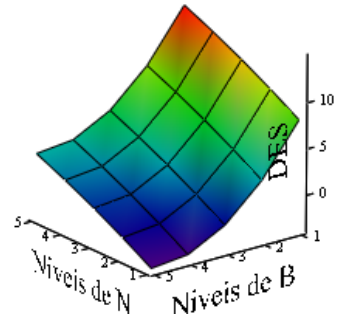
Figura 7 Superfícies de Resposta da variável NTV, para o cultivo de ápices, aos 24 DAP, incluindo os valores estimados para os níveis de S: A) Para S1; B) Para S2; C) Para S3; D) Para S4 e E) Para S5.

Tabela 6 Resumo da análise da variância e da análise da regressão da variável DES, para o cultivo de segmentos.

	Avaliação 1	Avaliação 2	Avaliação 3	Avaliação 4	Avaliação 5
GLM					
Significância do modelo	0,019	0,034	0,035	0,027	0,062
Coef.de Determinação	0,668	0,590	0,712	0,725	0,593
Coef. de Variação	98,6	83,2	76,8	68,1	88,7
Média	4,40	7,24	7,32	8,36	9,00
Fonte de Variação (F)					
S	-	-	-	0,13050	-
B	0,00110	0,00720	0,00210	0,00130	0,02550
N	-	0,08210	-	-	0,12400
B^2	0,01400	0,04260	0,06220	-	0,13340
S^2	-	-	-	0,10510	0,02840
N^2	-	-	-	-	0,09260
SB	-	-	0,08290	-	-
BN^2	-	-	-	0,07930	-
REG					
STEP	4	4	4	6	7
Coeficiente de Determinação	0,594	0,492	0,498	0,603	0,605
Significâncias (F)					
Modelo	<0,001	<0,001	0,002	<0,001	<0,001
Interseção	0,013	0,065	0,115	0,038	0,076
B	0,004	0,025	0,163	0,068	0,011
N	0,092	0,068	-	-	-
B^2	0,009	0,039	-	0,232	
BN^2	0,189	0,241	-	-	0,003
SN	-	-	0,015	0,004	0,001
S^2N^2	-	-	-	0,011	-
NS^2	-	-	-	-	0,002
NB^2	-	-	-	-	0,010
NBS^2	-	-	0,053	-	-
Coeficientes da Equação					
Interseção	15,098	15,541	7,275	13,207	11,913
S	-	-	-	-	-
B	-10,176	-10,929	-1,578	-7,967	-6,450
N	2,260	3,553	-	-	-
B^2	1,443	1,586	-	0,839	-
BN^2	-0,085	-0,110	-	-	-0,507
SN	-	-	0,965	2,120	4,403
S^2N^2	-	-	-	-0,076	-
NS^2	-	-	-	-	-0,716
NB^2	-	-	-	-	0,521
NBS^2	-	-	-0,039	-	-

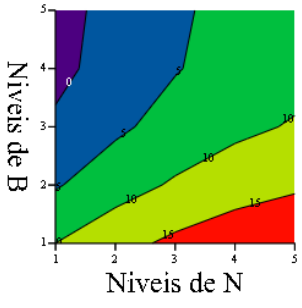
A)

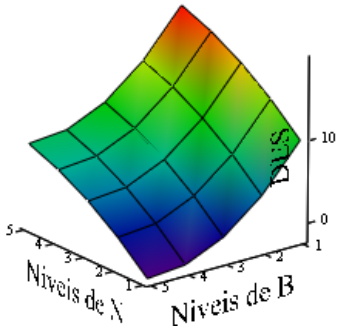




$$y1^{T} = \begin{pmatrix} 8.1221 & 10.01193 & 11.74892 & 13.33307 & 14.76438 \\ 2.67207 & 4.5619 & 6.29889 & 7.88304 & 9.31435 \\ -1.10006 & 0.78977 & 2.52676 & 4.11091 & 5.54222 \\ -3.19429 & -1.30446 & 0.43253 & 2.01668 & 3.44799 \\ -3.61062 & -1.72079 & 0.0162 & 1.60035 & 3.03166 \end{pmatrix}$$

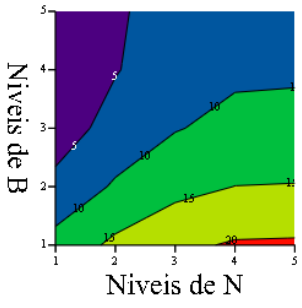
B)

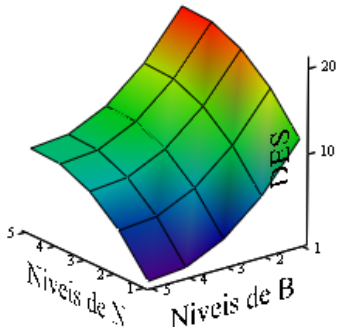




$$y2^{T} = \begin{pmatrix} 10.01193 & 13.33307 & 16.04285 & 18.14127 & 19.62833 \\ 4.5619 & 7.88304 & 10.59282 & 12.69124 & 14.1783 \\ 0.78977 & 4.11091 & 6.82069 & 8.91911 & 10.40617 \\ -1.30446 & 2.01668 & 4.72646 & 6.82488 & 8.31194 \\ -1.72079 & 1.60035 & 4.31013 & 6.40855 & 7.89561 \end{pmatrix}$$

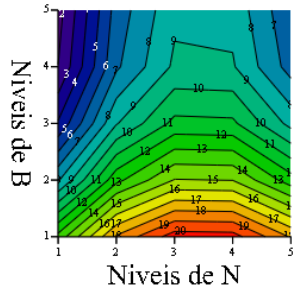
C)

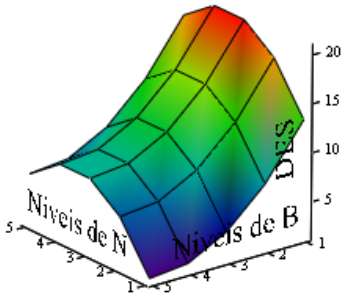




$$y3^{T} = \begin{pmatrix} 11.74892 & 16.04285 & 18.96122 & 20.50403 & 20.67128 \\ 6.29889 & 10.59282 & 13.51119 & 15.054 & 15.22125 \\ 2.52676 & 6.82069 & 9.73906 & 11.28187 & 11.44912 \\ 0.43253 & 4.72646 & 7.64483 & 9.18764 & 9.35489 \\ 0.0162 & 4.31013 & 7.2285 & 8.77131 & 8.93856 \end{pmatrix}$$

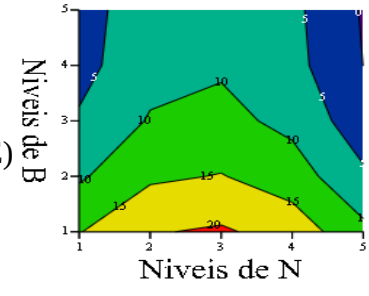
D)

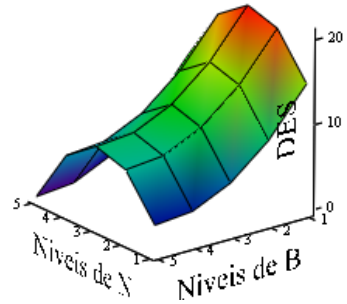




$$y4^{T} = \begin{pmatrix} 13.33307 & 18.14127 & 20.50403 & 20.42135 & 17.89323 \\ 7.88304 & 12.69124 & 15.054 & 14.97132 & 12.4432 \\ 4.11091 & 8.91911 & 11.28187 & 11.19919 & 8.67107 \\ 2.01668 & 6.82488 & 9.18764 & 9.10496 & 6.57684 \\ 1.60035 & 6.40855 & 8.77131 & 8.68863 & 6.16051 \end{pmatrix}$$

E)





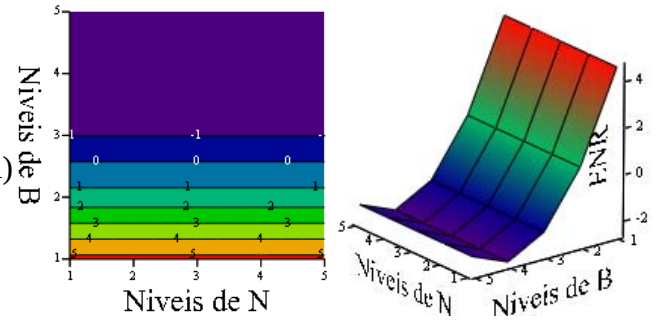
$$y5^{T} = \begin{pmatrix} 14.76438 & 19.62833 & 20.67128 & 17.89323 & 11.29418 \\ 9.31435 & 14.1783 & 15.22125 & 12.4432 & 5.84415 \\ 5.54222 & 10.40617 & 11.44912 & 8.67107 & 2.07202 \\ 3.44799 & 8.31194 & 9.35489 & 6.57684 & -0.02221 \\ 3.03166 & 7.89561 & 8.93856 & 6.16051 & -0.43854 \end{pmatrix}$$

Figura 8 Superfícies de Resposta da variável DES, para o cultivo de segmentos, aos 24 DAP, incluindo os valores estimados para os níveis de S: A) Para S1; B) Para S2; C) Para S3; D) Para S4 e E) Para S5.

Tabela 7 Resumo da análise da variância e da análise da regressão da variável ENR, para o cultivo de segmentos.

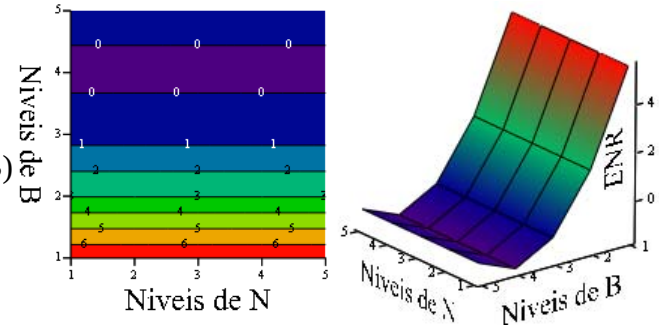
	Avaliação 1	Avaliação 2	Avaliação 3	Avaliação 4	Avaliação 5
GLM					
Significância do modelo	0,07260	0,08620	0,00090	0,18720	0,00130
Coef.de Determinação	0,58135	0,80492	0,85088	0,49790	0,84137
Coef. de Variação	113,28700	113,51640	96,38648	180,29210	93,41057
Média	1,52000	2,28000	2,20000	2,20000	2,72000
Fonte de Variação (F)					
S	0,03090	-	0,09500	-	-
B	0,05790	0,00960	0,00020	0,01130	<0,0001
S^2	-	-	-	-	0,06420
B^2	0,01230	0,00430	0,00020	0,13110	0,00200
BN^2	-	-	-	-	0,04390
REG					
STEP	6	4	7	4	3
Coeficiente de Determinação	0,82060	0,62970	0,79800	0,40960	0,67250
Significâncias (F)					
Modelo	< 0,0001	0,00040	< 0,0001	0,02620	<0,0001
Interseção	0,17060	0,00210	0,08950	0,11150	<0,0001
N	-	-	-	-	0,31300
S	-	-	< 0,0001	0,33170	-
B	-	0,00090	-	0,03490	0,00020
SN	-	0,04430	-	-	-
SB	-	-	0,01390	-	-
S^2	-	-	-	0,41400	-
B^2	-	0,00090	0,35810	0,10450	0,00260
BS^2	-	-	0,00070	-	-
NS^2	0,00030	-	-	-	-
SNB	-	0,07910	-	-	-
S^2B^2	-	-	< 0,0001	-	-
S^2N^2	0,00800	-	-	-	-
NBS^2	0,00020	-	0,05720	-	-
BS^2N^2	0,00280	-	-	-	-
NS^2B^2	< 0,0001	-	-	-	-
$S^2N^2B^2$	0,00120	-	-	-	-
Coeficientes da Equação					
Interseção	0,47085	10,25004	-3,09565	8,3200	16,38
N	-	-	-	-	0,4200
S	-	-	6,27994	2,70857	-
B	-	-7,10274	-	-6,16286	-9,26857
SN	-	0,37256	-	-	-
SB	-	-	-1,24742	-	-
S^2	-	-	-	-0,37143	-
B^2	-	1,12618	0,12015	0,75714	1,17143
BS^2	-	-	-0,46479	-	-
NS^2	0,47752	-	-	-	-
SNB	-	- 0,08900	-	-	-
S^2B^2	-	-	0,10737	-	-
S^2N^2	-0,07688	-	-	-	-
NBS^2	-0,35176	-	-0,01301	-	-
BS^2N^2	0,06141	-	-	-	-
NS^2B^2	0,05936	-	-	-	-
$S^2N^2B^2$	-0,01078	-	-	-	-

A)



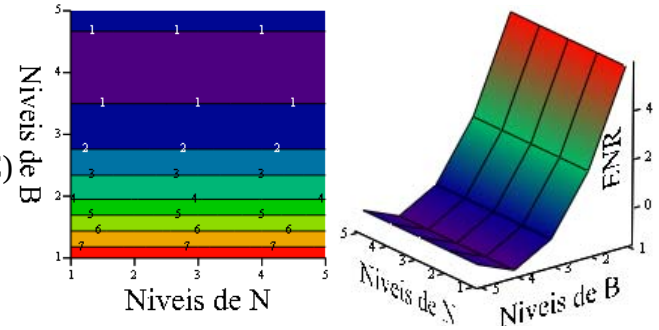
$$y1^T = \begin{pmatrix} 5.25142 & 5.25142 & 5.25142 & 5.25142 & 5.25142 \\ 1.35998 & 1.35998 & 1.35998 & 1.35998 & 1.35998 \\ -1.01718 & -1.01718 & -1.01718 & -1.01718 & -1.01718 \\ -1.88006 & -1.88006 & -1.88006 & -1.88006 & -1.88006 \\ -1.22866 & -1.22866 & -1.22866 & -1.22866 & -1.22866 \end{pmatrix}$$

B)



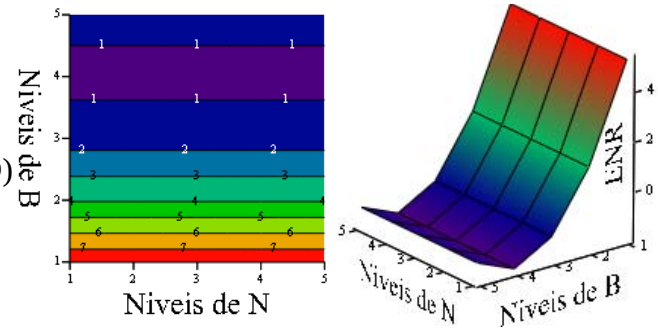
$$y2^T = \begin{pmatrix} 6.8457 & 6.8457 & 6.8457 & 6.8457 & 6.8457 \\ 2.95426 & 2.95426 & 2.95426 & 2.95426 & 2.95426 \\ 0.5771 & 0.5771 & 0.5771 & 0.5771 & 0.5771 \\ -0.28578 & -0.28578 & -0.28578 & -0.28578 & -0.28578 \\ 0.36562 & 0.36562 & 0.36562 & 0.36562 & 0.36562 \end{pmatrix}$$

C)



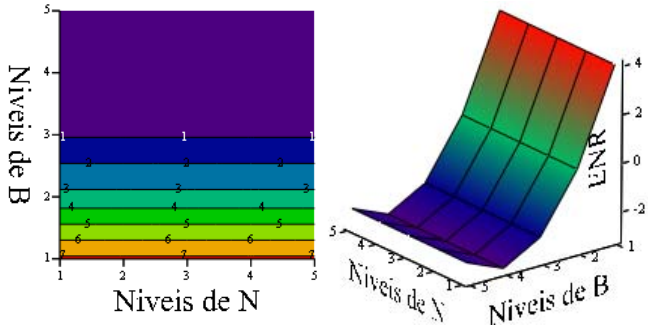
$$y3^T = \begin{pmatrix} 7.69712 & 7.69712 & 7.69712 & 7.69712 & 7.69712 \\ 3.80568 & 3.80568 & 3.80568 & 3.80568 & 3.80568 \\ 1.42852 & 1.42852 & 1.42852 & 1.42852 & 1.42852 \\ 0.56564 & 0.56564 & 0.56564 & 0.56564 & 0.56564 \\ 1.21704 & 1.21704 & 1.21704 & 1.21704 & 1.21704 \end{pmatrix}$$

D)



$$y4^T = \begin{pmatrix} 7.80568 & 7.80568 & 7.80568 & 7.80568 & 7.80568 \\ 3.91424 & 3.91424 & 3.91424 & 3.91424 & 3.91424 \\ 1.53708 & 1.53708 & 1.53708 & 1.53708 & 1.53708 \\ 0.6742 & 0.6742 & 0.6742 & 0.6742 & 0.6742 \\ 1.3256 & 1.3256 & 1.3256 & 1.3256 & 1.3256 \end{pmatrix}$$

E)



$$y5^T = \begin{pmatrix} 7.17138 & 7.17138 & 7.17138 & 7.17138 & 7.17138 \\ 3.27994 & 3.27994 & 3.27994 & 3.27994 & 3.27994 \\ 0.90278 & 0.90278 & 0.90278 & 0.90278 & 0.90278 \\ 0.0399 & 0.0399 & 0.0399 & 0.0399 & 0.0399 \\ 0.6913 & 0.6913 & 0.6913 & 0.6913 & 0.6913 \end{pmatrix}$$

Figura 9 Superfícies de Resposta da variável ENR, para o cultivo de segmentos, aos 24 DAP, incluindo os valores estimados para os níveis de S: A) Para S1; B) Para S2; C)Para S3; D)Para S4 e E)Para S5.

Tabela 8 Resumo da análise da variância e da análise da regressão da variável NTR, para o cultivo de segmentos.

	Avaliação 1	Avaliação 2	Avaliação 3	Avaliação 4	Avaliação 5
GLM					
Significância do modelo	0,13660	0,05350	0,04740	0,00270	0,00060
Coef. de Determinação	0,52863	0,60353	0,83613	0,82105	0,86143
Coef. de Variação	28,20329	67,40069	65,35289	60,71235	40,55820
Média	1,56000	1,60000	1,80000	1,88000	1,80000
Fonte de Variação (F)					
S	0,07290	-	-	-	-
B	-	0,00660	0,00190	0,00020	<0,0001
N^2	0,04620	-	-	-	-
B^2	-	0,01140	0,00720	0,00090	0,00020
BN^2	-	-	0,08530	0,04620	0,03650
REG					
STEP	4	4	8	5	14
Coeficiente de Determinação	0,3864	0,5181	0,7175	0,72060	0,88410
Significâncias (F)					
Modelo	0,0149	0,0042	0,0010	<0,0001	<0,0001
Interseção	<0,0001	<0,0001	0,1308	0,03620	0,13710
S			0,0002		
N	-	-		-	0,00370
B	-	0,0013		0,16710	0,00280
SN	-	-		0,03450	-
SB	-	0,10265	<0,0001	-	-
NB	0,003	-		-	0,04630
S^2	-	0,2308	0,0037	-	-
N^2	-	-		-	0,00500
B^2	-	0,0068	0,0222	0,21810	0,00030
SB^2	0,0185	-		-	-
BN^2	0,0031	-	0,2324	-	0,15340
SNB	-	-		0,13310	-
SBN^2	-	-		-	0,08400
SNB^2	-	-		0,23430	-
S^2B^2	-	-	0,0004	-	0,08140
S^2N^2			0,0930		
NBS^2	-	-		-	0,04690
Coeficientes da Equação					
Interseção	1,85184	6,34229	-2,20524	4,53944	2,38026
S	-	-	5,37958	-	-
N	-	-	-	-	3,79521
B	-	-3,01653	-	-2,19172	-2,26333
SN	-	-	-	0,39398	-
SB	-	0,10265	-1,34139	-	-
NB	-0,18599	-	-	-	-0,74813
S^2	-	-0,06384	-0,51563	-	-
N^2	-	-	-	-	-0,59786
B^2	-	0,37143	0,15889	0,3127	0,39263
SB^2	0,00875	-	-	-	-
BN^2	0,03313	-	0,01660	-	0,09669
SNB	-	-	-	-0,21283	-
SBN^2	-	-	-	-	0,02127
SNB^2	-	-	-	0,02671	-
S^2B^2	-	-	0,03348	-	0,00655
S^2N^2	-	-	-0,00342	-	-
NBS^2	-	-	-	-	-0,02313

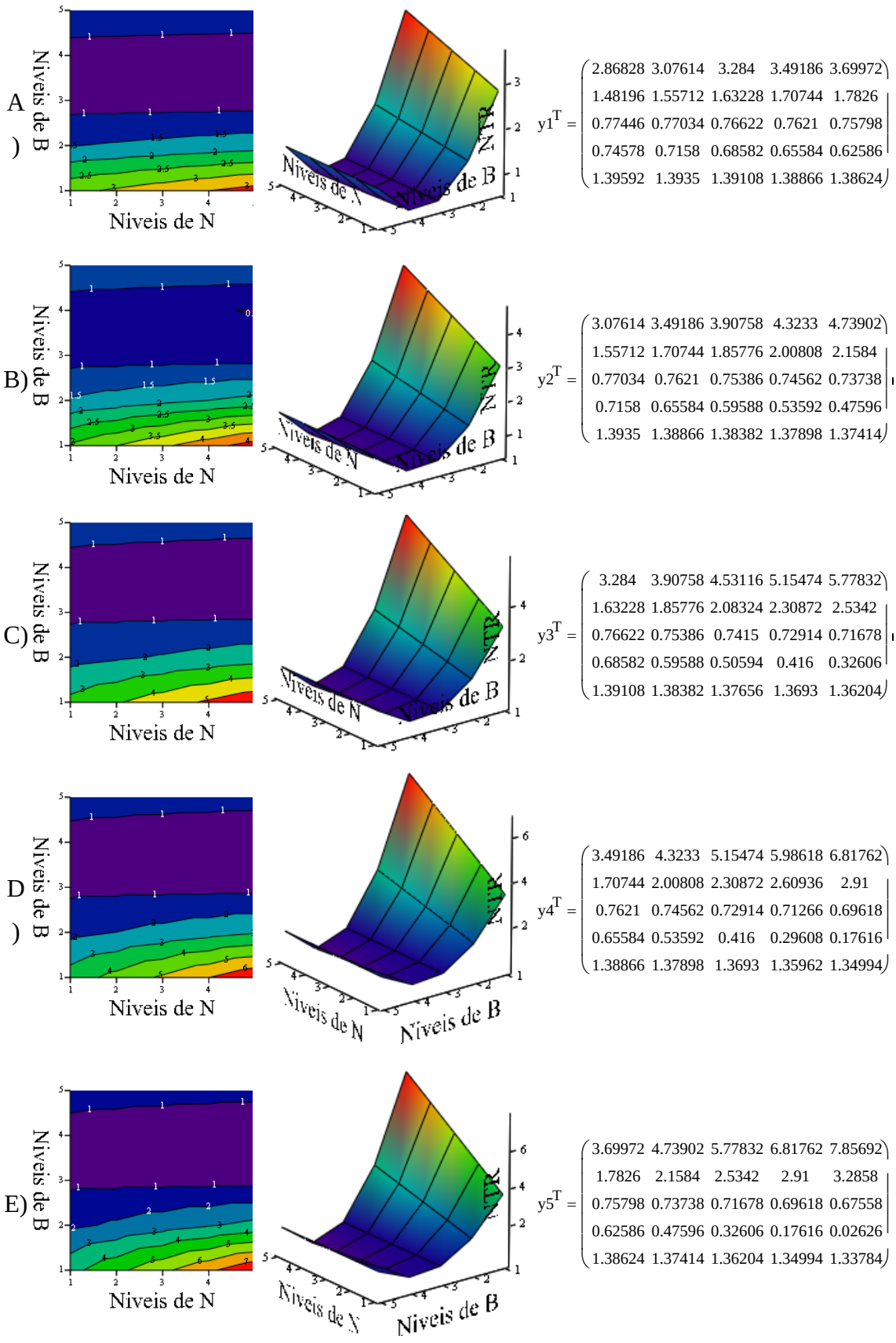
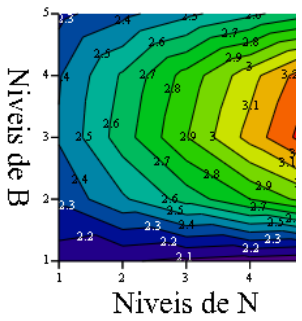


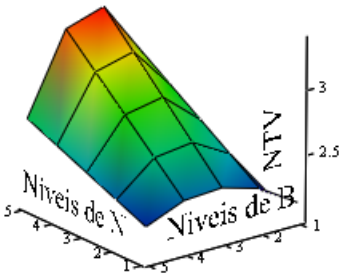
Figura 10 Superfícies de Resposta da variável NTR, para o cultivo de segmentos, aos 24 DAP, incluindo os valores estimados para os níveis de S: A) Para S1; B) Para S2; C)Para S3; D)Para S4 e E)Para S5.

Tabela 9 Resumo da análise da variância e da análise da regressão da variável NTV, para o cultivo de segmentos.

	Avaliação 1	Avaliação 2	Avaliação 3	Avaliação 4	Avaliação 5
GLM					
Significância do modelo	0,147300	0,057800	0,115100	0,0384	0,0274
Coef. de Determinação	0,521592	0,598154	0,543926	0,625852	0,646721
Coef. de Variação	31,515630	51,564690	48,632220	45,02602	42,5252
Média	1,360000	2,960000	4,040000	3,36	3,04
Fonte de Variação (F)					
S	-	0,008	0,0543	0,096	0,0237
N	-	-	-	-	0,0237
B	0,0186	-	0,0621	-	-
SB	0,0955	-	-	-	-
SN	-	0,0306	0,0757	0,0209	0,0154
S^2	0,0479	-	-	0,0892	-
B^2	-	-	-	0,0123	0,0712
REG					
STEP	7	3	2	3	3
Coeficiente de Determinação	0,55440	0,5742	0,4689	0,4484	0,6236
Significâncias (F)					
Modelo	0,00570	0,0004	0,0009	0,0052	0,0001
Interseção	0,01910	<0,0001	0,0215	0,0008	<0,0001
S	0,01230	-	-	-	-
SN	0,01650	0,0184	-	0,0225	-
NB^2	0,00060	-	-	-	-
SNB	-	-	0,0117	0,0029	-
SNB^2	0,00380	-	-	0,0052	-
S^2N^2	-	-	-	-	0,0371
NBS^2	-	0,0018	-	-	-
NS^2B^2	-	0,0056	-	-	-
SN^2B^2	-	-	0,1055	-	-
BS^2N^2	0,009	-	-	-	0,0033
$S^2N^2B^2$	-	-	-	-	0,0065
Coeficientes da Equação					
Interseção	0,67720	2,57568	1,74715	2,16749	2,15431
S	0,28703	-	-	-	-
SN	-0,07623	-0,27426	-	-0,31969	-
NB^2	0,03346	-	-	-	-
SNB	-	-	0,13108	0,34192	-
SNB^2	-0,01228	-	-	-0,05152	-
S^2N^2	-	-	-	-	-0,01214
NBS^2	-	0,06284	-	-	-
NS^2B^2	-	-0,00911	-	-	-
SN^2B^2	-	-	-0,00330	-	-
BS^2N^2	0,0017	-	-	-	0,01442
$S^2N^2B^2$	-	-	-	-	-0,00211

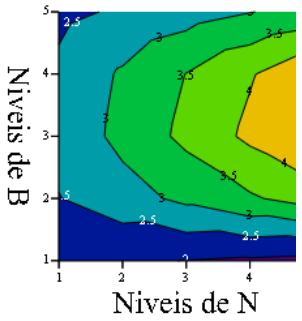
A)

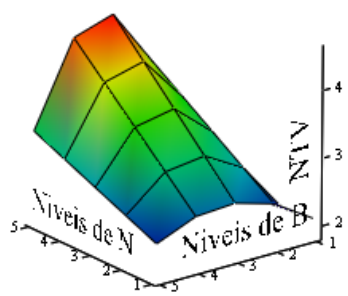




$$y1^T = \begin{pmatrix} 2.1382 & 2.10891 & 2.07962 & 2.05033 & 2.021(\\ 2.32556 & 2.48363 & 2.6417 & 2.79977 & 2.957(\\ 2.40988 & 2.65227 & 2.89466 & 3.13705 & 3.379(\\ 2.39116 & 2.61483 & 2.8385 & 3.06217 & 3.285(\\ 2.2694 & 2.37131 & 2.47322 & 2.57513 & 2.677(\end{pmatrix}$$

B)

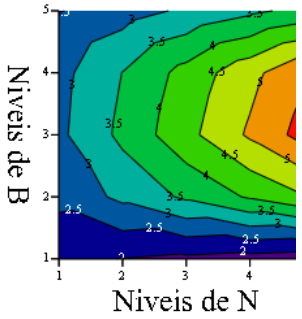


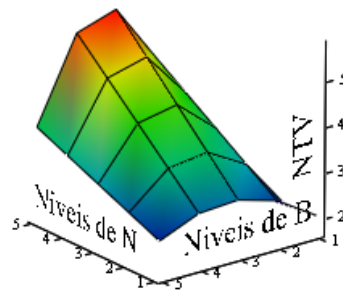


$$y2^T = \begin{pmatrix} 2.10891 & 2.05033 & 1.99175 & 1.93317 & 1.874(\\ 2.48363 & 2.79977 & 3.11591 & 3.43205 & 3.748(\\ 2.65227 & 3.13705 & 3.62183 & 4.10661 & 4.591(\\ 2.61483 & 3.06217 & 3.50951 & 3.95685 & 4.404(\\ 2.37131 & 2.57513 & 2.77895 & 2.98277 & 3.186(\end{pmatrix}$$

y2

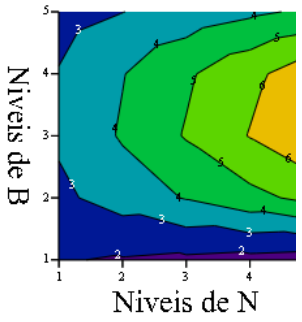
C)

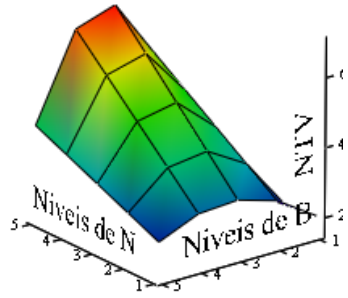




$$y3^T = \begin{pmatrix} 2.07962 & 1.99175 & 1.90388 & 1.81601 & 1.728(\\ 2.6417 & 3.11591 & 3.59012 & 4.06433 & 4.538(\\ 2.89466 & 3.62183 & 4.349 & 5.07617 & 5.803(\\ 2.8385 & 3.50951 & 4.18052 & 4.85153 & 5.225(\\ 2.47322 & 2.77895 & 3.08468 & 3.39041 & 3.696(\end{pmatrix}$$

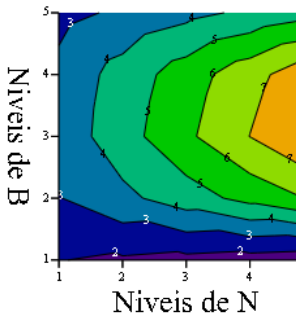
D)

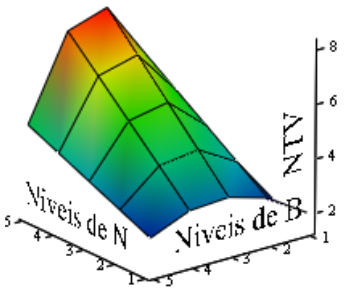




$$y4^T = \begin{pmatrix} 2.05033 & 1.93317 & 1.81601 & 1.69885 & 1.581(\\ 2.79977 & 3.43205 & 4.06433 & 4.69661 & 5.328(\\ 3.13705 & 4.10661 & 5.07617 & 6.04573 & 7.015(\\ 3.06217 & 3.95685 & 4.85153 & 5.74621 & 6.640(\\ 2.57513 & 2.98277 & 3.39041 & 3.79805 & 4.205(\end{pmatrix}$$

E)





$$y5^T = \begin{pmatrix} 2.02104 & 1.87459 & 1.72814 & 1.58169 & 1.435(\\ 2.95784 & 3.74819 & 4.53854 & 5.32889 & 6.119(\\ 3.37944 & 4.59139 & 5.80334 & 7.01529 & 8.227(\\ 3.28584 & 4.40419 & 5.52254 & 6.64089 & 7.759(\\ 2.67704 & 3.18659 & 3.69614 & 4.20569 & 4.715(\end{pmatrix}$$

Figura 11 Superfícies de Resposta da variável NTV, para o cultivo de segmentos, aos 24 DAP, incluindo os valores estimados para os níveis de S: A) Para S1; B) Para S2; C)Para S3; D)Para S4 e E)Para S5.

4.1.2 Formação de Microtubérculos

A formação de microtubérculos dentro do período estudado, após 32 DAP, ocorreu apenas nos tratamentos 254, 342, 421 e 532 e não foram suficientes para a obtenção de um modelo significativo na análise da variância e na análise da regressão. Isso pode ter ocorrido por causa do uso de BAP em fotoperíodo de dias longos, que segundo HUSSEY & STACEY (1984) e confirmado por GOPAL (1998) a tuberização *in vitro* é mais pronunciado em foroperíodo de dias curtos.

Os microtubérculos resultantes desses tratamentos foram formados a partir de explantes de ápices caulinares e segmentos nodais. Esses resultados são compatíveis com os obtidos por PRUSKI et. al. (2003); WANG & HU (1982) com o uso de 10 $mg.L^{-1}$ de BAP; com os obtidos por HUSSEY & STACEY (2003) utilizando 2,0 $mg.L^{-1}$ de BAP, e por PIAO et al (2003) utilizando 4,44μm de BAP (1,0 $mg.L^{-1}$).

A formação de microtubérculos ocorreu nos tratamentos com concentrações de sacarose entre 60 e 80 $g.L^{-1}$ de meio de cultivo compatíveis com os dados obtidos por GARNER & BLAKE, 1989; FORTI et al., 1991; de BAP entre 0 e 7,5 $mg.L^{-1}$ os mesmos obtidos por HUSSEY & STACEY (2003) e PIAO et al (2003) e que se mostrou ainda dependentes das concentrações de NH_4NO_3 entre 805 e 2415 $mg.L^{-1}$ presente no meio.

Níveis mais elevados de BAP determinaram maior necessidade de Nit para a formação de microtubérculos, sendo menos importante a concentração de sacarose.

Altas concentrações de sacarose associadas a baixos níveis de Nit e de BAP proporcionaram maior indução da tuberização, crescimento e desenvolvimento de microtubérculos, como no tratamento 421.

No tratamento 444, o fator determinante para a indução na tuberização foi o equilíbrio entre as concentrações de sacarose (60 $g.L^{-1}$), Nit e BAP (2415 e 7,5 $mg.L^{-1}$ respectivamente).

Destaque para os tratamentos 231, 351 e 421 que tiveram desenvolvimento, enraizamento e nota de enraizamento superiores e nota de vitrificação baixa, porém não produziram microtubérculos, o que caracteriza tratamentos que possuem produções de explantes superiores, de acordo com resultado obtido através das analises estatísticas.

As presenças de BAP e de Nit são importantes para a determinação da quantidade de sacarose a ser adicionada ao meio de cultivo para o melhor desenvolvimento crescimento e indução de tuberização.

4.2 Ajuste das variáveis a uma função contínua

Com as médias de cada tratamento procurou ajustar uma função contínua no intervalo entre 4 e 32 DAP com cada variável. As médias assim obtidas representam o efeito médio das interações entre os fatores Sac, Nit e BAP e serão a seguir apresentadas com a finalidade de caracterizar o comportamento médio de cada variável. Os gráficos de ajuste relacionados com o cultivo de ápices caulinares é apresentado na Figura 12 e os relacionados com o cultivo de segmentos nodais é apresentado na Figura 13.

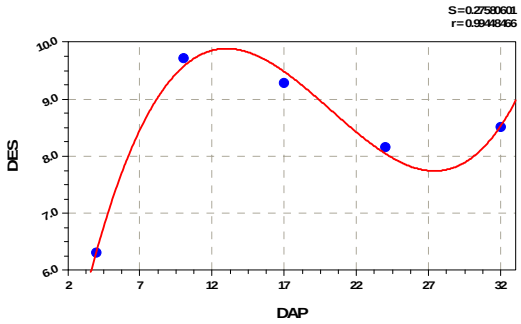
4.2.1 Desenvolvimento de ápices caulinares e segmentos nodais

As Figuras 12-A e 13-A mostram o comportamento médio da variável DES. Observa-se que no cultivo de ápices não foi possível ajustar-se uma função de comportamento aceitável biologicamente. A função apresentada, de terceiro grau, cumpre apenas o papel de demonstrar graficamente a evolução das médias até 32 DAP. Já no cultivo de segmentos nodais, os dados se ajustam à uma função raíz (quadrada), com crescimento contínuo, com tendência a um patamar.

A diferença de comportamentos característicos de acordo com MYASHITA et al. (1996) pode ser atribuída à maior quantidade de reservas e fitormônios endógenos normalmente observados em ápices. Os ápices meristemáticos possuem dominância apical e assim são mantidos pela planta até sua senescência, sendo, portanto, tecidos mais competentes e determinados para responder a estímulos exógenos. Os segmentos nodais, por outro lado, necessitam superar a dormência observada nos meristemas laterais e que é mais acentuada nas porções basais do caule, antes de responderem a outros estímulos.

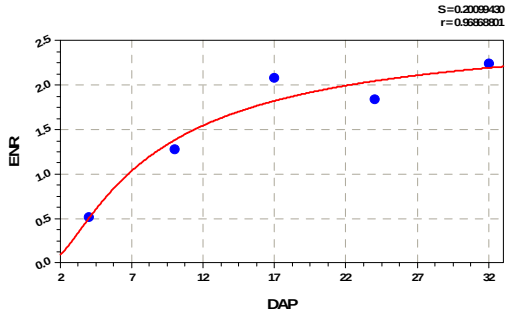
Segmentos nodais possuem também menor quantidade de reservas e precisam buscar no meio de cultivo os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento, enquanto os ápices possuem reservas para a nutrição dos tecidos por mais tempo. Quando há o esgotamento das reservas dos ápices, o explante passa a depender dos

nutrientes presentes no meio de cultivo, ocorrendo o enraizamento e o desenvolvimento dos ápices, o mesmo foi verificado por MYASHITA et al. (1996)



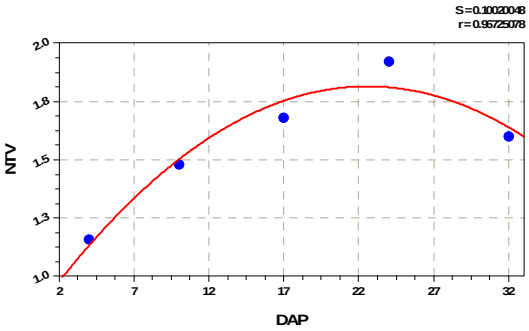
3rd degree Polynomial Fit: y=a+bx+cx^2+dx^3...
a = 1.5562947
b = 1.5254249
c = -0.086674658
d = 0.0014321987

A)



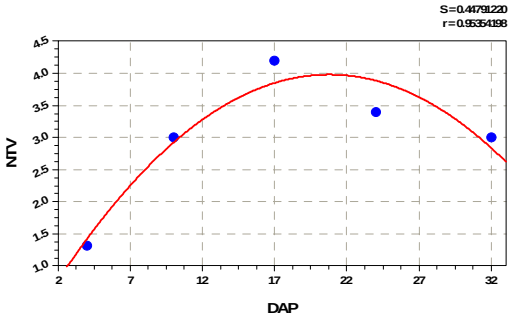
Modified Exponential: y=a*e^(b/x)
a = 2.7078944
b = -6.7085598

B)



Quadratic Fit: y=a+bx+cx^2
a = 0.80803832
b = 0.089282487
c = -0.0019789366

C)



Quadratic Fit: y=a+bx+cx^2
a = 0.060396068
b = 0.37762741
c = -0.0090950449

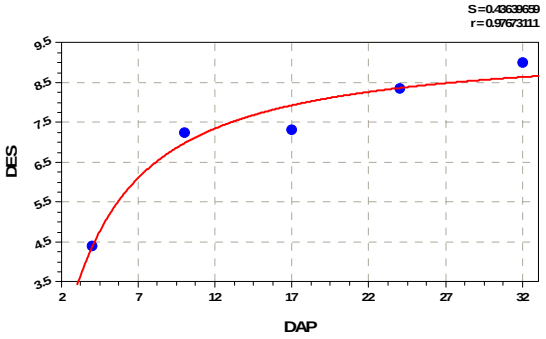
D)

Figura 12. Médias dos experimentos com o cultivo de ápices caulinares em datas sucessivas de avaliação: A) DES; B) ENR; C) NTR e D) NTV

4.2.2 Enraizamento de ápices caulinares e segmentos nodais

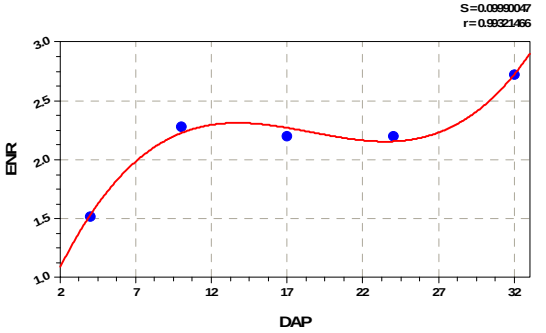
As Figuras 12-B e 13-B mostram o comportamento médio do enraizamento de ápices caulinares e segmentos nodais de batata até 32 DAP. Os valores médios observados são de pequena magnitude, demonstrando que a maioria das combinações de tratamentos não foram eficientes nesse aspecto. Percebe-se, no entanto, que o enraizamento dos ápices ajustou-se a uma função exponencial crescente e que ainda apresentava tendência de crescimento aos 32 DAP. Já o enraizamento dos segmentos nodais ajustou-se apenas a um polinômio de terceiro grau, cuja função é apresentada apenas a título ilustrativo do seu comportamento. Os prováveis motivos para esse tipo

de comportamento já foram em parte discutidos no item anterior. Ressalta-se, porém, que enquanto, o enraizamento dos ápices caulinares tende a ser efetivo a partir do plaqueamento, o enraizamento dos segmentos nodais tem sua iniciação verificada logo após o plaqueamento, mantendo-se em seguida num patamar para finalmente, após o provável re-equilíbrio hormonal endógeno, retomar o enraizamento com maior intensidade.



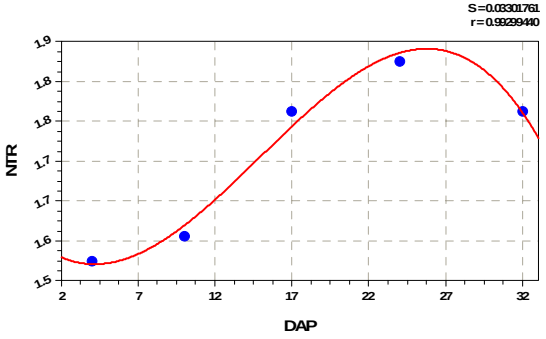
Root Fit: y=a^(1/x)
a = 9.520875
b = 0.04509654

A)



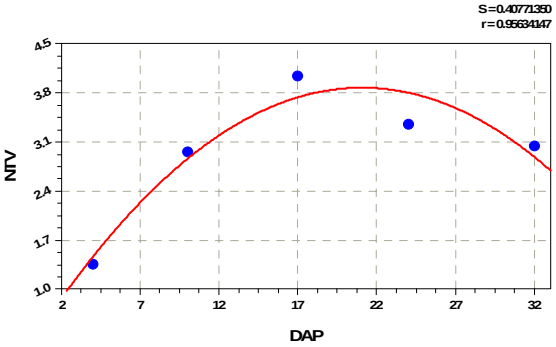
3rd degree Polynomial Fit: y=a+bx+cx^2+dx^3...
a = 0.50755465
b = 0.32722739
c = -0.018916215
d = 0.00033937213

B)



3rd degree Polynomial Fit: y=a+bx+cx^2+dx^3...
a = 1.5978402
b = -0.021947862
c = 0.0030756851
d = -6.8604801e-005

C)



Quadratic Fit: y=a+bx+cx^2
a = 0.20629082
b = 0.34868968
c = -0.0082830207

D)

Figura 13 Médias dos experimentos com o cultivo de segmentos nodais em datas sucessivas de avaliação: A) DES; B) ENR; C) NTR e D) NTV

4.2.3 Notas de Enraizamento de ápices caulinares e segmentos nodais

O comportamento médio das notas de enraizamento de ápices caulinares e segmentos nodais de batata até os 32 DAP é apresentado nas Figuras 12-C e 13-C.

A exemplo das variáveis anterior, também se observou falta de ajuste para o cultivo de segmentos nodais. As médias dos experimentos se situaram numa faixa

estreita e baixa, entre 1,0 e 2,0 enquanto o máximo da escala é de 8,0. O cultivo de ápices ajustou-se a uma quadrática com máxima igual a 1,86, observada aos 23 DAP valores aproximadamente idênticos aos obtidos com o cultivo de segmentos nodais na época da quarta avaliação, aos 24 DAP.

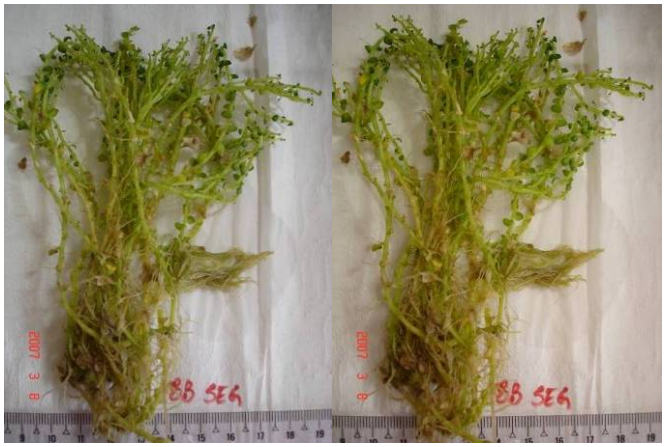
Apesar da ausência de ajuste, a disposição das médias dos experimentos em relação aos segmentos nodais permite concluir que a qualidade do enraizamento recebeu notas muito baixas até por volta dos 10 DAP e a partir desse ponto assume valores cada vez maiores até atingir o máximo aos 24 DAP, voltando em seguida a decair. É provável que se o experimento continuasse por mais tempo, talvez os explantes retomassem o seu desenvolvimento, depois de nutridos pelo meio.

4.2.4 Notas de vitrificação de ápices caulinares e segmentos nodais

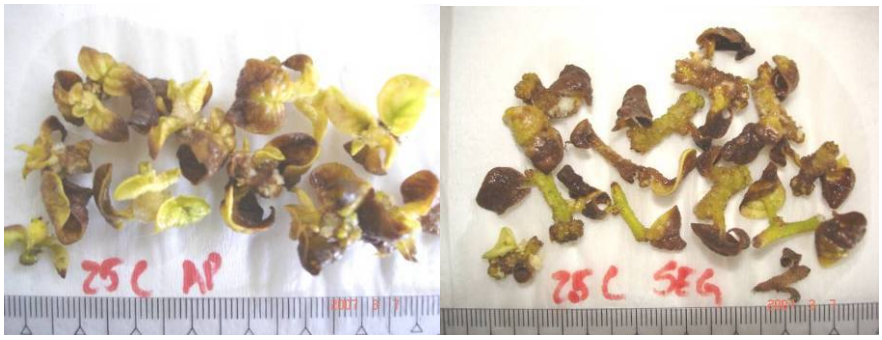
As notas de vitrificações estão relacionadas com a pressão osmótica dos tecidos que geralmente são associadas a altas concentrações de Sac, Nit e BAP. Observou-se durante o acompanhamento da experimentação que inicialmente o BAP favorece a vitrificação, com os explantes desenvolvendo calos nas extremidades. Esses calos vão se diferenciando e as gemas axilares formadas a partir desses calos brotam e a partir daí há uma redução no sintoma de vitrificação.

As médias do cultivo de ápices e o de segmentos nodais, Figuras 12-D e 13-D, ajustaram-se a funções quadráticas com nota de vitrificação máxima aos 21 DAP, alcançando 4,0 no cultivo de ápices e 3,9 no cultivo de segmentos. Várias combinações de tratamentos favoreceram a vitrificação, mas esta ocorreu principalmente nas doses mais elevadas de BAP.

A)



B)



C)

D)

Figura 14 Tratamentos: A) Ápices. B) Segmentos e ápices C) Ápices e segmentos. Tecidos vitrificados. D) Tubérculos obtidos através de ápices

5. CONCLUSÕES

a) Foram desenvolvidos três sistemas biorreatores de baixo custo, fácil utilização e de elevado rendimento para o cultivo de mudas de batata durante os experimentos preliminares que apoiaram este trabalho;
b) É possível produzir mudas de qualidade em sistemas de biorreatores, principalmente se for para rápida multiplicação do lote, com menos mão de obra.;
c) O protótipo IV é ideal para experimentos fatoriais de 1/5 de 5X5X5;
d) A adição de 6-Benzil-aminopurina tem ação depressiva sobre a produção de mudas e microtubérculos de batata em sistema BIT;
e) Para a produção de mudas *in vitro* de batata através de ápices caulinares, a concentração adequada de Nitrato de Amônio é proximo a 1958, 83 $mg.L^{-1}$;
f) A concentração de sacarose para a produção de mudas de batata a partir de ápices caulinares em sistemas BIT é da ordem de 48,67 $mg.L^{-1}$;
g) Para a produção de mudas *in vitro* de batata através de segmentos nodais, a concentração adequada de Nitrato de Amônio é proximo a 2819,51 $mg.L^{-1}$;
h) A concentração de sacarose para a produção de mudas de batata a partir de ápices caulinares em sistemas BIT é da ordem de 70,2 $mg.L^{-1}$;
i) Para a produção de mudas micropropagadas de batata em sistemas BIT a concentração de 6-Benzil-aminopurina se encontra em niveis muito baixos, próximos a nulidade;
j) As concentrações de 6-benzil-aminopurina, nitrato de amônio e sacarose na produção de microtubérculos de batata em sistemas BIT precisam ser melhor estudadas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL 2004. Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo, FNP Consultoria, 2003

AGRIANUAL 2006. Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo, FNP Consultoria, 2005

AITKEN – CHRISTIE, J.; DAVIES, H. E.; Development of a Semi – Automated Micropropagation System. In: High Technology in Protected Cultivation. Acta Horticulturae, Vol. 230, p. 81-87, 1988

AKITA, M. & OHTA, Y., A simple method for mass propagation of potato (Solanum tuberosum L.)using a bioreactor without forced aeration. **Plant Cell Reports** Vol. 18, p. 284-287, 1998.

AKITA, M. & TAKAYAMA, S. Mass propagation of Potato Tubers Using Jar Fermentor Techniques. In: High Technology in Protected Cultivation. Acta Horticulturae, Vol. 230, p. 55-61, 1988.

BAJAJ, Y. P. S. (Ed). Biotechnology in Agriculture and Forestry: Crops I. Springer-Verlag, Berlim Vol. 2, 1986.

BAJAJ, Y. P. S. (Ed). Biotechnology in Agriculture and Forestry: Potato. Springer-Verlag, Berlim Vol. 3, 1987.

BORÉM, A.; VIEIRA, M.L.C. Glossário de Biotecnologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 183p., 2005.

BRASIL, 2005 Instrução de Serviço Nº 2, DE 19 DE ABRIL DE 2005

BUDDENDORF-JOOSTEN, J.M.C.; WOLTERING, E.J. Controlling the gaseous composition in vitro - description of a flow system and effects of the different gaseous components on in vitro growth of potato plantlets. **Scientia Horticulturae** Vol. 65, p. 11-23, 1995.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios de Nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S. & BUSO, J. A. (EDS.) 1998. Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. Embrapa. Vol.1, p.87 – 132, 1998.

CASSELLS, A. C. Contamination and its Impact in Tissue Culture. In: SORVARI, S. et al. (Eds.) Proc. IV IS on *In Vitro* Cult. & Hort Breeding. **Acta Horticulturae**, Vol. 560, p. 353-359, 2001

CASSELLS, A. C. Problems in Tissue Culture: Culture Contamination. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Eds.) Micropropagation. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, p.31-44, 1991.

CASSELLS, A. C. Aseptic Microhydroponics: A Strategy to Advance Microplant Development and Improve Microplant Physiology. **Acta Horticulturae** Vol. 530, p. 187-194, 2000.

CASSELLS, A.C.; JOYCE, S.M.; O' HERLIHY, E.A.; PEREZ-SANZ, M.J.; WLASH, C. Stress and Quality *In Vitro* Culture. In: Proc. XXVI IHC – Biotecnology in Hort. Crop Improvement, **Acta Horticulturae**, Vol. 625, p. 153-164, 2003.

CID, L. P. B.; CRUZ, A. R. R. & TEIXIERA, J. M. Biorreatores de Imersão Permanente. **Biotecnologia – Ciência & Desenvolvimento**. Ano 4, n.25 Março-Abril/2002. p. 50-53, 2002.

COLEMAN, W. K. & COLEMAN, S. E., Modification of Potato Microtuber Dormancy During Induction and Growth In Vitro or Ex Vitro. **Am. J. of Potato Res**. Vol.77, p. 103-110, 2000.

CONAGIN, A.; JORGE, J. P. N. Delineamentos 1/5 de 5x5x5. **Bragantia**, Vol36, p. 23-58, 1977**.**

CUTTER, E. G. Structure and development of the potato plant. In: HARRIS, P.M. (ed.) **The potato Crop**. Chapman & Hall, London, p.65-161. 1992.

DANIELS, J.; SILVA, A.C.F.; SOUZA, Z.S.; SCHONS, J. Degenerescência de batata-semente básica após um ou dois períodos de cultivo. **Horticultura Brasileira**, Vol. 20, n.3, p. 510-513. 2002.

DEBERGH, P. C.; AITKEN – CHRISTIE, J.;COHEN, D.; GROUT, B.; VON ARNOLD, S.; ZIMMERMAN, R.; ZIV, M. Reconsideration of the Term 'Vitrification' as Used in Micropropagation**. Plant Cell. Tiss. Org. Cult**. Vol. 30 p. 135-140. 1992.

DEBERGH, P. C.; HARBAOUI, Y.; LEMEUR, R. Mass Propagation of Globe Artichoke (*Cynara scolymus*): Evaluation fo Different Hypoteses to Overcome Vitrification with Special Reference to Water Potencial, **Physiol. Plant**. Vol. 53, p. 181-187. 1981.

DEBERGH, P. C.; VANDERSCHAEGHE, A. M. Some Symptoms Indicating the Presence of Bacterial Contaminants in Plant Tissue Cultures. In: Bacterial Contamination *In Vitro*. **Acta Horticulturae**, Vol. 225, p.77-81, 1988.

DESJARDINS, Y. Photosunthesis in vitro – On the Factors Regulating CO_2 Assimilation in Micropropation Systems. In: Environmental Control in Planta Tissue Culture. **Acta Horticulturae**, Vol.393, p. 45-61, 1995.

DODDS, J. H.; ROBERTS, L. W. (Eds.). Experiments in Plant Tissue Culture. Cambridge University Press, New York, USA, 3ª Edition, p. 255, 1995.

DONNELY, D. J.; COLEMAN, W. K. & COLEMAN, S. E., Potato Microtuber Production and Performance: A review. **Am. J. of Potato Res**. Vol.80, p. 103-115, 2003.

ESCALONA, M., SAMSON, G.; BORROTO, C.; DESJARDINS, Y. Physiology of Effects of Temporary Immersion Bioreactors on Micropropagated Pineapple Plantlets. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant., Vol.39, p. 651-656. 2003.

ETIENNE, H. & BERTHOULY, M. Temporary immersion systems in plant micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** Vol.69, p. 215–231, 2002.

EWING, E. E. The Role of Hormones In Potato (Solanum tuberosum L.) Tuberization. In: DAVIES, P. J. (Ed.) Plant Hormones, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, p.698-724, 1995.

FERREIRA, W.F. & BITTENCOURT, M.L.C. Novos Métodos Aplicados à Produção de Batata Semente. In Anais IV Seminário Mineiro de Bataticultura –Bataticultura Comercialização e Marketing. Poços de Caldas. MG. p. 121-124, 2003.

FERRI, M.G.; MENEZES, N.L.; MONTEIRO, W.R. Glossário Ilustrado de Botânica, Nobel, São Paulo, 1992.

FIGUEIREDO – RIBEIRO, R. C. L.; CHU, E. P.; ALMEIDA, V. P. Tuberização. In: KERBAUY, G. B. (Ed.). Fisiologia Vegetal. Ed. Guanabara Koogan SA. P. 409-420, 2006.

FORTI, E.; MANDOLINO, G.; RANALLI, P. *In Vitro* Tuber Induction : Influence of the Variety and of the Media. **Acta Horticulturae**, Vol. 300, p. 127-132, 1991.

FUJIWARA, K.; KIRA, S. & KOZAI, T. Contribution of photosynthesis to dry weight increase of in vitro potato cultures under different CO_2 concentrations. In: Environmental Control in Plant Tissue Culture. **Acta Horticulturae**, Vol. 393, p.119-126, 1995.

GAMBORG, O. L.; PHILLIPS, G.C. (eds) Plant Cell, Tissue and Organ Culture – Fundamental Methods. Springer Lab Manual. Springer – Verlag Berlin Heidelberg, German, p. 359,1995.

GARNER, N.; BLAKE, J. The Induction and Development of Potato Microtubers *In Vitro* on Media Free of Growth Regulating Substances. **Annals of Botany**, Vol. 63, p. 663-674, 1989.

GASPAR,T.; FRANCK, T.; BISBIS, B.; KEVERS, C.; JOUVE, L.; HAUSSMAN, J. F.; MMES, J. Concepts in Plant Stress Physiology. Application to Plant Tissue Cultures, **Plant Growth Regul.** Vol. 37, p. 263-285. 2002.

GOPAL, J.; CHAMAIL, A.; SARKAR, D. *In Vitro* Production of Microtubers for Conservation of Potato Germplasm: Effect of Genotype, Abscisic Acid, and Sucrose. **In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant.** Vol. 40, p.485–490. 2004.

GOPAL, J.; MINOCHA, J. L.; DHALIWAL, H. S. Microtuberization in Potato (*Solanum tuberosum* L.). **Plant Cell Reports**, Vol. 17, p. 794-798. 1998.

GRANJA, N. P. Capacidade produtiva de batata (S. tuberosum L.) cv. Aracy em função da densidade de plantio, tamanho e estádio fisiológico da semente**.** 1995. 85f. Tese (Doutorado em Agronomia) ESALQ-USP.

GRATTAPAGLIA, D. & MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. & BUSO, J. A. (Eds). Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. Embrapa, 1998. p. 183-260, 1998.

GRIGORIADOU, K.; LEVENTAKIS, N. Large Scale Commercial Production of Potato Minitubers, Using *in vitro* Techniques. **Potato Research,** Vol. 42, p. 607-610. 1999.

GRIGORIADOU, K.; LEVENTAKIS, N. Comparative Use of a Commercial Bioreactor System and Conventional Micropropagation for the Production of Potato Microtubers and Grape Myrtle (*Lagerstroemia indica*) Microshoots. In: ECONOMOU, A. S.; READ, P. E. (Eds). Proc. 1ª IS on Accl & Estab. Microprop. Plants. **Acta Horticulturae**, Vol. 616. p.369-373, 2003.

GRIBBLE, K.; SARAFIS, V.; NAILON, J.; HOLFORD, P.; UWINS, P. Environmental Scanning Electron Microscopy of the Surface of Normal and Vitrified Leaves of *Gypsophila paniculata* (Babies Breath) Cultured *in vitro,* Plant Cell. Rep. Vol. 15, p. 771-776. 1996.

HALE, S. A.; YOUNG, R. E.; ADELBERG, J. W.; KEESE, R. J.; CAMPER, N. D. Bioreactor Development for Continual – Flow, Liquid Plant Tissue Culture. **Acta Horticulturae,** Vol. 319, p.107-112. 1992.

HUSSEY, G.; STACEY, N. J. Factors Affecting the Formation of *In Vitro* Tubers of Potato (*Solanum tuberosum* L.). **Annals of Botany**, Vol. 53, p.564-578, 1984.

HULSCHER, M.; KRIJGSHELD, H. T. & JONGEDIJK, E. Mass Propagation of Potato Microtubers in Jar Fermentors. In: Plant Production in Closed Ecosystems. **Acta Horticulturae**, Vol. 440, p. 533-538, 1996.

HVOSLEF-EIDE, A. K.; MUNSTER, C.; HEYERDAHL, P. H.; LYNGVED, R.; OLSEN, O. A. S. Liquid Culture Systems for Plant Propagation. In: HAMMERSCHLAG, F. A.; SAXENA, P. (Eds) Proc. XXVI IHC – Biotecnology in Hort. Crop Improvement. **Acta Horticulturae**, Vol. 625, p.173- 185, 2003.

JACKSON, B. M. Aeration Stress in Plant Tissue Cultures. Bulg. J. Plant. Physiol. Special Issue, p. 96-109. 2003.

JIMÉNEZ, E.; PÉREZ, N.; FERIA, M.; BARBÓN, R.; CAPOTE, A.; CHÁVEZ, M.; QUIALA, E. & PÉREZ, J.C. Improved production of potato microtubers using a temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** Vol. 59, p.19–23. 1999.

KERBAUY, G.B. (Ed.) Fisiologia Vegetal, Guanabara Koogan SA, São Paulo. 2004.

KEVERS, C.; COUMANS, M.; COUMANS – GILLES, F.; GASPAR, T. Physiological and Biochemecal Events Leading to Vitrification of Shoots Cultured *in vitro,* **Phusiol. Plant.** Vol. 61, p. 69-74. 1984.

KEVERS, C.; FRANCK, T.; STRASSER, R. J.; DOMMES, J.; GASPAR, T. Hyperhydricity of Micropropagated Shoots : a typical Stress- Induced Change of Physiological State. **Plant. Cell. Tiss. Org. Cult**. Vol. 77, p. 181-191. 2004.

KHURI, S.; MOORBY, J. Investigations Into the Role of Sucrose in Potato cv.Estima Microtuber Production *in vitro.* **Annals of Botany** Vol. 75, p. 295 – 303. 1995.

KITAYA, Y.; SAKAMI, K. & KOZAI, T. Development of photoautotrophic Plant Tissue Culture System Using CO_2 from Shiitake Mushroom. Environmental Control in Plant Tissue Culture **Acta Horticulturae**, Vol. 393.. p. 195-202, 1995.

KOZAI, T. Acclimatization of Micropropagated Plants. In: Bajaj, Y.P.S. (ED.), Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol 17. High- Tech and Micropropagation I. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. p. 127-141, 1991a.

KOZAI, T. Autotrophic Micropropagation. In: Bajaj, Y.P.S (ED). Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 17 High-Tech and Micropropagation I. Springer-verlag Berlin Heidelberg. p. 313-343, 1991b.

KOZAI, T.; FUJIWARA, K. & KITAYA, Y. Modeling, Measurement and Control in Plant Tissue Culture. In: Environmental Control in Plant Tissue Culture. **Acta Horticulturae**, Vol. 393, p. 63-73, 1995.

KOZAI, T.; KUBOTA, C.; JEONG, B.R. Environmental Control for the Large-Scale Production of Plants Through *in Vitro* Techniques. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Vol. 51, p.49-56. 1997.

KOZAI, T.; WATANABE, K. & JEONG, B.R. Stem elongation and growth of Solanum tuberosum L. in vitro in response to photosynthetic photon flux, photoperiod and difference in photoperiod and dark period temperatures. **Scientia Horticulturae** Vol.64, p.l-9. 1995

KRAUSS, A. Interaction of Nitrogen Nutrition, Phytormones, and Tuberization. In: LI, P. H. (Ed.). Potato Phisiology. Academic Press, Orlando, Florida. p. 209-230, 1985.

KRIKORIAN, A.D. Hormones in Tissue Culture and Micropropagation. In: DAVIES, P.J. (Ed.). Plant Hormones. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, p. 774-796, 1995.

KUBOTA, C. & KOZAI, T. Growth and Net Photosynthetic Rate of *Solanum tuberosum L.* in Vitro under Forced and Natural Ventilation. **Hort Science**, Vol.27 n.12, p.1312-1314, 1992.

LEMOS, E. E. P.; FERREIRA, M. S.; ALENCAR, L. M. C.; OLIVEIRA, J. G. L.; MAGALHÃES, V. S. Micropropagação de Clone de Banana CV. Terra em Sistema de Biorreator de Imersão Temporária. **Rev. Bras. Frutic. Jaboticabal**, Dezembro Vol. 23, n.3, p. 482-487, 2001.

LEVIN, R.; ALPER, Y.; STAV, R. & WATAD, A. Methods and apparatus for liquid media and semi-automated micropropagation. In*:* Hort. Biotech. In Vitro Cult. And Breeding. **Acta Horticulturae**, Vol. 447, p. 659-663, 1997.

LI, P. H. (Ed.). Potato Physiology. Academic Press, Inc. Orlando, Florida, 586p. 1985.

LORENZO, J.C.; GONZALES, B; ESCALONA, M.; TEISSON, C.; ESPINOSA, P.; BORROTO, C.G. Sugar cane shoot formation in an improved temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.54, n.3, p.197-200, 1998.

LONG, R. D.; CURTIN, T. F.; CASSELLS, A. C. An Investigation of the Effects of Bacterial Contaminants on Potato Nodal Cultures. In: Bacterial Contamination *In Vitro*. **Acta Horticulturae**, Vol. 225, p.83-91, 1988.

MARES, D. J.; SOWOKINOS, J. R.; HAWKER, J. S. Carbohydrate Metabolism in Developing Potato Tubers. In: LI, P. H. (Ed.). Potato Physiology. Academic Press Inc. Orlando, Florida, p. 279-327, 1985.

MIRANDA FILHO, H. S.; GRANJA, N. P.; MELO, P. C. T. Cultura da Batata. Apostila. Vargem Grande do Sul. 69p. 2003

MIYASHITA, Y.; KITAYA, Y.; KUBOTA, C.; KOZAI, T. Photoautotrophic Growth of Potato Plantlet as Affected by Explant Leaf Area, Fresh weIght and Stem Length. **Scientia Horticulturae** Vol. 65, p. 199-202. 1996.

MORENO, U. Environmental Effects on growth and Development of Potato Plants. In*:* Li, P.H. (Ed). Potato Physiology. Academic Press Inc. Orlando, Florida, p. 481-501. 1985.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised Medium For Rapid Growth and Biossays With Tobacco Tissue Culture. **Physiol. Plant**. Vol.15, p. 473-497, 1962.

NASCIMENTO, L. C.; PIO-RIBEIRO, G.; WILLADINO, L.; ANDRADE, G. P. Stock Indexing and Potato Vírus Y Elimination From Potato Plants Cultivated *in Vitro.* **Scientia Agricola**. Vol.60, n.3, Jul./Sept., p. 525-530. 2003.

NHUT, D.T.; NGUYEN, N.H.; THUY, D.T.T. A Novel *In Vitro* Hydroponic System for Potato (*Solanum tuberosum* L.) Microtuber Production. **Science Horticulturae**. Vol. 110 p. 230-234, 2006.

NIU, G.; KOZAI, T. & MIKAMI, H. Simulation of the effects of Photoperiod and Light Intensity on the growth of Potato Plantlets Cultured Photoautotrophically in Vitro. In: *Plant Production in Closed Ecosystems*. **Acta Horticulturae**, Vol. 440, p. 622-627, 1996.

OSAKI, M. Busca da Eficiência na Bataticultura. In Anais IV Seminário Mineiro de Bataticultura: “Bataticultura - Comercialização e Marketing”. Poços de Caldas, MG. EPAMIG – FECD, p.75-87. 2003.

PAEK, K. Y.; HAHN, E. J.; SON, S. H. Application of Bioreactors for Large-Scale Micropropagation Systems of Plants. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant** Vol.37, p.149-157. 2001

PAES, A. P. M.; SILVA, J.X. A Importância da Qualidade da Batata-Semente na Redução do Custo de Produção. In Anais IV Seminário Mineiro de Bataticultura – Bataticultura Comercialização e Marketing. Poços de Caldas. MG. p. 55-58, 2003.

PAQUES, M.; BOXUS, P. Vitrification: Review of Literature. **Acta Horticulturae.** Vol. 212, p.155-166. 1987

PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L. Protocolo para Produção de Material Propagativo de Batata em Meio Líquido. **Pesq. Agropec. Bras.**, Vol. 38, n. 9, p. 1035-1043. 2003.

PIAO, X. C.; CHAKRABARTY, D.; HAHN, E. J. & PAEK, K. Y. A Simple method for mass production of potato microtubers using a bioreactor system. **Current Science**. Vol.84, n.08, p. 1129-1132, 2003.

PREIL, W. Application of Bioreators in Plant Propagation. In: Bajaj, Y.P.S (ED). Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 17 High-Tech and Micropropagation I. Springer-verlag Berlin Heidelberg. p. 425-445, 1991.

PREIL, W.; FLOREK, P.; WIX, U.; BECK, A. Towards Mass Propagation by Use of Bioreactors. In: Propagation of Ornamentals, **Acta Horticulturae**, Vol. 226, p. 99-106, 1988.

PRUSKI, K.; ASTATKIE, T.; MIRZA, M.; & NOWAK, J. Photoautotrophic micropropagation of Russet Burbank Potato. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. Vol. 69, p. 197–200, 2002.

PRUSKI, K.; STRUIK, P.C.; NOWAK, J. Micropropagation Technology in Early Phases of Commercial Seed Potato Production. In: Proc. XXVI IHC – Potatoes – Healthy Food for Humanity. **Acta Horticulturae**, Vol. 619, p. 419-426, 2003.

PUGA, N.T.; NASS, L.L.; AZEVEDO, J.L. Glossário de Biotecologia Vegetal, Ed. Manole Ltda. São Paulo, 82p., 1991.

REFOUVELET, E.; DAGUIN, F.; BUFFET, D.; FOREST, L. & LETOUZÉ, R. Effect of Different Media and of a CO_2- Enriched Atmosphere on Growth of Lilac (*Syringa vulgaris L.*) Vitroplants. In: *Proc.* Int. Symp. On Meth. And Marks. For Qual. Assur. In Micropropagation. **Acta Horticulturae**. Vol. 530, p. ? 2000.

ROCHE, T. D.; LONG, R. D.; SAYEGH, A. J. & HENNERTY, M. J. Commercial-scale Photoautotrophic Micropropagation: Applications in Irich Agriculture, Horticulture and Forestry. In: Plant Production in Closed Ecosystems. **Acta Horticulturae**,Vol. 440. p.515-520, 1996.

RODRIGUES, P. H. V.; TEIXEIRA, F. M.; LIMA, A. M. L. P.; AMBROSANO, G. M. B. Propagação de mudas de Helicônia em Biorreator de Imersão Temporária. **Bragantia,** Vol. 65, n.1, p. 29-35, 2006

SANGWAN – NORREEL, B.; DUBOIS, F.; FLANDRE, F.; LAVIEVILLE, L.; SANGWAN, H. P. R. In Vitro Culture and Plant Improvement. **Acta Horticulturae**, Vol.289, p. 19-32, 1991.

SEABROOK, J. E. A. Light Effects on the Growth and Morphogenesis of Potato (*Solanum tuberosum* L.) *In Vitro*: A Review. **American Journal of Potato Research**, Vol. 82, p.353-367, 2005

SEABROOK, J. E. A.; DOUGLASS, L. K.; ARNOLD, D. A. Effect of Leaves on Microtubers Produced from Potato Single – Node Cuttings *In Vitro*. **American Journal of Potato Research**, Vol. 81 p. 1-5, 2004

STALLKNECHT, G. F. Tuber Initiation in *Solanum tuberosum*: Effect of Phytormones and Induced Changes in Nucleic Acid and Protein Metabolism. In: LI, P. H. (Ed.). Potato Physioloy. Academic Press Inc. Orlando, Florida, p. 231-260, 1985.

SAHER, S.; FERNÁNDEZ – GARCÍA, N.; PIQUERA, A.; HELLÍN, E.; OLMOS, E. Reducing properties, energy efficiency and carbohidrate metabolism in hyperhydric and

normal carnation shoots cultured *in vitro*: a hypoxia stress. Plant Phisiology and Biochemestry, Vol. 43 p. 573-582. 2005.

TAKAYAMA, S. Mass Propagation of Plants Through Shake and Bioreactor- Culture Techniques. In*: Bajaj. Y.P.S. (Ed.*)Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol.17. High-Tech and Micropropagation I. Springer-Verlag Berlin Heindelberg. p. 495-515, 1991.

TAO, G.; YIN, W.; GONG, G.; TSUI, C. *In Vitro* Production and Release of Potato Varieties in China. In: Bajaj, Y. P. S. (Ed), Biothnology in Agriculture and Forestry. Spring – Verlag, Berlin.Vol. 3, p. 62-78. 1987

TEISSON, C.; ALVARD, D. *In Vitro* Production of Potato Microtubers in Liquid Medium Using Temporary Immersion. **Potato Research,** Vol. 42, p. 499-504. 1999

TEISSON, C.; ALVARD, D.; BERTHOULY, B.; CÔTE, F.; ESCALANT, J. V.; ETIENNE, H. & LARTAUD, M. Simple Apparatus to Perform Plant Tissue Culture by Temporary Immersion. In: Plant Production in Closed Ecosystems. **Acta Hort**.**Vol.** p.521-526. 1996.

TEIXEIRA, J.B. Biorreatores. **Biotecnologia – Ciência & Desenvolvimento**. Ano 4, n.24 Janeiro-Fevereiro/2002. p. 36-41.

TEIXEIRA, D. M. C. ; PINTO, J. E. B.P. Minituberização da Batata em Diferentes Níveis de N, Sacarose e BAP. **R. Brás. de Fisiol. Veg.** Vol. 3 n.2 p. 77-81. 1991.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. Brasília, EMBRAPA-CNPH, 1998. Vol.1, 509 p.

TORRES, A.C.; FERREIRA, A.T.; SÁ, F.G.; BUSO, J.A.; CALDAS, L.S.; NASCIMENTO, A.S.; BRÍGIDO, M.M.; TOMANO, E. Glossário de Biotecnologia Vegetal, CBAB. Brasília, EMBRAPA- Hortaliças, 128p. 2000.

VREUGDENHIL, D.; STRUIK, P. C. An Integrated View of the Hormonal Regulation of Tuber Formation in Potato (*Solanum tuberosum* L.). **Physiol. Plant**., Vol. 75, p. 525-531. 1989.

VREUGDENHIL, D.; BOOGAARD, Y.; VISSER, R. G. F.; BRUIJN, S. M. Comparison of Tuber and Shoot Formation from *in vitro* Cultured Potato Explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Vol.53, p.197-204. 1998.

WANG, P.J.; HU, C.Y. Potato Tissue Culture and its Applications in Agriculture. In: Li, P. H. (Ed), Potato Physiology. Academic Press, Orlando, Florida. p. 503-577, 1985.

WANG, P.J.; HU, C.Y. In Vitro Mass Tuberization and Vírus Free Seed – Potato Production in Taiwan. **American Potato Journal**, Vol.59, p. 33-37, 1982.

WOLF, S.; KALMAN-ROTEM, N.; YAKIR, D. & ZIV, M. Autotrophic and Heterotrophic Carbon Assimilation of in vitro Grown Potato (*Solanum tuberosum L.)* Plants. **J. Plant Physiology**. Vol.153, p. 574-580, 1998.

XU, X.; VAN LAMMEREN, A. M.; VERMEER, E.; VREUGDENHIL, D. The Role of Gibberellin, Abscisic Acid, and Sucrose in the Regulation of Potato Tuber Formation *In Vitro*. **Plant Physiol**., Vol. 117, p. 575-584, 1998.

YU, W. C.; JOYCE, P. J.; CAMERON, D. C.; McCOWN, B. H. Sucrose Utilization During Potato Microtuber Growth in Bioreactors. **Plant Cell Reports**, Vol. 19, p. 407-413. 2000.

ZARRABEITIA, A.; LEJARCEGUI, X.; VERAMENDI, J.; MINGO – CASTEL, A. M. Influence of Nitrogen Supply on Micropropagation and Subsequent Microtuberization of Four Potato Cultivars. **American Potato Journal**, Vol. 74, p. 369-378, 1997.

ZIV, M. Morphogenic Control of Plants Micropropagated in Bioreactor Cultures And its Possible Impact on Acclimatization. In: Transplant Production Systems, **Acta Horticulturae**, Vol. 319, p. 119-124, 1992.

ZIV, M. The Control of Bioreactor environment for plant Propagation in Liquid Culture. In: Environmental Control in Plant Tissue Culture. **Acta Hort**. Vol.393, p.25-38, 1995.

ZIV, M. Vitrification: Morphological and Physiological disorders of *In Vitro* Plants. In: Bajaj, Y.P.S (ED). Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 17 High-Tech and Micropropagation I. Springer-verlag Berlin Heidelberg. p. 45-57, 1991.

ZIV, M.; CHEN, J. VISHNEVETSKY, J. Propagation of Plants in Bioreactors: Prospects and Limitations. In: ECONOMOU, A.S.; READ, P.E. (Eds) Proc 1ª IS on Accl. & Estab. Microprop. Plants, **Acta Horticulturae**, Vol. 616, p.85-93, 2003.

ZOBAYED, S. M. A.; AFREEN, F. & KOZAI, T. Quality Biomass Production Via Photoautotrophic Microrpropagation. **Acta Hort.** Vol.530, p. 377-386, 2000.

ZOBAYED, S. M. A.; ARMSTRONG, J.; ARMSTRONG, W. Micropropagation of Potato: Evaluation of Closed, Diffusive and Forced Ventilation on Growth and Tuberization. **Annals of Botany,** Vol. 87, p. 53-59. 2001.

7. GLOSSÁRIO

Autotrófico: organismo capaz de se nutrir utilizando gás carbônico ou carbonato como fonte exclusiva de carbono, obtendo energia de radiação solar, ou alguma fonte de energia luminosa, ou então da oxidação de elementos orgânicos, como ferro, enxofre, hidrogênio, amônio e nitritos.

BAP: 6- Benzilaminopurina, citocinina, que promove a divisão celular, .

Cutura de Ápices Caulinares: Cultura de gemas laterais ou axilares (explantes com dimensões maiores que 1mm), utilizada para propagação em massa.

Cultura de Meristemas: Cultura de meristemas, que compreende somente a região meristemática (tamanho do explante inferior a 1mm), utilizada geralmente para limpeza virotica

Explantes: Partes ou cortes de plantas.

Fotoautotrofico: organismo capaz de produzir hidratos de carbono a partir de água e CO_2, para poder se nutrir, utilizando a energia luminosa para quebra dos compostos inorganicos.

Gema: Célula ou grupo de células para a propagação de plantas.

Gema Apical: Região apical das gemas vegetais com células que se dividem ativamente.

Gemas Axilar: Região axilar da gema que se divide ativamente.

Heterotrofico: organismo incapaz de sintetizar seu próprio alimento a partir de compostos inorgânicos, necessitando de materiais orgânicos complexos como fonte de energia e substratos para o seu crescimento e/ou desenvolvimento.

Mixotrofico: Mistura de autotrófico com heterotrófico ou seja, produz seu próprio alimento através de componentes inorgânicos, mas também faz uso de alimento fornecido pelo ambiente para o seu crescimento e/ou desenvolvimento.

Microtubérculos: tubérculos com tamanho inferior a 0,5 cm de diâmetro, e peso menor que 1 g, produzidos em técnicas *in vitro*

Plântula: Pequeno caule enraizado ou embrião germinado (Puga, 1991), planta que se desenvolve após a germinação da semente ou planta recém germinada (Torres, 2000)

8 ANEXOS

Anexo I – Avaliação de tipos de explantes e indução à tuberização em meio líquido e meio sólido 71
Anexo II – Desenvolvimento dos protótipos de biorreatores 73
Anexo III – Rotina de programação do SAS para análises da variância e da regressão polinomial múltipla 79
Anexo IV – Justificativa do modelo adotado, análise da regressão polinomial múltipla e interpretação dos resultados. 81

Anexo I – **Avaliação de tipos de explantes e indução à tuberização em meio líquido e meio sólido**

Desenvolveu-se uma série de experimentos exploratórios utilizando explantes contendo ápices caulinares, segmentos nodais com uma e duas gemas axilares, incubação em meio de cultivo líquido e sólido para a verificação do comportamento e do tipo de explantes que proporciona melhor resposta em meio líquido. Os explantes utilizados nos experimentos, foram retirados de plantas plaqueadas 15 dias antes.

As parcelas foram compostas de 10 explantes, incubados em meio líquido e em meio sólido, com doses de sacarose de 30 $g.L^{-1}$ e de 80 $g.L^{-1}$, com 3 repetições, a 25 ºC e fotoperíodo de 16 horas.

As avaliações consistiram de: a) resposta dos explantes em meio líquido à adaptação, crescimento e desenvolvimento; b) altura do meio de cultivo em relação ao explante e o seu posicionamento no frasco de cultivo; c) indução à tuberização por concentração de sacarose; d) outras observações, para a melhoria do cultivo de explantes em meio líquido.

As principais conclusões desses experimentos foram:

a) Explantes cultivados em meio líquido tiveram o estabelecimento inicial mais demorado, mas a partir desse ponto, o seu desenvolvimento foi superior àqueles cultivados em meio sólido;

b) explantes cultivados em meio líquido resultaram em mudas mais vigorosas (Figura 15). Onde o aproveitamento de nutrientes foi aparentemente superior, uma vez que a taxa de explantes induzidos e o tamanho de microtubérculos foram maiores. Quando houve a reintrodução desse material em meio sólido, as respostas obtidas num curto espaço de tempo, foram superiores aos cultivados unicamente em meio solidificado. Estes resultados contrariam aqueles obtidos por PRUSKI et al, 2003.

c) microtubérculos resultantes de crescimento em meio líquido foram maiores e tiveram produção mais precoce em relação aos obtidos em meio solidificado;

d) explantes contendo duas gemas proporcionaram maior desenvolvimento e tiveram maiores rendimentos que os de gema única. O comportamento de ápices caulinares e segmentos duplos foram semelhantes;

e) a dose ótima de sacarose para o cultivo de ápices foi igual a 30 $g.L^{-1}$, não se observando ganhos com o aumento dessa concentração. Doses superiores resultaram no espessamento do explante, o que é indicativo de forte indução à tuberização, não se

observando porém a formação de tubérculos. Explantes com duas gemas, cultivados com 80 $g.L^{-1}$ de sacarose, produziram tubérculos sem a presença de estolhos, resposta característica de forte indução à tuberização.

(A)

(B)

Figura 15. Mudas de batata cultivados em (A) Meio Líquido e (B) Meio Solidificado

f) os explantes tiveram crescimento normal quando umedecidas pelo contato com o substrato. Quando as gemas ficaram submersas ou o nível da solução nutritiva ultrapassou a metade do explante, ocorreu vitrificação;

g) o correto posicionamento do explante sobre o substrato é fundamental para o cultivo em meio líquido. Deve ser evitada a movimentação do explante pois a batata apresenta elevada polaridade para seus hormônios endógenos e qualquer mudança de posição resulta em maior tempo de resposta na retomada do crescimento;

i) pode ocorrer indução da tuberização na batata como consequência de uma elevada amplitude térmica ou pela sucessão de temperaturas elevadas precedidas por períodos frios. Segundo MORENO (1985), o acúmulo de carboidratos nas folhas produzidos durante o período de temperatura elevada favorece a sua translocação para os tubérculos em menor temperatura. Temperaturas da ordem de 38 a 40 ºC, alcançadas em nossos experimentos, induziram a tuberização nas variedades Agata e Cupido.

As principais conclusões e recomendações deste primeiro grupo de experimentos foram: a) utilização de explantes formados por ápices caulinares e segmentos nodais contendo duas gemas; b) uso de algodão hidrófílo para a sustentação dos explantes; c) posicionar os explantes com as gemas voltadas para cima; d) o nível de solução nutritiva deve ser o suficiente para o molhamento do substrato; e) evitar o turbilhonamento da solução nutritiva para que não haja a movimentação dos explantes; f) o turno de molhamento dos explantes depende da evapotranspiração das mudas *in vitro*, mas não deve ser superior a uma semana, para evitar deficiência de nutrientes; g) a temperatura da câmara de crescimento não deve ultrapassar a 25 ºC (±3).

Anexo II – **Desenvolvimento dos protótipos de biorreatores**

Nesta fase de experimentação preliminar, foram construídos quatro protótipos de biorreatores, utilizando diferentes sistemas para a transferência de solução nutritiva. Foram utilizados: um compressor de ar; uma bomba submersa de água de aquário; uma bomba elétrica de gasolina para carro e transferência gravitacional manual. Dos quatro protótipos desenvolvidos foi selecionado aquele que teve melhor desempenho, menor taxa de contaminação e facilidade de montagem e manejo.

Protótipo I - Bomba submersa de aquário.

Neste protótipo foram utilizados: vasilhame de pirex de 3l, uma bomba submersa de aquário, frascos de plástico de 500 ml não autoclaváveis com tampa, mangueira plástica transparente com diâmetro de 6mm, conexões do tipo utilizadas em irrigação por microaspersão e mangueiras de silicone de 6 mm de diâmetro. A montagem foi de acordo com a figura 16.

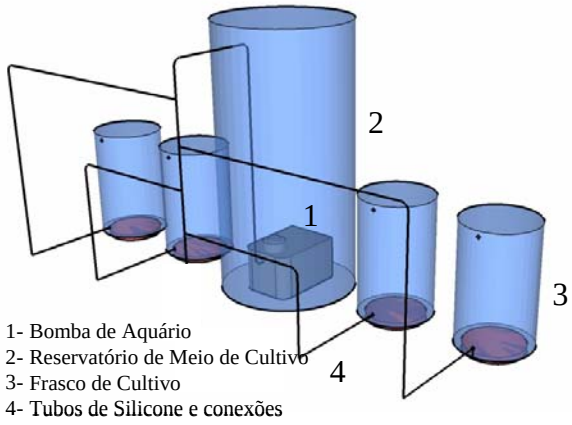


Figura 16. Esquema de Biorreator de imersão temporária com bomba submersa

Protótipo II - Bomba de compressor de ar.

Neste protótipo foram utilizados: um balão de pirex de 3l, bomba compressora de 300 psi, frascos plástico de 500 ml não autoclaváveis com tampa, mangueiras de silicone de 6 mm de diâmetro, filtro do tipo milipore de 0,22 µm (figura 17).

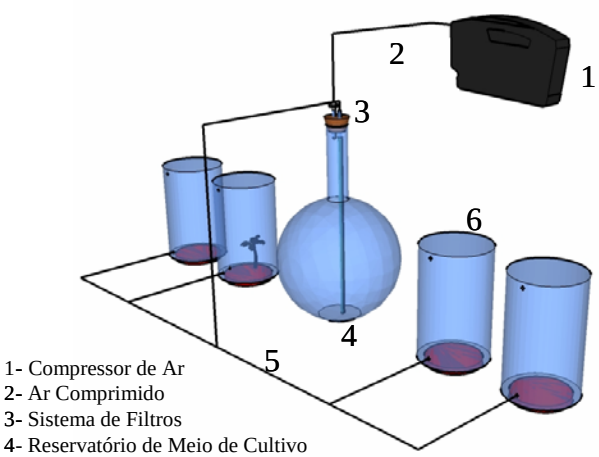


Figura 17. Biorreator de imersão temporária com compressor ar

Protótipo III - Bomba de injeção de gasolina de automóvel.

Utilizaram-se os mesmos materiais do protótipo II, substituindo o compresssor por uma bomba injetora de gasolina (esquema da figura 18).

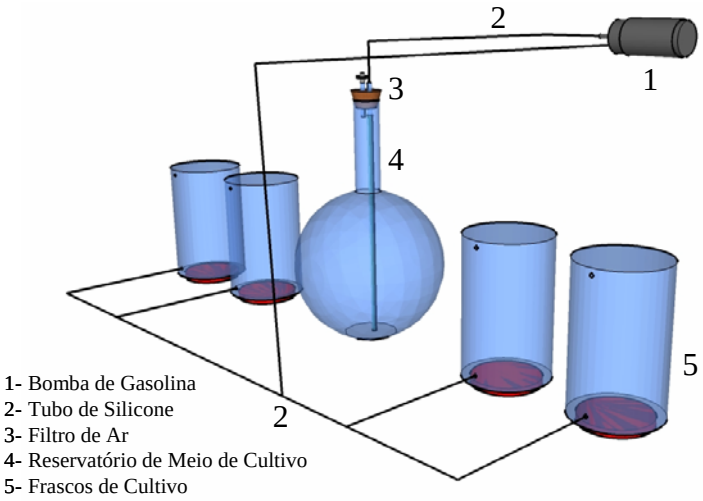


Figura 18. Biorreator de imersão temporária de bomba injetora

Protótipo IV - Biorreator de imersão temporária.

Os materiais utilizados foram: potes de plástico pet, com capacidade de 2900 ml e 1000 ml, bicos nebulizadores, conectores de irrigação, filtros tipo milipore de 0,22µm e tubos de silicone de 6mm de diâmetro (esquema da figura 19).

Cada bico nebulizador foi desmontado e colocado um filtro milipore no interior e reencaixados. Os potes pet foram furados em cada nos extremos dos potes e a conexão e o filtro foram afixados com cola,. Com a mangueira de silicone foi conectado um pote

de 2900 ml com um pote de 1000 ml, sendo o maior pote destinado ao cultivo e o menor como reservatório de meio nutritivo (figura 19).

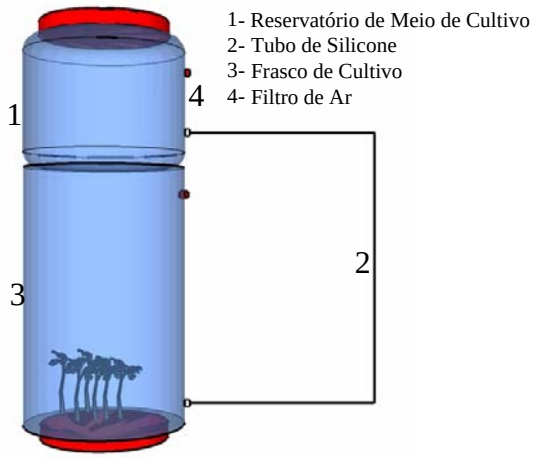


Figura 19. Biorreator de imersão temporária por gravidade

Os protótipos foram esterilizados com hipoclorito de sódio a 0,01% por contato, durante 72 horas, e enxaguados por três vezes em câmara de fluxo com água destilada autoclavada. O enxágüe foi realizado através da circulação de água destilada autoclavada nos sistemas.

Para avaliar o funcionamento dos quatro protótipos, foram colocados em torno de 100 segmentos em cada frasco de cultivo, sendo dois frascos com segmentos de ápices caulinares e dois frascos com segmentos de gemas laterais. A avaliação foi feita de acordo com o crescimento e a presença ou ausência de contaminação do meio de cultura.

A avaliação do desempenho dos protótipos se deu na facilidade de montagem do protótipo e na taxa de contaminação.

O processo de esterilização dos protótipos foi eficiente, não ocorreram sintomas de contaminações visíveis após o funcionamento dos biorreatores. Porém, houve recontaminações em algumas ocasiões, após a introdução de explantes no sistema, por fungos e bactérias, provenientes do manuseio de mudas já contaminadas e da entrada de patógenos presentes na atmosfera por meio de fissuras não detectáveis a olho nu.

A principal dificuldade verificada a ser superada foi na instalação dos sistemas biorreatores e na manutenção do meio de cultivo livre de contaminações.

Dos quatro protótipos desenvolvidos, três deles podem ser utilizados na rotina de produção de mudas micropropagadas de batata em escala industrial, apenas o protótipo I

foi descartado, por ser de difícil manuseio, ter alta taxa de contaminação pela dificuldade de esterilização dos componentes (da Bomba e do reservatório de solução nutritiva).

O protótipo II possibilita o cultivo de mudas e microtubérculos em escala industrial, pois se acoplar um compressor de maior potência e filtros de ar nas saídas de ar, pode-se acoplar um número maior de reservatórios de solução nutritiva e frascos de cultivo em série, obtendo-se maiores rendimentos.

O protótipo III é ideal para a manutenção de matrizes, pois a limitação se encontra na quantidade reservatório (um) e de frascos de cultivos acoplados, devido a característica da bomba de gasolina ter saída unidirecionada, como mostra a figura 20C.

A característica mais marcante do protótipo IV é a vantagem do isolamento do reservatório de cultivo em relação ao frasco de cultivo (figuras 19 e 20D), que permite um melhor controle em relação a contaminação do sistema por microrganismos.

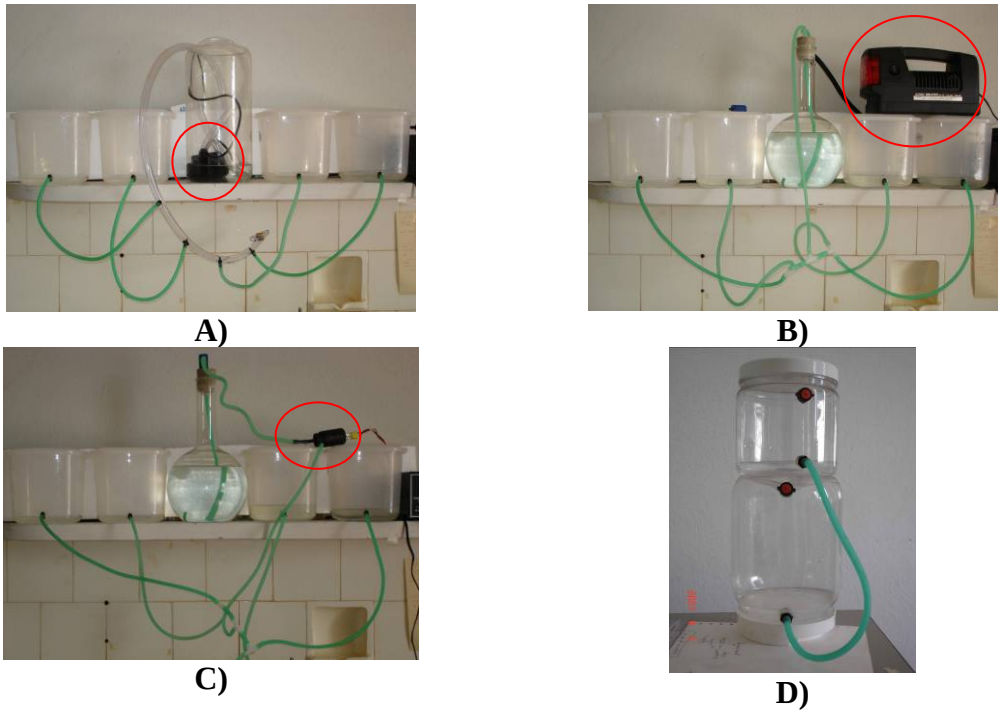


Figura 20. Caracteristicas dos biorreatores: A) Bomba Submersa, B) Compressor de Ar; C) Bomba injetora e D) Por Gravidade

O protótipo IV teve desempenho semelhante ao protótipo III, porém, sua montagem foi mais trabalhosa, que fica menos indicado para a produção em larga escala, uma vez que cada frasco de cultivo necessita de um frasco de estoque de meio. Mas, se torna interessante para a manutenção de mudas matrizes, já que o risco de contaminação é reduzido. Colocando-se o compressor de ar ligado a frascos em série,

pode se obter um sistema onde tenha diversos meios de cultivos associados a uma grande quantidade de frascos de cultivos.

De acordo com as avaliações, o protótipo selecionado para o experimento final foi o protótipo IV, que possibilita a utilização de diversos meios de cultivo, sem que um fique dependente de outro.

Comportamento de explantes no sistema de biorreator temporário

Nos experimentos exploratórios de funcionamento dos biorreatores, os protótipos foram colocados em funcionamento com explantes de ápices caulinares e segmentos contendo duas gemas, de acordo com resultados obtidos nos experimentos acima.

Em cada frasco de cultivo foram plaqueados 20 explantes, foi adicionado a solução nutritiva (MS acrescentado de pantotenato de cálcio, 2 $mg.L^{-1}$; glicina 2 $mg.L^{-1}$; 30 $g.L^{-1}$ de sacarose, sem adição de fitormônios, com pH ajustado a 5,8 e autoclavados por 20 min. a 121 ^{o}C), no frasco reservatório de meio. Esse procedimento foi realizado em câmara de fluxo.

Foram avaliadas as ocorrências de contaminações, a facilidade de manuseio do biorreator, o tempo de irrigação dos explantes (onde o intervalo entre molhamentos foi realizado assim que se observou a ausência de um filme de líquido ao redor do explante, não ultrapassando sete dias entre cada turno de rega), a necessidade de suporte para a fixação dos explantes, assim como o comportamento e desenvolvimento dos explantes de acordo com o tipo de explante colocado.

Neste experimento foi observado que, apesar da contaminação oriunda de fatores exógenos nos biorreatores testados, as plantas não mostraram sintomas de vitrificação ou algum outro tipo de estresse fisiológico. Foi identificado demora superior a sete dias na resposta do explante quando ocorre alteração do seu posicionamento ou na movimentação dos explantes causada pelo turbilhonamento da solução nutritiva.

Facilidade de implantação e montagem de biorreatores é importante, pois contribui com a prevenção à contaminação dos frascos de cultivo e redução da mão-de-obra na implantação do cultivo, que inviabiliza o sistema. É possível observar nesse experimento que de acordo com o tipo de multiplicação (comercial, pesquisa, manutenção de matrizeiro) pode se utilizar um sistema de irrigação nos frascos de

cultivo utilizando bombas diferentes, para otimizar custos, mão-de-obra e tempo de repicagem.

O tempo de fluxo necessário para o desenvolvimento dos explantes, foi de uma vez por semana, pois a drenagem do meio nutritivo não é completa e permanece um filme ao redor dos explantes, que não afeta no desenvolvimento e mantendo os explantes nutridos e hidratados.

Além da adaptação da membrana de polietileno dos filtros milipore nos nebulizadores, foi necessário acrescentar um chumaço de algodão junto ao filtro, esterilizado com álcool (70%), pois houve dificuldade em acomodar perfeitamente o elemento filtrante. Essa modificação prejudicou a circulação de ar no interior dos potes, pois as plantas apresentaram sinais de estresse provocado por falta de troca gasosa, mas não a ponto de influenciar o resultado dos experimentos.

Alteram-se a taxa de multiplicação e os prazos de repicagem entre os sistemas bioreatores comparados ao protocolo em meio solidificado, passando de 3 explantes por muda a cada 10 dias, obtidos com MSO para cerca de 20 explantes por muda a cada 3º dias obtidos no sistema bioreator. De acordo com esses dados, o sistema bioreator rende aproximadamente o dobro de mudas após 30 dias de cultivo.

A partir dos dados obtidos nos experimentos exploratórios, o protótipo adotado para os experimentos do meio de cultivo para a multiplicação e a produção de microtubérculos de batata em sistemas biorreatores foi o protótipo IV, pela facilidade de isolamento do cultivo, da solução nutritiva, irrigação e montagem.

Anexo III – **Rotina de programação do SAS para análises da variância e da regressão polinomial múltipla**

```
/**********************/
/* comentários globais*/
/**********************/

options;
title “Título”;

data PROD;
/***************************/
/* fatores A, B, C, Médias */
/***************************/

input A B C PROD;

/***************************/
/* definição das interações*/
/***************************/
A2=A*A; B2=B*B; C2=C*C; AB=A*B; AC=A*C; BC=B*C;
ABC=A*B*C;
AB2=A*B2; AC2=A*C2; BA2=B*A2; CA2=C*A2; BC2=B*C2; CB2=C*B2;
A2B2=A2*B2; A2C2=A2*C2; B2C2=B2*C2;
ABC2=A*B*C2; ACB2=A*C*B2; BCA2=B*C*A2;
AB2C2=A*B2*C2; BA2C2=B*A2*C2; CA2B2=C*A2*B2;
A2B2C2=A2*B2*C2;

/*********************************************/
/* em cards pode ser acrescentada uma coluna  */
/* com o número da repetição e nesse caso     */
/* será necessário acrescentar essa coluna    */
/* na declaração de input                     */
/*********************************************/
cards;
1 1 1 média
1 2 5 média
1 3 4 média
.
.
.5 4 1 média
5 5 5 média
;

/***********************************************************/
/* análise da variância                                    */
/* outras fontes de variação podem ser acrescentadas       */
/* dentro do limite de 23 graus de liberdade para o modelo */
/***********************************************************/
```

```
proc glm;
class SNB;
model  DESENVOLVIMENTO =
          A B C A2 B2 C2 AB AC BC
          /ss1;

/*********************************************/
/* Análise da regressão polinomial múltipla */
/* pelo método da máxima melhoria do       */
/* coeficiente de determinação             */
/*********************************************/

proc reg;
model PROD =
          A B C
          A2 B2 C2 AB AC BC
          AB2 BA2 AC2 CA2 BC2 CB2 ABC
          A2B2 A2C2 B2C2 ABC2 ACB2 BCA2
          AB2C2 BA2C2 CA2B2
          A2B2C2
          /selection=MAXR;
run;
```

Anexo IV – **Justificativa do modelo adotado, análise da regressão polinomial múltipla e interpretação dos resultados.**

A maior parte dos fatoriais fracionados foi desenvolvida visando solucionar questões relacionados com experimentos de adubação e nutrição de plantas. A sua análise pode ser realizada a partir de duas metodologias básicas, através da análise da variância para modelos não balanceados (proc glm) ou pela análise da regressão polinomial múltipla. Qualquer que seja a situação, é o modelo proposto como função de resposta que irá indicar as fontes de variação da análise da variância.

Nos estudos de adubação de plantas, frequentemente se espera uma resposta quadrática (ou raiz quadrada) para cada fator estudado, situação que se estende para a grande maioria dos experimentos em agronomia e biologia. O polinômio resultante da combinação dos três fatores é logicamente, um polinômio de mesmo grau que cada fator isolado, contém um termo independente (ou interseção) mais 26 parâmetros tanto na função quadrado como na raiz quadrada (Equação 1). No exemplo, os fatores A, B e C são representados por letras maiúsculas enquanto as minúsculas em itálico representam os coeficientes:

$$\text{Produção} = \text{Interseção} + aA + bB + cC + dA^2 + eB^2 + fC^2 + gAB + hAC + iBC + jAB^2 + kBA^2 + lAC^2 + mCA^2 + nBC^2 + oCB^2 + pABC + qA^2B^2 + rA^2C^2 + sB^2C^2 + tABC^2 + uACB^2 + vBCA^2 + wAB^2C^2 + xBA^2C^2 + yCA^2B^2 + zA^2B^2C^2 \quad \text{.....(Equação 1)}$$

Diversos autores afirmam que apenas alguns desses parâmetros são importantes para a explicação dos fenômenos e visando facilitar a análise e a interpretação dos resultados (evitando ainda a discussão de interações complexas), sugerem a adoção de um modelo reduzido formado por nove parâmetros contendo os efeitos isolados linear e quadrático e pelas interações duplas de primeiro grau (Equação 2).

$$\text{Produção} = \text{Interseção} + aA + bB + cC + dA^2 + eB^2 + fC^2 + gAB + hAC + iBC \quad \text{.....(Equação 2)}$$

Simulações por nós conduzidas durante a análise de um número elevado de experimentos, demonstram que a redução para nove parâmetros permite a ocorrência de viéses que só são superados pela adoção do polinômio completo de segundo grau. A alegada simplificação na estimativa dos coeficientes dos parâmetros não faz sentido nos dias atuais quando os computadores realizam a rotina de análise em menos de 30 segundos. Vantagem adicional da adoção do polinômio completo é evitar

generalizações (nem sempre corretas) sobre quais parâmetros costumam ser não-significativos.

A análise da variância de um modelo composto por *p* parâmetros assume a seguinte forma:

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F
Modelo com *p* parâmetros	*p*			
Resíduo	24- *p*			
Total	24			

Fica evidente a falta de graus de liberdade para a representação do modelo completo com 26 parâmetros. Uma solução é a redução do número de parâmetros para um número igual ou menor que 23, que disponibiliza ao menos 1 grau de liberdade para o resíduo. A questão é dificultada pela ausência de qualquer critério efetivo para a supressão dos 3 ou mais parâmetros "menos significativos".

A solução é dada pela adoção de um método de análise da regressão passo a passo (*stepwise*) em que cada passo (*step*) é uma solução na forma de uma equação reduzida do polinômio com *p* parâmetros, contendo a significância de cada parâmetro e respectivos coeficientes.

No *stepwise* cada um dos 26 parâmetros do modelo completo é testado individualmente antes de ser incluído (ou eliminado) do modelo reduzido e com isso, a limitação do modelo a 23 parâmetros não chega a comprometer a análise.

Adota-se a diretiva MAXR que seleciona os modelos reduzidos em passos sucessivos de incremento no coeficiente de determinação (R^2).

No *step* 1, dentre todos os termos do polinômio, é selecionado aquele que mais contribui para a soma de quadrados da equação de resposta com 1 parâmetro.

No passo seguinte (*step* 2) é apresentada uma equação contendo 2 parâmetros em que é mantido o primeiro parâmetro e há ganho no coeficiente de determinação.

No próximo passo (*step* 3) pode ocorrer a substituição de um parâmetro do passo anterior desde que isso resulte em aumento do coeficiente de determinação, ou então pode ser acrescentado um terceiro parâmetro.

Essa rotina prossegue por um número indeterminado de vezes (*steps*) até chegar em uma ou mais equações formadas por 23 parâmetros, quando se esgotam os graus de liberdade disponíveis.

Chega-se assim a um conjunto de soluções e a identificação daquela mais adequada é auxiliada pelo Coeficiente de Parâmetros (Cp) apresentado pelo SAS

juntamente com a análise da significância do modelo. Esse coeficiente foi definido por Mallows (Equação 3) e é citado no SAS User´s Guide (1989) e discutido também por Snedcor & Cochran (17ed.). A melhor solução numérica é obtida quando os valores absolutos de Cp e o número de parâmetros (p) mais se aproximam pela primeira vez (*steps* menores), indicando a ausência de viéses.

$Cp = (SQE_p / s^2) - (N - 2p)$ .....(Equação 3)

Onde:
s^2 = QME do modelo completo
SQE_p = SQE do modelo com *p* parâmetros
N = Número de parâmetros do modelo completo
p = Número de parâmetros do modelo reduzido

O delineamento 1/5 de 5x5x5 disponibiliza o maximo de 23 graus de liberdade para o modelo e fica impossível estabelecer qual seria o quadrado médio do modelo completo. Assim, o Cp presente em cada passo da análise contém viéses e sua utilização para a escolha da melhor solução fica prejudicada, a menos que se adote outros delineamentos e, ou, modelos que propiciem mais graus de liberdade.

A seleção da melhor resposta é realizada com o auxílio das significâncias (individuais) de cada parâmetro. Aceita-se os parâmetros com F iguais ou melhores que 15%, rejeita-se aqueles com F superiores a 30% (0,30), equações que contém parâmetros com F entre 15% e 30% devem ser avaliados graficamente quanto ao significado biológico da equação.

Na maioria das vezes a melhor solução é encontrada no passo (*step*) imediatamente anterior a aquele em que ocorre a primeira solução contendo ao menos um parâmetro não-significativo. É comum que nos *steps* seguintes voltem a aparecer modelos e parâmetros significativos, essas soluções no entanto, costumam apresentar viéses e pontos de sela por tenderem a “acompanhar” as médias observadas. Deve-se dar preferência às soluções mais simples, contendo menos parâmetros.

Em todos os casos porém, a solução mais adequada depende não somente dos níveis de significância do modelo e de cada parâmetro mas também da interpretação biológica dos gráficos da função-resposta.