



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**VARIAÇÃO SOMACLONAL
NAS CULTIVARES DE BATATA ASTERIX E
ATLANTIC POR MARCADORES MORFOLÓGICOS
E MICROSSATÉLITES**

TESE DE DOUTORADO

Gisele Santiago

Santa Maria, RS, Brasil

2011

VARIAÇÃO SOMACLONAL NAS CULTIVARES DE BATATA ASTERIX E ATLANTIC POR MARCADORES MORFOLÓGICOS E MICROSSATÉLITES

Gisele Santiago

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM-RS),
como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutora em Agronomia

Orientadora: Prof^a Dr^a Lia Rejane Silveira Reiniger

Santa Maria, RS, Brasil

2011

© 2011

Todos os direitos autorais reservados a Gisele Santiago. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

Endereço: Rua Félix Monteiro, nº 108, casa B, Santa Maria, RS, 97020-310

Fone (0xx) 55 3025 4068; End. eletr: gisaplantbiotec@yahoo.com.br

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Agronomia**

A comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**VARIAÇÃO SOMACLONAL
NAS CULTIVARES DE BATATA ASTERIX E ATLANTIC
POR MARCADORES MORFOLÓGICOS E MICROSSATÉLITES**

Elaborada por
Gisele Santiago

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutora em Agronomia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Lia Rejane Silveira Reiniger, Dr^a
(Presidente Orientadora)

Arione da Silva Pereira, Dr. (EMBRAPA)

Irajá Ferreira Antunes, Dr. (EMBRAPA)

Marlise Ladvocat Bartholomei-Santos, Dr^a (UFSM)

Sidinei José Lopes, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 23 de fevereiro de 2011

A Deus pela fé que me manteve até o final desta caminhada.

Agradeço...

Aos meus queridos pais e irmãos pelos cuidados, pelo carinho e amor que me possibilitaram realizar mais este sonho.

Aos meus sogros Julia Graciela e Carlos Alberto pelo incentivo e momentos alegres.

Ao meu cunhado Carlos Daniel e minha cunhada Mariuze pelo apoio em momentos decisivos.

Ao meu esposo Pedro e minha filha Giulia pelo simples fato de existirem em minha vida

Dedico...

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Prof^a Dr^a Lia Rejane Silveira Reiniger pela oportunidade, ensinamentos, apoio nos momentos difíceis ao longo desta caminhada (que não foram poucos...), incentivo, carinho e principalmente pela postura ética perante a vida.

A Prof^a Dr^a Marlise Ladvocat Bartholomei-Santos pelas sugestões e colaborações, além de possibilitar a realização dos ensaios moleculares no Laboratório de Diversidade Genética (DIVERGE).

Ao Prof. Dr. Jerônimo Luiz Andriolo pela disponibilidade, sugestões e colaborações na realização da etapa da hidroponia.

Aos demais professores do Departamento de Fitotecnia pela oportunidade e apoio durante todo o curso de pós-graduação.

Ao Pesquisador Zilmar da Silva Souza, Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri) pelo material concedido e pelas valiosas sugestões.

Aos funcionários do Departamento de Fitotecnia pela ajuda na condução dos experimentos e pela amizade.

A Marta Stochero Deprá pela amizade e colaboração em etapas decisivas da tese.

A Joana Graciela Hannauer pela colaboração nos experimentos de cultura de tecidos, com os ‘milhões’ de frascos para avaliar e lavar.

A Djeimi Janisch e todo o “pessoal da hidroponia” pelo auxílio nesta etapa e com a colheita no campo.

Aos colegas Aline Curti, Aline Pain, Henrique Benitez Leon e Márcio Navroski do Laboratório de Cultura de Tecidos do Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento pela agradável convivência e pelo apoio durante toda a execução do trabalho.

Aos colegas Rafaelle, Carol, Vanessa e Jobert do Laboratório de Diversidade Genética (DIVERGE) pela descontração e colaboração na realização deste trabalho.

E a todos aqueles que uma forma ou outra contribuíram para realização desta tese de Doutorado, e não estão nominalmente citados.

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa da Pós-Graduação em Agronomia
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

VARIAÇÃO SOMACLONAL NAS CULTIVARES DE BATATA ASTERIX E ATLANTIC POR MARCADORES MORFOLÓGICOS E MICROSSATÉLITES

AUTORA: GISELE SANTIAGO
ORIENTADORA: LIA REJANE SILVEIRA REINIGER
Local e data da defesa: Santa Maria, 23 de Fevereiro de 2011.

A batata (*Solanum tuberosum* L.) ocupa o quarto lugar em nível mundial em produção, sendo superada apenas pelo trigo, arroz e milho. A cultura da batata é propagada de forma vegetativa e, devido à suscetibilidade a doenças, é imprescindível o emprego da cultura de ápices caulinares para efetuar limpeza clonal e, na sequência, da micropropagação das partes aéreas para a obtenção de mudas livres de patógenos para satisfazer a demanda dos agricultores. Entretanto, a cultura de tecidos pode induzir variabilidade genética no material micropropagado, a qual é denominada variação somaclonal. Face ao exposto, o objetivo geral do presente estudo consistiu na análise da variação somaclonal nas cultivares de batata Asterix e Atlantic, com o intuito de contribuir para uma melhor compreensão e, também, para o desenvolvimento de estratégias direcionadas ao controle e monitoramento desse fenômeno, e, simultaneamente, para a obtenção de variantes de utilidade para programas de melhoramento genético. Com esta finalidade, as diferentes etapas do sistema de produção de batata-semente foram avaliadas por descritores morfológicos, morfoagronômicos e marcadores microssatélites. Os resultados revelaram que os rametes de Asterix e Atlantic apresentam extensiva variabilidade intraclonal, observando-se padrões diferenciados nas duas cultivares em resposta às fontes de variação estudadas. Há variabilidade intraclonal na estabilidade fenotípica *in vitro* e em características de tubérculo-semente nos rametes das cultivares de batata Atlantic e Asterix, provenientes do cultivo de plantas básicas da geração inicial (G0) em sistema hidropônico. Plantas e tubérculos de primeira geração clonal apresentam grande variabilidade intraclonal e divergência em relação ao padrão fenotípico das cultivares nos descritores mínimos nos rametes de Asterix e Atlantic. O grau de diferenciação dos explantes que originam os rametes não tem efeito na estabilidade fenotípica de Asterix e Atlantic. Os rametes das duas cultivares apresentam elevada variabilidade genética intraclonal em marcadores microssatélites. O padrão de instabilidade nos fenótipos moleculares é diferenciado em Asterix e Atlantic. Rametes regenerados a partir de ápices caulinares e derivados de organogênese indireta são igualmente instáveis em nível molecular. O tempo de subcultivo pode ser usado como ferramenta de controle da variação somaclonal nas cultivares de batata Asterix e Atlantic, pela análise dos fenótipos moleculares.

Palavras-chave: *Solanum tuberosum* L. Cultura de tecidos. Cultura de ápices caulinares. Micropropagação. Microssatélites. Estabilidade genética.

ABSTRACT

Doctoral Thesis

Graduate Program in Agronomy

Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

SOMACLONAL VARIATION IN CULTIVARS OF POTATO ASTERIX E ATLANTIC THROUGH MORPHOLOGICAL AND MICROSATELLITES MARKERS

AUTHOR: GISELE SANTIAGO

ADVISOR: LIA REJANE SILVEIRA REINIGER

Location and date of presentation: Santa Maria, February 23th, 2011.

The potato (*Solanum tuberosum* L.), Solanaceae, ranked fourth in quantity food production, exceeded only by wheat, rice and corn. The potato crop is propagated vegetative form, which requires high quality plant for income maintenance in the field. However, culture is susceptible to diseases, mainly viruses so it is necessary to use techniques such as culture of shoot tips for cleaning and subsequent clonal propagation in a system that maintains the quality of plant propagation material such as hydroponics. However, it is known that tissue culture induced genetic variability in micropropagated material. Changes collectively termed somaclonal variation. As a result, strategies are needed to control and monitor this phenomenon in potato cultivars due to the possibility of loss of genetic traits for which have been improved. Given the above, this study aimed to evaluate the *in vitro* behavior of ramets, evaluate characteristics of the tubers produced hydroponically, evaluate the phenotypic stability of ramets from tissue culture through 26 minimum description of potato compare the phenotypic stability of ramets of each cultivar according to the degree of differentiation of the explants that originated ramets, indicating potential minimum descriptors to monitor the phenotypic stability, to analyze the variability over the subcultures of the growing season and the field through microsatellite markers from potato cultivar Asterix and Atlantic. The results showed that ramets both of Asterix as Atlantic differ on *in vitro* behavior for the variables. There is variability in characteristics of tuber-seed in the ramets of potato cultivars Atlantic and Asterix, from the cultivation of basic generation zero (G0) in a closed hydroponic system. Ramets of Asterix have a different behavior of ramets Atlantic in relation to minimum descriptors. There is great variability and intraclonal divergence in relation to the phenotypic varieties in minimum descriptors in ramets of Asterix and Atlantic. The degree of differentiation of explants that form these ramets has no effect on the phenotypic stability of Asterix and Atlantic. Growth habit and pigmentation of the main stem descriptors can be useful in monitoring the genetic purity of Asterix. Growth habit, vegetative and Tuber shape have potential use in monitoring the intraclonal variability in Atlantic. The potato cultivars Asterix and Atlantic show high variability in intraclonal microsatellite markers. The pattern of instability in molecular phenotypes is different among potato cultivars Asterix and Atlantic. Ramets regenerated from shoot tip derived and indirect organogenesis are also unstable. The subculture time, alone, seems to have no effect on the incidence of somaclonal variation in potato cultivar Asterix and Atlantic.

Key words: *Solanum tuberosum* L. Tissue culture. Shoot tip culture. Micropropagation. Microsatellites. Genetic instability.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1 - A) Ramete 33A de Asterix antes de ser subcultivado, apresentando formação de brotação lateral (indicada pela seta) e de raízes; B) Ramete 29A de Asterix antes do subcultivo, apresentando formação de raízes. C) Ramete 33D, e D) Ramete 33TA de Asterix antes da aclimatização. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.....44

CAPÍTULO II

Figura 1 - Plantas básicas G0 dos rametes das cultivares de batata Asterix após 15 dias de aclimatização em sistema com substrato (areia). Santa Maria, RS, UFSM, 2010.....93

Figura 2 – Plantas básicas G0 da cultivar de batata Asterix em cultivo hidropônico: a) ramete 20D; b, c e d) formação de estolões nas gemas laterais dos rametes da cultivar Asterix antes da colheita. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.....102

CAPÍTULO III

Figura 1 – A e B) Ocorrência de flores hexâmeras em inflorescências do ramete 36TD de Asterix. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.....117

CAPÍTULO IV

Figura 1 – Quantificação de alguns “bulks” de DNA genômico de Atlantic isolado pelo protocolo CTAB. A e B=DNA do fago lambda (A=10 ng μl^{-1} , B=20 ng μl^{-1}). 1=Atlantic controle; 2=14A3SC; 3=14A6SC;4=14A9SC; 5=14A12SC; 6=14D3SC; 7=14D6SC;

8=14D12SC; 9=5D3SC;10=5D12SC; 11=14D3SC; 12=14D6SC; 13=14D9SC. Os rametes são indicados por numerais (5 e 14) seguidos por uma letra, que identifica o tipo de explante usado para regenerar: D=derivado de calo e A=ápice caulinar, e, na sequência, por uma associação entre um numeral, que representa o subcultivo respectivo, e as letras SC, que significam subcultivo (3SC=terceiro subcultivo, 6SC=sexto subcultivo e 12SC=décimo segundo subcultivo). Santa Maria, RS, UFSM, 2010.....125

Figura 2 - Padrões de bandas obtidas por meio dos produtos da PCR, a partir da técnica de microssatélites, utilizando-se o “primer” STWIN12G em rametes da cultivar de batata Atlantic: 1=16D12SC; 2=16D3SC; 3=14D12SC; 4=14D6SC; 5=14D3SC; 6=14A12SC; 7=14A6SC; 8=14A3SC; 9=5D12SC; 10=5D3SC. Os rametes são indicados por numerais (14 e 16) seguidos por uma letra, que identifica o tipo de explante usado para regenerar: D=derivado de calo e A=ápice caulinar, e, na sequência, por uma associação entre um numeral, que representa o subcultivo respectivo, e as letras SC, que significam subcultivo (3SC=terceiro subcultivo, 6SC=sexto subcultivo e 12SC=décimo segundo subcultivo). 50 pb=marcador de peso molecular. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.....130

Figura 3 - Padrões de bandas obtidas por meio dos produtos da PCR, a partir da técnica de microssatélites, utilizando-se o “primer” STPATPI em rametes da cultivar de batata Atlantic: 1=5D3SC; 2=5D12SC; 3=controle; 4=14A3SC; 5=14A6SC; 6=14A12SC; 7=14D3SC; 8=14A6SC; 9=14D12SC. Os rametes são indicados por numerais (5 e 14) seguidos por uma letra, que identifica o tipo de explante usado para regenerar: D=derivado de calo e A=ápice caulinar, e, na sequência, por uma associação entre um numeral, que representa o subcultivo respectivo, e as letras SC, que significam subcultivo (3SC=terceiro subcultivo, 6SC=sexto subcultivo e 12SC=décimo segundo subcultivo). Controle=amostra não micropropagada. 50 pb=marcador de peso molecular. Setas

indicam bandas exclusivas do ramete 14A no terceiro subcultivo.
 Santa Maria, RS, UFSM, 2010.....132

Figura 4 - Dendrograma elaborado a partir de estimativas de similaridade (índice de Dice), definido pelo critério de agrupamento UPGMA de diferentes rametes da cultivar de batata Atlantic. Os rametes são indicados por numerais (5, 14 e 16) seguidos por uma letra, que identifica o tipo de explante usado para regenerar: D=derivado de calo e A=ápice caulinar, e, na sequência por uma associação entre um numeral, que representa o subcultivo respectivo, e as letras SC, que significam subcultivo (3SC=terceiro subcultivo, 6SC=sexto subcultivo, 9SC=nono subcultivo e 12SC=décimo segundo subcultivo). Os rametes reúnem-se a 0,46 de similaridade. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.....134

Figura 5 - Padrões de bandas obtidas por meio dos produtos da PCR, a partir da técnica de microssatélites, utilizando-se o “primer” STGBSS em rametes da cultivar de batata Asterix: 1=33A3SC; 2=33A6SC; 3=33A12SC; 4=33AC; 5=33D6SC; 6=33D12SC; 7=33DC; 8=20D6SC; 9=20D9SC; 10=20D12SC; 11=20DH). Os rametes são indicados por numerais (20 e 33) seguidos por uma letra, que identifica o tipo de explante usado para regenerar: D=derivado de calo e A=ápice caulinar, e, na sequência, por C=amostra coletada em planta básica G1 cultivada em condições de campo e H=amostra coletada em planta básica G0 cultivada em sistema hidropônico, ou, ainda, por uma associação entre um numeral, que representa o subcultivo respectivo, e as letras SC, que significam subcultivo (3SC=terceiro subcultivo, 6SC=sexto subcultivo, 9SC=nono subcultivo e 12SC=décimo segundo subcultivo). 50 pb=marcador de peso molecular. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.....136

Figura 6 - Dendrograma elaborado a partir de estimativas de similaridade (índice de Dice), definido pelo critério de agrupamento UPGMA de diferentes rametes da cultivar de batata Asterix. Os rametes são indicados por numerais (20 e 33) seguidos por uma letra, que identifica o tipo de explante usado para regenerar: D=derivado de calo e A=ápice caulinar, e, na sequência por C=amostra coletada em planta básica G1 cultivada em condições de campo e H=amostra coletada em planta básica G0 cultivada em sistema hidropônico, ou, ainda, por uma associação entre um numeral, que representa o subcultivo respectivo, e as letras SC, que significam subcultivo (3SC=terceiro subcultivo, 6SC=sexto subcultivo, 9SC=nono subcultivo e 12SC=décimo segundo subcultivo). Os rametes reúnem-se a 0,55 de similaridade. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.....139

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A – Caracterização morfológica da cultivar de batata Asterix por descritores necessários à proteção legal (COLLARES et al., 2002).....	162
ANEXO B – Caracterização morfológica da cultivar de batata Atlantic por descritores necessários à proteção legal (COLLARES et al., 2002).....	163

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A – Matriz de similaridade genética entre o controle e os rametes 5D, 14A, 14D e 16D da cultivar de batata ao longo dos subcultivos.....	165
APÊNDICE B – Matriz de similaridade genética entre os diferentes rametes da cultivar de batata Atlantic ao longo dos subcultivos, cultivo hidropônico e em condições de campo.....	166

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1 Cultura da batata.....	21
2.2 Cultura de ápices caulinares e micropropagação em batata.....	25
2.3 Cultivo hidropônico e produção de batata-semente.....	28
2.4 Variação somaclonal	31
2.5 Marcadores moleculares.....	37
3 CAPÍTULO I - ESTABILIDADE FENOTÍPICA <i>IN VITRO</i> DAS CULTIVARES DE BATATA ASTERIX E ATLANTIC NA MICROPROPAGAÇÃO.....	41
3.1 Objetivo.....	41
3.2 Material e métodos.....	41
3.3 Resultados e discussão.....	51
3.4 Conclusões.....	63
4 CAPÍTULO II – VARIABILIDADE INTRACLONAL EM CARACTERÍSTICAS DE MINITUBÉRCULOS DE RAMETES DAS CULTIVARES DE BATATA ASTERIX E ATLANTIC PRODUZIDOS EM SISTEMA HIDROPÔNICO	92
4.1 Objetivo.....	92
4.2 Material e métodos.....	92
4.3 Resultados e discussão.....	97
4.4 Conclusões.....	104
5 CAPÍTULO III – CARACTERIZAÇÃO MORFOAGRONÔMICA DE PLANTAS E TUBÉRCULOS G1 DE RAMETES DAS CULTIVARES DE BATATA ASTERIX E ATLANTIC.....	105
5.1 Objetivos.....	105
5.2 Material e métodos.....	105
5.3 Resultados e discussão.....	111
5.4 Conclusões.....	120
6 CAPÍTULO IV – VARIABILIDADE INTRACLONAL DAS CULTIVARES DE BATATA ASTERIX E ATLANTIC AO LONGO DA MICROPROPAGAÇÃO, CULTIVO HIDROPÔNICO E EM CAMPO POR MARCADORES MICROSSATÉLITES.....	121
6.1 Objetivo.....	121
6.2 Material e métodos.....	121
6.3 Resultados e discussão.....	128
6.4 Conclusões.....	140
7 CONCLUSÕES GERAIS E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	141
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	143

ANEXOS..... 159

APÊNDICES..... 162

1 INTRODUÇÃO

A batata (*Solanum tuberosum* L.) ocupa o quarto lugar em importância econômica no mundo, sendo superada apenas pelo trigo, arroz e milho (NYENDE et al., 2005). A produção brasileira de batata, em 2010, foi de 3.576.755, em uma área de 141.329 hectares, resultando em uma produtividade média 25.31 kg. ha⁻¹. (IBGE, 2011). O consumo *per capita* de batata, no Brasil, é menor que 15 kg ano habitante⁻¹ enquanto que, na Europa, é de 96 Kg ano habitante⁻¹ (FPN, 2009).

Em decorrência da importância socioeconômica desta cultura, a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) declarou 2008 como o “Ano Internacional da Batata”, com o intuito de alcançar as metas para reduzir a fome no mundo até 2015 (FAO, 2008). Além disso, essa organização objetivou chamar a atenção da comunidade científica e da população mundial para a função estratégica que este alimento representa para a dieta da população mundial, especialmente os mais pobres, pois “a batata está na linha de frente ao combate contra a fome e a pobreza no mundo” (FAO, 2008).

A cultura da batata é propagada, principalmente, de forma vegetativa por meio de tubérculos-semente que desempenham importante função na fixação do conteúdo genético, possibilitando a formação de clones. A utilização de material propagativo durante ciclos repetidos, todavia, pode causar o acúmulo de patógenos, tais como fungos, bactérias e vírus, contribuindo para a degenerescência das cultivares. A recuperação das cultivares é, geralmente, efetuada pela cultura de ápices caulinares, uma técnica da cultura de tecidos de plantas que, de maneira geral, é considerada capaz de preservar a identidade genotípica das plantas regenerantes em função da estabilidade genética das células meristemáticas (TORRES et al., 1998). Na sequência, as partes aéreas regeneradas são subcultivadas várias vezes até a obtenção de um número suficiente de mudas livres de vírus. Entretanto, a cultura de tecidos pode introduzir variabilidade genética no material micropropagado, a qual é

denominada, coletivamente, variação somaclonal (LARKIN; SCOWCROFT, 1981).

A variação somaclonal pode ser uma vantagem quando o objetivo é ampliar a variabilidade genética de, por exemplo, culturas de base genética estreita. Contudo, pode ser considerada uma desvantagem quando empregada na multiplicação de genótipos elite, devido à perda de características agrônômicas importantes introduzidas pelo melhoramento genético.

Existem várias metodologias e técnicas capazes de identificar a ocorrência de variação somaclonal, destacando-se marcadores morfológicos, bioquímicos e moleculares.

Em batata (SANTIAGO, 2007), observou-se a ocorrência de variação somaclonal em cultivares de batata por meio dos descritores mínimos (BRASIL, 1987) recomendados pelo Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC) do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Entretanto, não há registro na literatura do monitoramento da estabilidade genética de cultivares ao longo do processo de produção de batata-semente, efetuando-se amostragens: no cultivo inicial dos ápices caulinares, nos subcultivos, nos minitubérculos produzidos a partir das plantas cultivadas *in vitro* e, depois, nas plantas, inflorescências e tubérculos da primeira geração clonal.

O objetivo geral do estudo consistiu na análise da variação somaclonal em duas cultivares de batata de importância para o contexto produtivo brasileiro: Asterix e Atlantic, com o intuito de contribuir para uma melhor compreensão e, também, para o desenvolvimento de estratégias direcionadas ao controle e monitoramento desse fenômeno, e, simultaneamente, para a obtenção de variantes de utilidade para programas de melhoramento genético.

O trabalho está dividido em três capítulos iniciais, organizados de acordo com a etapa do processo de produção de batata-semente e, nos quais, foram empregados marcadores morfológicos ou morfoagronômicos na análise da variabilidade intraclonal, e um último capítulo, em que essa variabilidade foi estudada em nível molecular pelo emprego de marcadores microssatélites em amostras de DNA genômico; coletadas nas diferentes etapas: controle não micropropagado, subcultivos, cultivo em sistema hidropônico e em condições de campo. Mais especificamente:

- no capítulo I foi avaliado o comportamento *in vitro* de rametes das cultivares de batata Asterix e Atlantic ao longo de quatro e oito subcultivos, respectivamente, visando obter subsídios para analisar a estabilidade genética destas cultivares;

- no capítulo II foi analisada a variabilidade intraclonal de rametes de plantas básicas G0 (provenientes da cultura de tecidos), das cultivares de batata Asterix e Atlantic cultivadas em sistema hidropônico fechado com substrato, por meio de características de tubérculo importantes na produção de batata-semente básica;

- no capítulo III foi investigada a variabilidade intraclonal das cultivares de batata Asterix e Atlantic, por meio da caracterização através de 26 dos descritores mínimos de planta, inflorescência e tubérculos da primeira geração clonal (G1) e comparar a estabilidade fenotípica dos rametes de cada cultivar em função do grau de diferenciação do explante que os originou;

- no capítulo IV foi verificada a ocorrência de variabilidade intraclonal das cultivares de batata Asterix e Atlantic, ao longo dos subcultivos, do cultivo hidropônico e em campo, por meio de marcadores microssatélites.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura da batata e descrição de cultivares

A batata (*Solanum tuberosum* L.) é a quarta cultura agrícola no mundo, depois do milho, arroz e trigo, constituindo-se em um dos principais alimentos para a humanidade. Devido à importância socioeconômica, a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) declarou 2008 como o “Ano Internacional da Batata” (FAO, 2008). É cultivada em mais de 100 países desde o círculo Ártico até o extremo sul da América do Sul e em todas as latitudes intermediárias (FAO, 2008).

O gênero *Solanum* possui aproximadamente duas mil espécies, das quais cerca de 150 apenas são formadoras de tubérculos. Essas espécies são de ocorrência no seu centro de origem e especiação, a região Andina da América do Sul, sendo que apenas oito espécies são cultivadas (HAWKES, 1990). Dentre estas, apenas *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* é cultivada nos países ocidentais, embora as cultivares modernas, ao longo do seu processo de melhoramento, tenham incorporado genes das outras espécies.

A batata cultivada (*S. tuberosum* ssp. *tuberosum*) é um tetraplóide ($2n=2x=48$). O tetraplóide cultivado na Europa e em outras partes do mundo é considerado uma seleção a partir de uma pequena introdução de tubérculos de *S. tuberosum* ssp. *andigena* procedente, provavelmente, da Colômbia e do Peru, e, em decorrência, possui estreita base genética. Os argumentos que embasam essa teoria são de que as plantas introduzidas originalmente na Europa são conhecidas por apresentarem florescimento e tuberização tardios, e a descrição morfológica dessas cultivares de batata corresponde ao tipo *andigena* (HOWARD, 1970). Por outro lado, após a epidemia de requeima que destruiu as lavouras da Europa na década de 40 do século XIX, existem registros de introdução de acessos de *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* originários do Chile, os quais contribuíram, substancialmente, para a base da constituição genética das cultivares modernas (HAWKES, 1990).

A dispersão mundial da batata está associada às Grandes Navegações, especialmente, aos exploradores espanhóis, que, em 1565, introduziram os primeiros tubérculos de batata na Espanha. Após, ocorreu disseminação para o continente europeu, e, posteriormente no século XVII, se espalhou para Índia, China e Japão. Na América do Norte, os registros indicam introdução a partir das Bermudas, em 1621, após uma importação inicial da Inglaterra (HAWKES, 1990).

A cultura da batata está passando por intensas modificações no cenário mundial. Até início da década de 1990, a maior parte da produção comercial e consumo da batata se localizavam na Europa, América do Norte e países da antiga União Soviética. Desde então, tem ocorrido um aumento exponencial na produção e demanda de batata na Ásia, África e América Latina, que passou de 30 milhões de toneladas do início da década de 1960 para mais de 165 milhões de toneladas em 2007 (FAO, 2008).

No Brasil, a batata foi introduzida no final do século XIX por imigrantes europeus em São Paulo e Estados do Sul. Na América Latina, o Brasil é o segundo maior produtor de batata. A colheita recorde de 2006, nesta parte do continente americano, de cerca de 33,1 milhões de toneladas, é um indicativo do crescimento da produção nos últimos 15 anos, em que a produção de batata cresceu mais de 5% ao ano, e os rendimentos médios aumentaram de 14 para 22 toneladas por hectare (FAO, 2008).

A batata é a principal hortaliça do agronegócio brasileiro, cujo PIB supera U\$\$ 1,6 bilhão, sendo que seu cultivo tem se modificado nos últimos 15 anos. Essa mudança ocorreu no perfil de produtores, uma vez que deixou de ser uma cultura de caráter exclusivamente familiar, em que passou a ocorrer um aumento na produção, passando de 2,23 milhões de toneladas, em 1990, para 3,57 milhões de toneladas em 2010, em uma área de 141 mil hectares (IBGE, 2011). O rendimento médio obtido aumentou de 18,5 kg/ha em 2001 para 25,3 kg/ha em 2010 confirmando as intensas modificações pelas qual a cultura vem passando (IBGE, 2011).

As maiores produções são registradas nas regiões sudeste e sul com 1.797.744 e 1.179.501 toneladas respectivamente. Os maiores produtores são

os estados de Minas Gerais, Paraná, São Paulo e Rio Grande do Sul, que respondem por cerca de 80% da produção nacional (IBGE, 2011).

No Rio Grande do Sul, existem três importantes regiões produtoras de batata concentradas nas regiões sul, central e norte/nordeste do Estado que, mesmo com aumento na produtividade da ordem de 123%, manteve-se abaixo da média nacional (23,7 t ha⁻¹) (IBGE, 2009).

A baixa produtividade das lavouras está associada ao uso de tubérculos-semente de baixa qualidade fitossanitária, que é um dos principais fatores que têm afetado negativamente a produtividade (MEDEIROS et al., 2002). Estima-se que, no Brasil, 13% da produção de batata é utilizada como batata-semente. Deste montante, apenas 20% a 30% é batata-semente certificada (PEREIRA; FORTES, 2003).

Para fins comerciais, a batata é multiplicada de forma vegetativa por meio de tubérculos. O plantio através de sementes botânicas, forma sexuada, é mais empregado com finalidade de melhoramento, pois os genótipos obtidos são altamente heterozigóticos (KACZMARCZYK et al., 2010). O plantio de tubérculos-semente tem como objetivo uma lavoura de constituição genética com as características da cultivar que está sendo utilizada. Entretanto, o método de propagação assexuada acarreta em alguns problemas, como a vulnerabilidade a infecções por patógenos como fungos, bactérias e, principalmente, vírus, que a cada ciclo são transmitidos para aproxima geração, contribuindo assim para a degenerescência da cultura (PEREIRA; FORTES, 2003). Em consequência, o material propagativo precisa ser renovado periodicamente para que ocorra a recuperação das características da cultivar, principalmente, com relação às infecções por vírus.

A cultura da batata é suscetível a importantes viroses, tais como: vírus do enrolamento da folha (*Potato leafroll virus* – PLRV) e ao vírus Y da batata (*Potato virus Y* - PVY), que fazem com que as cultivares percam, gradualmente, vigor e capacidade de produção com os cultivos continuados (DANIELS, 1995). As reduções na produtividade em função do PLRV podem chegar a 50% (CÂMARA et al., 1986; FILGUEIRA; CÂMARA, 1986), enquanto aquelas causadas por PVY podem variar de 30 a 100%, dependendo da cultivar (KUS, 1995).

A cultura de tecidos é utilizada para recuperar plantas de batata livres de vírus mediante o cultivo de ápices caulinares. Esta técnica preserva, na maioria dos casos, a identidade do genótipo regenerado, uma vez que as células do meristema apical mantêm mais uniformemente a estabilidade genética (TORRES et al., 1998). Após a limpeza clonal, os explantes são multiplicados pela micropropagação de partes aéreas, objetivando manter a estabilidade genética do material propagado (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). No entanto, a cultura de tecidos pode induzir variabilidade genética ao material multiplicado *in vitro*. As variações induzidas por cultura de tecidos nas plantas regeneradas são chamadas, coletivamente, de variação somaclonal (LARKIN; SCOWCROFT, 1981).

O clone é uma réplica fiel do genótipo que está sendo multiplicado por técnicas de propagação vegetativa, inclusive cultura de tecidos. No processo de micropropagação é esperado que todas as progênies (rametes) sejam geneticamente idênticas à planta/cultivar (ortete) a partir de cujos tecidos foram regenerados. Entretanto, na prática, tem sido observado ocorrer alguma variação entre os rametes produzidos (variação somaclonal). Ortete é o indivíduo inicial (geralmente originado a partir do crescimento e desenvolvimento do embrião zigótico) que é propagado vegetativamente, produzindo um clone. Todos os propágulos vegetativos isolados de um ortete são chamados rametes. Assim, um clone é composto do ortete e seus rametes (FGC, 2010).

A estabilidade genética e a qualidade fitossanitária do material propagativo de batata apresentam-se com pré-requisitos para a melhoria dos resultados na cadeia produtiva da cultura.

Dentre as cultivares de batata mais plantadas no Brasil, destacam-se Ágata, Asterix, Atlantic, Cupido e Monalisa. Essas cultivares possuem características desejáveis em relação a algumas características como: produtividade, elevado teor de matéria seca, dentre outras. A seguir, descrição sucinta das cultivares usadas neste estudo.

A cultivar Asterix é resultante do cruzamento de Cardinal x SVP Ve 709, originária da Holanda (Empresa HZPC), tem como principais características ciclo médio-tardio, tubérculos de formato longo, película vermelha e polpa

amarela, suscetível a requeima (*Phytophthora infestans* (Mont) de Bary), PVY e PLRV, dormência longa, pouco sensível ao esverdeamento. Pode-se destacar como pontos fortes: alto potencial produtivo, boa aparência, teor de matéria seca médio-alto e boa para fritura na forma de palitos. Os pontos fracos desta cultivar são a dormência longa, suscetibilidade a requeima, PVY (Mosaico) e PLRV (Vírus do Enrolamento da Folha).

A cultivar Atlantic é resultante do cruzamento de 'B 5141-6 (Lepane) e Wauseon', originária do 'Maine Department of Agriculture', Estados Unidos (1978). As principais características desta cultivar são o ciclo médio-tardio, tubérculos grande e arredondados, película amarela e áspera, polpa branca, suscetível a requeima, à pinta preta (*Alternaria solani*), ao PVY, resistente ao PVX e média resistência ao PLRV e pouco suscetível a sarna comum. Bastante indicada para o preparo de chips e batata-palha na produção industrial.

2.2 Cultura de ápices caulinares e micropropagação em batata

A cultura de tecidos compreende o crescimento e a multiplicação de células, tecidos e/ou órgãos sob condições controladas de nutrição, de assepsia e de fatores ambientais (CALDAS et al., 1998). A cultura de tecidos é um instrumento importante da biotecnologia na obtenção de plantas livres de vírus e para a micropropagação, dentre outras aplicações.

A recuperação de plantas livres de vírus pode ser efetuada através da cultura de ápices caulinares. Essa técnica utiliza o ápice caulinar, que compreende o meristema apical com primórdios foliares subjacentes e pode incluir também as folhas emergentes (CLARK, 1997). As células do meristema apical estão divididas conceitualmente em três regiões: a zona central (células meristemáticas indiferenciadas) flanqueada em ambos os lados pela zona periférica que é, por sua vez, flanqueada externamente pela zona de formação de órgãos. A três regiões estão sob o meristema em arco que dará origem ao sistema vascular (este ainda sem conexão com o meristema apical) e demais estruturas da haste da planta (CLARK, 1997).

A cultura de ápices caulinares permite isolar tecidos livres de vírus, pois se baseia na premissa de que a concentração de patógenos diminui, progressivamente, no corpo da planta com o decréscimo do estágio de desenvolvimento das folhas, chegando a ser nula no ápice, isto é, é inversamente relacionada ao tamanho do explante (MURASHIGE, 1977). Quanto menor o explante maior a chance de se obter regenerantes isentos de contaminações; entretanto, maior é a dificuldade de sua regeneração subsequente (MURASHIGE, 1977). Em geral, explantes constituídos do meristema apical, terminal ou axilar, com um ou dois primórdios foliares são os recomendados para a limpeza clonal.

A utilização da cultura de ápices caulinares é, portanto, importante em plantas de propagação vegetativa, tais como: alho (*Allium sativum*) (CHOMÁTOVÁ et al., 1990), banana (*Musa spp.*) (VUYLSTEKE et al., 1988), batata (*Solanum tuberosum* L.) (AVERSANO et al., 2009) e batata-doce (*Ipomea batatas*) (TORRES et al., 1996), dentre outras culturas, pois proporciona a produção de mudas de alta qualidade fitossanitária.

A busca por qualidade fitossanitária em plantas de batata iniciou-se com Morel e Martin, em 1955, que obtiveram plantas regeneradas *in vitro* a partir de ápices caulinares livres dos vírus A, X e Y (TORRES et al., 1998). Posteriormente, Sip (1972) obteve plantas livres do vírus S da batata (PVS) quando utilizou meristemas com tamanho variando entre 0,3 a 0,5 mm de comprimento.

Essa propagação vegetativa efetuada *in vitro*, também denominada micropropagação por causa do tamanho dos propágulos utilizados, é uma das mais importantes aplicações da cultura de tecidos e tem grande impacto comercial. Essa técnica da cultura de tecidos consiste na propagação massal de um genótipo selecionado (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Ápices caulinares micropropagados preservam, na maioria dos casos, a identidade do genótipo regenerado, uma vez que as células do meristema apical mantêm mais uniformemente a estabilidade genética (TORRES et al., 1998). Todavia, não deve ser ignorado que a cultura de tecidos pode conduzir à ampliação da variabilidade genética.

Apesar da possibilidade de ocorrência de variação somaclonal no material propagado *in vitro*, a técnica é a alternativa preferencial para limpeza clonal. Por isso, quando o objetivo é a manutenção da estabilidade de genótipos elite alguns cuidados são necessários, tais como: observar o número e os intervalos dos subcultivos, a taxa de multiplicação e a estabilidade genética do material (CALVETE et al., 2009). Sais minerais (DONNELLY et al., 1984) e níveis de benziladenina (RANCILLAC; NOURISSEAU, 1989) são alguns fatores que afetam a estabilidade do material obtido *in vitro*. Além desses, fatores como o efeito do genótipo, o método de propagação, isto é, passagem ou não pela fase de calo, tipos e concentração de reguladores de crescimento, estresse oxidativo, também, estão associados à indução de variabilidade no material vegetal que é submetido ao cultivo *in vitro* (OLHOFT; PHILLIPS, 1999; JAIN, 2001; CASSELS; CURRY, 2001; BAIRU et al., 2010).

A ocorrência de variação somaclonal nas cultivares em propagação pode comprometer tanto a produção de batata-semente quanto à produção de tubérculos, caso haja perda das características originais do germoplasma melhorado. Em consequência, esse fenômeno necessita ser melhor compreendido para que possam ser desenvolvidas estratégias de controle e monitoramento da variação somaclonal em cultivares de batata de importância para a agricultura brasileiro.

2.3 Cultivo hidropônico e produção de batata semente

Pela micropropagação são obtidas plantas básicas de batata livres de viroses, as quais devem ser cultivadas em ambiente protegido para produzir tubérculos básicos da geração inicial (G0), que, subsequentemente, darão continuidade ao processo de produção de batata-semente, livre de vírus, até sua disponibilização aos agricultores.

O sucesso desse processo depende de sistemas eficientes de multiplicação do material livre de fitopatógenos, de maneira a disponibilizar batata-semente de elevada qualidade genética, fisiológica e sanitária em quantidade suficiente para atender a demanda do mercado (MEDEIROS, 2003).

A hidroponia é uma técnica alternativa de cultivo de plantas em solução nutritiva na ausência ou na presença de substratos naturais ou artificiais. Os sistemas hidropônicos têm sido empregados, em diferentes países, como uma forma de substituir o cultivo em solo tradicional e resolver problemas na produção de batata-semente, que incluem a redução na contaminação do solo e água subterrânea, além da manipulação de nutrientes, otimizando a taxa de multiplicação, reduzindo custos e permitindo a obtenção de material livre de doenças radiculares (CHANG et al., 2000a, CORRÊA, 2004; MEDEIROS et al., 2002; RODRIGUES, 2002). No Brasil, trabalhos com produção de batata-semente hidropônica foram realizados, inicialmente, na EMBRAPA Clima Temperado (MEDEIROS et al., 2002).

Adicionalmente, na produção da batata-semente, a aclimatização das plantas básicas, provenientes do cultivo *in vitro*, é uma etapa crucial, pois o material oriundo da cultura de tecidos, por vezes, é menos vigoroso e com menor potencial produtivo (PEREIRA et al., 2001).

Considerando o exposto, após a limpeza clonal efetuada pela cultura de ápices caulinares, e uma multiplicação das partes aéreas livres de vírus pela micropropagação, a propagação das plantas em sistema hidropônico pode ajudar a elevar as taxas de multiplicação, colaborando, também, para reduzir os custos de produção da batata-semente. A associação entre sistema hidropônico e plantas advindas da cultura de tecidos tem se mostrado uma estratégia importante na cultura da batata, pois possibilita aumento em

produtividade, preservando alta qualidade fitossanitária da batata semente (FIOREZE, 1997). Nos sistemas hidropônicos, devido a menor incidência de patógenos de solo, a aplicação de produtos fitossanitários é reduzida, gerando menor contaminação por resíduos químicos e, conseqüentemente menor contaminação ambiental (FIOREZE, 1997).

As culturas em sistemas hidropônicos consistem no desenvolvimento de plantas em meio inerte ou, simplesmente, em água sem a utilização de solo. Os sistemas hidropônicos estão sendo empregados em diferentes países a fim de substituir os métodos convencionais de produção de batata-semente (CHANG et al., 2000a).

No Brasil, a produção de batata semente através de sistemas hidropônicos tem contribuído na superação de um dos principais problemas da cultura da batata que é a baixa taxa de multiplicação de tubérculos pré-básicos. A maior produtividade dos sistemas hidropônicos deve-se, principalmente, a ausência de enfermidades radiculares do material livre de patógenos (CALDEVILLA; LOZANO, 1993).

No País, a maior produtividade de batata-semente é bastante desejada, uma vez que cerca de 13% da produção é destinada a sementes, mas apenas 20 a 30% deste total representam sementes de qualidade controlada (PEREIRA; DANIELS, 2003). A batata-semente representa o componente mais alto no custo da produção (30 a 40%) e tem reflexos diretos na produtividade e qualidade dos tubérculos produzidos (ASSIS, 1999), consituindo-se, assim, em uma questão central para a cultura da batata (MEDEIROS, 2003).

Diferentes sistemas hidropônicos vêm sendo empregados em diversos países, como forma de substituir os métodos convencionais de produção de batata semente (CHANG et al., 2000a). A seguir, está apresentada uma descrição sucinta dos principais tipos de sistemas hidropônicos determinados pelas estruturas específicas, a saber:

- a) sistema NFT (“nutrient film technique”) ou técnica do fluxo laminar de nutrientes: composto, basicamente, por um tanque de solução nutritiva, um sistema de bombeamento, canais de cultivo e um sistema de retorno ao tanque. A solução nutritiva é bombeada aos canais e escoar, por gravidade, formando uma fina lâmina de solução que irriga as raízes.

- b) sistema DFT (“deep film technique”) ou cultivo na água ou, ainda, “floating”: a solução nutritiva forma uma lâmina profunda (5 a 20 cm) em que as raízes ficam submersas. Não existem canais e, sim, uma mesa plana onde circula a solução, através de um sistema de entrada e drenagem característicos;
- c) sistema com substratos: para hortaliças, frutíferas, flores e outras culturas que têm sistema radicular e parte aérea mais desenvolvida, utilizam-se vasos ou outros recipientes preenchidos com substratos comerciais. Os mais usados são os compostos por casca de pinus e fibra de coco. Também são usados areia, argila expandida, pedras diversas (seixos, brita), vermiculita e outros para a sustentação da planta, em que a solução nutritiva é percolada através desses materiais e drenada pela parte inferior dos vasos, podendo retornar (sistema fechado) ou não (sistema aberto) ao tanque de solução. Nos sistemas fechados, há risco de contaminação de todo o plantio por recirculação da solução nutritiva contaminada. Atualmente, está havendo um esforço em desenvolver sistemas com substratos com o tratamento da solução lixiviada antes de seu reaproveitamento.

Para a multiplicação de batata semente visando o cultivo comercial, o sistema hidropônico com substrato é o mais adequado em função de sua simplicidade operacional, custos mais baixos, menor risco e maior inércia térmica (ANDRIOLO, 2006). Outra vantagem do sistema hidropônico fechado é que o volume de solução nutritiva armazenada junto às raízes, no interior do substrato, diminui as variações de concentração da solução nutritiva, que são elevadas em sistemas de pequena inércia como a técnica do fluxo laminar de nutrientes (NFT) (FAVORETTO, 2005).

Quanto ao substrato, a utilização de areia tem-se mostrado uma boa alternativa em decorrência de sua grande estabilidade física, baixo custo, maior disponibilidade nas distintas regiões do País e maior facilidade de limpeza e desinfestação, quando necessárias (ANDRIOLO, 2006).

A solução nutritiva é um dos principais fatores que determinam o sucesso de uma cultura em sistema hidropônico, pois os nutrientes previamente dissolvidos em água são disponibilizados às plantas através da solução nutritiva (ANDRIOLO, 1999). A formulação e o manejo adequados da solução nutritiva são, portanto fatores determinantes no sucesso de um cultivo hidropônico (FURLANI et al., 1999). Nesse sentido, não existe uma solução nutritiva ideal. Entretanto, a “solução nutritiva modificada de Hoagland”, isto é, formulações modificadas daquela proposta, em 1938, por Hoagland e Arnon é a mais empregada no cultivo hidropônico. Esta solução é constituída (em mg L⁻¹) de: N-NO₃ (210), P(31), K(234), Ca (160), Mg (48), S (64), B (0,5), Cu (0,02), Fe (1,0), Mn (0,5), Mo (0,01) e Zn (0,05).

O pH da solução nutritiva é outro fator que deve ser considerado no sistema hidropônico, pois o pH influencia diretamente na solubilidade e disponibilidade dos nutrientes na solução presente no sistema radicular, afetando, ainda, a capacidade de troca catiônica dos substratos, podendo, ainda, ter efeito direto sobre a planta. O nível adequado de pH em água no ambiente radicular deve ficar entre 5,0 e 6,0, pois quando os valores se encontram abaixo de 4,0 podem afetar a integridade das membranas celulares e valores superiores a 6,5 podem causar sintomas de deficiências de Fe, P, B e Mn (FURLANI et al., 1999).

2.4 Variação somaclonal

A partir do emprego da cultura de tecidos, novas plantas são regeneradas a partir de gemas adventícias ou axilares. As plantas propagadas de forma clonal são esperadas constituir réplicas exatas da planta mãe, pois o crescimento de células *in vitro* e sua regeneração em plantas completas é um processo assexual, envolvendo somente divisão mitótica que, teoricamente, não causaria nenhuma variação (BAIRU et al., 2010). Entretanto, frequentemente, tem sido observada variação nas plantas regeneradas. Ao conjunto de variações induzidas por cultura de tecidos dá-se o nome de variação somaclonal, cuja característica típica é a complexidade, isto é, as

variações são compostas de diversos tipos, que podem se manifestar nos níveis fenotípicos, de ploidia, cromossômico e molecular. Assim, a variação somaclonal é um termo amplo, que compreende qualquer fenômeno que cause variação genética ou epigenética, que pode ser refletida em mudanças fenotípicas nas plantas regeneradas, cujo fenótipo é herdável somática e, com frequência, meioticamente (PEREDO et al., 2008; RHEE et al., 2010). Considerando esses aspectos, Phillips et al. (1994) propuseram que as variações decorrentes da cultura de tecidos teriam características de uma mutagênese auto-imposta devido à quebra do controle do ciclo celular normal.

As mudanças fenotípicas relacionadas as modificações genéticas apresentam vasto registro na literatura, sendo observadas em plantas regeneradas e sua progênie, sendo decorrentes de mutações qualitativas, que resultam da mutação de genes de herança Mendeliana simples, frequentemente recessivos. Alguns desses mutantes foram observados em milho e incluem fenótipos com deficiência de clorofila, nanismo e estruturas reprodutivas alteradas (PHILLIPS et al., 1994).

As alterações no nível de ploidia das células provenientes de cultura de tecidos, principalmente daquelas derivadas de calo, podem causar alterações fenotípicas na anatomia, na fisiologia e no metabolismo das plantas regeneradas. A variação no nível de ploidia, seja o aumento ou a diminuição de genomas ou cromossomos, pode ser estimulada pelo ambiente de cultivo ou, ainda, ser uma condição existente (originalmente) *in vivo* na planta. Em algumas espécies diplóides de orquídeas, como por exemplo, *Spathoglottis plicata*, os tecidos diferenciados apresentam células diplóides normais ($2n=2X$) e células que passaram por endoduplicações, isto é, o DNA mitótico replicado nas células somáticas não é seguido por ciclo de divisão celular, modificando-se o nível de ploidia (YANG; LOH, 2004). Essa espécie apresenta, portanto, uma condição mixoplóide *in vivo* e, na cultura de tecidos, caso esses tecidos forem utilizados como explantes, mesmo não ocorrendo organogênese indireta, podem ocorrer variantes somaclonais (YANG; LOH, 2004). A planta doadora de explantes constitui-se, portanto, em uma quimera.

Rearranjos e recombinações cromossômicas são comuns em plantas regeneradas a partir da cultura de tecidos, o que é consistente com a elevada frequência de variação fenotípica observada. Anormalidades citogénéticas,

incluindo eventos de quebras e rearranjos cromossômicos, têm sido observadas, tanto em cultura de células como entre plantas regeneradas pela cultura de tecidos. Uma análise comparativa entre aveia e milho mostrou que eventos de quebra ocorrem com mais frequência do que mudanças em nível de ploidia (OLHOFT; PHILLIPS, 1999). As translocações foram às anormalidades cromossômicas mais comuns observadas, seguidas por inversão e inserção/deleção, que, igualmente, ocorrem. A maioria dos eventos de quebras ocorreu entre a heterocromatina distal e o centrômero, em milho, ou dentro da heterocromatina centromérica em aveia. Essas observações conduziram à formulação da hipótese de que a replicação da heterocromatina é posterior em células cultivadas *in vitro*, levando a eventos de pontes e quebras cromossômicas (OLHOFT; PHILLIPS, 1999). Os estudos sobre eventos de quebras cromossômicas apontaram, portanto, evidências de que o controle do ciclo celular normal, que evita a divisão celular antes da replicação completa dos cromossomos, pode estar perturbado pelas condições de cultivo *in vitro*.

Mutações gênicas em plantas derivadas de cultura de tecidos também têm sido estudadas em nível de DNA e proteínas. Em plantas de milho regeneradas de cultivo *in vitro*, foram identificados alelos mutantes *Adh1*, resultantes de duas mutações de ponto independentes (KAEPLER et al., 2000).

A migração de elementos de transposição ou transposons pode, igualmente, induzir a ocorrência de variantes somaclonais. A constatação de que elementos de transposição são ativados durante a cultura de tecidos foi proposta, primeiramente, por Ahloowalia; Sherington (1985) ao estudar linhagens de trigo. O estresse causado pela cultura de tecidos parece ser um ambiente propício para ativar, em plantas ou células, elementos que fora da cultura de tecidos estariam em repouso (OLHOFT; PHILLIPS, 1999). Além dos elementos de transposição, os retrotransposons, que se movem via RNA podem ser mobilizados durante a cultura de tecidos, causando variações no genoma da planta. Em arroz, Hirochika et al. (1996) encontraram 15 novos retrotransposons da família *Tos* (*Tos* 6 a *Tos* 20) que estavam inativos (ou quase inativos) sob condições normais de crescimento e desenvolvimento e detectaram a ativação dos retrotransposons *Tos* 10, *Tos* 17 e *Tos* 19 durante o cultivo *in vitro*. Esses autores verificaram que o elemento *Tos* 17 aumentava o

número de cópias para 5 a 30 cópias transpostas nas plantas regenerantes, com o prolongamento do tempo de subcultivo.

De uma maneira geral, quando as células são submetidas a condições de estresse, como ocorre na cultura de tecidos, o genoma pode se alterar por uma questão de sobrevivência e adaptação. Assim, do ponto de vista evolutivo, um organismo (ou as células submetidas ao cultivo *in vitro*) precisa encontrar um meio termo entre adaptabilidade e mutabilidade (ZHANG et al., 2009).

A resposta diferencial do genoma da planta a uma condição de estresse como a cultura de tecido pode, também, estar relacionada a mudanças epigenéticas. As mudanças epigenéticas são causadas por modificações na expressão do DNA, que pode ser decorrente de alteração na metilação do DNA, modificações em histonas e remodelagem da cromatina; essas alterações podem influenciar a transcrição de genes (BAIRU et al., 2010; SMULDERS; DE KLERK, 2011).

Em função da complexidade da variação somaclonal, os mecanismos exatos relacionados à ruptura do controle, que se verifica durante a cultura de tecidos, ainda não são totalmente compreendidos. Entretanto, vários aspectos têm sido expostos, contribuindo para elucidar, pelo menos parcialmente até o momento, as bases mecanicistas ou a gênese da variação somaclonal.

Alguns pesquisadores têm se debruçado a estudar a epigenômica, que engloba os mecanismos epigenéticos envolvidos no controle da expressão de genes na tentativa de explicar as bases da gênese da variação somaclonal. O estudo epigenético das mudanças na expressão dos genes, que são hereditárias e que não envolvem uma mutação trouxe novas perspectivas aos fenômenos da hereditariedade. Os mecanismos epigenéticos, tais como a metilação ou as modificações covalentes das histonas e os RNAs de interferência estão envolvidos no cerne dessa questão. Neste âmbito, os diferentes estados de metilação das citosinas do DNA modelam uma série de processos biológicos (TANURDZIC et al., 2008).

Rhee et al. (2010), visando compreender as bases moleculares da variação somaclonal, caracterizaram quatro epialelos do *gene pericarpo color1* (*P1*) em plantas de milho derivadas da cultura de tecidos. O genitor possuía o alelo *p1*, *P1-wr*, que condiciona a cor vermelho-tijolo nas glumelas da espiga de milho. Na progênie regenerada a partir da cultura de tecidos foi identificada a

ocorrência de novos epialelos que exibiram perda parcial ou completa da função *p1*, verificada pelo fenótipo “Pink” ou descolorido das glumelas. A ausência de pigmentação foi associada à perda completa dos níveis de transcrição do gene *p1*. O silenciamento desse epialelo foi associado à hipermetilação de uma região do segundo intron de *P1-wr*. Um modificador epigenético de *p1* (*Ufo1*) foi capaz de restaurar a coloração das glumelas nos alelos silenciados, e essa reativação foi acompanhada de hipometilação da sequência *p1*. Essa observação confirmou que o silenciamento de epialelos é induzido por modificações epigenéticas e que o epialelo *p1* foi capaz de retomar a função na presença de um fator ativador trans. Enquanto as regiões de reduzido número de cópias do genoma, geralmente, passam por hipometilação durante a cultura de tecidos, foi demonstrado que genes com repetições em tandem são propensos à hipermetilação e silenciamento genético.

Adicionalmente, alguns fatores, tais como: o efeito do genótipo, o método de propagação, isto é, passagem ou não pela fase de calo, os tipos e concentrações de reguladores de crescimento, o estresse oxidativo, o número, bem como, a duração dos subcultivos, estão associados à indução de variabilidade no material cultivado *in vitro* (OLHOFT; PHILLIPS, 1999; JAIN, 2001; CASSELLS; CURRY, 2001; BAIRU et al., 2010).

As razões pelas quais alguns genótipos apresentam maior estabilidade genética ao passar pela cultura de tecidos ainda não são bem compreendidas. No entanto, é amplamente registrado na literatura que o sucesso na iniciação, crescimento e diferenciação de cultivos *in vitro* varia entre genótipos em uma determinada espécie. A estabilidade diferencial de genótipos submetidos à cultura de tecidos tem sido tema de estudo em diversas culturas. Nas cultivares de aveia Lodi e Tippecanoe houve diferenças quanto à estabilidade genética, com as plantas regeneradas de Lodi apresentando 49% de anormalidades cromossômicas enquanto aquelas de Tippecanoe, somente 12% (MACCOY et al., 1982). Em alho, Al-Zahim et al. (1999), buscando variabilidade genética através de variantes somaclonais, constataram que dentre as cinco cultivares avaliadas, Solent White apresentou uma frequência de variação de 21% em relação ao nível de ploidia de plantas regeneradas a partir de embriões somáticos. Já em batata, Bordallo et al. (2004), buscando genótipos estáveis

para a produção de sementes sintéticas, constataram que dentre as cinco cultivares avaliadas, a Baronesa apresentou o mais alto nível de variação somaclonal e a Contenda, o menor.

O tipo de explante e a rota de organogênese são fatores importantes associados ao aparecimento de variação somaclonal. Na organogênese indireta, a partir do explante primário, ocorre desdiferenciação das células e formação de calo, que é uma massa de células indiferenciadas. As plantas regeneradas a partir de calo apresentam alta frequência de variações, que podem variar de 10 até próximo de 100%, dependendo da espécie vegetal estudada (ILLG, 1991). Para finalidades de micropropagação clonal, a formação de calos é indesejável, uma vez que variantes somaclonais podem ser originados (LARKIN; SCOWCROFT, 1981). Na organogênese direta, a partir do explante primário, há a formação de um eixo caulinar nas gemas apicais, laterais ou axilares. Nesta condição, as plantas regeneradas, de modo geral, são mais estáveis geneticamente, se comparadas com as plantas regeneradas a partir de calo (ILLG, 1991).

O tempo de subcultivo é outro fator ligado ao aumento da instabilidade genética. É conhecido que, células continuamente cultivadas podem sofrer diminuição no crescimento e na organogênese até um ponto em que as células em cultivo perdem a totipotência (MURASHIGE; NAKANO, 1965). Fluminham; Kameya (1996) observaram um aumento nas anormalidades cromossômicas durante o subcultivo de células mitóticas embriogênicas da linhagem de milho Mexico Amber Kernel, sendo que as alterações observadas na anáfase aumentaram de 4%, após três meses, para 10,6%, ao final de um ano de cultivo *in vitro*. Variantes somaclonais foram identificados por Pontaroli; Camadro (2005) em *Asparagus officinalis* cv. Argenteuil em cultura de calo subcultivada durante um ano.

A composição do meio de cultura pode, igualmente, aumentar a frequência de variantes somaclonais. Existem evidências de que nutrientes não balanceados, deficiências nutricionais e reguladores de crescimento em elevadas concentrações, causam mutações. A deficiência em fósforo, por exemplo, também perturba o ciclo celular, pois esse elemento, juntamente com ciclinas, regula esse processo, uma vez que as quinases dependentes de ciclinas, quando fosforiladas no sítio de ativação, enviam uma mensagem para

iniciar a síntese de DNA; se nutrientes básicos estão em deficiência no meio de cultura pode ocorrer desequilíbrio de todo o ciclo celular (TAIZ; ZAIGER, 2002). Em estudo comparativo da estabilidade de genótipos de batata, Bordallo et al. (2004) observaram que o regulador de crescimento Ácido 4-Amino-3,5,6-trichloro-2-piridinocarboxílico (Picloram) promoveu aumento no número de variantes somaclonais nos diferentes genótipos quando comparado à auxina Ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D).

Já foram registrados milhares de variantes somaclonais em batata, como o descrito por Shepard et al. (1980) na cultivar “Russet Burbank” e por Thomas et al. (1982) em “Maris Bard”.

A variabilidade genética introduzida pela cultura de tecidos pode ser uma ferramenta importante na busca por características desejáveis nos programas de melhoramento. Skirvin et al. (1994) relataram que protoplastos isolados da cultivar de batata “Russet Burbank” produziram milhares de progênes variantes, das quais foram selecionados dois ou três clones avançados. Entretanto, podem ocorrer modificações em características diagnósticas da cultivar de batata, tais como cor de polpa e de película, além de resistência a doenças (BINSFELD, 1992).

2.5 Marcadores moleculares

Os marcadores moleculares são ferramentas importantes para detectar variações no genoma, aumentando o poder de análise genética, que varia de acordo com o marcador escolhido. Existe uma grande disponibilidade de marcadores moleculares que podem ser empregados com diferentes finalidades no melhoramento de plantas, tais como identificação de origem parental, identificação e proteção de cultivares, certificação de pureza genética, estudos de diversidade e distância genética, construção de mapas genéticos, entre outras (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995).

Os primeiros marcadores moleculares estabelecidos foram as isoenzimas, sendo reveladas em géis de eletroforese por diferenças no tamanho e carga elétrica. O surpreendente nível de polimorfismo observado,

nestas proteínas, pela primeira vez, dentro de populações trouxe a idéia de que a maioria das mutações é neutra. Este, provavelmente, foi o maior legado das isoenzimas. O surgimento de técnicas de manipulação de DNA, posteriormente, levou ao desenvolvimento de marcadores de Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLPs), que permitiram a análise de regiões não-codificadoras e de mutações silenciosas. Na década de 80, a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) permitiu a amplificação de fragmentos de DNA, e permitiu o desenvolvimento de marcadores de Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD), de Sequências Simples Repetidas (SSR) ou microssatélites e, também, de Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP). Estes dois últimos marcadores têm sido amplamente utilizados em análises de diversidade genética de plantas.

Apesar da disponibilidade de diferentes marcadores, grande parte da informação obtida é oriunda de polimorfismos em regiões do genoma detectadas por marcadores aleatórios. Com a popularização das técnicas de sequenciamento foi possível o desenvolvimento de marcadores funcionais e análise de polimorfismos de sequências. Dentro dessa classe, existe uma ampla gama de variação de técnicas, tais como Polimorfismo de Sequência Única (SPN), Polimorfismo de Amplificação da Região Alvo (TRAP) (HU; VICK, 2003), Sítio de Ligação ao Nucleotídeo (NBS) (VAN DER LINDEN et al., 2004), e *Diversity Arrays Technology* (DArT) (WENZL et al., 2004), dentre outros tipos de marcadores, que, muitas vezes, têm aplicações muito específicas.

Embora exista uma gama de marcadores moleculares disponíveis, os marcadores microssatélites ou sequências simples repetidas (SSR) ou repetições curtas em tandem (STR), constituem a classe mais amplamente usada em estudos genéticos, com aplicações em muitos campos da genética, incluindo conservação de germoplasma, genética de populações, melhoramento molecular, *fingerprint* de indivíduos e teste de paternidade. Esse amplo leque de aplicações se deve ao fato de que os marcadores microssatélites são codominantes e multialélicos, altamente reprodutíveis e baseados na PCR (OLIVEIRA et al., 2006).

Os microssatélites são regiões de DNA repetitivo não codificante compostos de pequenos motivos de um a seis nucleotídeos repetidos em

tandem, que são amplamente distribuídos tanto em genomas procariotos como eucariotos (TÓTH et al., 2000). Além disso, as sequências microsatélites são intrínsecas ou estocasticamente instáveis, devido a sugestões metabólicas ou sob perturbação de condições ambientais, portanto, são marcadores ideais para o acompanhamento da instabilidade do genoma em várias circunstâncias (VARSHNEY et al., 2005).

O uso dos microsatélites para identificação de variação somaclonal foi demonstrado em sorgo (ZHANG et al., 2010) e *Pinus pinaster* (MARUM et al., 2009). Em sorgo, Zhang et al. (2010) avaliaram a estabilidade de um conjunto de 20 *loci* microsatélites, em cultura de calo e plantas regeneradas, de um par de híbridos recíprocos em F₁ e suas linhagens puras parentais. Foram medidos os níveis de transcritos de um conjunto de nove genes de reparo e um gene de DNA glicosilase, sendo testada a possível relação entre a expressão alterada de cada um dos genes de reparo e do gene de glicosilase com as variações nos SSRs. Foi observado que as variações nos SSRs ocorreram nos calos e nas plantas regeneradas das linhagens puras, mas nenhuma variação foi observada nos híbridos. Os autores relataram que uma linhagem pura exibiu alta frequência de variação no conjunto dos 29 *loci* SSRs (20,7%). Assim, foi constatado que genomas híbridos de sorgo são mais estáveis que as linhagens puras para enfrentar as instabilidades genômicas geradas pela cultura de tecidos.

Em *Pinus pinaster*, Marum et al. (2009) observaram que linhagens celulares embriogênicas, bem como as plantas regeneradas a partir dessas linhagens, apresentaram variação genética detectada por sete *loci* SSRs quando subcultivadas por seis, 14 e 22 meses. Assim, os marcadores microsatélites foram eficientes em monitorar eventos de mutação durante a embriogênese somática nesta espécie.

3 CAPÍTULO I – ESTABILIDADE FENOTÍPICA *IN VITRO* DAS CULTIVARES DE BATATA ASTERIX E ATLANTIC NA MICROPROPAGAÇÃO

3.1 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a estabilidade fenotípica de rametes de Asterix e Atlantic ao longo do cultivo inicial e subcultivos, na micropropagação.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios *in vitro* foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento, do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), localizada em Santa Maria, RS.

O presente estudo consistiu em dois experimentos realizados em momentos diferentes, devido ao fato de que apenas o cultivo de ápices caulinares de Asterix foi bem sucedido na primeira tentativa. Os rametes de Atlantic, por sua vez, fracassaram na regeneração em meio nutritivo MS (MURASHIGUE; SKOOG, 1962), apresentando oxidações fenólicas ou albinismo. Por conseguinte, os dois experimentos diferiram na época de isolamento e inoculação em meio nutritivo dos ápices caulinares, e tempo de cultivo e número de repetições, sendo que as demais condições, descritas conjuntamente na sequência, foram idênticas para as duas cultivares.

Os tubérculos das cultivares Asterix e Atlantic, cujas brotações forneceram os ápices caulinares e gemas axilares que deram início à cultura de tecidos, foram provenientes de plantas matrizes indexadas para as principais viroses, proveniente da EMBRAPA – Canoinhas, SC.

3.2.1 Obtenção das brotações e isolamento dos ápices caulinares e gemas axilares

O plantio dos tubérculos de Asterix ocorreu em 04 de março de 2008 em casa-de-vegetação. O isolamento dos ápices caulinares foi realizado em 02 de abril de 2008. Quarenta ápices caulinares foram isolados de brotações de tubérculos, totalizando 40 rametes. Os explantes permaneceram de abril a julho de 2008 em meio nutritivo MS sem reguladores de crescimento; em julho, foram transferidos para meio nutritivo MS acrescido de reguladores. O primeiro subcultivo ocorreu em agosto de 2008, e a cada 30 dias subsequentes foram realizados novos subcultivos, em um total de quatro que perfazem um total de 120 dias.

O plantio dos tubérculos de Atlantic correu em 04 de setembro de 2008 em casa-de-vegetação. O isolamento dos ápices caulinares e gemas axilares foi realizado em 02 de outubro de 2008. Vinte ápices caulinares e igual número de gemas axilares foram isolados de brotações de tubérculos, totalizando 40 rametes. Os explantes permaneceram em meio nutritivo MS sem reguladores de crescimento, de outubro a dezembro de 2008. O primeiro subcultivo ocorreu em janeiro de 2009, e a cada 30 dias subsequentes foram realizados novos subcultivos, somando um total de oito (240 dias).

Os tubérculos das cultivares Asterix e Atlantic foram plantados em vasos de 1,3 L de capacidade (15 cm de altura), com substrato Plantmax[®], para estimular as brotações. Aproximadamente 30 dias após o plantio dos tubérculos, as hastes foram coletadas, desfolhadas e conduzidas ao Laboratório, onde foram separadas em gemas individuais e submetidas à assepsia por imersão em etanol a 70% (v/v) durante 10 segundos, seguida por imersão em hipoclorito de sódio a 2% (v/v) durante 15 minutos, ao qual se adicionaram duas gotas de detergente comercial para cada 100 ml de solução. A seguir, em câmara de fluxo laminar foram realizados três enxágues consecutivos em água destilada e autoclavada. Após, com o auxílio de microscópio estereoscópico, foram extraídos 40 ápices caulinares de Asterix e 20 ápices caulinares e 20 gemas axilares de Atlantic. Os ápices ou gemas que

tinham, aproximadamente, 0,3cm, foram colocados, individualmente, em frascos com 10ml de capacidade, contendo 2ml de meio nutritivo MS (MURASHIGUE; SKOOG, 1962) sem reguladores de crescimento e com 3,0% de sacarose, 100mg L^{-1} de mio-inositol, 0,6% de ágar, em pH 5,7. Os frascos contendo os explantes de Atlantic permaneceram no escuro, em ambiente com temperatura de 25°C , por 72 horas, sendo, posteriormente, transferidos para o ambiente iluminado por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia, com intensidade luminosa de $20\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25\pm 3^{\circ}\text{C}$. Os frascos contendo os explantes de Asterix foram encaminhados diretamente para o ambiente de cultivo, sem passar por um período no escuro.

3.2.2 Cultivo dos ápices caulinares e micropropagação

O período inicial de cultivo foi de 120 dias para Asterix e 90 dias para Atlantic, sendo que, a cada 30 dias, os explantes foram transferidos (subcultivados) para meio fresco, de igual composição, porém suplementado com os fitorreguladores 6-Benzilaminopurina – BAP (1 mg L^{-1}); Ácido α -Naftaleno Acético - ANA ($0,01\text{ mg L}^{-1}$); e Ácido Giberélico - GA₃ ($0,1\text{ mg L}^{-1}$). A partir do cultivo inicial, a cada subcultivo, foram separados, em frascos diferentes, os ápices caulinares e os explantes derivados de organogênese indireta (calo), que originaram novos rametes.

Em ambos os experimentos, após o isolamento dos ápices caulinares e gemas axilares, identificou-se cada ápice/gema (ramete) por um número seguido das letras A que significa ápice caulinar, D designa derivado de calo, TA significando ramete originado de tubérculo derivado de ápice caulinar e TD que significa ramete de tubérculo derivado de derivado de calo. Por exemplo, 33TA significa ramete 33 regenerado de tubérculo de ápice caulinar. A tuberização *in vitro* foi observada ao final do quarto subcultivo.

Ao final do primeiro cultivo, e em cada subcultivo subsequente, foram avaliadas as seguintes variáveis: formação de calo (%), coloração dos calos,

número total de brotos, número total de entrenós, número total de gemas axilares, número total de brotos alongados e taxa de multiplicação. A coloração dos calos foi avaliada a partir do primeiro subcultivo em Asterix e a partir do quarto subcultivo em Atlantic, quando houve formação dessas estruturas adotando-se a seguinte escala de notas: 1 – esbranquiçado; 2 – creme; 3 – creme/verde; 4 – verde/creme; 5 – verde claro/verde/amarelo; 6 – verde; 7 – creme/marrom; 8 – marrom/creme; 9 – verde/marrom; 10 – marrom/verde; e 11 – marrom. Esta avaliação foi de caráter descritivo. A taxa média de multiplicação foi calculada de duas maneiras: a) pelo quociente entre o somatório de ápices e entrenós e o número de explantes, designada TX1, e b) por meio da contagem do número de gemas formadas ao final do período de subcultivo, excluindo-se a gema apical, conforme proposto por Pereira; Fortes (2004), designada TX2.

Decorrido o período inicial de cultivo de Atlantic, a maioria dos ápices caulinares e das gemas axilares foi perdida em decorrência de contaminações microbianas, oxidação fenólica e/ou albinismo. Contudo, ao longo dos subcultivos das culturas remanescentes, foram sendo formados novos explantes por organogênese indireta. Esses novos explantes, derivados de calo, receberam a mesma numeração do ramete de onde se originaram, seguida pela letra D (por exemplo: 15D). Em Asterix, todos os ápices caulinares sobreviveram ao período inicial de cultivo (Figura 1).



Figura 1. A) Ramete 33A de Asterix antes de ser subcultivado, apresentando formação de brotação lateral (indicada pela seta) e de raízes; B) Ramete 29A de Asterix antes do subcultivo, apresentando formação de raízes. C) Ramete 33D, e D) Ramete 33TA de Asterix antes da aclimatização. Santa Maria, RS, UFSM, 2010. Barra = 1cm.

3.2.34 Delineamento experimental e análises estatísticas

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado.

Em Asterix, os rametes foram à única fonte de variação no cultivo inicial e primeiro subcultivo, em função da inexistência de repetições; no segundo, terceiro e quarto subcultivos, puderam ser efetuadas análises em esquema bifatorial A x D, em que os níveis do fator A referiram-se aos diferentes rametes e os níveis do fator D, ao número de subcultivos que foram realizados (Tabela 1).

Em Atlantic, como foram isolados um ápice caulinar e uma gema axilar provenientes de uma única brotação de um mesmo tubérculo, ambos os explantes foram considerados pertencer a um único ramete, havendo, portanto, repetições desde o cultivo inicial para a maioria dos rametes, o que permitiu que as análises, nesta cultivar, fossem efetuadas em arranjo bifatorial A x D desde a primeira avaliação (cultivo inicial). Da mesma maneira que em Asterix, os níveis do fator A referiram-se aos diferentes rametes, mas, em Atlantic, os níveis do fator D foram o cultivo inicial somado aos subcultivos subseqüentes (Tabela 2).

Nas duas cultivares, os níveis do fator A (rametes) variaram ao longo dos subcultivos, em decorrência da formação de explantes que se originaram da organogênese indireta que ocorreu nos explantes iniciais, pela perda de culturas por contaminação microbiana ou oxidação fenólica e, também, pela inexistência de repetições em alguns rametes/subcultivos.

Uma terceira abordagem estatística foi efetuada, considerando-se como fatores principais o tipo de explante (ápice caulinar ou derivado de calo, somando-se todos os rametes) e o cultivo inicial e/ou os subcultivos realizados. Assim, em Asterix, os dados foram analisados em arranjo bifatorial A x D, em que os níveis de A foram dois (os dois tipos de explantes) e D consistiu dos três últimos subcultivos, e, em Atlantic, A foi igualmente dois e D variou de 1 a 9 (o cultivo inicial mais um número variável de subcultivos, cujo máximo foi nove).

Após testar a normalidade dos dados por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett, as variáveis foram transformadas, sempre que necessário, pela função $\sqrt{x+0,5}$ ou arco seno $\sqrt{x/100}$, estas quando expressas em porcentagem, sendo x o valor observado. Foram realizadas análises de variância e, quando o valor de F foi significativo, foi utilizado, quando necessário, para a comparação das médias, o teste de Tukey ou Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. Nas análises estatísticas utilizou-se o programa SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows®, versão 4.0 (FERREIRA, 2000).

Tabela 1 - Número de repetições para cada ramete em cada cultivo/subcultivos para cultivar Asterix. Santa Maria, RS – UFSM, 2010.

Ramete	Cultivo	subcultivo			
		1	2	3	4
1A	1	1	2	2*	-
1D	0	1	2	4	-
2A	1	1	2	-	-
2D	0	1	3	-	-
3A	1	1	2	-	-
3D	0	1	2	-	-
4A	1	1	2	-	-
4D	0	1	4	-	-
5A	1	1	1	-	-
5D	0	0	1	2	-
6A	1	1	1	-	-
7A	1	1	-	-	-
7D	0	1	2	-	-
8A	1	1	0	-	-
8D	0	1	1	-	-
9A	1	1	0	-	-
9D	0	1	1	-	-
10A	1	1	0	-	-
10D	0	0	1	-	-
11A	1	1	-	-	-
12A	1	1	1	-	-
12D	0	0	6	10	20
13A	1	1	1	-	-
14A	1	1	1	-	-
15A	1	1	1	-	-
16A	1	1	2	-	-
17A	1	1	1	-	-

Continuação da Tabela 1 - Número de repetições para cada ramete em cada cultivo/subcultivos para cultivar Asterix. Santa Maria, RS – UFSM, 2010.

17D	0	0	2	5	8
18A	1	1	1	-	-
19A	1	1	1	-	-
20A	1	1	-	-	-
20D	0	0	3	11	20
21A	1	1	1	10	20
21D	0	0	1	11	20
22A	1	1	1	12	20
22D	0	0	2	12	20
23A	1	1	2	10	20
23D	0	0	2	12	20
24A	1	1	4	14	20
26A	1	1	1	-	-
26D	0	0	1	8	18
27A	1	1	1	-	-
27D	0	0	4	8	8
28A	1	1	1	10	20
28D	0	0	1	0	-
29A	1	1	1	6	20
29D	0	0	6	12	9
30A	1	1	6	10	10
30D	0	0	3	16	18
31A	1	1	2	10	14
31D	0	0	3	16	18
32A	1	1	1	4	18
32D	0	0	1	8	18
33A	1	1	8	26	20
33D	0	1	4	16	18
34A	1	1	1	-	-

Continuação da Tabela 1 - Número de repetições para cada ramete em cada cultivo/subcultivos para cultivar Asterix. Santa Maria, RS – UFSM, 2010

34D	0	0	1	2	2
35A	1	1	1	1	2
35D	0	0	2	2	8
36A	1	1	2	15	18
36D	0	0	1	4	14
37A	1	1	1	-	-
37D	0	0	1	-	-
38A	1	1	1	-	-
38D	0	0	2	2	-
39A	1	1	1	-	-
40A	1	1	3	-	-
40D	0	0	2	2	-

* Rametes que não apresentam repetição no subcultivo seguinte foram perdidos.

Tabela 2 - Número de repetições para cada ramete em cada cultivo/subcultivos para a cultivar Atlantic. Santa Maria, RS – UFSM, 2010.

Ramete	Cultivo	Subcultivo							
		1	2	3	4	5	6	7	8
1D	2	5	2	3*	-	-	-	-	-
2D	2	6	3	-	-	-	-	-	-
3D	2	5	3	3	12	21	20	20	20
4D	2	4	3	-	-	-	-	-	-
5D	2	7	21	27	21	24	21	20	24
6A	2	5	-	-	-	-	-	-	-
6D	-	-	5	-	-	-	-	-	-
7D	2	6	15	14	8	7	2	-	-
8D	2	4	2	-	-	-	-	-	-

Continuação da Tabela 2 - Número de repetições para cada ramete em cada cultivo/subcultivos para a cultivar Atlantic. Santa Maria, RS – UFSM, 2010.

9A	2	3	-	-	-	-	-	-	-
9D	2	-	1	-	-	-	-	-	-
10D	2	4	2	2	-	-	-	-	-
11A	2	4	-	-	-	-	-	-	-
12D	2	4	-	-	-	-	-	-	-
13D	2	5	14	24	20	22	20	21	24
14A	2	3	3	6	25	24	22	24	22
14D	-	2	11	13	22	22	20	22	20
15D	2	6	8	8	-	-	-	-	-
16A	2	1	1	-	-	-	-	-	-
16D	2	2	5	6	12	20	20	24	20
17D	2	5	3	-	-	-	-	-	-

* Rametes que não apresentam repetição no subcultivo seguinte foram perdidos.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em Asterix, decorridos os 120 dias do cultivo inicial, todos os rametes sobreviveram. O tempo de cultivo inicial foi semelhante ao observado por Augustin et al. (2006), para esta cultivar, sendo suficiente para que os explantes regenerados a partir do ápice caulinar atingissem tamanho ideal para proceder-se o primeiro subcultivo. As perdas de alguns dos rametes ao longo dos subcultivos foram ocasionadas por albinismo, oxidações fenólicas ou contaminações microbianas.

No cultivo inicial e no primeiro subcultivo, os rametes de Asterix não diferiram na calogênese, observando-se uma elevada média de 92,92% de formação de calos. Da mesma maneira, nos três subcultivos subsequentes não houve diferença entre os rametes, que tiveram, novamente, uma elevada média de 99,79% de formação de calos.

Em Asterix, ainda, quando foram analisados os tipos de explantes (ápice caulinar e derivado de calo) nos três últimos subcultivos, sem se discriminar os rametes, verificou-se interação entre os dois fatores principais. Nesta cultivar, no segundo subcultivo, as culturas originadas a partir de ápices formaram menos calos (93,88%) que aquelas iniciadas por explantes oriundos de organogênese indireta (100%) (Tabela 3).

Contudo, em todos os cultivos, mesmo no inicial, na ausência de reguladores de crescimento, houve uma elevada calogênese em Asterix, o que significa que esse genótipo responde formando calos nas condições a que as culturas foram submetidas, e, também, que neste aspecto não há variabilidade intraclonal.

Em Atlantic, decorridos os 90 dias do cultivo inicial, apenas cinco rametes (6A, 9A, 11A, 14A e 16A) sobreviveram. Destes, apenas 14A permaneceu até o final das avaliações; os demais sobreviveram apenas até o primeiro (6A, 9A e 11A) ou segundo (16A) subcultivos. Contudo, a maioria destes rametes, antes de morrer, formou novos rametes por organogênese indireta, entretanto, novamente, a maior parcela desses propágulos não resistiu até o final das avaliações. Essas perdas foram ocasionadas por contaminações microbianas, albinismo ou oxidações fenólicas.

Em Atlantic houve interação entre os rametes e os cultivos na formação de calos. No cultivo inicial e no primeiro subcultivo foi possível observar a formação de três grupos em relação à calogênese. Nos primeiros 120 dias, houve rametes que não formaram calos; que formaram calos em 50% dos explantes; e uma maioria em que houve 100% de formação de calos (Tabela 4). Já no primeiro subcultivo em todos os três grupos houve calogênese, na faixa dos 60-67% no primeiro; 75-80% no segundo grupo; e 100% no terceiro. Nos demais subcultivos, não houve diferença entre os rametes, verificando-se, na grande maioria das vezes, 100% de calogênese. Nos rametes foi possível observar que, aqueles poucos que não formaram calos no cultivo inicial, responderam à suplementação de reguladores de crescimento no meio nutritivo e após 30 dias já apresentaram 100% de calogênese. Verifica-se, portanto, que, na ausência de fitorreguladores há um comportamento diferente dos rametes de Atlantic em relação à calogênese, as quais podem ser decorrentes de uma velocidade de resposta (iniciação) celular variada à cultura de tecidos.

Em relação ao tipo de explante empregado para regenerar as partes aéreas, em Atlantic, os derivados de calo formaram mais calos que os originados a partir de ápices caulinares, mas apenas no cultivo inicial e primeiro subcultivo, nos demais não houve diferença entre os tipos de explantes em relação à calogênese, que atingiu 100% ou em torno desse valor (Tabela 5). Os ápices formaram menos calos no cultivo inicial e primeiro subcultivo, que diferiram entre si e, igualmente, dos subcultivos seguintes; já nos derivados de calo, a calogênese foi diferenciada (e menor), apenas no cultivo inicial (Tabela 5).

Conceitualmente, o calo é considerado um tecido desdiferenciado, ou pouco diferenciado, podendo ser induzido, tornando-se determinado e, finalmente, sofrer rediferenciação para formar gemas caulinares ou raízes, conforme o balanço hormonal existente (SKOOG; MILLER, 1957). Portanto, na mudança do cultivo inicial (sem reguladores de crescimento) para os subcultivos, nos quais foram adicionados a citocinina BAP e a auxina ANA, que, provavelmente, alteraram o balanço hormonal endógeno, foi induzida a calogênese. Os rametes de Asterix e Atlantic tiveram comportamento diferenciado, pois já no cultivo inicial houve formação de calo. Essa formação de calo em meio de cultura sem reguladores de crescimento não era esperada.

Os resultados obtidos no presente trabalho são discordantes daqueles relatados por Fiegert et al. (2000), que não registraram formação de calo quando usaram meio nutritivo MS sem reguladores de crescimento no cultivo de ápices caulinares de batata. O comportamento dos rametes de Asterix e Atlantic pode ser decorrente de uma resposta de estresse causada pelo ambiente de cultivo *in vitro*, uma vez que o genoma da planta pode passar por intensas modificações para poder responder às condições de um novo ambiente (KAEPPLE et al., 2000; McCLINTOCK, 1983).

A formação de calo durante os subcultivos também não era esperada, à medida que foi utilizado o protocolo descrito por Resende; Paiva (1985), cujo balanço hormonal favorece a formação de parte aérea. Pereira; Fortes (2004), empregando este mesmo protocolo para o cultivo de ápices caulinares das cultivares Baronesa, Eliza e Pérola, obtiveram apenas 0,4% de calogênese. Dessa forma, os resultados obtidos no presente trabalho podem ser decorrentes de uma resposta ao estresse gerado pelo ambiente de cultivo *in vitro*, acarretando variabilidade no comportamento dos rametes de Asterix e Atlantic durante os subcultivos (KAEPPLE et al., 2000).

Quanto à coloração do calo, no cultivo inicial e primeiro subcultivo, nos rametes de Asterix observou-se a formação de dois grupos, no primeiro, de maior amplitude de variação, no intervalo de notas 1 a 7, que equivale às cores: esbranquiçado, creme, creme/verde, verde/creme, verde claro/verde/amarelo, verde até creme/marrom; e o segundo grupo, formado por rametes cuja coloração variou entre marrom/creme a marrom (notas 8 a 11). Nos subcultivos seguintes, considerando cada ramete, formaram-se cinco grupos, contudo, a amplitude de variação observada no cultivo inicial e primeiro subcultivo repetiu-se: os calos apresentaram coloração de esbranquiçada (nota 1) a marrom (nota 11). De uma maneira geral, considerando os subcultivos observou-se a predominância das colorações verde/claro, verde e marrom.

Considerando os rametes em função do tipo de explante que os originou, em Asterix, observou-se naqueles oriundos de ápice caular coloração verde, enquanto naqueles derivados de calo houve predomínio da coloração creme/marrom. Em relação aos subcultivos, as notas dos calos foram aumentando, observando-se calos verde/claro (notas igual a 5) no

segundo subcultivo que se tornaram creme-marrom no quarto (média das notas igual a 7).

Nos rametes de Atlantic, a coloração dos calos somente foi avaliada a partir do terceiro subcultivo. Sendo assim, a coloração dos calos apresentou uma amplitude menor de variação, de 1 a 6, variando de esbranquiçado a verde. Quando foram considerados apenas os diferentes rametes, a coloração variou de verde /claro a creme/marrom.

Em Atlantic, ainda, em relação ao tipo de explante, não houve diferenças na coloração entre culturas oriundas de ápices caulinares e derivadas de calo até o oitavo subcultivo, formando-se, inicialmente, calos verde-claro a verde amarelado e, depois calos verde; no último subcultivo, aquelas culturas formaram calos de coloração marrom/creme e estas, de cor verde.

A variação na coloração de calos observada para os diferentes rametes de Asterix e Atlantic, ao longo dos cultivos, neste estudo, foi bastante ampla. Uma grande variação na coloração de calos foi, igualmente, registrada por Shirin et al. (2007), que obtiveram calos de cor branca, creme, amarela, amarelo-claro, verde-claro, marrom-claro e marrom na indução de calogênese em explantes foliares e internodais de quatro cultivares de batata cultivadas em meio nutritivo MS, suplementado com diferentes concentrações e combinações de auxinas (2,4-D e ANA) e citocininas (Benziladenina – BA e cinetina - CIN). Entretanto, no presente trabalho, as condições nutritivas fornecida pelos sais do meio MS, vitaminas, sacarose e reguladores de crescimento, foram idênticas para todos os rametes, indicando que a base da variação está relacionada ao potencial genético ou epigenético de Asterix e Atlantic. Nos subcultivos, tanto de Asterix quanto de Atlantic, observou-se o predomínio da cor verde. Abd Elaleem et al. (2009), trabalhando com a cultivar Diamant, observaram a coloração verde e o aspecto rígido quando utilizaram meio nutritivo MS suplementado $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP.

Os rametes de Asterix, dividiram-se em dois grupos em relação à média do número de brotos formados: um constituído pelo maior de número de rametes, porém com menor formação de brotos (médias entre 0,0 e 1,67) e um segundo com apenas seis rametes, com 2,33 a 4,33 brotos formados (Tabela 6). Nos subcultivos que se seguiram (Tabela 10), houve interação entre os fatores principais, verificando-se, no segundo subcultivo, um máximo de 4,5-5

brotos em dois rametes (23A e 33D), os quais, no cultivo inicial e primeiro subcultivo constituíram o grupo menos produtivo e que, no terceiro subcultivo, integraram o grupo intermediário em relação ao número de brotos formados, com médias de 1,0 e 0,88 respectivamente. No quarto e último subcultivo, estes dois rametes não diferiram dos demais, observando-se uma média de 1,0 e 0,94 brotos por explante.

Os resultados da reunião dos rametes de Asterix em função do tipo de explante que os originou, para o número de brotos, nos três últimos subcultivos (Tabela 11), confirmam a tendência de redução na capacidade morfogênética das culturas nos subcultivos. Os ápices caulinares produziram mais brotos no segundo e terceiro subcultivos, cujas médias não diferiram, mas no último subcultivo observou-se uma redução significativa. Já nos explantes derivados de calo não houve diferença no número de brotos nos três últimos subcultivos.

Os rametes de Atlantic, em relação à média de formação total de brotos diferenciaram-se em dois grupos de tamanho semelhante: um com médias entre 0,08 e 0,22 e os mais produtivos, com 0,75 a 1,28 (Tabela 7). Aqueles rametes que tiveram um número maior de subcultivos ou que sobreviveram até o final dos subcultivos apresentaram as maiores médias de brotações, conforme era de se esperar. Apenas quatro rametes (5D, 14A, 16A e 16D) tiveram médias iguais ou superiores a um e, destes, três chegaram ao último subcultivo. As médias, para número de brotos formados, obtidas foram semelhantes às observadas por Pereira; Fortes (2004) quando estudaram a influência da consistência do meio de cultura sobre o crescimento e desenvolvimento de meristemas das cultivares de batata Baronesa, Eliza e Pérola. Em relação aos cultivos de Atlantic (Tabela 8), o cultivo inicial e o primeiro subcultivo não diferiram entre si, apresentando as menores médias de brotos formados. Contudo, diferiram dos demais subcultivos, que apresentaram maior formação total de brotos. Esses resultados demonstram que os rametes de Atlantic não perderam a capacidade de regeneração de novos brotos durante os oito subcultivos, contrastando com o comportamento dos rametes de Asterix, relatados anteriormente. Diferem, igualmente, dos resultados de Ahloowalia et al. (1981), que observaram redução na capacidade regenerativa em explantes de batata subcultivados continuamente em meio nutritivo suplementado com BAP.

Em Atlantic, o número de brotos formados equivaleu-se nas culturas originadas por ápice caulinar e derivado de calo, exceto no segundo, terceiro e sexto subcultivos, em que os primeiros tipos de explantes produziram mais brotos que os últimos (Tabela 12). Nos derivados de calo, o cultivo inicial e os dois primeiros subcultivos foram menos produtivos na diferenciação de brotos comparados aos subcultivos seguintes. Nas culturas regeneradas a partir de ápices caulinares, o comportamento não foi tão linear, sobressaindo-se em produtividade os subcultivos de número dois, três e seis, sem razão aparente.

Em relação ao número de entrenós, os rametes de Asterix não diferiram no cultivo inicial e primeiro subcultivo (média 0,80). Esse resultado pode ser devido ao fato de que, nesse período inicial de 120 dias, as culturas estavam se estabelecendo e, além disso, nesse período, o meio nutritivo não continha reguladores de crescimento. Nos subcultivos subsequentes, entretanto, formaram-se dois ou três grupos de rametes, nos quais se destacaram 23A, 24A e 33A, que se mantiveram dentro do grupo com maior número de entrenós (Tabela 13).

Os resultados da reunião dos rametes de Asterix em função do tipo de explante que os originou, ao longo dos três últimos subcultivos, demonstraram, novamente, a superioridade dos ápices caulinares em detrimento dos derivados de calo (Tabela 14). Os ápices caulinares produziram mais entrenós no terceiro subcultivo (3,82) comparado ao desempenho do segundo e quarto subcultivos neste quesito; os derivados de calo, por sua vez, não diferiram nos três subcultivos avaliados, apresentando média de 1,52 entrenós.

Em relação ao número total de entrenós, os rametes 3D, 5D, 7D, 13D, 14A, 14D 16A e 16D de Atlantic apresentaram as maiores médias (1,67 a 2,73), diferindo dos demais cujas médias variaram de zero a 1,43 (Tabela 15). Os melhores resultados foram observados no terceiro, quinto, sétimo e oitavo subcultivos, enquanto o menor desempenho ocorreu no cultivo inicial e primeiro subcultivo (Tabela 16). Observou-se uma oscilação no rendimento de entrenós, mas, de uma maneira geral, os resultados ajustaram-se às expectativas de menor formação no início da cultura e maior no final.

No segundo, terceiro e sétimo subcultivos de Atlantic, os ápices apresentaram mais entrenós que os derivados de calo, nos demais cultivos, os dois tipos de explantes não diferiram. Nos ápices, o terceiro subcultivo foi o que

apresentou mais entrenós, diferindo de todos os demais cultivos; nos calos, os terceiro, o quinto e o oitavo subcultivos foram os mais produtivos neste quesito, diferindo dos demais (Tabela 17).

A formação de entrenós está ligada à formação de brotos e sua alongação, e à formação de gemas nos brotos. O desenvolvimento e o crescimento dos entrenós é um parâmetro importante na micropropagação de batata, pois está relacionado à taxa de multiplicação de segmentos viáveis, isto é, segmentos em torno de 1 cm de comprimento, contendo, no mínimo, uma folha e uma gema (AUGUSTIN et.al., 2006). No presente trabalho, observou-se que tanto os rametes de Asterix como os de Atlantic apresentaram entrenós viáveis, contribuíram para aumentar a taxa média de multiplicação TX1.

Os rametes de Asterix não diferiram no número de gemas formadas no cultivo inicial e primeiro subcultivo, apresentando média de 1,63. Nos demais subcultivos (Tabela 18), os rametes 23A, 24A e, principalmente, 33A destacaram-se em superioridade nesta variável, sendo que seu comportamento foi variável: 23A formou mais gemas no segundo subcultivo; 24A teve o pior desempenho no quarto subcultivo; e 33A, foi melhor no segundo e terceiro subcultivos.

Os resultados da reunião dos rametes de Asterix em função do tipo de explante que os originou, ao longo dos três últimos subcultivos, demonstraram, outra vez, a superioridade dos ápices caulinares na formação de gemas em comparação aos derivados de calo. Os ápices caulinares produziram mais gemas nos três últimos subcultivos comparados aos derivados de calo. Nos subcultivos, os ápices foram mais produtivos no terceiro, enquanto os calos não apresentaram diferenças na formação de gemas nos subcultivos avaliados (Tabela 19).

Em Atlantic, no que diz respeito às gemas formadas, os rametes reuniram-se em dois grupos diferentes (Tabela 15) e em três grupos considerando-se os cultivos (Tabela 16). Os subcultivos com maiores médias foram o terceiro, o quinto, o sétimo e oitavo subcultivos, que não diferiram entre si. Apesar de divergir um pouco das expectativas, pois se esperava um aumento linear na formação de gemas ao longo dos cultivos (o quarto e o sexto subcultivos reuniram-se no grupo intermediário, juntamente com o segundo), os

dois últimos subcultivos enquadraram-se nesse grupo que se destacou positivamente na formação de gemas.

No segundo, terceiro, quinto e sétimo subcultivos, em Atlantic, as culturas regeneradas a partir de ápices produziram mais gemas que aquelas derivadas de calo, mas no oitavo, estas foram superiores. Nas culturas regeneradas a partir de calo, houve um aumento linear na formação de gemas ao longo dos cultivos, entretanto, o mesmo não ocorreu naquelas originadas a partir de explantes oriundos de organogênese direta, em que não se observa um padrão de desempenho capaz de justificar a oscilação para a média do número de gemas formadas nos subcultivos (Tabela 20).

Os resultados observados no presente estudo situam-se dentro da faixa registrada por Hussain et al. (2005) para número de gemas formadas a partir de diferentes fontes de explante via regeneração direta em cultivares de batata. Da mesma maneira, para os rametes e subcultivos mais produtivos de Asterix e Atlantic as médias são iguais ou superiores à média de cinco gemas por broto obtida em diferentes cultivares batata em meio de multiplicação suplementado com BAP, Ácido Indol Acético - AIA e GA₃ (ROCA et al., 1978; MARINUS, 1984).

Em relação ao número de brotos alongados, no cultivo inicial e primeiro subcultivo, não houve variabilidade intraclonal em Asterix, obtendo-se uma média baixa (0,28), porém adequada ao estágio de desenvolvimento *in vitro* das culturas. Nos subcultivos que se seguiram, porém, houve rametes que manifestaram superioridade em um ou mais subcultivos (Tabela 21). Isolando-se o tipo de explante, verificou-se, mais uma vez, a superioridade dos ápices caulinares que tiveram mais brotos alongados que os derivados de calo em todos os três subcultivos avaliados (Tabela 22).

Nos rametes de Atlantic, as médias de brotos alongados variaram de zero a 1,02, esta última média sendo observada em 5D. Os rametes que apresentaram médias iguais ou superiores a 0,75 formaram um grupo que não diferiu entre si, mas diferiu do outro grupo de rametes de menor alongamento (Tabela 7). Dentre aqueles do primeiro grupo, apenas dois (7D e 16A) não chegaram até o oitavo subcultivo, contudo, mesmo assim, efetuaram um alongamento nas brotações comparável àqueles que foram subcultivados por mais tempo. Esse desempenho diferenciado dos rametes submetidos a

condições de cultivo idênticas reforça a existência de variabilidade intraclonal nesta cultivar. No cultivo inicial e no primeiro subcultivo ocorreu a menor alongação, que diferiu dos demais subcultivos (Tabela 9)

Em Atlantic, ainda, as culturas regeneradas a partir de ápices caulinares tiveram mais brotos alongados que aquelas originadas por explantes derivados de calo no segundo, terceiro, quarto e sexto subcultivos; nos demais subcultivos, não houve diferença entre os dois tipos de explantes (Tabela 23). O cultivo inicial e o primeiro subcultivo, bem como o último subcultivos foram aqueles em que as culturas regeneradas a partir de ápices apresentaram menor alongação dos brotos, contrastando com aquelas regeneradas a partir de calo, em que a menor alongação foi verificada apenas no cultivo inicial e dois primeiros subcultivos. Contudo, o alongamento que ocorreu nos rametes de Asterix e Atlantic foi satisfatório, permitindo sua posterior aclimatização no sistema contendo areia como substrato.

Em Asterix, no cultivo inicial e no primeiro subcultivo não houve diferenças entre os rametes no que concerne à rizogênese, observando-se uma média muito baixa (2,68%), adequada, entretanto, ao estágio de desenvolvimento *in vitro* das culturas. Nos subcultivos subsequentes, também não houve diferenças entre os rametes no que diz respeito à formação de raízes, que apresentaram 22,10% de enraizamento; entretanto, observaram-se diferenças entre o segundo (10%) e o terceiro (21,55%) e quarto (26,91%) subcultivos.

Considerando-se o efeito do tipo de explante que originou as culturas, verificou-se, em Asterix, que os ápices caulinares foram superiores aos derivados de calo apenas no terceiro subcultivo, e no segundo e quarto, não diferiram (Tabela 24). Ambos os tipos de explantes desenvolveram brotações que progrediram no enraizamento ao longo dos três subcultivos avaliados.

Em Atlantic, observaram-se dois grupos em relação à formação de raízes: um, com maior número de integrantes, em que não houve rizogênese ou foi inferior a 15%; e outro, formado por apenas cinco rametes, os quais apresentaram 23,58% a 51,15% de raízes (Tabela 8). De uma maneira geral, a rizogênese aumentou linearmente ao longo dos subcultivos, em ambos os tipos de explantes (Tabela 8). Embora não tenha ocorrido a formação *in vitro* de raízes na totalidade das culturas, posteriormente, durante a aclimatização das

plantas, isso ocorreu, o que permitiu um adequado desenvolvimento dos rametes no cultivo em sistema hidropônico.

Em Atlantic, ainda, no quarto, quinto, sexto e sétimo subcultivos, as culturas oriundas de ápices diferenciaram mais raízes que aquelas derivadas de calo (Tabela 25). Os ápices produziram mais raízes a partir do terceiro subcultivo, enquanto os calos formaram mais raízes no último subcultivo, que não diferiu do quinto subcultivo, sem razão aparente.

A indução de raízes *in vitro* é uma etapa importante no processo de aclimatização, pois auxilia as plantas no processo de transição entre o ambiente heterotrófico do cultivo *in vitro* para o ambiente autotrófico (HOQUE, 2010) que, neste estudo, foi efetuado pelo sistema de aclimatização tendo areia como substrato (BANDINELLI, 2009).

Os rametes de Asterix apresentaram diferenças significativas para a taxa média de multiplicação TX1. Formaram-se dois grupos: o primeiro, com médias variando entre zero e 3,3, diferiu do segundo grupo, em que as médias variaram entre 4, 2 e 8,50 (Tabela 6). Deve-se esclarecer que média igual a zero refere-se aos rametes que se mantiveram como calo ou foram perdidos antes do término das avaliações.

Em Asterix, ainda, as culturas desenvolvidas a partir de ápices caulinares não diferiram daquelas originadas por calos, sendo observada uma taxa média de 1,94. Entretanto, as taxas de multiplicação incrementaram-se significativamente a partir do segundo subcultivo (Tabela 26).

Já no que diz respeito à taxa média de multiplicação TX2, os rametes de Asterix também diferiram entre si (Tabela 6). Observou-se a estratificação dos rametes em três partes: uma reunindo rametes com as menores (TX2 variando entre zero e 13,8); a segunda com TX2 variando entre 14,6 e 37,8; e a última representada pelo ramete 33A com TX2 igual a 72, foi superior aos demais. Verificou-se interação entre os fatores principais tipo de explante e cultivos na taxa média de multiplicação TX2 (Tabela 27), observando-se a superioridade dos ápices caulinares em relação aos derivados de calo apenas no terceiro subcultivo. Nos ápices, as taxas médias se incrementaram significativamente a partir do terceiro subcultivo, enquanto que nos derivados de calo observou-se um aumento mais gradual, com a formação de três grupos (cultivo inicial e primeiro e segundo subcultivos; terceiro subcultivo e quarto subcultivo).

Nos diferentes rametes de Atlantic houve a formação de dois grupos para a taxa de multiplicação TX1. No primeiro grupo de rametes, TX1 variou entre zero e 2, que diferiu dos rametes mais produtivos com médias entre 2,89 e 5,05 (Tabela 15). Os ápices caulinares foram mais eficientes que os derivados de calo somente no segundo e terceiro subcultivos, igualando-se a partir do quarto (Tabela 28).

Os rametes de Atlantic também demonstraram diferenças significativas para a taxa de multiplicação TX2. Nesta, observou-se, também, a formação de dois grupos; no primeiro, as médias variaram entre zero e 17,67, enquanto que, no segundo grupo, as médias variaram entre 34,83 e 102,38 (Tabela 15). Os rametes originados de ápices foram, desta vez, menos produtivos que aqueles derivados de calo (18,33 versus 36,59), entretanto, independente do tipo de explante ocorreu, em geral, um aumento gradativo na multiplicação ao longo dos cultivos (Tabela 29).

A taxa de multiplicação é um fator importante a ser considerado em relação à estabilidade do material propagado *in vitro*. Na cultura do morangueiro, a taxa de multiplicação é um dos parâmetros avaliados na homogeneidade do material, em que taxas elevadas podem ser indicativas de variação somaclonal (CALVETE et al, 2009).

O comportamento *in vitro* diferenciado dos rametes de Asterix e de Atlantic pode ser avaliado por meio da comparação entre as médias das taxas de multiplicação. No presente estudo, as taxas de multiplicação foram estimadas por meio de duas expressões. Na primeira, identificada como TX1, calculou-se quociente entre o número de brotos formados e o número de entrenós pelo número de explantes no período de cultivo, estimando-se a capacidade de crescimento e desenvolvimento do material micropropagado. Enquanto que, na segunda (TX2), o número total de gemas formadas no período, excluindo-se a apical, foi considerado para o cálculo da taxa de multiplicação; esta estima o potencial de propagação do material em cultivo.

Nos rametes de Asterix, para a taxa de multiplicação TX1, os valores médios obtidos, de 4,62 e 8,5, estão dentro da faixa recomendada para incrementos na taxa de multiplicação por meio de modificações nos protocolos de micropropagação em batata. Pereira; Fortes (2004), estudando a consistência do meio nutritivo nas fases de estabelecimento e multiplicação,

sobre o crescimento e desenvolvimento de ápices caulinares das cultivares de batata Baronesa, Eliza e Pérola observaram taxas de multiplicação variando entre 2,3 e 8,4. Já nos rametes de Atlantic, observaram-se menores taxas de multiplicação, as quais, entretanto, encontram-se dentro da faixa registrada na literatura pertinente à taxa de multiplicação em batata.

Com relação à taxa de multiplicação TX2, que considera o número total de gemas formadas no período de cultivo, a maioria dos rametes de Asterix e Atlantic apresentou médias de taxa de multiplicação superiores às registradas na literatura, tanto para explantes originados de ápices caulinares como para aqueles derivados de calo (PEREIRA; FORTES, 2003; PEREIRA; FORTES, 2004; HUSSAIN et al., 2005; HOQUE, 2010). Para ilustrar, os rametes mais produtivos das duas cultivares avaliadas, o 33A de Asterix, apresentou uma taxa média de multiplicação, ao longo dos subcultivos, de 72, enquanto que o ramete 5D de Atlantic teve uma média de 102,38 gemas formadas ao longo dos subcultivos. Esses resultados ratificam as afirmações anteriormente registradas no presente trabalho, referentes às outras variáveis-resposta analisadas, de que ocorreu variação somaclonal nas duas cultivares estudadas.

3.4 CONCLUSÃO

As cultivares de batata Asterix e Atlantic apresentam extensa variabilidade intraclonal revelando-se fenotipicamente instáveis, no que diz respeito à estabilidade *in vitro*.

Tabela 3 - Tipo de explante e os subcultivos sobre a formação de calos (%) na cultivar de batata Asterix, em meio nutritivo MS na presença de reguladores de crescimento. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Tipo de explante	Subcultivo			Média
	2	3	4	
Ápice caulinar	93,88bB ¹	100,00aA	100,00aA	97,96
Derivado de calo	100,00aA	100,00aA	100,00aA	100,00
Média	96,94	100,00	100,00	99,61
CV(%)	2,56			

¹Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 4 – Rametes e cultivos e a formação de calos (%) na cultivar de batata Atlantic, cujos explantes foram cultivados por um período inicial de 90 dias em meio nutritivo MS na ausência de reguladores de crescimento e subcultivados oito vezes, a cada 30 dias, em meio fresco idêntico, porém na presença de reguladores de crescimento. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Ramete	Cultivo inicial	Subcultivo								Média
		1	2	3	4	5	6	7	8	
1D ¹	100,0aA ³	60,0cB	100,0aA	100,0aA ⁴	-	-	-	-	-	90,0
2D	100,0aA	100,0aA	100,0aA	-	-	-	-	-	-	100,0
3D	100,0aA	100,0aA	100,0aA	100,0aA	100,0aA	100,0aA	100,0aA	100,0aA	100,0aA	100,0
4D	100,0aA	100,0aA	100,0aA	-	-	-	-	-	-	100,0
5D	100,0aA	100,0aA	100,0aA	100,0aA	100,0aA	100,0aA	100,0aA	100,0aA	100,0aA	100,0
6A ²	0,0cB	80,0bA	-	-	-	-	-	-	-	40,0
6D	-	-	100,0a	-	-	-	-	-	-	100,0
7D	100,0aA	100,0aA	100,0aA	100,0aA	100,0aA	100,0aA	100,0aA	-	-	100,0
8D	100,0aA	100,0aA	100,0aA	-	-	-	-	-	-	100,0
9A	0,0cB	66,7cA	-	-	-	-	-	-	-	33,4
10D	100aA	100,0aA	100,0aA	100,0aA	-	-	-	-	-	100,0
11A	50,0bB	75,0bA	-	-	-	-	-	-	-	62,5
12D	100,0aA	100,0aA	-	-	-	-	-	-	-	100,0
13D	50,0bB	100,0aA	100,0aA	100,0aA	100, 0aA	100,0aA	100,0aA	95,2aA	100,0aA	93,8
14A	0,0cB	100,0aA	100,0aA	100,0aA	100,0aA	100,0aA	100,0aA	100,0aA	100,0aA	88,9
14D	0,0cB	-	100,0aA	100,0aA	100,0aA	100,0aA	100,0aA	100,0aA	100,0aA	88,9
15D	100,0aA	100,0aA	100,0aA	100,0aA	100,0aA	-	-	-	-	100,0
16A	100, 0aA	100,0aA	100,0aA	-	-	-	-	-	-	100,0
16D	100,0aA	100,0aA	100,0aA	100,0aA	100,0aA	100,0aA	100,0aA	100,0aA	100,0aA	100,0
17D	100,0aA	100,0aA	100,0aA	-	-	-	-	-	-	100,0
Média	75,0	93,4	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	99,2	100,0	98,4
CV (%)	3,3									

¹ Ramete originado por organogênese indireta. ² Ramete originado por organogênese direta. ³ Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. ⁴ Ramete que não apresenta repetição no subcultivo seguinte foi perdido.

Tabela 5 – Tipo de explante e os cultivos e a formação de calos (%) na cultivar de batata Atlantic, cujos explantes foram cultivados por um período inicial de 90 dias em meio nutritivo MS na ausência de reguladores de crescimento e subcultivados oito vezes, a cada 30 dias, em meio fresco idêntico, porém na presença de reguladores de crescimento. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Tipo de Explante	Cultivo Inicial	Subcultivo								Média
		1	2	3	4	5	6	7	8	
Ápice caulinar	30,0bC*	82,4bB	100,0aA	100,0aA	100,0aA	100,0aA	100,0aA	99,1aA	100,0aA	90,2
Derivado de calo	89,3aB	96,6aA	100,0aA	100,0aA	100,0aA	100,0aA	100,0aA	100,0aA	100,0aA	98,4
Média	98,4	59,65	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	99,55	100,0	98,3
CV(%)	4,4									

* Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 6 – Rametes da cultivar de batata Asterix e o número de brotos, taxa média de multiplicação TX1 e taxa média de multiplicação TX2, cujos explantes foram cultivados por um período inicial de 120 dias em meio nutritivo MS na ausência de reguladores de crescimento e subcultivados quatro vezes, a cada 30 dias, em meio fresco idêntico, porém na presença de reguladores de crescimento. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Ramete	Número de brotos	Taxa média de multiplicação TX1	Taxa média de multiplicação TX2
1A ¹	0,33b ³	0,75b	0,75c
2A	0,50b	0,67b	0,67c
2D ²	- ⁴	0,33b	0,33c
3A	0,50b	0,67b	0,67c
4A	0,50b	0,33b	0,33c
4D	-	0,50b	0,50c
5A	0,67b	0,67b	0,67c
5D	0,00b	1,50b	1,25c
6A	0,33b	0,67b	0,67c
7A	0,50b	0,67b	0,67c
8A	0,50b	0,67b	0,67c
8D	0,00b	-	-
9A	0,50b	0,67b	0,67c
9D	0,00b	0,67b	0,67c
10A	0,50b	0,67b	0,67c
10D	0,00b	-	-
11A	0,50b	0,67b	0,67c
12A	0,67b	1,33b	1,00c
12D	-	1,68b	15,4b
13A	0,33b	0,67b	0,67c
14A	0,33b	0,67b	0,67c
15A	0,33b	0,67b	0,67c
16A	0,50b	0,67b	0,67c
17A	0,33b	0,67b	0,67c
17D	-	1,58B	6,40c
18A	0,33b	0,50b	0,50c
19A	0,33b	0,67b	0,67c
20A	1,00b	1,33b	1,00c
20D	-	1,95b	13,80c
21A	3,00a	7,97a	27,80b
21D	-	1,39b	19,80b
22A	4,00a	5,97a	27,60b
22D	-	1,77b	19,40b
23A	1,50b	4,69a	26,80b
24A	1,00b	3,30b	31,00b
24D	-	0,10b	0,20c
25A	0,33b	0,67b	0,67c
26A	0,33b	0,50b	0,50c
26D	0,00b	-	-
27A	0,67b	1,00b	1,00c
27D	-	0,63b	2,25c
28A	2,33a	2,77b	16,20b
28D	0,00b	-	-
29A	4,33a	5,65a	34,60b

(Cont.) Tabela 6 - Rametes da cultivar de batata Asterix e o número de brotos, taxa média de multiplicação TX1 e taxa média de multiplicação TX2, cujos explantes foram cultivados por um período inicial de 120 dias em meio nutritivo MS na ausência de reguladores de crescimento e subcultivados quatro vezes, a cada 30 dias, em meio fresco idêntico, porém na presença de reguladores de crescimento. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Ramete	Número de brotos	Taxa média de multiplicação TX1	Taxa média de multiplicação TX2
29D ¹	1,14b ³	11,00c	11,00 c
30A ²	1,50b	2,00c	2,00c
30D	- ⁴	0,10b	0,40c
31A	2,50a	4,97a	12,20c
31D	-	2,51b	17,40b
32A	1,67b	2,26b	14,60b
33A	1,00b	5,66a	72,00a
33D	-	8,50a	25,00b
34A	0,33b	-	0,67c
34D	0,00b	0,10b	0,20c
35A	0,75b	-	2,80c
36A	2,67a	4,62a	37,80b
36D	-	-	16,20b
37A	0,33b	0,67b	0,67c
37D	0,00b	-	-
38A	0,33b	0,67b	0,67c
38D	-	0,00b	0,00c
39A	0,67b	-	0,67c
39D	-	0,67b	0,67c
40A	0,50b	-	1,67c
40D	-	0,00b	0,00c
Média	0,91	1,94	10,33
CV(%)	38,82	1,37	91,27

¹ Ramete originado por organogênese indireta. ² Ramete originado por organogênese direta. ³ Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. ⁴ Ramete que não apresenta repetição no subcultivo seguinte foi perdido ou não foi considerado na análise.

Tabela 7 – Rametes da cultivar de batata Atlantic, no cultivo inicial de 90 dias em meio nutritivo MS na ausência de reguladores de crescimento e subcultivados a cada 30 dias para meio fresco idêntico, porém na presença de fitorreguladores, sobre o número de brotos, número de entrenós e formação de raízes. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Ramete	Número de brotos	Número de brotos alongados	Número entrenós	Raiz (%)
1D ¹	0,08b ³	0,00b	0,00b	0,00b
2D	0,09b	0,00b	0,00b	0,00b
3D	0,85a	0,60a	2,16a	23,58a
4D	0,22b	0,00b	0,00b	0,00b
5D	1,28a	1,02a	4,49a	47,90a
6A ²	0,14b	0,00b	0,00b	0,00b
7D	0,98a	0,72a	3,40a	9,43b
8D	0,13b	0,00b	0,00b	0,00b
9A	0,20b	0,00b	0,00b	0,00b
10D	0,10b	0,00b	0,00b	0,00b
11A	0,17b	0,00b	0,00b	0,00b
12D	0,17b	0,00b	0,00b	0,00b
13D	0,86a	0,62a	2,37a	23,68a
14A	1,25a	0,97a	4,04a	51,15a
14D	0,92a	0,70a	2,73a	14,39b
15D	0,75a	0,36b	1,43a	10,71b
16A	1,00a	0,67a	1,67a	0,00b
16D	1,13a	0,69a	2,60a	25,00a
17D	0,10b	0,00b	0,00b	0,00b
Média	0,96	0,69	2,83	27,08
CV(%)	25,78	22,75	43,62	24,91

¹Ramete originado por organogênese indireta. ²Ramete originado por organogênese direta. ³Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 8 – Cultivos efetuados na cultivar de batata Atlantic, em meio nutritivo MS e o número de brotos, número de entrenós e formação de raízes. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Cultivo	Número Brotos	Número entrenós	Raiz (%)
Cultivo inicial	0,45b*	0,53c	0,00c
1º subcultivo	0,41b	0,97c	2,63c
2º subcultivo	0,79 ^a	2,52b	9,18c
3º subcultivo	1,15 ^a	3,75a	23,58b
4º subcultivo	1,06 ^a	2,72b	26,77b
5º subcultivo	1,06 ^a	3,61a	40,71a
6º subcultivo	1,16 ^a	2,69b	28,00b
7º subcultivo	0,99 ^a	3,19a	38,17a
8º subcultivo	1,00a	3,11a	39,23a
Média	0,96	2,83	27,08
CV(%)	25,78	43,62	24,91

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 9– Tipo de explante e os cultivos e o número de brotos alongados na cultivar de batata Atlantic, cujos explantes foram cultivados por um período inicial de 90 dias em meio nutritivo MS na ausência de reguladores de crescimento e subcultivados oito vezes, a cada 30 dias, em meio fresco idêntico, porém na presença de reguladores de crescimento. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Tipo de Explante	Cultivo Inicial	Subcultivo								Média
		1	2	3	4	5	6	7	8	
Ápice caulinar	0,29bC	0,24bC	1,60aA	1,33aA	0,96aB	1,13aB	1,00aB	0,95bB	0,59bC	0,85
Derivado de calo	0,30bC	0,25bC	0,48bB	0,60bA	0,70bA	0,87aA	0,71bA	0,81bA	0,79bA	0,67
Média	0,69									
CV(%)	24,74									

* Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 10 – Rametes e cultivos e o número de brotos formados na cultivar de batata Asterix, cujos explantes foram cultivados por um período inicial de 120 dias em meio nutritivo MS na ausência de reguladores de crescimento e subcultivados quatro vezes, a cada 30 dias, em meio fresco idêntico, porém na presença de reguladores de crescimento. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Ramete	Subcultivo			Média
	2	3	4	
1D ¹	0,00c	0,00c	-	0,00
2D	0,33c	- ⁴	-	0,33
3D	0,00c	-	-	0,00
4D	0,33cA ³	0,17cA	-	0,25
5D	0,00c	-	-	0,00
7D	0,00c	-	-	0,00
12D	0,50cA	1,00bA	0,95aA	0,82
16A ²	0,00c	-	-	0,00
17D	1,00cA	0,80bA	0,63aA	0,81
20D	0,33cA	0,73bA	0,90aA	0,65
22D	2,50bA	1,00bB	1,00aB	1,50
23A	4,50aA	1,00bB	1,00aB	2,17
23D	0,00cA	0,75bA	0,85aA	0,53
24A	2,25bA	2,21aA	1,00aB	1,82
27D	0,00cA	0,13cA	0,75aA	0,29
29D	1,33cA	0,75bA	0,78aA	0,95
30A	1,50c	-	-	1,50
30D	0,00cA	0,00cA	0,50aA	0,17
31A	1,00aA	1,00bA	1,00aA	1,00
31D	1,67cA	0,00cB	0,83aB	0,70
33A	2,75bA	2,50aA	1,00aB	1,95
33D	5,00aA	0,88bB	0,94aB	2,27
35D	0,00cA	1,00bA	1,00aA	0,67
38D	0,00cA	0,00cA	-	0,00
40A	1,00c	-	-	1,00
40D	0,50cA	0,00cA	-	0,25
Média	1,23	1,06	0,92	0,63
CV(%)	23,62			

¹Ramete originado por organogênese indireta. ²Ramete originado por organogênese direta. ³Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. ⁴Ramete que não apresenta repetição no subcultivo seguinte foi perdido ou não foi considerado na análise.

Tabela 11 – Tipo de explante e os cultivos e o número de brotos formados na cultivar de batata Asterix, cujos explantes foram cultivados por um período inicial de 120 dias em meio nutritivo MS na ausência de reguladores de crescimento e subcultivados, a cada 30 dias, em meio fresco idêntico, porém na presença de reguladores de crescimento. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Tipo de explante	Subcultivo			Média
	2	3	4	
Ápice caulinar	1,69aA*	1,63aA	1,02aB	1,45
Derivado de calo	0,86bA	0,77bA	0,89aA	0,84
Média	1,28	1,20	0,96	1,10
CV(%)	27,88			

*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 12 – Tipo de explante e os cultivos e o número de brotos formados na cultivar de batata Atlantic, cujos explantes foram cultivados por um período inicial de 90 dias em meio nutritivo MS na ausência de reguladores de crescimento e subcultivados oito vezes, a cada 30 dias, em meio fresco idêntico, porém na presença de reguladores de crescimento. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Tipo de Explante	Cultivo	Subcultivo								Média
	Inicial	1	2	3	4	5	6	7	8	
Ápice caulinar	0,50aB*	0,41aA	2,00aA	2,50aA	1,00aB	1,21aB	1,64aA	1,00aB	1,00aB	1,12
Derivado de calo	0,43aB	0,41aA	0,72bB	1,07bA	1,08aA	1,03aA	1,06bA	0,99aA	1,00aA	0,93
Média	0,45	0,41	1,36	1,79	1,04	1,12	1,35	1,00	1,00	0,96
CV(%)	27,45									

*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 13 – Rametes e os cultivos e o número de entrenós formados na cultivar de batata Asterix, cujos explantes foram cultivados por um período inicial de 120 dias em meio nutritivo MS na ausência de reguladores de crescimento e subcultivados quatro vezes, a cada 30 dias, em meio fresco idêntico, porém na presença de reguladores de crescimento. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Ramete	Subcultivo			Média
	2	3	4	
1D ¹	0,00bA ³	0,00bA	-	0,00
2D	0,00b	- ⁴	-	0,00
3D	0,00b	-	-	0,00
4D	0,00b	0,00b	-	0,00
5D	0,00b	-	-	0,00
7D	0,00b	-	-	0,00
12D	1,50bA	2,10bA	2,35aA	1,98
16A ²	0,00b	-	-	0,00
17D	2,00bA	2,20bA	1,25bA	1,67
20D	2,67bA	1,73bA	2,50aA	2,14
22D	0,00bA	2,08bA	2,25aA	2,06
23A	6,00aA	3,60aB	2,85aB	2,28
23D	0,00bA	0,50bA	1,05bA	0,79
24A	3,50bA	3,50aA	2,25aA	2,84
27D	0,00bA	0,00bA	0,38bA	0,16
29D	1,83bA	0,25bA	0,67bA	0,74
30A	0,50b	-	-	0,50
30D	0,00bA	0,00bA	0,00bA	0,00
31A	2,00bA	1,00bA	1,20bA	1,31
31D	7,00aA	1,13bB	1,50bB	1,78
33A	4,75aA	5,31aA	4,40aA	4,89
33D	6,00aA	1,44bB	1,83bB	2,11
35D	0,00bA	4,00aA	1,63bA	1,75
38D	0,00bA	0,00bA	-	0,00
40A	1,00b	-	-	1,00
40D	0,00bA	0,00bA	-	0,00
Média	1,94	2,03	2,05	2,02
CV(%)	42,18			

¹Ramete originado por organogênese indireta. ²Ramete originado por organogênese direta. ³Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. ⁴Ramete que não apresenta repetição no subcultivo seguinte foi perdido ou não foi considerado na análise.

Tabela 14 – Tipo de explante e os cultivos e o número de entrenós formados na cultivar de batata Asterix, cujos explantes foram cultivados por um período inicial de 120 dias em meio nutritivo MS na ausência de reguladores de crescimento e subcultivados, a cada 30 dias, em meio fresco idêntico, porém na presença de reguladores de crescimento. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Tipo de explante	Subcultivo			Média
	2	3	4	
Ápice caulinar	2,53aB [*]	3,82aA	2,58aB	3,00
Derivado de calo	1,22bA	1,34bA	1,74bA	1,52
Média	1,79	2,40	2,10	2,16
CV(%)	45,87			

^{*}Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 15 - Rametes da cultivar de batata Atlantic e a média do número de entrenós e do número de gemas, taxa média de multiplicação TX1 e taxa média de multiplicação TX2, cujos explantes foram cultivados por um período inicial de 90 dias em meio nutritivo MS na ausência de reguladores de crescimento e subcultivados oito vezes, a cada 30 dias, em meio fresco idêntico, porém na presença de reguladores de crescimento. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Ramete	Número de entrenós	Número de gemas	Taxa média de multiplicação TX1 ⁵	Taxa média de multiplicação TX2 ⁶
1A ¹	- ³	-	0,50b	0,50b
1D ²	0,00b	0,17b	0,05b	0,00b
2A	-	-	0,50b	0,00b
2D	0,00b ⁴	0,18b	0,00b	0,00b
3A	-	-	0,50b	1,50b
3D	2,16a	3,40a	3,31a	34,83a
4A	-	-	0,50b	0,50b
4D	0,00b	0,33a	0,13b	0,50b
5A	-	-	1,75b	2,50b
5D	4,48a	5,81a	4,88a	102,38a
6A	0,00b	0,29b	0,25b	0,50b
6D	-	-	0,00b	0,00b
7A	-	-	2,00b	4,00b
7D	-	4,42a	2,92a	17,67b
8A	-	-	0,25b	0,50b
8D	0,00b	0,25b	0,00b	0,00b
9A	0,00b	0,40b	0,17b	0,33b
10D	0,00b	0,20b	0,00b	0,00b
10A	-	-	0,25b	0,50b
11A	0,00b	0,33b	0,38b	1,00b
12D	0,00b	0,33b	0,00b	0,00b
12A	-	-	0,25b	0,50b
13A	-	-	1,00b	1,50b
13D	2,37a	3,40a	2,89a	55,13a
14A	-	5,53a	5,05a	84,88a
14D	2,73a	4,07a	1,91b	45,22a
15A	-	-	1,25b	3,00b
15D	1,43b	1,86b	1,37b	10,50b
16A	1,67a	3,33a	4,50a	6,00b
16D	2,60a	4,21a	2,89a	57,63a
17A	-	-	0,25b	0,50b
17D	0,00b	0,20b	0,00b	0,00b
Média	2,83	4,02	1,96	28,60
CV(%)	43,62	40,44	36,89	79,33

¹Ramete originado por organogênese direta. ²Ramete originado por organogênese indireta. ³Ramete que não apresenta repetição no subcultivo seguinte foi perdido ou não foi considerado na análise. ⁴Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. ⁵Calculada pelo quociente entre número de brotos e o número de entrenós e o número total de explantes no período de cultivo. ⁶Calculada pelo total de gemas formadas ao final do período, excluindo-se a apical.

Tabela 16- Cultivos e o número de entrenós e número de gemas formadas na cultivar de batata Atlantic, cujos explantes foram cultivados por um período inicial de 90 dias em meio nutritivo MS na ausência de reguladores de crescimento e subcultivados oito vezes, a cada 30 dias, em meio fresco idêntico, porém na presença de reguladores de crescimento. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Cultivo	Número de entrenós	Número de gemas
Cultivo inicial	0,53c	1,37c
1º subcultivo	0,97c	1,78c
2º subcultivo	2,52b	3,31b
3º subcultivo	3,76a	4,49a
4º subcultivo	2,72b	3,94b
5º subcultivo	3,61a	4,84a
6º subcultivo	2,69b	3,59b
7º subcultivo	3,19a	5,31a
8º subcultivo	3,10a	4,60a
Média	2,83	4,02
CV(%)	43,62	40,44

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 17 - Tipo de explante e os cultivos e o número de entrenós formados na cultivar de batata Atlantic, cujos explantes foram cultivados por um período inicial de 90 dias em meio nutritivo MS na ausência de reguladores de crescimento e subcultivados oito vezes, a cada 30 dias, em meio fresco idêntico, porém na presença de reguladores de crescimento. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Tipo de Explante	Cultivo		Subcultivo							Média
	Inicial	1	2	3	4	5	6	7	8	
Ápice caulinar	0,30aD*	0,59aD	5,60aB	7,67aA	3,52aB	4,58aB	3,73aB	4,58aB	2,82aC	3,48
Derivado de calo	0,61aC	1,08aC	2,35bB	3,52bA	2,53aB	3,41aA	2,47aB	2,88bB	3,17aA	2,71
Média	0,53	0,97	2,52	3,75	2,72	3,61	2,69	3,19	3,11	2,83
CV(%)	46,72									

*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 18 – Rametes e os cultivos e o número de gemas formadas na cultivar de batata Asterix, cujos explantes foram cultivados por um período inicial de 120 dias em meio nutritivo MS na ausência de reguladores de crescimento e subcultivados quatro vezes, a cada 30 dias, em meio fresco idêntico, porém na presença de reguladores de crescimento. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Ramete	Subcultivo			Média
	2	3	4	
1D ¹	0,00bA ³	0,00cA	-	0,00
2D	0,33b	- ⁴	-	0,33
3D	0,00b	-	-	0,00
4D	0,33bA	0,17cA	-	0,20
5D	0,00b	-	-	0,00
7D	0,00b	-	-	0,00
12D	2,00bA	2,90cA	3,15bA	2,68
16A ²	0,00b	-	-	0,00
17D	2,50bA	3,20cA	1,63cA	2,44
20D	2,67bA	2,00cA	2,95bA	2,54
22D	2,50bA	2,50cA	2,70bA	2,57
23A	10,50aA	4,30bB	3,35bB	6,05
23D	0,00bA	1,08cA	1,55cA	0,88
24A	5,75aA	5,36bA	3,00bB	2,44
27D	0,00bA	0,13cA	1,00cA	0,38
29D	3,00bA	1,25cA	1,22cA	1,82
30A	1,50b	-	-	1,50
30D	0,00bA	0,00bA	0,00cA	0,00
31A	2,17bA	2,30cA	1,80cA	2,09
31D	8,00aA	1,38cB	2,78bB	4,05
33A	6,88aA	7,85aA	5,40aB	6,71
33D	7,25aA	2,19cB	2,33cB	3,92
35D	0,00bA	4,50bA	2,25cA	2,26
38D	0,00bA	0,00cA	-	0,00
40A	1,00b	-	-	1,00
40D	0,00bA	0,00cA	-	0,00
Média	2,73	2,97	2,66	2,79
CV(%)	37,36			

¹Ramete originado por organogênese indireta. ²Ramete originado por organogênese direta. ³Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. ⁴Ramete que não apresenta repetição no subcultivo seguinte foi perdido ou não foi considerado na análise.

Tabela 19 – Tipo de explante e os cultivos e o número de gemas formadas na cultivar de batata Asterix, cujos explantes foram cultivados por um período inicial de 120 dias em meio nutritivo MS na ausência de reguladores de crescimento e subcultivados, a cada 30 dias, em meio fresco idêntico, porém na presença de reguladores de crescimento. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Tipo de explante	Subcultivo			Média
	2	3	4	
Ápice caulinar	4,02aB*	5,32aA	3,26aB	4,08
Derivado de calo	1,73bA	1,99bA	2,35bA	2,13
Média	2,73	3,41	2,74	2,97
CV(%)	41,47			

*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 20 – Tipo de explante e os cultivos e o número de gemas formadas na cultivar de batata Atlantic, cujos explantes foram cultivados por um período inicial de 90 dias em meio nutritivo MS na ausência de reguladores de crescimento e subcultivados oito vezes, a cada 30 dias, em meio fresco idêntico, porém na presença de reguladores de crescimento. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Tipo de Explante	Cultivo Inicial	Subcultivo								Média
		1	2	3	4	5	6	7	8	
Ápice caulinar	1,30aC*	1,12aC	8,40aA	9,17aA	4,64aB	6,33aA	4,32aB	7,29aA	3,77aB	4,84
Derivado de calo	1,39aC	1,97aC	3,03bB	4,21bA	3,76aA	4,53bA	3,44aA	4,87bA	4,77aA	3,87
Média	1,37	1,78	3,31	4,49	3,94	4,84	3,59	5,31	4,60	4,02
CV(%)	43,74									

*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 21 – Rametes e os cultivos e o número de brotos alongados na cultivar de batata Asterix, cujos explantes foram cultivados por um período inicial de 120 dias em meio nutritivo MS na ausência de reguladores de crescimento e subcultivados oito vezes, a cada 30 dias, em meio fresco idêntico, porém na presença de reguladores de crescimento. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Ramete	Subcultivo			Média
	2	3	4	
1D ¹	0,00cA ³	0,00bA	-	0,00
2D	0,00c	- ⁴	-	0,00
3D	0,00c	-	-	0,00
4D	0,00cA	0,00bA	-	0,00
5D	0,00c	-	-	0,00
7D	0,00c	-	-	0,00
12D	0,50cA	0,60aA	0,65aA	0,61
16A ²	0,00c	-	-	0,00
17D	1,00cA	0,60aA	0,50aA	0,60
20D	0,33cA	0,36bA	0,85aA	0,65
22D	0,00cA	0,58aA	0,70aA	0,62
23A	2,00bA	1,00aB	0,90aB	1,00
23D	0,00cA	0,25bA	0,50aA	0,38
24A	1,00cA	1,07aA	0,90aA	0,97
27D	0,00cA	0,00bA	0,25bA	0,10
29D	0,83cA	0,08bB	0,33bB	0,33
30A	0,50c	-	-	0,50
30D	0,00c	0,00b	0,00b	0,00
31A	0,83cA	0,50aA	0,60aA	0,62
31D	1,33bA	0,31bB	0,56aB	0,51
33A	1,38bA	1,31aA	1,00aA	1,21
33D	3,50aA	0,31bB	0,61aB	0,79
35D	0,00cA	1,00aA	0,75aA	0,67
38D	0,00cA	0,00bA	-	0,00
40A	0,00c	-	-	0,00
40D	0,00cA	0,00bA	-	0,00
Média	0,68	0,55	0,68	0,63
CV(%)	24,56			

¹Ramete originado por organogênese indireta. ²Ramete originado por organogênese direta. ³Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. ⁴Ramete que não apresenta repetição no subcultivo seguinte foi perdido ou não foi considerado na análise.

Tabela 22 – Tipo de explante e os cultivos e o número de brotos alongados na cultivar de batata Asterix, cujos explantes foram cultivados por um período inicial de 120 dias em meio nutritivo MS na ausência de reguladores de crescimento e subcultivados, a cada 30 dias, em meio fresco idêntico, porém na presença de reguladores de crescimento. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Tipo de explante	Subcultivo			Média
	2	3	4	
Ápice caulinar	0,82aA*	1,00aA	0,82aA	0,50
Derivado de calo	0,46bAB	0,34bB	0,62bA	0,88
Média	0,62	0,62	0,71	0,67
CV(%)	27,07			

*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 23 – Tipo de explante e os cultivos e o número de brotos alongados na cultivar de batata Atlantic, cujos explantes foram cultivados por um período inicial de 90 dias em meio nutritivo MS na ausência de reguladores de crescimento e subcultivados oito vezes, a cada 30 dias, em meio fresco idêntico, porém na presença de reguladores de crescimento. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Tipo de Explante	Cultivo	Subcultivo								Média
	Inicial	1	2	3	4	5	6	7	8	
Ápice caulinar	0,30aC*	0,24aC	1,60aA	1,33aA	0,96aB	1,13aB	1,00aB	0,96aB	0,59C	0,85
Derivado de calo	0,29aC	0,25aC	0,48bC	0,60bA	0,70bA	0,87aA	0,72bA	0,81aA	0,80A	0,67
Média	0,29	0,25	0,54	0,64	0,75	0,91	0,77	0,84	0,76	0,70
CV(%)	24,74									

*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 24 – Tipos de explantes e os cultivos sobre a formação de raiz (%) na cultivar de batata Asterix, cujos explantes foram cultivados por um período inicial de 120 dias em meio nutritivo MS na ausência de reguladores de crescimento e subcultivados oito vezes, a cada 30 dias, em meio fresco idêntico, porém na presença de reguladores de crescimento. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Tipo de explante	Subcultivo			Média
	2	3	4	
Ápice caulinar	8,16aB*	39,13aA	30,59aA	30,24
Derivado de calo	7,94aB	18,71bAB	23,56aA	19,64
Média	8,04	27,41	26,58	0,24
CV(%)	26,11			

*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 25 – Tipo de explante e os cultivos e a formação de raiz (%) na cultivar de batata Atlantic, cujos explantes foram cultivados por um período inicial de 90 dias em meio nutritivo MS na ausência de reguladores de crescimento e subcultivados oito vezes, a cada 30 dias, em meio fresco idêntico, porém na presença de reguladores de crescimento. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Tipo de Explante	Cultivo	Subcultivo								Média
	Inicial	1	2	3	4	5	6	7	8	
Ápice caulinar	0,00Ab*	0,00aB	0,00aB	33,33aA	48,00aA	62,50aA	54,55aA	75,00aA	36,36aA	43,23
Derivado de calo	0,00aC	3,38aC	9,68aC	23,00aB	21,57bB	36,21bA	22,33bB	29,91bB	39,81aA	24,02
Média	0,00	2,63	9,18	23,58	26,77	40,71	28,00	38,17	39,23	27,09
CV(%)	25,52									

*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 26 – Cultivos efetuados na cultivar de batata Asterix, em meio nutritivo MS, e a taxa média de multiplicação TX1. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Cultivo	Taxa média de multiplicação TX1 ²
Cultivo inicial	0,66b ¹
1º subcultivo	1,78b
2º subcultivo	2,50 ^a
3º subcultivo	3,03 ^a
4º subcultivo	2,87 ^a
Média	1,94
CV(%)	49,74

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. ²Calculada pelo quociente entre número de brotos e o número de entrenós e o número total de explantes no período de cultivo.

Tabela 27 – Tipo de explante e os cultivos e a taxa média de multiplicação TX2 na cultivar de batata Asterix, cujos explantes foram cultivados por um período inicial de 120 dias em meio nutritivo MS na ausência de reguladores de crescimento e subcultivados, a cada 30 dias, em meio fresco idêntico, porém na presença de reguladores de crescimento. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Tipo de explante	Taxa média de multiplicação TX2 ²					Média
	Cultivo Inicial	1º	2º	3º	4º	
Ápice caulinar	0,98aB ¹	1,90aB	5,50aB	52,17aB	58,27aA	11,37
Derivado de calo	0,00aC	1,05aC	5,58aC	13,24bB	32,83aA	8,66
Média	0,66	1,63	5,53	29,34	45,00	10,33
CV(%)	67,32					

¹Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. ²Calculada pelo total de gemas formadas ao final do período, excluindo-se a apical

Tabela 28 – Tipo de explante e os cultivos e a taxa média de multiplicação TX1 na cultivar de batata Atlantic, cujos explantes foram cultivados por um período inicial de 90 dias em meio nutritivo MS na ausência de reguladores de crescimento e subcultivados oito vezes, a cada 30 dias, em meio fresco idêntico, porém na presença de reguladores de crescimento. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Tipo de Explante	Cultivo Inicial	Taxa média de multiplicação TX1 ²								Média
		1	2	3	4	5	6	7	8	
Ápice caulinar	1,35aA ¹	0,70aA	4,78aA	9,39aA	9,33aA	5,79aA	4,68aA	5,58aA	3,81aA	1,93
Derivado de calo	0,00aB	1,44aB	1,92bB	2,87bA	2,87bA	4,23aA	3,38aA	3,86aA	4,16aA	2,27
Média	0,74	1,03	2,45	3,52	3,74	4,45	3,60	4,14	4,11	2,15
CV(%)	39,45									

¹Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. ²Calculada pelo quociente entre número de brotos e o número de entrenós e o número total de explantes no período de cultivo.

Tabela 29 – Tipo de explante e os cultivos e a taxa média de multiplicação TX2 na cultivar de batata Atlantic, cujos explantes foram cultivados por um período inicial de 90 dias em meio nutritivo MS na ausência de reguladores de crescimento e subcultivados oito vezes, a cada 30 dias, em meio fresco idêntico, porém na presença de reguladores de crescimento. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Tipo de Explante	Cultivo Inicial	Taxa média de multiplicação TX2 ²								Média
		1	2	3	4	5	6	7	8	
Ápice caulinar	2,41aC ¹	1,47aC	12,00C	55,00aC	126,00aB	152,00aA	95,00aB	175,00aA	83,00aB	18,33
Derivado de calo	0,00aC	7,74aC	19,69aC	31,89aC	55,17bB	84,33bA	69,80aB	93,04bA	103,00aA	36,59
Média	1,32	4,30	18,25	34,20	65,29	94,00	74,00	106,70	99,67	30,05
CV(%)	59,00									

¹Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. ²Calculada pelo total de gemas formadas ao final do período, excluindo-se a apical.

4 CAPÍTULO II – VARIABILIDADE INTRACLONAL EM CARACTERÍSTICAS DE MINITUBÉRCULOS DE RAMETES DAS CULTIVARES DE BATATA ASTERIX E ATLANTIC EM SISTEMA HIDROPÔNICO

4.1 OBJETIVO

O objetivo desse estudo foi avaliar a variabilidade fenotípica intraclonal de rametes, provenientes da cultura de tecidos, das cultivares de batata Asterix e Atlantic no cultivo em sistema hidropônico fechado com substrato, por meio de características de tubérculo importantes na produção de batata-semente básica.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Obtenção de plantas básicas da geração inicial (G0)

Os tubérculos das cultivares Asterix e Atlantic, cujas brotações forneceram os ápices caulinares que deram início à cultura de tecidos, foram provenientes de plantas matrizes indexadas para as principais viroses. O material foi proveniente da EMBRAPA – Canoinhas, SC.

Das brotações, foram isolados 40 ápices caulinares em Asterix e 20 ápices caulinares e 20 gemas axilares em Atlantic. Estes explantes foram cultivados em meio nutritivo MS (MURASHIGUE; SKOOG, 1962) sem reguladores de crescimento e com 3,0% de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 0,6% de ágar, em pH 5,7. Os frascos contendo os explantes de Atlantic permaneceram no escuro, na sala de cultivo com temperatura controlada

($25\pm 3^{\circ}\text{C}$), por 72 horas, sendo, posteriormente, submetidos à intensidade luminosa de $20\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecido por lâmpadas fluorescente brancas frias tipo luz do dia, sob fotoperíodo de 16 horas no mesmo ambiente. Os frascos contendo os explantes de Asterix foram encaminhados diretamente para este ambiente de cultivo, sem passar por um período no escuro.

Decorridos 120 dias para Asterix e 90 dias para Atlantic, a cada 30 dias, os explantes foram subcultivados para meio nutritivo fresco, de igual composição, porém suplementado com os fitorreguladores 6-Benzilaminopurina – BAP (1 mg L^{-1}); Ácido α -Naftaleno Acético - ANA ($0,01 \text{ mg L}^{-1}$); e Ácido Giberélico - GA₃ ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$). A partir do cultivo inicial, a cada subcultivo, os ápices caulinares e os explantes derivados de organogênese indireta (calo), que originaram novos rametes foram separados, em frascos diferentes.

4.2.2 Aclimatização das plantas básicas

Após doze meses de subcultivo para Asterix e Atlantic, as plantas básicas obtidas foram aclimatizadas. As plantas provenientes do cultivo *in vitro* foram lavadas em água corrente para a remoção do meio nutritivo das raízes. Após este procedimento, as plantas, dispostas em espaçamento 2 x 2cm, foram acondicionadas em bandejas contendo areia e irrigação durante 15 dias, no interior de uma estufa, localizada no Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

A irrigação foi efetuada utilizando-se o sistema fechado com substrato. O sistema foi composto por uma bandeja preta de polietileno, na qual foi colocada uma camada de 7cm de brita média, visando facilitar a drenagem da solução nutritiva. Essa camada de brita foi coberta por uma tela fina de polietileno, a fim de evitar que o substrato interrompesse a livre drenagem pelo preenchimento do espaço entre as britas. Sobre a tela foi acomodada uma camada de 5cm de

espessura de areia grossa (partículas entre 1 e 3mm de diâmetro), utilizada como substrato (Figura 1).

A bandeja recebeu irrigação a cada duas horas durante o dia, efetuadas com o auxílio de um programador digital e uma bomba de baixa vazão, até o completo encharcamento do substrato e a formação de uma lâmina superficial de água, a qual era drenada por dois orifícios, um situado na base e o outro, na parte superior da bandeja.



Figura 1 - Plantas básicas G0 dos rametes das cultivares de batata Asterix após 15 dias de aclimatização em sistema com substrato (areia). Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Após a aclimatização, as plantas foram acondicionadas no interior de um abrigo de 120m², localizado no Departamento de Fitotecnia da UFSM.

O material foi transferido para o sistema de cultivo constituído por telhas de fibrocimento, com 3,60m de comprimento x 1,10m de largura, com canais de 0,06m de altura e 0,18m de distância entre os canais. Cada telha foi apoiada

sobre suportes a 0,80m de altura do solo, com declividade de 1%, e a superfície foi revestida com filme transparente de polietileno de baixa densidade com espessura de 100 μ m. Os canais foram preenchidos com brita basáltica média, com tamanho de partículas entre 0,015m e 0,020m e sobre esta foi colocada uma tela anti-inseto coberta com uma camada de 0,15m de areia média como substrato, para a sustentação das plantas. Um reservatório de fibra de vidro com capacidade para 500L foi instalado próximo à extremidade inferior das telhas, para armazenar a solução nutritiva.

A solução nutritiva foi preparada com a seguinte composição em mmol L⁻¹: 0,3587 de KH₂PO₄; 1,1684 de KNO₃; 2,1828 de Ca(NO₃)₂ e 0,7122 de MgSO₄. Os micronutrientes foram fornecidos nas concentrações, em mg L⁻¹, de: 0,03 de Mo; 0,26 de B; 0,06 de Cu, 0,50 de Mn, 0,22 de Zn e 4,0 de Fe. O pH, no momento do preparo da solução foi ajustado para 5,5 e a condutividade elétrica (CE) de 1,6 dS m⁻¹. Os fertilizantes empregados foram: nitrato de potássio (KNO₃), nitrato de cálcio [Ca(NO₃)₂] (Calcinit®), monofosfato de potássio (KH₂PO₄) e sulfato de magnésio (MgSO₄). O cálculo das relações iônicas entre os macronutrientes e das quantidades de sais micronutrientes foi feito de acordo com a metodologia descrita por Andriolo (1999).

A CE da solução nutritiva contida no reservatório de estocagem foi medida semanalmente. A solução nutritiva foi corrigida sempre que foi observada uma discrepância de 10% nos valores observados em relação ao valor original. Para esse ajuste, foi adicionado água ou volumes complementares de solução nutritiva. O pH também foi medido e corrigido sempre que se encontrava fora da faixa de 5,5 à 6,5, mediante adições de volumes de soluções 1N de HCl ou KOH. Nenhum descarte de água ou solução nutritiva foi feito durante todo o período experimental. A água do substrato em cada irrigação/fertirrigação foi drenada para os reservatórios.

O plantio foi realizado no dia 28 de março de 2010, na densidade de 100 plantas m⁻². A colheita foi realizada ao se constatar o início da senescência das folhas basais; o que correu em Asterix aos 60 dias após o plantio (DAP) e, em Atlantic, aos 73 DAP.

Ao final do experimento foram avaliadas as seguintes variáveis: número de tubérculos por planta, massa fresca da amostra de tubérculos (g), massa fresca individual de tubérculo (g), comprimento (cm), largura (cm) e relação comprimento/largura de tubérculos. A amostra de tubérculos foi formada pelos três maiores tubérculos produzidos por planta. A relação comprimento/largura foi obtida pelo quociente entre os dois componentes de produção.

Os rametes das duas cultivares foram avaliados em dois experimentos individuais, conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, unifatorial (4 rametes de Asterix e 7 de Atlantic), com número de repetições variável para cada ramete, em função da disponibilidade de rametes que sobreviveram à aclimatização (Tabela 1).

Tabela 1 – Número de plantas básicas G0 dos rametes das cultivares de batata Asterix e Atlantic transferidas e que sobreviveram à aclimatização. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Ramete	Nº de plantas transferidas	Nº de plantas que sobreviveram
<i>Asterix</i>		
12D	20	15
20D	25	20
32A	25	22
33A	20	10
33D	25	25
33TA	20	19
36TD	10	6
<i>Atlantic</i>		
5D	20	20
14A	20	19
14D	10	7
16D	10	4

Após testar a normalidade dos dados por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett, as variáveis foram transformadas, sempre que necessário, pela função $\sqrt{x+0,5}$, sendo x o valor observado. Foram realizadas análises de variância e, quando significativas, utilizou-se, para a comparação das médias, o teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade de erro. A precisão do experimento foi medida por meio das estatísticas coeficiente de variação (CV%) e acurácia seletiva (AS), calculada por $\sqrt{1-1/FCC}$. Utilizou-se o programa estatístico SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows®, versão 4.0 (FERREIRA, 2000).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As variações na CE situaram-se entre 1,3 e 1,8 dS m⁻¹, com média de 1,5 dS m⁻¹, durante todo o período de condução da cultura. As variações de pH situaram-se entre 5,4 e 6,5, com média de 5,9, sendo necessário corrigir uma vez durante o experimento. Portanto, pode-se considerar que o pH da solução nutritiva manteve-se em uma faixa adequada, não acarretando problemas para o desenvolvimento das plantas. Valores de pH abaixo de 4,0 podem afetar a integridade das membranas celulares e superiores a 6,5 podem causar sintomas de deficiências de Fe, P, B e Mn (FURLANI et al., 1999).

Os rametes de Asterix não diferiram na massa fresca da amostra de tubérculos, massa fresca individual de tubérculo e comprimento de tubérculos. As médias de número de tubérculos por planta, largura e relação comprimento/largura dos rametes de Asterix estão apresentadas na Tabela 2. Por outro lado, em Atlantic, os rametes diferiram em todas as características de tubérculos avaliadas.

A acurácia seletiva (AS) para as características avaliadas em Asterix variou de 0,25 a 0,92, sendo que para número de tubérculos, largura e relação

comprimento:largura (Tabela 1), nos quais houve variabilidade intraclonal, os valores obtidos foram muito altos e altos (0,92; 0,83 e 0,73 respectivamente), de acordo com a classificação proposta por Resende; Duarte (2007). Em Atlantic, a AS variou de 0,79 a 0,91 (valores altos e muito altos) nas características de tubérculos (Tabelas 2 e 3). Por conseguinte, pode-se considerar que, de acordo com esse critério, houve alta precisão no acesso do valor genético verdadeiro dos rametes nas avaliações, uma vez que a correlação entre os valores fenotípicos observados e os preditos, daquelas características em que os rametes apresentaram variabilidade, foi alta ou muito alta.

A AS não depende apenas da magnitude do erro experimental e do número de repetições, mas, também, da proporção entre as variações de natureza genética e residual associadas ao caráter em avaliação, sendo adequada para a classificação da precisão de experimentos em geral (CARGNELUTTI FILHO; STORCK, 2007). Sua validade na avaliação da precisão experimental de ensaios de competição de cultivares de milho (CARGNELUTTI FILHO; STORCK, 2009) e soja (STORCK et al., 2010) já foi comprovada.

Quanto ao número de tubérculos produzidos, os valores observados em Asterix assemelham-se àqueles produzidos no método convencional de cultivo de batata-semente, em que os índices de multiplicação situam-se entre 3-5 tubérculos por planta (DANIELS et al., 2000), mas são inferiores àqueles relatados para as cultivares de batata Baronesa (10,9) e Eliza (8,6), cujas plantas básicas foram cultivadas em telhas de fibrocimento, com colheita escalonada dos tubérculos (MEDEIROS et al., 2002). Entretanto, os resultados observados no presente trabalho são semelhantes aos relatados por Andriolo et al. (2006), para colheita de minitubérculos ao final do ciclo, nesse tipo de sistema hidropônico e usando areia como substrato para os clones SMIJ 461-1 e SMIJ 319-1. Diaz; Medeiros (2005) obtiveram resultados semelhantes na produção de batata-semente pré-básica de Atlantic, sob diferentes níveis de nitrogênio na solução nutritiva. As menores taxas de multiplicação observadas,

frente aos resultados obtidos com o emprego de minitubérculos ou colheita escalonada dos tubérculos ainda pequenos, podem ser decorrentes da colheita efetuada somente ao final do ciclo. A produtividade pode ser aumentada quando se utiliza colheita escalonada, pois a energia que seria investida no aumento do tamanho dos tubérculos é destinada a produção de novo material, obtendo-se dessa forma altas taxas de multiplicação (Medeiros, 2002). Em Atlantic, 50% dos rametes avaliados apresentaram taxa de multiplicação inferior a 3, sugerindo um menor potencial genético para multiplicação dos rametes 5D e 14A e, em consequência, um indício de ocorrência de variação somaclonal para um parâmetro de rendimento. O tipo de variação deve ser averiguado nas gerações clonais subsequentes.

Tabela 2 – Médias do número de tubérculos por planta (NTUB), largura de tubérculo e relação comprimento:largura (C:L) de plantas básicas G0 de diferentes rametes da cultivar de batata Asterix cultivadas em sistema hidropônico fechado com substrato. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Ramete	NTUB	Largura (cm)	C:L
12D ¹	3,21b ⁵	1,63 b	2,37a
20D	3,90 b	1,77 b	2,15 b
32A ²	3,94 b	2,06a	2,13 b
33A	5,40a	1,90a	2,14 b
33D	3,20 b	2,00a	2,14 b
33TA ³	4,17 b	2,18a	2,03 b
36TD ⁴	5,62a	2,00a	2,54a
Média	4,04	1,96	2,17
CV%	24,42	14,19	10,59
AS**	0,92	0,83	0,73

¹Ramete derivado de organogênese indireta. ²Ramete derivado de organogênese direta. ³Ramete derivado de tubérculo de ápice caulinar. ⁴Ramete derivado de tubérculo de derivado de calo. ⁵Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. **AS = acurácia seletiva (muito alta: $\geq 0,90$; alta: $\geq 0,70$ e $< 0,90$; moderada: $< 0,70$ e $\geq 0,50$; baixa: $< 0,50$).

Tabela 3 – Médias do número de tubérculos por planta (NTUB), massa fresca da amostra de tubérculos (MFTUB) e massa fresca individual de tubérculo (MFITUB) produzidos em plantas básicas G0 de diferentes rametes da cultivar de batata Atlantic cultivadas em sistema hidropônico fechado com substrato. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Ramete	NTUB	MFTUB (g)	MFITUB (g)
5D ¹	2,00 b ³	39,64 b	20,76a
14A ²	2,10 b	32,50 b	15,52 b
14D	3,50a	16,00 b	3,20 b
16D	5,00a	116,50a	33,43a
Média	2,25	42,08	18,74
CV(%)	24,00	45,51	50,47
AS**	0,87	0,88	0,79

¹Ramete derivado de organogênese indireta. ²Ramete derivado de organogênese direta. ³Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. **AS = acurácia seletiva (muito alta: $\geq 0,90$; alta: $\geq 0,70$ e $< 0,90$; moderada: $< 0,70$ e $\geq 0,50$; baixa: $< 0,50$).

A média de comprimento dos tubérculos de Asterix foi de 4,07cm, enquanto em Atlantic (Tabela 4), os rametes 5D, 14A e 16D formaram tubérculos mais compridos (entre 2,90 e 3,71 cm) em comparação à 14D (1,78 cm). O comprimento dos tubérculos dos rametes de Asterix teve repercussões na relação comprimento:largura, conforme será visto na sequência.

No que diz respeito à largura de tubérculos, os rametes 32A, 33A, 33D, 33TA e 36TD de Asterix, foram os que produziram as maiores médias (entre 2,18 e 1,90 cm), diferindo de 12D e 20D, com 1,63 e 1,77 cm respectivamente (Tabela 2). Em Atlantic, os rametes 16D, 5D e 14A apresentaram as maiores médias (entre 3,02 a 2,84 cm), contrastando de 14D, com média 1,30cm (Tabela 4).

Embora os rametes de Asterix tenham diferido entre si, na largura, todos os tubérculos foram enquadrados na classe V de batata-semente, que compreende aqueles com tamanho do menor diâmetro inferior a 23mm, de

acordo com a classificação constante na portaria nº 154, de 23 de julho de 2007 (BRASIL, 1987). Por outro lado, em Atlantic, houve maior variabilidade, que resultou em diferentes tipos de batata-semente produzidos. Os tubérculos do ramete 14D pertencem ao tipo V (tamanho do menor diâmetro inferior a 23 mm), enquanto que aqueles de 5D e 14A, ao tipo IV (entre 23 e 30mm) e os tubérculos do ramete 16D, como tipo III (entre 30 e 40mm). Tubérculos grandes (tipos I a III) são mais indicados para um plantio subsequente em campo (MEDEIROS et al., 2002).

Tabela 4 – Médias de comprimento, largura e relação comprimento/largura (C/L) de tubérculos produzidos em plantas básicas G0 de diferentes rametes da cultivar de batata Atlantic cultivadas em sistema hidropônico fechado com substrato. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Ramete	Comprimento (cm)	Largura	C/L ¹
5D ²	3,20a ⁴	2,84a	1,08 b
14A ³	2,90a	2,47a	1,21a
14D	1,78 b	1,30 b	1,22a
16D	3,71a	3,02a	1,20a
Média	3,02	2,58	1,17
CV(%)	20,36	20,40	4,62
AS ⁵	0,80	0,84	0,91

¹A relação comprimento/largura foi obtida pelo quociente entre esses dois componentes de produção. ² Ramete derivado de organogênese indireta. ³Ramete derivado de organogênese direta. ⁴Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. ⁵AS = acurácia seletiva (muito alta: $\geq 0,90$; alta: $\geq 0,70$ e $< 0,90$; moderada: $< 0,70$ e $\geq 0,50$; baixa: $< 0,50$).

Essa maior variabilidade de tipos dos minitubérculos de Atlantic pode ser decorrente da colheita ter sido efetuada ao final do ciclo de cultivo, da mesma maneira que ocorre em condições de campo, em que os tubérculos variam muito em tamanho e massa, podendo, alguns, atingir valores superiores a 250

g enquanto outros são descartados pelo tamanho reduzido (MEDEIROS et al., 2002). Entretanto, se fosse causada, exclusivamente, pelo manejo deveria ter ocorrido, igualmente, nos rametes de Asterix, cultivados sob as mesmas condições.

Na relação comprimento/largura de tubérculos, em Asterix, as maiores médias foram observadas nos rametes 36TD (2,54) e 12D (2,37); os demais variaram de 2,15 a 2,03 (Tabela 2). Em Atlantic, a relação foi maior nos rametes 14A, 14D e 16D (entre 1,22 e 1,20), diferindo da média de 5D, que foi igual a 1,08 (Tabela 3). Observa-se que, em Asterix, a se repetirem essas médias de relação comprimento:largura nas gerações clonais subsequentes, nenhum dos rametes avaliados manterá o formato oval ($100 \times \text{comprimento/largura} = 110 \text{ a } 150$) característico da cultivar. Deverá ser verificado, igualmente, se foi o comprimento de tubérculo que variou em relação ao fenótipo original da cultivar, repercutindo na relação comprimento:largura. Já em Atlantic, apesar de ter ocorrido diferenças significativas entre os rametes, foi preservado o padrão fenotípico da cultivar, de tubérculo oval.

O formato do tubérculo foi considerado o caráter mais eficiente para avaliar a dissimilaridade entre progênies de batata (SILVA et al., 2008). Contudo, no estudo citado, houve interação genótipo x ambiente significativa, e, por conseguinte algumas progênies foram classificadas de maneira diferente nas duas gerações avaliadas (*seedlings* e primeira geração clonal).

Nos rametes 12D, 20D, 32A, 33A, 33TA e 36TD ocorreu a formação, nas gemas laterais, de estolões, próximo ao período de colheita (Figura 2). O desenvolvimento de gemas axilares em estolões pode ser causada pela responsividade dos rametes de Asterix ao Ácido Giberélico (GA_3) adicionado ao meio nutritivo usado na produção das plantas básicas na cultura de tecidos. VREUGDENHIL et al. (1998) observaram que segmentos nodais de batata cultivados em meio com 8% de sacarose e uma mistura de $GA_{4/7}$ desenvolviam estolões a partir de gemas axilares. Os rametes de Asterix apresentaram comportamento semelhante ao observado por esses autores.

A média da massa fresca da amostra de tubérculos (MFTUB) por planta, em Asterix, foi 22,76g. Em Atlantic, a maior média para esta variável foi

observada no ramete 16D (116,5g), que diferiu dos demais rametes, cujas médias variaram de 39,64 a 16,00g (Tabela 3).

Para massa fresca individual de tubérculos (MFITUB), em Asterix registrou-se média 9,09g; em Atlantic, as maiores médias foram verificadas nos rametes 16D e 5D (de 33,43 e 20,76g respectivamente), contrastando de 14A e 14D, com 15,52 e 3,02g respectivamente (Tabela 3).



Figura 2 – Plantas básicas G0 da cultivar de batata Asterix em cultivo hidropônico: a) ramete 20D; b, c e d) formação de estolões nas gemas laterais dos rametes da cultivar Asterix antes da colheita. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

A variabilidade intraclonal observada em Atlantic, em relação à MFTUB e MFITUB também poderia ser atribuída à colheita efetuada em uma única vez, semelhante ao verificado para tipo de tubérculo. Contudo, pode ser, igualmente, ocorrência de variação somaclonal.

Quanto maior a massa do tubérculo, maior a quantidade de reserva que o mesmo terá para emitir brotação. Porém, um tubérculo menor, mesmo dotado de menos reserva, emitirá brotos igualmente (CORRÊA et al., 2004). Ratificando essa afirmação, Filgueira (2003) relatou que a massa do tubérculo da batata-semente, em si, pouco influencia a produção, sendo mais relevante o número de hastes por hectare. Entretanto, os tubérculos básicos G0 do ramete 14D de Atlantic, que teve as menores MFTUB (3,02 g) e largura (1,30 cm), não apresentou bom desempenho em campo, uma vez que cerca de 75% desses tubérculos falharam na emissão de haste.

Os resultados obtidos no presente estudo para número de tubérculos produzidos por planta e largura de tubérculo no rametes de Asterix e Atlantic, além de MFTUB e MFTUB em Atlantic, indicam que existe variabilidade no comportamento dos rametes das duas cultivares no cultivo em sistema hidropônico. Considerando-se que foram fornecidas exatamente as mesmas condições para crescimento e desenvolvimento dos tubérculos no sistema, as diferenças expressas constituem variação somaclonal.

4.4 CONCLUSÕES

Há variabilidade em características fenotípicas de tubérculo-semente nos rametes das cultivares de batata Atlantic e Asterix, provenientes do cultivo de plantas básicas da geração zero (G0) em sistema hidropônico fechado.

A variabilidade intraclonal de Atlantic, para minitubérculos básicos da geração zero (G0) produzidos em sistema hidropônico, manifesta-se em um número maior de características que em Asterix.

Em Atlantic ocorre variação somaclonal para taxa de multiplicação.

Em Asterix, a variabilidade somaclonal presente nos rametes não implica em tipos diferentes de batata-semente, ao contrário do que ocorre com Atlantic, em que os minitubérculos básicos produzidos podem ser enquadrados em três tipos diferentes.

5 CAPÍTULO III – CARACTERIZAÇÃO MORFOAGRONÔMICA DE PLANTAS E TUBÉRCULOS DE PRIMEIRA GERAÇÃO CLONAL DE RAMETES DAS CULTIVARES DE BATATA ASTERIX E ATLANTIC

5.1 OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram: avaliar a estabilidade fenotípica de planta, inflorescência e tubérculo da primeira geração clonal de rametes das cultivares de batata Asterix e Atlantic, por meio de 26 descritores mínimos de batata; e comparar a estabilidade fenotípica dos rametes de cada cultivar em função do grau de diferenciação do explante que os originou.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Obtenção dos tubérculos básicos

As plantas produzidas na cultura de tecidos, que originaram os tubérculos básicos da geração inicial (G0), foram oriundas do cultivo de ápices caulinares e gemas axilares isolados de brotações de tubérculos das cultivares de batata Asterix e Atlantic, cujas plantas matrizes foram indexadas para as principais viroses. O material foi proveniente da EMBRAPA – Canoinhas, RS.

Os tubérculos de Asterix e Atlantic foram plantados em 04 de março de 2008 e, em 04 de setembro de 2008, respectivamente e, em vasos de 1,3L de capacidade (15cm de altura), com substrato Plantmax[®] para estimular as brotações, realizado em casa-de-vegetação. Aproximadamente 30 dias após o plantio dos tubérculos, as hastes foram coletadas, desfolhadas e conduzidas

ao Laboratório, onde foram separadas em gemas individuais e submetidas à assepsia por imersão em etanol a 70% (v/v) durante 10 segundos, seguido por imersão em hipoclorito de sódio a 2% (v/v) durante 15 minutos, na qual se adicionaram duas gotas de detergente comercial para cada 100 ml de solução. Após, em câmara de fluxo laminar foram realizados três enxágües consecutivos em água destilada e autoclavada. Em seguida, com o auxílio de microscópio estereoscópico, foram extraídos 20 ápices caulinares e 20 gemas axilares de, aproximadamente, 0,3cm, os quais foram colocados, individualmente, em frascos com 10ml de capacidade, contendo 2ml de meio base MS (MURASHIGUE; SKOOG, 1962) sem reguladores de crescimento e com 3,0% de sacarose, 100 mg L^{-1} de mio-inositol, 0,6% de ágar, em pH 5,7.

O período inicial de cultivo foi de 120 dias para Asterix e 90 dias para Atlantic, e após, a cada 30 dias, os explantes foram transferidos (subcultivados) para meio fresco, de igual composição, porém suplementado com os fitorreguladores 6-Benzilaminopurina – BAP (1 mg L^{-1}); Ácido α -Naftaleno Acético - ANA ($0,01 \text{ mg L}^{-1}$); e Ácido Giberélico - GA₃ ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$). A partir do cultivo inicial, foram efetuados oito subcultivos, separando-se, em cada um, em frascos diferentes, os ápices caulinares e os explantes derivados de organogênese indireta (calo) que originaram novos rametes.

Trinta dias após o último subcultivo, as plantas básicas G0, obtidas conforme descrito anteriormente, foram lavadas em água corrente para remoção de meio de cultura das raízes. Logo após, as plantas foram acondicionadas em bandejas contendo areia e irrigação durante 15 dias e, a seguir foram cultivadas em sistema hidropônico fechado com substrato.

O sistema hidropônico consistiu de uma estrutura formada por telhas de fibrocimento, com 3,60m de comprimento, 1,10m de largura, canais de 0,06m de altura e 0,18m de distância entre os canais. Cada telha foi apoiada sobre suportes a 0,80m de altura do solo, com declividade de 1%, e a superfície foi revestida com filme transparente de polietileno de baixa densidade com espessura de 100 μm . Os canais foram preenchidos com brita basáltica média, de tamanho de partículas entre 0,015m e 0,020m e sobre esta foi colocada

uma tela anti-inseto coberta com uma camada de 0,15m de areia média como substrato para a sustentação das plantas. Um reservatório de fibra de vidro com capacidade para 500L foi instalado próximo à extremidade inferior das telhas, para armazenar a solução nutritiva (ANDRIOLO, 2006).

O plantio das plantas básicas G0 foi realizado em março de 2010, na densidade de 100 plantas m⁻². A colheita foi efetuada ao se constatar o início da senescência das folhas basais; o que ocorreu, em Asterix, aos 60 dias após o plantio (DAP) e, em Atlantic, aos 73 DAP. Após a colheita, os minitubérculos foram armazenados em câmara refrigerada à 20°C, até a implantação do experimento em campo.

5.2.2 Caracterização morfoagronômica

A caracterização morfoagronômica das cultivares Asterix e Atlantic de batata foi efetuada em condições de campo, na área experimental do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil (latitude: 29° 43'S, longitude: 53° 48'W e altitude: 95m). O clima da região, segundo a classificação Köppen, é do tipo Cfa, subtropical úmido sem estação seca definida com verões quentes (MORENO, 1961). O solo representativo do local é um Argissolo Vermelho-Amarelo distrófico arênico e pertence à unidade de mapeamento São Pedro (EMBRAPA, 1999).

Foram conduzidos dois experimentos, um com Asterix e o outro com Atlantic, em delineamento inteiramente casualizado, com 20 repetições. Os tratamentos de Asterix consistiram de sete rametes derivados de quatro tipos de explante: 1) ápice caulinar, cujos rametes foram designados por um numeral seguido pela letra A (32A e 33A); 2) derivado de calo que se formou no ápice caulinar, cujos rametes foram simbolizados, também, por um numeral seguido pela letra D (12D, 20D e 33D); 3) microtubérculos produzidos *in vitro* nas culturas originadas a partir de ápices caulinares, cujos rametes foram

identificados pelo número do ramete de origem, seguido pelas letras TA, que significam microtubérculo derivado de ápice caulinar (33TA); e 4) microtubérculos produzidos *in vitro* nas culturas originadas a partir de explante derivado de calo, cujos rametes foram identificados pelo número de ramete de origem, seguido pelas letras TD, que significam microtubérculo proveniente de derivado de calo (36TD). A tuberização *in vitro* ocorreu espontaneamente nos rametes 33A e 36D no final do quarto subcultivo. Os tratamentos de Atlantic consistiram em dois rametes, sendo um derivado de ápice caulinar, 14A, e o outro, de calo (5D).

O plantio dos tubérculos básicos G0 foi realizado durante a primavera de 2010. As plantas foram cultivadas em campo em parcelas de 30 covas espaçadas a 0,30m x 0,80m e manejadas de acordo com Pereira et al. (2005).

A caracterização morfoagronômica foi efetuada segundo metodologia descrita por Collares (2002) (ANEXOS A e B), utilizando-se 26 dos 33 descritores mínimos necessários para o registro de novas cultivares de batata (BRASIL, 1997), estabelecidos pelo Sistema Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC). Para cada descritor foi atribuída uma nota, de acordo com a escala estabelecida pelo Ministério da Agronomia, Pecuária e Abastecimento (MAPA), sendo empregados os descritores relacionados na tabela 1.

As avaliações foram feitas nas plantas, inflorescências e tubérculos. Os descritores de planta foram avaliados entre 45 e 50 dias após o plantio e os de inflorescência, quando mais de 50% dos botões florais estavam abertos. Todos os caracteres de tubérculos foram avaliados logo após a colheita.

Para os descritores de planta e inflorescência (Tabelas 1 e 2) foram avaliadas todas as 20 plantas de cada ramete em ambas as cultivares. Para os descritores de tubérculo (Tabela 3) foram avaliadas 20 amostras de tubérculos, tomadas de 20 plantas. Foi avaliada, adicionalmente, a massa fresca média de tubérculos (g) de cada ramete.

Após testar a normalidade dos dados por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett, as variáveis foram transformadas, sempre que necessário, pela função $\sqrt{x+0,5}$, sendo x o

valor observado. Foram realizadas análises de variância e, quando significativas, utilizou-se, para a comparação das médias, em Asterix, o teste Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro. A precisão do experimento foi medida por meio das estatísticas coeficiente de variação (CV%) e da acurácia seletiva (AS), calculada por $\sqrt{1-1/FCC}$. Os resultados apresentados são as médias originais obtidas. Utilizou-se o programa estatístico SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows®, versão 4.0 (FERREIRA, 2000).

Tabela 1 - Descritores mínimos de planta usados na caracterização morfoagronômica dos rametes das cultivares de batata Asterix e Atlantic, realizada em condições de campo. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Número e descritor morfológico	Descrição da característica	Código para cada descrição *
8. Tipo de Planta em relação à folhagem	Aberto	1
	Fechada	3
9. Hábito de crescimento	Ereto	3
	Prostrado	7
10. Pigmentação da haste	Ausente	1
	Muito Forte	9
11. Asas	Ausentes	1
	Dentadas	4
12. Inserção das folhas	Aguda (ângulo de inserção<45°)	1
	Obtuso(ângulo de inserção>45°)	2
13. Fechamento das folhas	Fechado	3
	Aberto	7
14. Pigmentação na nervura principal	Ausente	1
	Presente	2
15. Tamanho dos folíolos	Pequeno	3
	Grande	7
16. Largura dos folíolos	Estreito	3
	Largo	7
17.Coalescência dos folíolos	Ausente/rara	1
	Frequente	2
18. Ondulação das bordas dos folíolos	Ausente/muito rara	1
	Muito Forte	9
19. Frequência de folíolos secundários	Nula/muito baixa	1
	Muito Alta	9

* Foram exemplificados nesta tabela os valores mínimos e máximos para cada descritor morfológico.

Tabela 2 - Descritores mínimos de inflorescência usados na caracterização morfoagronômica dos rametes das cultivares de batata Asterix e Atlantic, realizada em condições de campo. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

<i>Número e descritor morfológico</i>	<i>Descrição da característica</i>	<i>Código para cada descrição *</i>
20. Frequência de flores	Ausente	1
	Presente	2
21. Comprimento do pedúnculo floral	Curto	3
	Longo	7
22. Pigmentação do pedúnculo floral	Presente	1
	Ausente	2
23. Coloração na parte interna da corola	Branca	1
	Violeta Ametista**	4
24. Intensidade de pigmentação na parte interna da corola, em flores coloridas	Fraca	3
	Forte	7
25. Pigmentação na parte externa da corola, em flores brancas	Ausente	1
	Presente	2
26. Frequência de frutos	Nula	1
	Muita Alta	9
27. Ciclo Vegetativo	Precoce (< 90 dias)	1
	Longo (> 110 dias)	3

* Foram exemplificados nesta tabela os valores mínimos e máximos para cada descritor morfológico.** Binsfeld (1992)

Tabela 3 - Descritores mínimos de tubérculo usados na caracterização morfoagronômica dos rametes das cultivares de batata Asterix e Atlantic, realizada em condições de campo. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Número e descritor morfológico	Descrição da característica	Código para cada descrição *
28.Formato (100Xcomprimento/largura)	Redondo (<110)	1
	Longos (>170)	4
29.Profundidade dos olhos	Rasos	1
	Profundos	5
30.Aspereza da película	Lisa	1
	Reticulada	5
31.Cor da película	Amarela	1
	Vermelha	2
32.Cor da polpa	Branca	1
	Amarela intensa	4
33.Esverdeamento	Ausente/Muito Fraco	1
	Muito Forte	9

* Foram exemplificados nesta tabela os valores mínimos e máximos para cada descritor morfológico.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os rametes da cultivar Asterix diferiram entre si e divergiram do fenótipo esperado em 18 dos 26 descritores mínimos avaliados (Tabelas 4, 5, 6 e 7), além da massa fresca total de tubérculos por planta. Inclusive, em oito destes 18 descritores analisados nenhum dos sete rametes exibiu o padrão fenotípico da cultivar, enquanto nos demais descritores um número variável de um a quatro rametes demonstrou estabilidade fenotípica. Os descritores que apresentaram maior variabilidade intraclonal e que podem ser úteis no monitoramento da pureza varietal em Asterix foram: formato do tubérculo, aspereza da película, coloração da parte interna da corola, intensidade de pigmentação da parte interna da corola, tamanho dos folíolos, ondulações das bordas dos folíolos, hábito de crescimento e pigmentação da haste principal. Entretanto, a potencialidade de emprego desses descritores deverá ser investigada em ensaios repetidos em uma sequência de cultivos.

A pigmentação da haste principal, o hábito de crescimento, a intensidade de pigmentação da parte interna da corola e o formato do tubérculo destacaram-se, juntamente com outros descritores, pelos maiores valores de repetibilidade, conforme observado por Silva et al. (2009a), em avaliações de 77 cultivares e clones elite realizadas nos anos de 1999 a 2003. Essas estimativas elevadas de repetibilidade obtidas implicam em um menor número de avaliações necessárias para fins de caracterização morfoagronômica.

Para ciclo vegetativo, cor da película do tubérculo e frequência de frutos, os sete rametes foram monomórficos, apresentando médias 2,00, 2,00 e 1,00, respectivamente; destes descritores o ciclo vegetativo e a cor da película não diferiram do padrão da cultivar.

Por outro lado, para os descritores tipo de planta em relação à folhagem, pigmentação na nervura principal, frequência de folíolos secundários, pigmentação na parte interna da corola (em flores brancas) e esverdeamento de tubérculos, apesar dos rametes serem polimórficos, estes não diferiram entre si (2,20; 1,85; 5,32; 1,00 e 1,22) e, tampouco, divergiram do padrão de Asterix.

A pigmentação na nervura principal foi um dos três descritores, dentre os 31 avaliados por Silva et al. (2009a), em 77 cultivares e clones elite de batata,

durante cinco anos, que não apresentou efeito significativo do ano de cultivo, indicando que não foi influenciada pelas variações de ambiente.

Os rametes 12D, 20D e 33TA exibiram plantas com hábito de crescimento semi-ereto. Binsfeld (1992) observou esse tipo de alteração morfológica em plantas regenerantes da cultivar Macaca. Em trabalho anterior com a cultivar Macaca (SANTIAGO, 2007), foi registrada a ocorrência de hábito semi-ereto em plantas regenerantes de segmento nodal e de derivado de calo.

Os rametes 12D e 32A apresentaram a pigmentação da haste principal intermediária, e 36TD, débil, diferindo do padrão da cultivar - forte (Tabela 4). A ocorrência de somaclones para pigmentação da haste principal já tinham sido detectada (SANTIAGO, 2007). Esse tipo de variação somaclonal parece ser comum nas plantas regenerantes, independente se foram originadas via organogênese direta ou indireta, pois em diferentes rametes há uma tendência de perda na capacidade de produção de pigmentação em vários descritores, tais como pigmentação do pedúnculo floral, coloração na parte interna da corola e intensidade da pigmentação na parte interna da corola, em flores coloridas (Tabela 6).

O ramete 33TA apresentou asas onduladas, enquanto que algumas plantas do ramete 12D não formou asas; ambos divergiram do padrão da cultivar, de asas retas (Tabela 4).

A inserção das folhas nos rametes 32A, 33D e 33TA foi obtusa, diferindo da inserção aguda do fenótipo padrão. Em trabalho anterior, observou-se, igualmente, inserção obtusa em regenerantes de ápice caulinar em Asterix (SANTIAGO, 2007).

Tabela 4 – Médias das notas atribuídas aos descritores hábito de crescimento, pigmentação na haste principal, asas, inserção e fechamento de folhas em diferentes rametes na cultivar Asterix de batata. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Ramete	Hábito de crescimento ^I	Pigmentação na haste principal ^{II}	Asas ^{III}	Inserção das folhas ^{IV}	Fechamento das folhas ^V
12D ¹	4,10b ⁵	4,90b	1,90a	1,00a	3,90b
20D	3,90b	6,40a	2,15a	1,20a	3,80b
32A ²	3,30a	5,30b	2,10a	1,35b	4,40b
33A	3,10a	6,80a	2,00a	1,10 ^a	4,40b
33D	3,50a	6,20a	2,10a	1,45b	4,90a
33TA ³	4,60b	6,60a	2,50b	1,75c	5,70a
36TD ⁴	3,60a	3,00c	2,10a	1,00a	5,40a
Média	3,73	5,60	2,12	1,26	4,64
CV(%)	11,73	14,27	6,45	10,01	13,08
AS ⁶	0,89	0,96	0,91	0,95	0,91

¹Ramete regenerado de organogênese indireta. ²Ramete regenerado de organogênese direta. ³Ramete regenerado de tubérculo derivado de ápice caulinar. ⁴ Ramete regenerado de tubérculo derivado de derivado de calo. ⁵Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro. ⁶AS= acurácia seletiva (muito alta:≥0,90; alta:≥0,70 e <0,90; moderada:<0,70 e ≤0,50; baixa <0,50. Categoria e respectiva nota da cultivar Asterix para os descritores avaliados: ^Iereto(3); ^{II}forte(7); ^{III}retas(2); ^{IV}aguda(1); ^Vmédio-aberto(5-7).

Tabela 5 – Médias das notas atribuídas aos descritores tamanho, largura, coalescência e ondulação das bordas dos folíolos em diferentes rametes da cultivar de batata Asterix. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Ramete	Tamanho ^I	Largura ^{II}	Coalescência ^{III}	Ondulação das bordas ^{IV}
12D ¹	5,80a ⁵	6,60c	1,70c	5,00a
20D	6,30b	5,80b	1,25b	7,10c
32A ²	5,80a	5,30a	1,05a	6,10b
33A	6,20b	5,10a	1,00a	6,70b
33D	5,60a	5,20a	1,05a	5,10a
33TA ³	6,50b	5,20a	1,00a	7,90c
36TD ⁴	5,30a	5,00a	1,00a	4,50a
Média	5,93	5,46	1,15	6,05
CV(%)	9,61	8,04	7,60	13,46
AS ⁶	0,79	0,93	0,97	0,96

¹Ramete regenerado de organogênese indireta. ²Ramete regenerado de organogênese direta. ³Ramete regenerado de tubérculo derivado de ápice caulinar. ⁴ Ramete regenerado de tubérculo derivado de derivado de calo. ⁵Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro. ⁶AS= acurácia seletiva (muito alta:≥0,90;

alta $\geq 0,70$ e $< 0,90$; modeada: $< 0,70$ e $\leq 0,50$; baixa $< 0,50$. Categoria e respectiva nota da cultivar Asterix para os descritores avaliados:

^Imédio(5); ^{II}médio(5); ^{III}ausente-rara (1); ^{IV}débil(3).

Tabela 6 – Médias das notas atribuídas aos descritores frequência de flores, comprimento do pedúnculo floral, pigmentação no pedúnculo floral, coloração na parte interna da corola e intensidade de pigmentação na parte interna da corola, em flores coloridas, em diferentes rametes da cultivar de batata Asterix. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Ramete	Frequência de flores ^I	Comprimento do pedúnculo ^{II}	Pigmentação no pedúnculo ^{III}	Coloração na parte interna da corola ^{IV}	Intensidade da pigmentação ^V
12D ¹	1,70b ⁵	3,30d	0,70e	2,80a	5,00a
20D	2,00a	5,00b	1,00d	4,00b	4,90a
32A ²	2,00a	4,40c	2,00a	4,00b	5,00a
33A	2,00a	5,90a	2,00a	4,00b	5,00a
33D	1,85a	4,10c	1,85a	3,40b	4,40b
33TA ³	2,00a	6,50a	1,70b	4,00b	4,00b
36TD ⁴	1,40c	2,75d	1,40c	2,20a	1,95c
Média	1,85	4,56	1,52	3,50	4,32
CV(%)	9,48	18,42	12,24	21,63	11,85
AS ⁶	0,94	0,97	0,98	0,93	0,98

¹Ramete regenerado de organogênese indireta. ²Ramete regenerado de organogênese direta. ³Ramete regenerado de tubérculo derivado de ápice caulinar. ⁴Ramete regenerado de tubérculo derivado de derivado de calo. ⁵Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro. ⁶AS= acurácia seletiva (muito alta: $\geq 0,90$; alta: $\geq 0,70$ e $< 0,90$; modeada: $< 0,70$ e $\leq 0,50$; baixa $< 0,50$. Categoria e respectiva nota da cultivar Asterix para os descritores avaliados: ^Ipresente(2); ^{II}médio-longo(5-7); ^{III}presente(2); ^{IV}vermelho-púrpura(2); ^Vforte(7).

Tabela 7– Médias das notas atribuídas aos descritores formato, profundidade dos olhos, aspereza da película, cor da polpa de tubérculo e massa fresca total de tubérculos por planta (MFTUB) em plantas e tubérculos da primeira geral clonal de diferentes rametes da cultivar de batata Asterix. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Ramete	Formato de tubérculo ^I	Profundidade dos olhos ^{II}	Aspereza da película ^{III}	Cor da polpa ^{IV}	MFTUB (g)
12D ¹	3,85b ⁵	1,00a	2,60b	3,50b	473c
20D	3,15a	1,00a	2,00a	4,00d	980a
32A ²	3,05a	1,00a	3,00b	4,00d	714b
33A	3,50b	1,00a	2,60b	4,00d	716b
33D	3,20a	1,05b	4,00c	3,00a	581b
33T ³	3,15a	1,00a	2,80b	3,95d	880a
36TD ⁴	3,45b	1,00a	2,70b	3,80c	406c
Média	3,34	1,07	2,81	3,75	679

CV(%)	11,96	8,69	15,57	3,19	29,64
AS ⁶	0,73	0,92	0,94	0,99	0,94

¹Ramete regenerado de organogênese indireta. ²Ramete regenerado de organogênese direta. ³Ramete regenerado de tubérculo derivado de ápice caulinar. ⁴ Ramete regenerado de tubérculo derivado de derivado de calo. ⁵Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro. ⁶AS= acurácia seletiva (muito alta: ≥0,90; alta: ≥0,70 e <0,90; moderada: <0,70 e ≤0,50; baixa <0,50. Categoria e respectiva nota da cultivar Asterix para os descritores avaliados: ^Ioval(2); ^{II}rasos(1); ^{III}lisa(1); ^{IV}amarela-clara (3).

Os rametes 20D, 33A e 33TA apresentaram folíolos com tamanho maior que o padrão descrito para Asterix, que se caracteriza por apresentar folíolos de tamanho médio (Tabela 5). De maneira semelhante, folíolos mais largos foram observados no rametes 12D e 20D, contrastando do padrão de Asterix que têm folíolos de largura média (Tabela 5). Os rametes 12D e 20D apresentaram folíolos coalescentes atípicos a Asterix, em que a coalescência é rara (Tabela 5).

A ondulação da borda dos folíolos dos rametes variou entre média e forte, contrastando do padrão de Asterix, que possui folíolos de ondulação débil (Tabela 5).

Algumas plantas dos rametes 12D, 33D e 36TD não emitiram inflorescências. Nos rametes 33D e 36TD observou-se, também, a ocorrência de flores tetrâmeras e hexâmeras (Figura 1). Além disso, nos rametes de Asterix observou-se uma coloração violeta ametista na parte interna da corola, cuja intensidade de pigmentação variou de fraca a média, divergindo da coloração vermelho-púrpura de Asterix. Binsfeld (1992) identificou soma clones regenerados via organogênese indireta na cultivar Macaca que não floresceram em condições de campo, concordando com os resultados obtidos para alguns dos rametes derivados de calo. Adicionalmente, observaram-se variantes com pedúnculo curto nos rametes 12D, 32A, 33D e 36TD, contrastando com o fenótipo de Asterix que possui pedúnculo médio-longo (Tabela 6).



Figura 1 – A e B) Ocorrência de flores hexâmeras em inflorescências do ramete 36TD de Asterix. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Tubérculos de formato longo foram identificados nos diferentes rametes de Asterix ao invés do formato oval-alongado característico (Tabela 7). Todos os rametes avaliados apresentaram película variando entre áspera e reticulada, distintamente da película lisa da cultivar. Adicionalmente, foi observada cor de polpa amarela intensa em todos os tubérculos dos rametes 32A, 33A e 20D.

A MFTUB também foi distinta entre os diferentes rametes, sendo que a maior produção foi registrada para o ramete 20D e a menor, para o 36TD (Tabela 7).

Os rametes da cultivar Atlantic, por outro lado, diferiram entre si em apenas quatro dos 26 descritores mínimos, cujas médias estão apresentadas na Tabela 8. Em três destes descritores (fechamento de folhas, tamanho de folíolos e frequência de folíolos secundários), ambos os rametes divergiram do padrão da cultivar; e, na inserção de folhas, o ramete originado do cultivo *in vitro* de ápice caulinar apresentou um fenótipo diferente do originalmente descrito, enquanto aquele regenerado a partir de explante derivado de calo manteve-se estável fenotipicamente. Este resultado vai de encontro ao que se tem estabelecido até o momento em relação à maior estabilidade genética de explantes com maior grau de diferenciação.

Para o tipo de planta em relação à folhagem, hábito de crescimento, asas, largura dos folíolos, ondulação da borda de folíolos, coloração na parte interna da corola, ciclo vegetativo, formato dos tubérculos, profundidade dos olhos,

aspereza da película, cor de polpa e esverdeamento dos tubérculos, embora não tenham sido observadas diferenças significativas entre os rametes, estes não corresponderam ao fenótipo descrito para a cultivar (Tabela 9). Assim, os rametes de Atlantic divergiram do padrão fenotípico da cultivar em 15 dos 26 descritores avaliados. Nos demais descritores não houve diferença entre os rametes nem, tampouco, foi observada divergência em relação ao padrão descrito para a cultivar.

O hábito de crescimento, o ciclo vegetativo e o formato de tubérculo apresentam elevados valores de repetibilidade, conforme registrados por Silva et al. (2009), nas avaliações de 77 cultivares e clones elite repetidos durante cinco anos.

Em Atlantic, o ramete 14A exibiu plantas com arquitetura fechada, com hábito de crescimento semi-ereto, folhas de inserção aguda com folíolos médios e com alta frequência de folíolos secundários. O padrão da cultivar é de arquitetura de planta intermediária, hábito ereto, folhas com inserção obtusa e frequência de folíolos secundários, média. Já as plantas do ramete 5D apresentaram variação nos descritores de tubérculo, que se apresentaram redondos, com olhos de profundidade média e esverdeamento ausente ou muito fraco. Em ambos os rametes, o ciclo vegetativo foi médio (Tabela 9). Os rametes de Atlantic não demonstraram diferenças significativas para produção, cuja média foi de 889,82 gramas de tubérculos por planta.

Tabela 8 – Médias das notas atribuídas aos descritores inserção e fechamento de folhas, tamanho dos folíolos e frequência de folíolos secundários em diferentes rametes da cultivar de batata Atlantic. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Ramete	Inserção das folhas ^I	Fechamento das folhas ^{II}	Tamanho dos folíolos ^{III}	Frequência de folíolos secundários ^{IV}
5D ¹	2,00a ³	5,20a	6,40b	5,20a
14A ²	1,50b	3,80b	5,70a	6,60b
Média	1,75	4,50	6,05	5,90
CV(%)	8,66	12,25	8,43	8,96
AS ⁴	0,97	0,96	0,88	0,97

¹Ramete regenerado de organogênese indireta. ²Ramete regenerado de organogênese direta. ³Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro. ⁴AS= acurácia seletiva (muito alta: ≥0,90; alta: ≥0,70 e <0,90; moderada: <0,70 e ≤0,50; baixa <0,50. Categoria e respectiva nota da cultivar Atlantic para os descritores avaliados: ^Iobtus(2); ^{II}médio(5); ^{III}médio(5); ^{IV}média(5).

A análise fenotípica dos rametes de Asterix e Atlantic quer sejam provenientes do cultivo de ápice caulinar quer sejam de explantes derivados de calo, demonstrou que ambas as cultivares são fenotipicamente instáveis após o cultivo *in vitro*, uma vez que foram observadas variabilidade intraclonal e/ou divergência em relação ao padrão da cultivar para muitos dos descritores avaliados. Os resultados observados revelaram que a escolha de explantes em função de seu grau de diferenciação não assegura estabilidade genética na cultura de tecidos. Isso contraria o preceito de que o aparecimento de variantes somaclonais parece ser uma ocorrência mais comum em determinados tipos de explantes (JAIN, 2001). Em um trabalho realizado com Asterix, foi observada divergência do padrão da cultivar em culturas regeneradas a partir de ápices caulinares (SANTIAGO, 2007), explantes considerados estáveis por Jain (2001).

Tabela 9 – Médias das notas atribuídas aos descritores hábito de crescimento, largura dos folíolos, ciclo vegetativo, tipo de planta em relação à folhagem, ondulação da borda dos folíolos e coloração na parte interna da corola dos rametes 5D e 14A da cultivar de batata Atlantic. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Ramete	Hábito de crescimento ^I	Largura dos folíolos ^{II}	Ciclo vegetativo ^{III}	Tipo de planta em relação à folhagem ^{IV}	Ondulação da borda dos folíolos ^V	Coloração na parte interna da corola ^{VI}
Média	4,0	6,25	2,00	1,93	3,90	1,45
CV(%)	13,75	7,45	0	15,02	21,89	23,18
AS*	-	-	-	0,73	0,56	-

*AS= acurácia seletiva (muito alta: $\geq 0,90$; alta: $\geq 0,70$ e $< 0,90$; modeada: $< 0,70$ e $\leq 0,50$; baixa $< 0,50$. Categoria e respectiva nota da cultivar Atlantic para os descritores avaliados: ^Iereto(3); ^{II}médio(5); ^{III}precoce(1); ^{IV}intermediária (2); ^VDébil (3); ^{VI}vermelho-púrpura(2).

Tabela 10 – Médias das notas atribuídas aos descritores aspereza da película, cor de polpa, formato, profundidade dos olhos e esverdeamento tubérculo nos rametes 5D e 14 A da cultivar de batata Atlantic. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Ramete	Aspereza da película ^I	Cor de polpa ^{II}	Formato dos tubérculo ^{III}	Profundidade dos olhos ^{IV}	Esverdeamento ^V
Média	3,65	1,50	1,93	3,90	1,45
CV(%)	11,11	12,45	15,02	21,89	23,18
AS*	-	0,62	0,73	0,52	-

* AS= acurácia seletiva (muito alta: $\geq 0,90$; alta: $\geq 0,70$ e $< 0,90$; modeada: $< 0,70$ e $\leq 0,50$; baixa $< 0,50$. Categoria e respectiva nota da cultivar Atlantic para os descritores avaliados: ^IÁspera(3); ^{II}Branca(1); ^{III}precoce(1); ^{IV}rasos (1); ^Vausente/muito fraco (1).

Contudo, como os rametes foram avaliados em apenas um ciclo de cultivo não é possível indicar potenciais descritores para monitorar a variação somaclonal.

Modificações nas características fenotípicas de cultivares de batata provenientes de cultura de calos foram observadas por vários autores (VAN-HARTEN et al., 1981; AHLOOWALIA et al., 1981; BINSFELD, 1992), principalmente na pilosidade, coloração e formato das folhas, coloração de flores, coloração da polpa e ciclo vegetativo. Variantes obtidos a partir de

meristemas das cultivares de batata Agrie dzeltenie e Juku submetidos a tratamento de termoterapia, também, mostraram instabilidade fenotípica, sendo identificados soma clones para a intensidade de florescimento, a altura das hastes e a uniformidade das plantas (ROSENBERG et al., 2007). Em um trabalho mais recente, Rosenberg et al. (2010) investigaram o efeito da termoterapia sobre a viabilidade de meristemas de batata. Observaram que plantas regeneradas de meristemas diferiram quanto ao rendimento, peso e número de tubérculos por planta, e resistência a *Phytophthora infestans*. Os autores atribuíram às variações observadas no material originado de meristemas ao tratamento por termoterapia e aos reguladores de crescimento usados no meio de cultivo.

5.4 CONCLUSÕES

Há grande variabilidade intraclonal e divergência em relação ao padrão fenotípico das cultivares nos descritores mínimos nos rametes das cultivares de batata Asterix e Atlantic.

O grau de diferenciação dos explantes que originam os rametes não tem efeito na estabilidade fenotípica das cultivares de batata Asterix e Atlantic.

6 CAPÍTULO IV – VARIABILIDADE INTRACLONAL DAS CULTIVARES DE BATATA ASTERIX E ATLANTIC AO LONGO DA MICROPROPAGAÇÃO, CULTIVO HIDROPÔNICO E EM CAMPO POR MARCADORES MICROSSATÉLITES

6.1 OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi analisar a variabilidade genética intraclonal das cultivares de batata Asterix e Atlantic, ao longo dos subcultivos, do cultivo hidropônico e em campo, por meio de marcadores microssatélites.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios de cultura de tecidos, cultivo em sistema hidropônico e cultivo em campo foram conduzidos no Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento e área experimental do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Os ensaios moleculares foram realizados no Laboratório de Diversidade Genética (DIVERGE), do Departamento de Biologia, UFSM.

6.2.1 Obtenção e cultivo dos explantes para a cultura de ápices caulinares e micropropagação

Os tubérculos das cultivares Asterix e Atlantic foram cedidos pela EMBRAPA – Canoinhas, SC, sendo provenientes de plantas matrizes indexadas para as principais viroses. A partir das brotações dos tubérculos, foram coletadas folhas jovens, em condições fisiológicas e sanitárias adequadas e, a partir destas, foram isolados, em condições assépticas, 40

ápices caulinares de Asterix e 20 ápices caulinares e 20 gemas axilares de Atlantic, os quais constituíram os rametes dos respectivos ortetes (tubérculos indexados de Asterix e Atlantic).

Após o isolamento, os ápices e as gemas foram inoculados em meio nutritivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescido de 3,0% de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 0,6% de ágar, em pH ajustado para 5,7. Estes explantes foram cultivados em frascos de vidro com capacidade para 10 ml contendo 20 ml de meio nutritivo, na sala de cultivo sob intensidade luminosa de 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 $\pm$ 3°C, durante 90 dias para Atlantic e 120 dias para Asterix, sendo transferidos, a cada 30, dias para meio nutritivo fresco de igual composição.

Após esse período de cultivo inicial, iniciou-se a etapa de micropropagação, com as culturas sendo transferidas para meio nutritivo de igual formulação, porém suplementado com os fitorreguladores 6-Benzilaminopurina – BAP (1 mg L⁻¹), Ácido α -Naftaleno Acético - ANA (0,01 mg L⁻¹) e Ácido Giberélico - GA₃ (0,1 mg L⁻¹). O cultivo ocorreu nas mesmas condições descritas anteriormente. A cada 30 dias foram efetuados os subcultivos, que totalizaram doze em Asterix e Atlantic.

Da micropropagação foram obtidas plantas pré-básicas que, após aclimatizadas, foram cultivadas em sistema hidropônico com a finalidade de produzir tubérculos pré-básicos. Estes, por sua vez, foram, posteriormente, cultivados em campo com o objetivo de se proceder às avaliações dos descritores morfoagronômicos.

6.2.2 Coleta de material vegetal controle, nos subcultivos, hidroponia e campo para o isolamento de DNA genômico

A partir de brotações dos tubérculos das cultivares Asterix e Atlantic, coletaram-se folhas jovens de 10 plantas. Logo após, cada amostra contendo 140mg de tecido foliar foi armazenada a - 20°C até extração do DNA genômico.

Foram coletadas folhas com segmentos nodais de 10 partes aéreas de cada ramete no terceiro, sexto, nono e décimo segundo subcultivos. Cada uma destas amostras constituiu um “bulk” que continha 140mg de tecido vegetal.

Após a coleta, os “bulks” foram armazenados em freezer a -20°C até o isolamento de DNA genômico.

Durante o cultivo em sistema hidropônico, foram coletadas folhas jovens recém expandidas de cinco plantas de cada ramete. Cada um destas amostras constituiu um “bulk” que continha 140mg de tecido vegetal. Após a coleta, o material foi macerado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer a -20°C até o isolamento de DNA genômico.

No cultivo em campo, foram coletadas folhas jovens, em condições fisiológica e sanitária adequadas, de cinco plantas de cada ramete para constituir um “bulk”. Após a coleta, procedeu-se, imediatamente, o procedimento de isolamento de DNA genômico.

6.2.3 Isolamento, quantificação e purificação de DNA genômico

Para o isolamento de DNA genômico dos rames de Atlantic coletados nos subcultivos e no cultivo em sistema hidropônico foi utilizado o protocolo CTAB descrito por Ferreira; Grattapaglia (1995). Quando as amostras apresentavam coloração marrom escura na fase de limpeza com o solvente clorofórmio álcool isoamílico repetiu-se o procedimento mais duas vezes. Para o isolamento de DNA genômico dos rames de Asterix e dos “bulks” provenientes do cultivo em campo de Atlantic foi efetuado mediante o emprego de “Extract-N-Amp Plant PCR Kits®” (Sigma Aldrich), seguindo-se as recomendações do fabricante.

As soluções de DNA de Atlantic foram quantificadas por eletroforese em gel de agarose a 0,8% por meio da comparação com concentrações de DNA do fago lambda (10, 20, 50 e 100ng) (Figura 1). As bandas das soluções de DNA foram visualizadas por coloração com brometo de etídeo a 0,5 $\mu\text{l/ml}$ e, após, a solução estoque de DNA foi diluída em tampão TE (10mM de TRIS-HCl e 1mM de EDTA, pH 8,0) em alíquotas de 20 ng μl^{-1} , as quais foram mantidas em freezer a -20°C até a realização das reações de amplificação.

Após a quantificação, as soluções de DNA que apresentaram menor qualidade, a qual foi identificada pelos arrastes no gel, foram purificadas pelo

emprego de polietilenoglicol (PEG) a 13%, conforme descrito a seguir. Para cada 20 μ l da amostra de DNA genômico adicionou-se 80 μ l de água MilliQ, após adicionou-se o mesmo volume de PEG. Misturou-se cuidadosamente invertendo o tubo. Após, manteve-se em temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 10.000g. Após, procedeu-se três vezes a lavagem das amostras com etanol 70%. O sobrenadante foi desprezado, tomando cuidado para não perder o pellet. Adicionou-se 400 μ l de etanol 70%. Após, a amostra foi centrifugada por 10 minutos a 10.000g. Em seguida, o sobrenadante foi removido e deixou-se o tubo secando em temperatura ambiente. Após, a amostra foi eluída em 50 μ l de TE, a mesma foi mantida em banho-maria à 40°C. Ao final a amostra foi checada em gel de agarose 0,8%.



Figura 1 – Quantificação de “bulks” de DNA genômico de Atlantic isolado pelo protocolo CTAB. A e B=DNA do fago lambda (A=10 ng μ l⁻¹, B=20 ng μ l⁻¹). 1=Atlantic não subcultiva *in vitro*; 2=14A3SC; 3=14A6SC;4=14A9SC; 5=14A12SC; 6=14D3SC; 7=14D6SC; 8=14D12SC; 9=5D3SC;10=5D12SC; 11=14D3SC; 12=14D6SC; 13=14D9SC. Os rametes são indicados por numerais (5 e 14) seguidos por uma letra, que identifica o tipo de explante usado para regenerar: D = derivado de calo e A = ápice caulinar, e, na sequência, por uma associação entre um numeral, que representa o subcultivo respectivo, e as letras SC, que significam subcultivo (3SC=terceiro subcultivo, 6SC=sexto subcultivo e 12SC=décimo segundo subcultivo). Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

6.2.4 Amplificação e revelação dos produtos da PCR

Neste estudo foram usados três pares de oligonucleotídeos iniciadores da replicação (“primers”), publicados por Provan et al. (1996), cujas sequências encontram-se na Tabela 1.

Cada reação de PCR dos “bulks” da cultivar Atlantic utilizou um volume final de 20µl, que incluiu: tampão da Taq 10X, 2,5mM de MgCl₂, 200µM de dNTPs, 10pmol de cada “primer”, 0,1 U µl⁻¹ de Taq DNA polimerase (Sigma Aldrich) e água MilliQ para completar o volume da reação. Todas as reações empregaram 20ng de DNA genômico.

Cada reação de PCR dos “bulks” da cultivar Asterix utilizou um volume final de 20µl, que incluiu: 10µl de “Extract-N-Amp Plant PCR Kits®” (Sigma Aldrich), 0,4µM de cada “primer” e água MilliQ para completar o volume da reação. Todas as reações empregaram 20ng de DNA genômico.

Todas as amplificações foram efetuadas em um termociclador Tecne®, empregando-se o seguinte perfil térmico: (1) 94°C por 3 min, [*T_m*] por 2 min, 72°C por 1,5 min x 1 ciclo; (2) 94°C por 1 min, [*T_m*] por 2 min, 72°C por 1,5 min x 29 ciclos; (3) 72°C por 5 min. Os valores de *T_m* e demais informações sobre os “primers” microssatélites estão na Tabela 1.

Os produtos de amplificação de cada loco foram separados foram separados em gel vertical de poliacrilamida a 6%, em tampão TBE 1X (TRIS – base, ácido bórico, EDTA 0,5M) por 5-7 horas a 125 V. Como marcador de peso molecular foi empregado o DNA “ladder” de 50pb (Ludwig). A revelação das bandas microssatélites foi efetuada segundo protocolo descrito por Sanguinetti et al. (1994). Após a obtenção da coloração desejada, os géis foram fotografados e imersos em solução de secagem (1% Glicerol, 30% Metanol) juntamente com papel celofane para permitir seu armazenamento e posterior registro fotográfico.

Tabela 1 – Denominação, gene ou pseudogene em que o microsatélite está localizado, motivo de repetição, localização, sequência, temperatura de anelamento (T_m), tamanho e número de alelos esperados a partir da amplificação de “primers” microsatélites de batata (*Solanum tuberosum* L.), utilizados neste estudo. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Denominação e gene	Motivo da repetição	Localização	Sequência do iniciador (5'-3')	T_m (°C)	Tamanho (pb)	Nº de alelos esperados
STPATPI:	(AT) ₂₂	Intron II	F**:TGCAATGTGTGCAACAATCA	56	203	9
Pseudogene patatina da batata (SB6B)		Cromossomo IX*	R***:TAATTGGATAGGTCGGCCT G			
STWIN12G:	(TGAAA) ₂ (ATA) ₆	3'-UTR	F:TGTTGATTCTGGTGATAA	48	167	5
Genes WIN1 e WIN2 ligados à indução de fermento em batata			R:TGTTGGACGTGACTTGTA			
STGBSS*:	(TCT) ₉	Intron I	F:AATCGGTGATAAATGTGAATGC	58	138	6
Amido sintase		Cromossomo VIII	R:ATGCTTGCCATGTGATGTGT	53*	121-150*	16*

Adaptado de Provan et al. (1996). * Referências obtidas de Ghislain et al. (2009). ** F = forward. ***R = reverse

6.2.5 Análise dos polimorfismos

Para a análise dos géis, sendo os acessos tetraplóides, os produtos gerados pelos “primers” microssatélites foram considerados como marcadores dominantes, dada a dificuldade em determinar as frequências alélicas, avaliando-se a presença ou a ausência de cada banda. Cada banda amplificada correspondeu a um alelo microssatélite.

As bandas amplificadas foram analisadas, visualmente, e, após, foi construída uma matriz para cada uma das cultivares, considerando os dados binários em que o valor 1 significou a presença da banda e o valor zero, a sua ausência. A partir da matriz binária, foi calculada uma matriz de similaridade para cada uma das cultivares, utilizando-se o coeficiente de Dice (1945) (ANEXOS A e B). A partir destes coeficientes foi construído um dendrograma pelo método de agrupamento de médias aritméticas não ponderadas - UPGMA e pelo procedimento sequencial, aglomerativo, hierárquico e exclusivo - SAHN, A consistência do dendrograma foi testada pela correlação cofenética, cuja significância foi testada pelo teste de Mantel com 1.000 permutações aleatórias. Na análise dos polimorfismos moleculares foi utilizado o programa NTSys (ROHLF, 2000).

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O isolamento de DNA genômico do material proveniente dos subcultivos e do cultivo em sistema hidropônico pelo protocolo CTAB (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995) resultou eficiente para os subcultivos de Atlantic, exceto para as amostras coletadas no sexto e nono subcultivos dos rametes 5D e 16D, além daquela(s) do nono subcultivo de 14D, pois o DNA obtido não permitiu amplificação. O mesmo ocorreu com todas as amostras (5D, 14A, 14D e 16D) provenientes do cultivo hidropônico. Essas amostras apresentaram coloração escura ao final do processo de extração, indicando a contaminação por compostos secundários (pigmentos) e/ou outras substâncias oxidadas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995). Para essas amostras, as lavagens adicionais com clorofórmio-álcool isoamílico não surtiram efeito, tampouco a purificação com PEG, não sendo possível obter DNA de boa qualidade que permitisse a amplificação.

Por outro lado, em Asterix, não foi possível extrair DNA genômico de qualidade satisfatória do material proveniente dos subcultivos e cultivo hidropônico usando-se o protocolo CTAB (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995), em virtude da contaminação do “pellet” obtido por compostos secundários e/ou substâncias oxidadas. Para contornar esses problemas, com Asterix utilizou-se um “kit” comercial que possibilitou a extração do DNA genômico “bulks” através de reagentes específicos e, posteriormente, o DNA das amostras foi utilizado nas reações de amplificação que foram realizadas também com os reagentes do “kit” comercial.

Na avaliação da variabilidade intraclonal de Atlantic, os *loci* STPATPI, STWIN12G e STGBSS (Tabela 1) revelaram polimorfismo entre os rametes/cultivos, produzindo bandas nítidas e reprodutíveis (Figuras 2 e 3). Foi amplificado um total de 189 alelos (bandas). O maior número de alelos (14), foi amplificado no ramete 14A no terceiro subcultivo para o locus STPATPI (pseudogene da patatina) e menor número de alelos (1), foi observado no ramete 16D no décimo segundo subcultivo para o mesmo *locus*. A ocorrência de um único alelo pode ser devida a condição homozigota do ramete neste

locus ou mutações na região de pareamento dos primers, impedindo a amplificação.

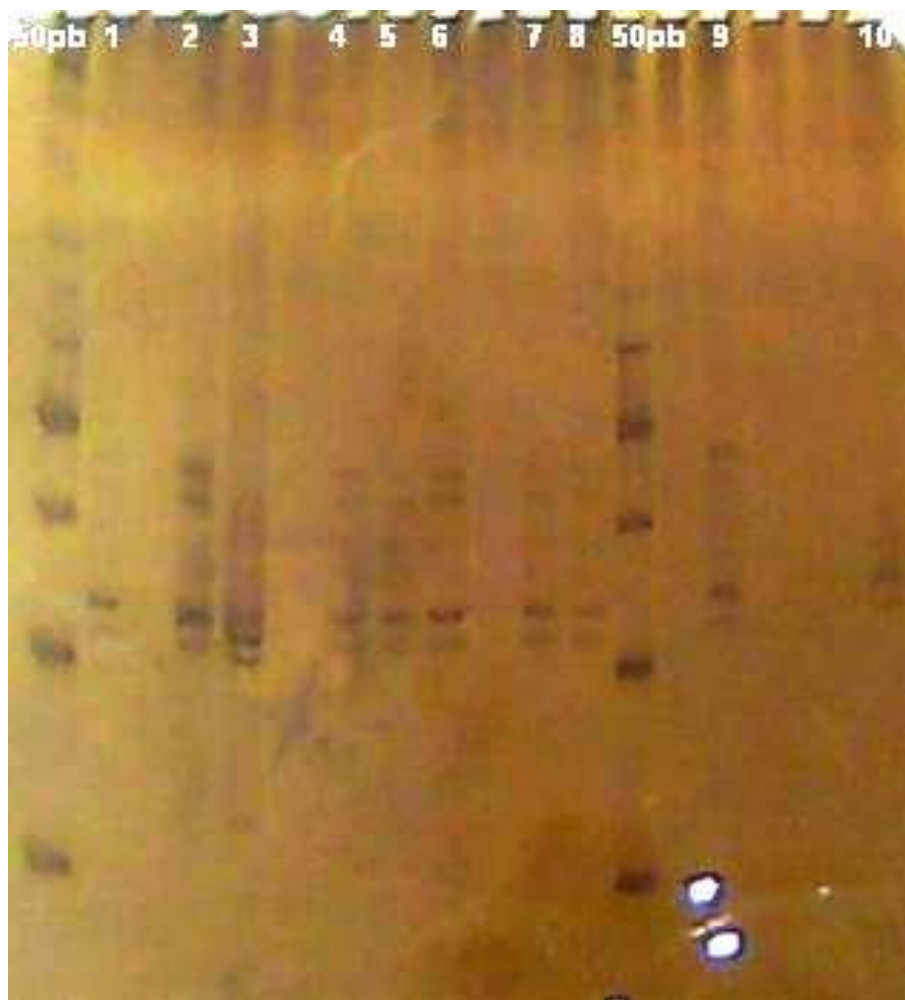


Figura 2 - Padrões de bandas obtidas por meio dos produtos da PCR, a partir da técnica de microssatélites, utilizando-se o “primer” STWIN12G em rametes da cultivar de batata Atlantic: 1=16D12SC; 2=16D3SC; 3=14D12SC; 4=14D6SC; 5=14D3SC; 6=14A12SC; 7=14A6SC; 8=14A3SC; 9=5D12SC; 10=5D3SC. Os rametes são indicados por numerais (5, 14 e 16) seguidos por uma letra, que identifica o tipo de explante usado para regenerar: D=derivado de calo e A=ápice caulinar, e, na sequência, por uma associação entre um numeral, que representa o subcultivo respectivo, e as letras SC, que significam subcultivo (3SC=terceiro subcultivo, 6SC=sexto subcultivo e 12SC=décimo segundo subcultivo). 50 pb=marcador de peso molecular. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Os *loci* microssatélites usados permitiram identificar variabilidade genética entre o controle de Atlantic, a amostra não micropropagada, e os demais rametes, como pode ser observado no dendrograma apresentado na Figura 4. A similaridade estimada entre o controle (amostra de uma brotação não micropropagada) e os 11 rametes de um mesmo ortete, que se originaram de explantes diferenciados (ápices caulinares) ou desorganizados (calos), em diferentes subcultivos, variou de 0,32 a 0,95 (APÊNDICE A). A máxima semelhança observada (0,95) não incluiu a amostra não subcultivada, ao contrário do que seria esperado. O controle, que constituiu um ramo isolado no diagrama de árvore, apresentou maior similaridade (0,69) com o grupo constituído pelos rametes 5D3SC, 14A3SC, 14A6SC, 14A12SC, 14D3SC e 14D6SC; e maior dissimilaridade (0,52) com 14A9SC. Este ramete foi, inclusive, o mais divergente de todos, constituindo, também, um ramo isolado. No outro extremo, com 0,95 de similaridade estão os rametes 14 no terceiro (14D3SC) e sexto subcultivo (14D6SC), ambos oriundos de calo. Os demais rametes apresentaram similaridade intermediária.

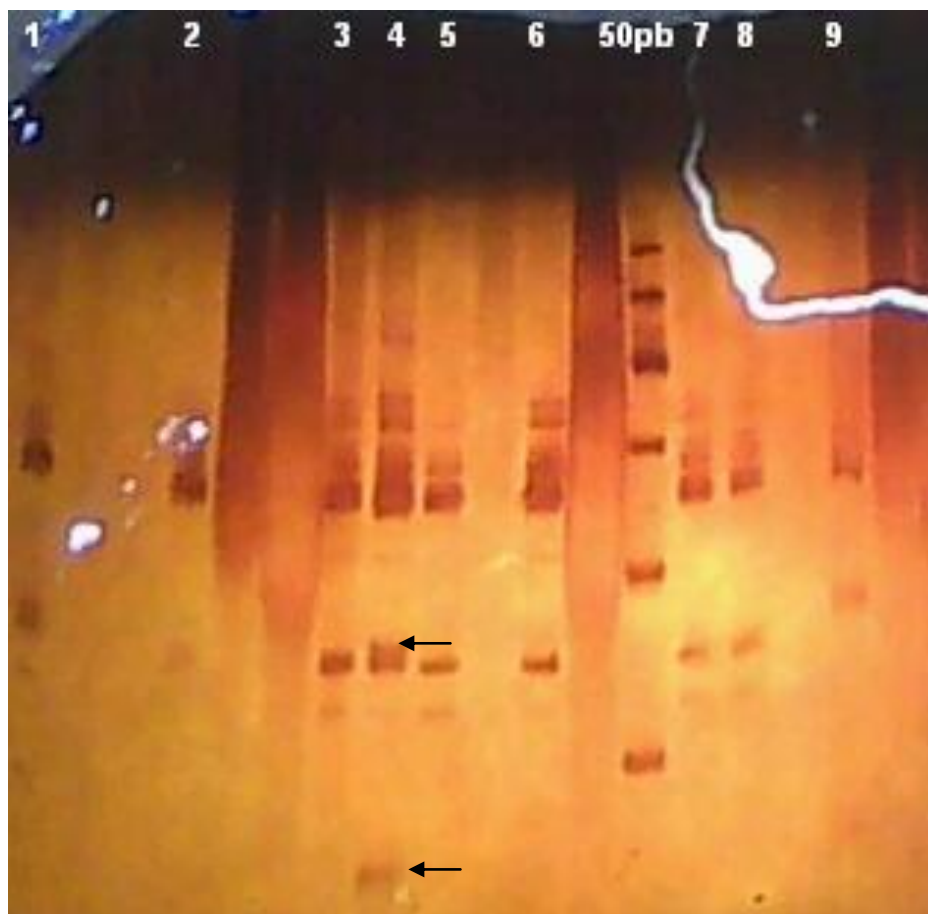


Figura 3 - Padrões de bandas obtidas por meio dos produtos da PCR, a partir da técnica de microssatélites, utilizando-se o “primer” STPATPI em rametes da cultivar de batata Atlantic: 1=5D3SC; 2=5D12SC; 3=controle; 4=14A3SC; 5=14A6SC; 6=14A12SC; 7=14D3SC; 8=14A6SC; 9=14D12SC. Os rametes são indicados por numerais (5 e 14) seguidos por uma letra, que identifica o tipo de explante usado para regenerar: D=derivado de calo e A=ápice caulinar, e, na sequência, por uma associação entre um numeral, que representa o subcultivo respectivo, e as letras SC, que significam subcultivo (3SC=terceiro subcultivo, 6SC=sexto subcultivo e 12SC=décimo segundo subcultivo). Controle=amostra não micropropagada. 50 pb=marcador de peso molecular. Setas indicam bandas exclusivas do ramete 14A no terceiro subcultivo. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Quanto à forma de agrupamento, observou-se que o ramete 5D3SC de Atlantic passou por modificações semelhantes ao ramete 14A3SC para os loci microssatélites empregados, pois compartilharam similaridade de 0,83. Entretanto, ao longo dos subcultivos, observou-se que a dissimilaridade aumentou para aquele ramete, pois apresentou perfil que se agrupou a 0,75 de similaridade, juntamente com o ramete 16D12SC. Contudo, o ramete 16D passou por modificações mais intensas no período inicial do subcultivo, pois agrupou-se a 0,60 com o ramete 14D12SC (Figura 4). Enquanto que o ramete

14D, embora já apresentasse modificações em relação ao padrão do controle, manteve-se com o mesmo perfil até o sexto subcultivo, quando compartilhou similaridade de 0,96 com o terceiro subcultivo, só apresentando modificações no décimo segundo subcultivo. O ramete 14A apresentou variação em relação ao padrão do controle e essas modificações aumentaram até o nono subcultivo, pois o ramete, nesse período, foi agrupado externamente aos demais, reunindo-se a 0,48. Entretanto, após três meses de subcultivo ocorreu uma diminuição na dissimilaridade e o ramete 14A voltou a compartilhar similaridade igual a 0,88 com os demais rametes (Figura 4).

Para a análise da variabilidade intraclonal de Asterix, em que foram utilizados os *loci* microssatélites STWIN12G e STGBSS, ambos apresentaram polimorfismo para os rametes analisados, produzindo bandas nítidas e reproduzíveis (Figura 5). Foi amplificado um total de 36 alelos (bandas), em que o maior (6) e, também, o menor (1) número de alelos foi amplificado pelo *locus* STGBSS. A ocorrência de um único alelo sugere a existência de um genótipo homozigoto para este *locus* ou mutações na região de pareamento dos primers, impedindo a amplificação.

Através dos *locos* microssatélites empregados foi possível identificar a existência de variabilidade genética entre os rametes de Asterix (Figura 6). A similaridade estimada entre os 11 rametes de um mesmo ortete, que se originaram de explantes organizados (ápices caulinares) ou desdiferenciados (calos), em diferentes subcultivos, no cultivo hidropônico ou em campo, variou de 0,29 a 1,00. Máxima similaridade (1,00) foi observada em um grupo constituído por rametes regenerados a partir de ápices caulinares ou a partir de organogênese indireta, durante a micropropagação, no cultivo hidropônico e em campo. Integram este grupo os rametes 20D9SC, 20D12SC, 20DH, 33A3SC,

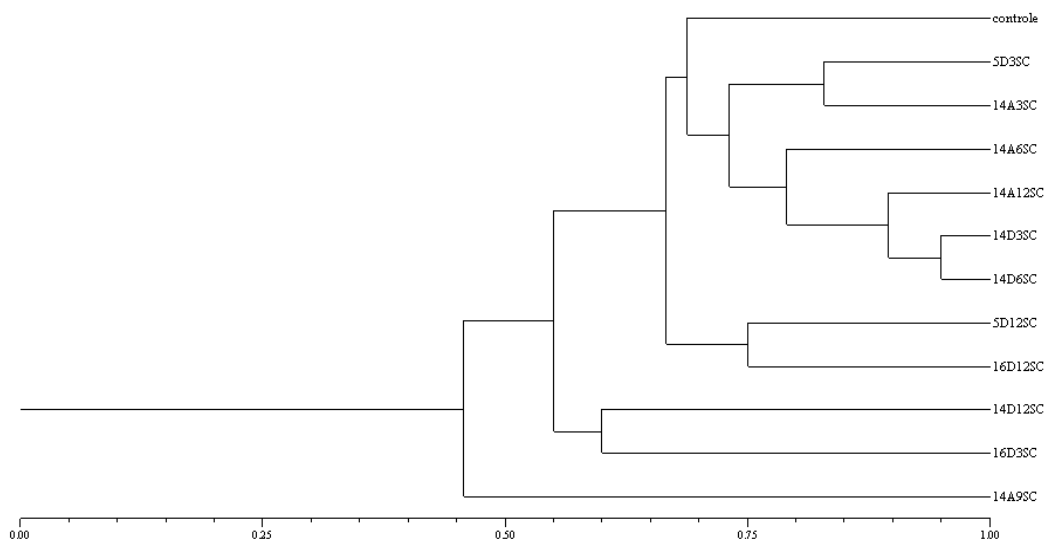


Figura 4 - Dendrograma elaborado a partir de estimativas de similaridade (índice de Dice), definido pelo critério de agrupamento UPGMA de diferentes rametes da cultivar de batata Atlantic. Os rametes são indicados por numerais (5, 14 e 16) seguidos por uma letra, que identifica o tipo de explante usado para regenerar: D=derivado de calo e A=ápice caulinar, e, na sequência por uma associação entre um numeral, que representa o subcultivo respectivo, e as letras SC, que significam subcultivo (3SC=terceiro subcultivo, 6SC=sexto subcultivo, 9SC=nono subcultivo e 12SC=décimo segundo subcultivo). Os rametes reúnem-se a 0,46 de similaridade. Coeficiente de correlação cofenética (r)=0,86. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

33A6SC, 33D6SC e 33DC. Similaridade intermediária (0,55) foi apresentada pelos rametes 20D6SC e 33D12SC, afins àqueles do grupo que apresentou similaridade máxima. A variação somaclonal observada no ramete 33D pode ser de natureza epigenética, posto que o fenótipo molecular apresentado no sexto subcultivo foi recuperado no cultivo em campo, mesmo tendo se alterado no décimo segundo subcultivo. No ramete 20D observou-se resultado semelhante, cujo padrão molecular observado a partir do nono subcultivo se manteve no cultivo hidropônico, apesar de ter diferido no sexto subcultivo. Entretanto, como a amostra controle de Asterix (não micropropagada) não amplificou, não é possível saber se o padrão de bandas observado é o original ("true-to-type") da cultivar. O comportamento do ramete 33D constitui um exemplo da tese defendida por muitos autores (AL-ZAHIM et al., 1999; JIN et al., 2008; ARAÚJO et al., 2001; ALBANI; WILKINSON, 1998; EHSANPOUR et al., 2007; LI et al., 2007; KUZNETSOVA et al., 2005; MATHEKA et al., 2008) de que o ambiente da cultura de tecidos predispõe à variação somaclonal e que o retorno ao campo estabiliza o fenótipo. A característica de aumento da similaridade com o tempo de subcultivo, para alguns dos rametes, pode indicar que o ambiente da cultura de tecidos causa estresse para o genoma da planta independente se o explante é oriundo de ápice caulinar ou derivado de calo (ZUCCHI et al., 2002). Uma hipótese alternativa para explicar a aparente reversão dos alelos, seria a ocorrência de homoplasias, isto é, os alelos seriam iguais em estado, mas não em descendência (SLATKIN, 1995).

Contrariamente ao observado com 20D e 33D, no ramete 33A, a similaridade foi máxima (1,00) entre o terceiro e o sexto subcultivos, reduziu-se para 0,80 no décimo segundo subcultivo e atingiu o seu mínimo (0,65) quando o ramete foi cultivado em campo. Este resultado fortalece a hipótese inicialmente elaborada para o presente estudo: o aumento no tempo de cultivo *in vitro* induz à variação somaclonal e que pode ser usado como um parâmetro de controle da estabilidade genética. A estabilidade e o posterior aumento na variação para o ramete 33A, em todos os períodos avaliados, parecem estar mais relacionados a modificações genéticas, que envolvem rearranjos e recombinações cromossômicas (OLHOFT; PHILLIPS, 1999; SMULDERS; DE KLERK, 2011). Os resultados obtidos neste ramete concordam com os observados por Dan e Wilson (2010) que obtiveram aumento no polimorfismo

em linhagens da cultivar Russet Burbank derivada de segmentos nodais subcultivados por longo tempo.



Figura 5 - Padrões de bandas obtidas por meio dos produtos da PCR, a partir da técnica de microssatélites, utilizando-se o "primer" STGBSS em rametes da cultivar de batata Asterix: 1=33A3SC; 2=33A6SC; 3=33A12SC; 4=33AC; 5=33D6SC; 6=33D12SC; 7=33DC; 8=20D6SC; 9=20D9SC; 10=20D12SC; 11=20DH). Os rametes são indicados por numerais (20 e 33) seguidos por uma letra, que identifica o tipo de explante usado para regenerar: D=derivado de calo e A=ápice caulinar, e, na sequência, C=amostra coletada em planta básica G1 cultivada em condições de campo e H=amostra coletada em planta básica G0 cultivada em sistema hidropônico, ou, ainda, por uma associação entre um numeral, que representa o subcultivo respectivo, e as letras SC, que significam subcultivo (3SC=terceiro subcultivo, 6SC=sexto subcultivo, 9SC=nono subcultivo e 12SC=décimo segundo subcultivo). 50 pb=marcador de peso molecular. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Foram obtidas elevadas estimativas de correlação cofenética (r), de 0,85931 para Atlantic e 0,94744 para Asterix, o que demonstra que as relações de similaridade entre os rametes de cada cultivar estão adequadamente representados nos dendrogramas elaborados e apresentados nas Figuras 4 e 6 respectivamente.

Os resultados de elevada variabilidade intraclonal observados indicam a ocorrência de variação somaclonal nos rametes, independente de terem sido regenerados a partir de ápices caulinares ou de calo, tanto em Asterix como em Atlantic.

As variações observadas nos rametes derivados de calo em Atlantic podem ser decorrentes da passagem pela própria fase de crescimento desorganizado de calo, considerada uma das causas da variação somaclonal (RANI; RAINA, 2000). Os resultados observados estão de acordo com a descrição da literatura para várias espécies incluindo alho (AL-ZAHIM et al., 1999), algodão (JIN et al., 2008), arroz (ARAÚJO et al., 2001), batata (ALBANI; WILKINSON, 1998; EHSANPOUR et al., 2007), cana-de-açúcar (YADAV et al., 2006), cevada selvagem (LI et al., 2007), ervilha (KUZNETSOVA et al., 2005), milho (MATHEKA et al., 2008), dentre outras espécies.

Já a ocorrência de variação somaclonal em plantas regeneradas de ápices caulinares nas duas cultivares de batata pode ser decorrente da perda da influência estabilizadora do meristema, que ocorre quando as plantas crescem e se desenvolvem a partir de fragmentos de outras plantas da mesma espécie/cultivar, na cultura de tecidos (KARP, 1994). Adicionalmente, é importante salientar que a cultura de tecidos envolve alterações que estão relacionadas a dano celular ao DNA, incluindo estresse oxidativo, causado pelo uso de agentes oxidantes empregados na desinfestação superficial dos explantes no início do cultivo e dos tecidos, nos subcultivos subsequentes (CASSELLS; CURRY, 2001).

Além do próprio ambiente da cultura de tecidos, fatores como reguladores de crescimento empregados no meio de cultura podem ter contribuído para ocorrência de variação somaclonal nos rametes regenerados de ápices caulinares, pois os eventos primários, que são controlados pelo balanço hormonal da planta passam a ser controlados pelos reguladores de

crecimento, que são responsáveis pela morfogênese via alteração do ciclo celular, e podem induzir variabilidade (PESCHKE; PHILLIPS, 1992). Em morangueiro, Arruda et al. (2006) identificaram variação somaclonal por meio de marcadores RAPD, mesmo em concentrações reduzidas de 6-Benzilaminopurina - BAP (2,2µM), em um único subcultivo.

Na cultivar Reet de batata, Rosenberg et al. (2010) observaram variação somaclonal para características fenotípicas, como rendimento, em clones originados de ápices caulinares tratados com termoterapia para a eliminação de partículas virais.

No presente estudo, as cultivares apresentaram instabilidade genética ao passarem pelo cultivo *in vitro*, porém o comportamento foi diferenciado. Em função disso, não se pode atribuir a instabilidade genética, exclusivamente, ao efeito do genótipo. Em rametes regenerados a partir de ápices caulinares de *Camellia sinensis* e *C. assamica* spp. *Assamica* foram, igualmente, observadas diferenças na estabilidade genética a partir de marcadores RAPD, ISSR e RFLP (DEVARUMATH et al., 2002).

Observou-se esse comportamento no ramete 14A de Atlantic que comportou-se como grupo externo no nono subcultivo, mas, no décimo segundo subcultivo, a similaridade aumentou, isto é, o ramete 14A12SC tornou-se mais similar ao 14A6SC. O ramete 16D, também, apresentou baixo índice de similaridade no terceiro subcultivo e, porém no décimo segundo subcultivo, apresentou maior similaridade (Figura 5).

Esse comportamento de variação nos *loci*, no início da cultura de tecidos, pode indicar que o genoma está sofrendo estresse *in vitro* e, depois de um período, é capaz de se estabilizar (SMULDERS; DE KLERK, 2011). É possível que esse tipo de resposta do genoma da planta esteja associado a eventos epigenéticos, tais como a mobilização de elementos de transposição. Esses resultados, obtidos no presente estudo, foram semelhantes aos registrados por Zucchi et al. (2002), que observaram alta variabilidade nos *loci* no início do processo de cultura de ápices caulinares de dois genótipos de cana-de-açúcar.

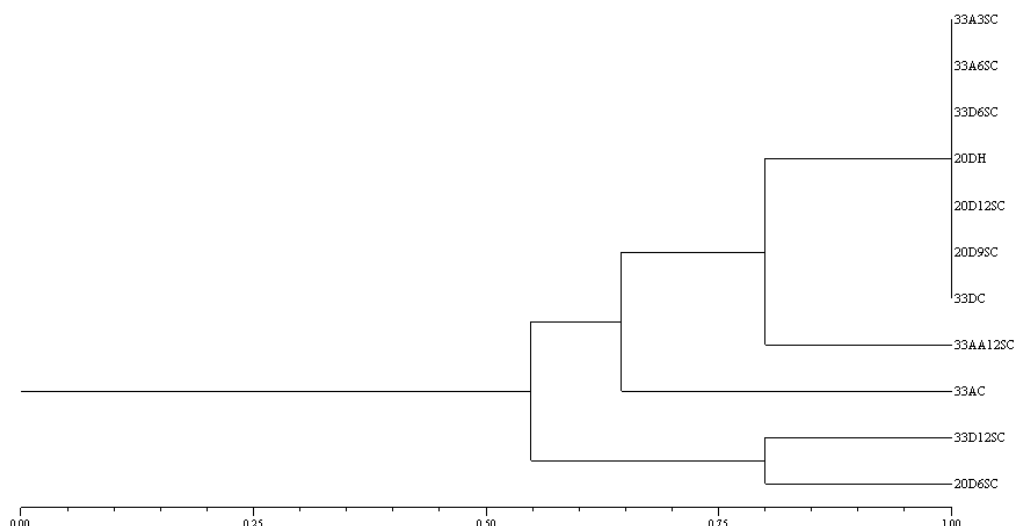


Figura 6 - Dendrograma elaborado a partir de estimativas de similaridade (índice de Dice), definido pelo critério de agrupamento UPGMA de diferentes rametes da cultivar de batata Asterix. Os rametes são indicados por numerais (20 e 33) seguidos por uma letra, que identifica o tipo de explante usado para regenerar: D=derivado de calo e A=ápice caulinar, e, na sequência por C=amostra coletada em planta básica G1 cultivada em condições de campo e H=amostra coletada em planta básica G0 cultivada em sistema hidropônico, ou, ainda, por uma associação entre um numeral, que representa o subcultivo respectivo, e as letras SC, que significam subcultivo (3SC=terceiro subcultivo, 6SC=sexto subcultivo, 9SC=nono subcultivo e 12SC=décimo segundo subcultivo). Os rametes reúnem-se a 0,55 de similaridade. Coeficiente de correlação cofenética (r)=0,95 Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

A variação somaclonal tem bases moleculares em eventos de ordem genética e epigenética e suas interações envolvem profundos efeitos sobre a transcrição gênica, elementos de transposição e mudanças em cromossomos. Na verdade a distinção entre mudanças genéticas e epigenéticas atualmente é uma simplificação, pois existem evidências moleculares demonstrando que mudanças epigenéticas podem levar a modificações genéticas (SMULDERS; DE KLERK, 2011). E essas mudanças epigenéticas ocorrem em vários níveis, independentemente, e incluem metilação reversível no DNA, modificações em histonas e remodelagem da cromatina, que podem ser mutuamente antagonistas (BAIRU et al., 2010). Nesse sentido, é importante salientar que a metilação do DNA é necessária para regular o desenvolvimento de plantas, podendo apresentar algum impacto sobre o vigor e a morfogênese (CHAN et al., 2005). Além disso, modificações epigenéticas devido ao estresse durante o cultivo *in vitro* podem, talvez, resultar em fenótipos alterados nas plantas regeneradas (BOYKO; KOVALCHUK, 2008), o que poderia explicar a grande variabilidade fenotípica observada em campo para as duas cultivares por meio dos descritores mínimos (ver capítulo III).

6.4 CONCLUSÕES

As cultivares de batata Asterix e Atlantic apresentam elevada variabilidade intraclonal em marcadores microssatélites.

O padrão de instabilidade nos fenótipos moleculares é diferenciado nas cultivares de batata Asterix e Atlantic.

Rametes regenerados a partir de ápices caulinares e derivados de organogênese indireta são igualmente instáveis.

O tempo de subcultivo pode ser uma ferramenta de controle da variação somaclonal.

7 CONCLUSÕES GERAIS E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo constitui um dos primeiros realizados no país, direcionados a investigar a variação somaclonal em plantas e tubérculos básicos de cultivares de batata regenerados a partir do cultivo *in vitro* de ápices caulinares. Espera-se que outros trabalhos venham a ser realizados em um futuro próximo e que contribuam para uma melhor compreensão desse fenômeno.

A observação do desempenho *in vitro* de rametes de Asterix e Atlantic possibilitou a constatação de diferenças para a maioria das características avaliadas ao longo dos subcultivos. Essas diferenças indicam a ocorrência de extensiva variabilidade intraclonal, mesmo em rametes originados a partir de ápices caulinares. Além disso, a abordagem utilizada permitiu identificar diferenças, principalmente no que se refere à taxa de multiplicação *in vitro*, que não é percebida quando não são avaliados os rametes individualmente. Esse tipo de análise poderá auxiliar no monitoramento da variação somaclonal, que pode ser feito precocemente, ainda no ambiente da cultura de tecidos. Simultaneamente, essa característica poderá ser empregada na seleção precoce de variantes somaclonais.

Foi identificada variabilidade em características de tubérculo-semente nos rametes das cultivares de batata Atlantic e Asterix, provenientes do cultivo de plantas básicas da geração zero (G0) em sistema hidropônico fechado. A variabilidade fenotípica intraclonal de Atlantic, para minitubérculos básicos da geração zero (G0) produzidos em sistema hidropônico, manifestou-se em um número maior de características que em Asterix. Em Asterix ocorreu variação somaclonal para taxa de multiplicação.

Plantas e tubérculos da primeira geração (G1) clonal de rametes da cultivar de batata Asterix apresentam um padrão de comportamento diferenciado daqueles de rametes de Atlantic em relação aos descritores mínimos. Nas análises dos descritores mínimos, efetuados em campo,

observou-se que, em Asterix, a variabilidade somaclonal acarretou em alteração no formato padrão da cultivar, de oval-alongado para longo. Além disso, os rametes de Asterix apresentaram um comportamento diferenciado dos de Atlantic em relação aos descritores mínimos, entretanto, houve grande variabilidade intraclonal e divergência em relação ao padrão fenotípico das cultivares nos descritores mínimos nos rametes de ambas as cultivares. Entretanto, o grau de diferenciação dos explantes que originam os rametes não teve efeito na estabilidade fenotípica de Asterix e Atlantic discordando da tese, amplamente aceita, de que explantes diferenciados são geneticamente mais estáveis.

Finalmente, em nível molecular, analisando-se os produtos de PCR de apenas três pares de “primers” em Atlantic e dois destes em Asterix, verificou-se elevada variabilidade genética intraclonal em marcadores microssatélites, cujo padrão de instabilidade dos fenótipos moleculares foi diferenciado nas duas cultivares de batata. Ratificando a conclusão anteriormente elaborada em relação aos descritores mínimos, os rametes regenerados a partir de ápices caulinares e derivados de organogênese indireta foram igualmente instáveis.

Pela análise dos marcadores microssatélites verificou-se que o tempo de subcultivo pode ser usado como ferramenta para controle da variação somaclonal, devendo considerar o genótipo que está sendo avaliada, pois em Asterix foi observada estabilidade genética para rametes de ápice caulinar até o sexto subcultivo, enquanto que em Atlantic a partir do terceiro subcultivo já se observa variabilidade genética em relação ao controle não subcultivado.

Para avaliar a estabilidade dessas variações observadas ao longo das gerações de batata e, portanto, suas consequências sobre a pureza genética das cultivares são necessários ensaios adicionais, acompanhando-se os rametes avaliados no presente estudo.

Além disso, seria interessante acessar a variabilidade molecular através de outros marcadores, como aqueles de amplificação de polimorfismo sensível à metilação (MASP) ou, ainda, testar outros “primers” microssatélites ou genes

específicos relacionados a características de tubérculo e de pigmentação de planta e tubérculo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD ELALEEM, K. G. et al. Effect of plant growth regulators on callus induction and plant regeneration in tuber segment culture of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Diamant. **African Journal of Biotechnology**. v. 8, n.11, p. 2529-2534, 2009.

AHLOOWALIA, B.S.; SHERINGTON, J. Transmission of somaclonal variation in wheat. **Euphytica**, v.34, p. 525-537, 1985.

AHLOOWALIA, B.S. Plant regeneration from callus culture in potato. **Euphytica**, v.31, p.755-759, 1981.

ALBANI, M.C.; WILKINSON M.J. Inter simple sequence repeat polymerase chain reaction for the detection of somaclonal variation. **Plant Breeding**, v.117, p.573–575, 1998.

AL-ZAHIM, M.A.; et al. Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis. **Plant Cell Report**, v.18, p. 473–477, 1999.

ANDRIOLO, J. L. **Fisiologia das culturas protegidas**. Santa Maria: UFSM, 142p. 1999.

ANDRIOLO, J. L. Sistema hidropônico fechado com subirrigação para produção de minitubérculos de batata. In: SIMPÓSIO DE MELHORAMENTO GENÉTICO E PREVISÃO DE EPIFITIAS EM BATATA, 2006, Santa Maria, **Anais...** Santa Maria: UFSM, 2006. p. 26-40.

ARAÚJO, L.G.; et al. RAPD analysis of blast resistant somaclones from upland rice cultivar IAC 47 for genetic divergence. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 67, p. 165–172, 2001.

ARRUDA, A.S. et al. Variação genômica intraclonal de explantes de morango em ambiente controlado. **Bioscience Journal**, v.22, p.119-121, 2006.

ASSIS, M. de. Novas Tecnologias na Propagação de Batata. **Informe Agropecuário**, v.20, n.197, p. 3033,1999.

AVERSANO, R. et al. Genetic stability at nuclear and plastid DNA level in regenerated plants of *Solanum* species and hybrids. **Euphytica**, v.165, p. 353–361, 2009.

AUGUSTIN, L. et al., Taxa de multiplicação de genótipos de batata cultivados *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, v. , n., p. , 2006.

BANDINELLI, M.G. **Micropropagação e miniestaquia na propagação de batata**. 2009. 60f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

BAIRU, M.W.; et al. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. **Plant Growth Regulation**. DOI 10.1007/s10725-010-9554-x. Disponível em <http://www.springerlink.com/content/01t677688j1l0j15/> Acesso em: 14 jan. 2011.

BINSFELD, P.C. **Obtenção e caracterização morfológica e isoenzimática de somaclones de batata (*Solanum tuberosum* L.)**. 1992. 100f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1992.

BORDALLO, P.N.; et al. Somaclonal variation on in vitro callus culture potato cultivars. **Horticultura Brasileira**, v.22, p.300-304, 2004.

BOYKO, A.; KOVALCHUCK, I. Epigenetic control of plant stress response. **Enviromental Molecular Mutagenesis**, v.49, p.61–72, 2008.

CÂMARA F.L.A.; et al. Incidência de vírus em cultivares de batata multiplicadas sucessivamente em Goiás. **Fitopatologia Brasileira**, v.11, p. 711-716, 1986.

CORRÊA, R.M.; et al. Comparativo de produção de tubérculos de batata em canteiros, vasos e hidroponia. **Horticultura Brasileira**, v.20, n.2, 2004. Suplemento. CD-ROM.

CALDAS. L.S.; et al. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPACNPH, 1998. v.1, p. 87-132.

CALDEVILLA, E.M.; LOZANO, M.G. **Cultivos sin suelo: hortalizas en clima mediterraneo**. Reus: Ediciones de Horticultura, 1993, 123p.

CALVETE et al., Desempenho in vitro e agronômico de cultivares micropropagadas de morangueiro em vários subcultivos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 4, p. 943-949, 2009.

CASSELLS, A.C.; CURRY, R.F. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagation and genetic engineers. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. v. 64, p. 145–57, 2001.

CLARK, S.E. Organ formation at the vegetative shoot meristem. **The Plant Cell**, v.9, p.1067-1076, 1997.

CHANG, D.C.; et al. Hydroponic culture system for the production of seed tubers without soil. **American Journal of Potato Research**, v.77, n.6, p.394, 2000.

CHOMÁTOVÁ, S.; et al. Protein complex and esterase isoenzyme patterns of *Allium sativum* L. cultivars and clones-regenerants. **Biol ogy Plant**, v.32, p.321–331, 1990.

COLLARES, E.A.V.S. **Caracterização de cultivares e clones avançados de batata através de marcadores morfológicos e moleculares**. 2002. 81f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2002.

DANN, A.L.; WILSON, C.R. Comparative assessment of genetic and epigenetic variation among regenerants of potato (*Solanum tuberosum*) derived from long-term nodal tissue-culture and cell selection. **Plant Cell Report**, 2010. Disponível em: Acesso em: 07 jan. 2011

DANIELS, J. Viroses da batata e suas implicações na produção de batata semente no Rio Grande do Sul. **Summa Phytopathologica**, v. 21, n. 3-4, p. 269-270, 1995.

DIAZ, B.C.; MEDEIROS, C.A.B. Produção hidropônica de sementes pré-básicas de batata em diferentes concentrações de nitrogênio na solução nutritiva. *Horticultura Brasileira*, v.30, p. 189-193, 2005.

DICE, L. R. Measures of the amount of ecologic association between species. **Ecology**, v.26, n. 3, p. 297-302, 1945.

DONNELLY, D.J.; STACE-SMITH, R.; MELLOR, F.C. *In vitro* culture of three *Rubus* species. **Acta Horticulture**, v. 112, p. 69-75, 1984.

EMPRESA BRASILERIA DE PESQUISA E AGROPECUÁRIA. **Manual de procedimentos tecnológicos para produção e comercialização de batata-semente da marca Embrapa**. Canoinhas: SNT, 2000. 43p.

EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília: Embrapa Produções de informações, 1999. 412p.

EHSANPOUR, A.A., MADANI, S.; HOSEINI, M. Detection of somaclonal variation in potato callus induced by UV-C radiation using RAPD-PCR. **Genetic Applied to Plant Physiology**, v.33, p. 3–11, 2007.

FACTOR, T.L. **Produção de minitubérculos de batata semente em sistemas hidropônicos NFT, DFT e Aeroponia**. 2007. 131 f. Tese. (Doutorado em Agronomia) – Curso de Pós-Graduação em Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, campus Jaboticabal, 2007.

FAO. AÑO INTERNACIONAL DE LA PAPA 2008. **Nueva luz sobre un tesoro enterrado**. Disponível em: <http://www.potato2008.org/pdf/IYPbook-es.pdf>. Acesso em: 15 jun. 2010.

FAVORETTO, P. **Parâmetros de crescimento e marcha de absorção de nutrientes na produção de minitubérculos de batata cv. Atlantic**. 2005. 96p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de São Paulo - Escola Superior em Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In...45ª Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade internacional de Biometria. UFSCar, São Carlos, SP, Julho de 2000. p.255-258.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995, p.220.

FGC – Forest Genetics Council of British Columbia. **Glossary of Forest Genetics Terms.** Disponível em: <http://www.fgcouncil.bc.ca/doc-glos.html#anchor5490764>. Acesso em 28 de nov. 2010.

FIEGERT, A.K.; et al. Regeneration of *Solanum tuberosum* L. Tomensa cv, Induction of somatic embryogenesis in liquid culture for the production of artificial seed. **Landbauforschung Volkenrode**, v.50, p. 199-202, 2000.

FILGUEIRA FAR; CÂMARA FLA. Comportamento de cultivares européias de batata em gerações sucessivas. **Horticultura Brasileira**, v. 4, p. 29-31, 1986.

FIOREZZE, C. Diagnóstico das regiões produtoras de batata do Rio Grande do Sul. In: GUEDES, J.V.C. (Ed.) SEMINÁRIO DE ATUALIZAÇÃO NA CULTURA DA BATATA. Santa Maria: UFSM, EMATER, 1997. p.13-25.

FLUMINHAM, A.; KAMEYA, T. Behaviour of chromosome in anaphase cells in embryogenic callus cultures of maize (*Zea mays* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.92, p. 982–990, 1996.

FURLANI, P.R.; et al. **Cultivo hidropônico de plantas.** Campinas: Instituto Agrônômico, 1999. 52p (Boletim técnico, 180).

GHISLAIN, M.; et al. Robust and highly informative microsatellite-based genetic identity kit for potato. **Molecular Breeding**, v.23, 377-388, 2009.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. IN: TORRES, A.; CALDAS, L. S.; BUSO, J.A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPQ, 1998. p.183-260.

HAWKES, J.G. **The potato evolution, biodiversity and genetic resources.** London: Belhaven Press, 1990.

HIROCHIKA, H. et al. Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture. **Proceedings of the National Academy Science**, v.93, p.7783- 7788, 1996. Online. Disponível na Internet <http://www.pnas.org/cgi/search>

HOQUE, M.E. *In vitro* regeneration potentiality of potato under different hormonal combination. **World Journal of Agricultural Sciences**, v.6, n.6, p. 660-663, 2010.

HOWARD, H.W. **Genetics of the potato *Solanum tuberosum* L.** London: Academic Press, 1970, 111p.

HUSSAIN, I. et al. Morphogenic potencial of three potato (*Solanum tuberosum*) cultivars from explants, a prerequisite in genetic manipulation. **Pakistan Journal Botanic**, v.37, n.4, p. 889-898, 2005.

HU, J.; VICK, B.A. Target Region Amplification Polymorphism: A Novel Marker Technique for Plant Genotyping. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.21, p. 289–294, 2003.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 14 nov. 2009.

IBGE, 2011. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201102_6.shtm. Acesso em: 10 mar. 2011.

ILLG, R.D. Cultura de tecidos de alho e tomate: Variação somaclonal seleção *in vitro*. In: CROCOMO, O.J.; SHARP, W.R.; MELO, M. **Biotechnology for plant production**. Piracicaba, CEBTEC, 1991. 539p.

JAIN, S.M. Tissue cultured-derived variation in crop improvement. **Euphytica**, v.118, p. 153-166, 2001.

JIN, S.; et al. Detection of somaclonal variation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using cytogenetics, flow cytometry and molecular markers. **Plant Cell Report**, v. 27, p. 1303–1316, 2008.

KARP, A. Origins, causes and uses of variation in plant tissue cultures. In: VASIL, I.K.; THORPE, T.A. (eds) **Plant cell and tissue culture**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 139–152, 1994.

KUS M. 1995. The epidemic of the tuber necrotic ringspot strain of *Potato virus Y* (PVY_{NTN}) and its effect on potato crops in Slovenia. In: European Association for Potato Research Meeting, Virology Section. 9. **Proceedings**...Bled: EAPR. p.159-160.

KUZNETSOVA, O.I. et al. RAPD and ISSR analyses of regenerated pea *Pisum sativum* L. plants. **Russian Journal of Genetics**, v.41, p.60–65, 2005.

KACZMARCZYK, A. et al. **Potato Shoot Tip Cryopreservation. A Review**. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/u10273477x863664/fulltext.pdf> Acesso em: 10 dez. 2010.

KAEPPLER, S.M. et al. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. **Plant Molecular Biology**, v.43, p.179-188, 2000.

LARKIN, P.J.; SCOWCROFT, W.R. Somaclonal variation: a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 60, p. 197-214, 1981.

LI, X. et al. Genetic and epigenetic instabilities induced by tissue culture in wild barley (*Hordeum brevisubulatum* (Trin.) Link). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.90, p.153–168, 2007.

MACCOY, T.J.; et al. Cytogenetic analysis of plant regenerated from (*Avena sativa*) tissue culture: high frequency of partial chromosome loss. **Canadian Journal of Genetic Cytology**, v.24, p. 37-50, 1982.

MARINUS, J. Methods for rapid multiplication of potatoes. **Potato Research**, v. 27, p. 317, 1984.

MARUM, L. et al. Analysis of genetic stability at SSR loci during somatic embryogenesis in maritime pine (*Pinus pinaster*). **Plant Cell Report**, v.28, p. 673-682, 2009.

MATHEKA, J.M; et al. In vitro selection and characterization of drought tolerant somaclones of tropical maize (*Zea mays* L.). **Biotechnology**, v.7, p. 641–650, 2008.

McCLINTOCK, B. The significance of responses of the genome to challenge. **Nobel Physiology of Medicine**, p. 181-199, 1983.

MEDEIROS, C. A. B.; et al. Produção de sementes pré-básicas de batata em sistemas hidropônicos. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 110-114, jan./jun. 2002.

MEDEIROS, C.A.B. Batata-semente pré-básica: multiplicação por hidroponia. In: PEREIRA, A.S.; DANIELS, J. (Ed.) **O cultivo da batata na região sul do Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p.444-474.

MORENO, J.A. **Clima do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Secretaria da Agricultura, 1961. 46p.

MURASHIGE, T.; NAKANO, R. Morphogenetic behavior of tobacco tissue cultures and implications of plant senescence. **American Journal of Botany**, v. 52, n.8, p. 819-827, 1965.

MURASHIGE, T. Manipulation of organ initiation in plant tissue culture. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v.18, p. 1-24, 1977.

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

NASRIN, S.; et al. Induction and evaluation of somaclonal variation in potato (*Solanum tuberosum* L.). **Online Journal of Biological Sciences**, v.3, n.2, p. 183-190, 2003.

NYENDE, A.B. et al. Yield and canopy development of field grown potato plants derived from synthetic seeds. **European Journal of Agronomy**, v.22, p.175-184, 2005.

OLHOFT, P.M.; PHILLIPS, R.L. Genetic and epigenetic instability in tissue culture and regenerated progenies. IN: LERNE, H.R. (Ed.). **Plant responses to environmental stress: from phytohormones to genome reorganization**. New York: Harcourt Dekker, p.111-148, 1999.

OLIVEIRA, E.J; et al. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p.294-307, 2006.

PEREDO, E.L. et al. Genetic and epigenetic stability of cryopreserved and cold-stored hops. **Cryobiology**, v. n. p. 2008.

PEREIRA, J.E.S. et al. Avaliação de dois sistemas hidropônicos na produção de material pré-básico de batata. **Horticultura Brasileira**, v.19, suplemento CD-Rom, 3p., 2001.

PEREIRA, E.M.S.; et al. **A batata e seus benefícios**. Ufuberlândia: EDUFU, 2005. 58p.

PEREIRA, A.S. et al. **Produção de Batata no Rio Grande do Sul** Embrapa/CPACT, CIRCULAR TÉCNICA 48, 2005. 14p.

PEREIRA, A.S.; DANIELS, J. (Ed.). **O cultivo da batata na região sul do Brasil**. Brasília: Embrapa, 2003, p. 419.

PEREIRA, J.E.S; FORTES, G.R.L. Organogênese de ápices meristemáticos de batata em meios de isolamento e multiplicação *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, v.22, p.197-201, 2004.

PEREIRA, J.E.S.; FORTES, G.R.L. Protocolo para produção de material propagativo de batata em meio líquido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 1035-1043, 2003.

PESCHKE, V.M.; PHILLIPS, R.L. Genetic implications of somaclonal variation in plants. **Advances Genetics**. v.30, p.41–75, 1992.

PHILLIPS, R.L; et al. Genetic instability of plant tissue cultures: Breakdown of normal controls. **Proceedings of the National Academy Science**, v. 91, p. 5222-5226, 1994.

PONTAROLI, A.C.; CAMADRO, E.L. Somaclonal variation in *Asparagus officinalis* plants regenerated by organogenesis from long-term callus cultures. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, 423-430, 2005

PROVAN, J.; et al. Microsatellite analysis of relationships within cultivated potato (*Solanum tuberosum*). **Theoretical and Applied Genetics**, v.92, p.1078-1084, 1996.

RANCILLAC, M.J.; NOURRISEAU, J.G. Micropropagation and strawberry plant quality. **Acta Horticulturae**, v. 265, p.343-348, 1989.

RANI, V.; RAINA, S. Genetic fidelity of organized meristem derived micropropagated plants: a critical reappraisal. **In Vitro Cell and Development Biology of Plant**, v.36, p.319–330, 2000.

RESENDE, R.O.; PAIVA, M. Eradication of potato virus X and S by meristem-tip culture. **HortScience**, v.20, p.525, 1985.

RHEE, Y. et al. Tissue Culture-Induced Novel Epialleles of a *Myb* Transcription Factor Encoded by *pericarp color1* in Maize. **Genetics**, v.186, p.843-855, 2010.

ROCA, W.M et al. A tissue culture method for the rapid propagation of potatoes. [American Journal of Potato Research](#), **V.55**, p.691-701, 1978.

ROHLF, F.J. **NTSYS-PC**: Numerical taxonomy and multivariate analysis system. New York: Exeter Publisher, 2000. 210p.

ROSENBERG, V. et al. Somaclonal variation in potato meristem culture and possibility to use this phenomenon in seed potato production and breeding. **Agronomy Research**, v.3, p.697-704, 2010.

ROSENBERG, V.; et al. 2007. Variation of agronomic traits of potato somaclones produced by meristem culture. Disponível em: http://www.eria.ee/public/files/LA_artikkel.pdf. Acesso em: 29 abr. 2009.

RODRIGUES, L.R.F. **Cultivo pela técnica da hidroponia**. Técnicas de cultivo hidropônico e de controle ambiental no manejo de pragas, doenças e nutrição vegetal em ambiente protegido. Jaboticabal: Funep, 2002, 726p.

SANGUINETTI, C.J.; DIAS NETO, E., and SIMPSON A.J.G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**, v.17, p. 915-919, 1994.

SANTIAGO, G. Identificação de variação somaclonal em batata (*Solanum tuberosum* L.) através de marcadores morfológicos. 2007. 81f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

SHIRIN, F.; H. Callus induction and plant regeneration from internodal and leaf explants of four potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 3, n.1, p. 1-6, 2007.

SILVA, G.O.; et al. Repetibilidade e importância de caracteres para avaliação de coleção ativa de germoplasma de batata. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n.3, p. 290-293, 2009a.

SILVA, G.O; et al. Distâncias genéticas entre genótipos de batata a partir de dados morfológicos, moleculares e genealógicos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, suplemento 1, p. 983-992, 2009b.

SIP, V. Erradication of potato viruses A and S by thermotherapy and sprout tip culture. **Potato Research**, Netherlands, v.15, p.270-273, 1972.

SKIRVIN, R.M.; et al. Sources of frequency of somaclonal variation. **Hortscience**, v.29, p.1232-1237. 1994.

SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposium of Society of Experimental Biology**, v.11, p. 118-231, 1957.

SMULDERS, M.J.M.; DE KLERK, G.J. Epigenetics in plant tissue culture. **Plant Growth Regulation**. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/d27413044p156622/fulltext.pdf> Acesso em: 5 jan. 2011.

SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, v.139, p.457-462, 1995.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 3.ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2002. p.423-460.

TANURDZIC, M.; et al. Epigenomic consequences of immortalized plant cell suspension culture. **PLoS Biology**, v.6, n.12, 2008. e302. doi:10.1371/journal.pbio.0060302

TÓTH, G.; et al. Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. **Genome Research**, v.10, p. 967-981, 2000.

TORRES, A.C. et al. Recuperação de plantas de batata-doce livres de vírus a partir da regeneração direta de ápices caulinares. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.8, p. 209-213, 1996.

TORRES, L. S.; et al. Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus. IN: TORRES, A.; CALDAS, L. S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPV, 1998. v.1, p. 87-132.

VAN DER LIDEN et al. Efficient targeting of plant disease resistance loci using NBS Profiling. **Theoretical and Applied Genetics**, v.109, p. 384-393, 2004.

VAN-HARTEN, A.M.; et al. In vitro adventitious bud techniques for vegetative propagation and mutation breeding potato (*Solanum tuberosum* L.). **Euphytica**, v.30, p. 1-8, 1981.

VARSHNEY, R.K.; et al. Genetic microsatellite markers in plant: features and applications. **Trends in Biotechnology**, v.23, p. 48-55, 2005.

VREUGDENHIL, D.; et al. Comparison of tuber and shoot formation from in vitro cultured potato explants. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.53, p.197-204, 1998.

VUYLSTEKE, D. et al. Phenotypic variation among *in vitro* propagated plantain (*Musa* sp. cultivar 'AAB'). **Science Horticulture**, v.36, p. 79–88, 1988.

YADAV, P.; et al. Molecular profiling using RAPD technique of salt and drought tolerant regenerants of sugarcane. **Sugar Technolgy**, v.8, p. 63–68, 2006.

YANG, M.; LOH, C.S. Systemic endopolyploidy in *Spathoglottis plicata* (Orchidaceae) development. **BioMed Central Cell Biology**, v.33, n.5, p. 1-8, 2004.

ZHANG, M. et al. Tissue culture-induced variation at simple sequence repeats in sorghum (*Sorghum bicolor* L.) is genotype-dependent and associated with down-regulated expression of a mismatch repair gene, MLH3. **Plant Cell Report**, v.29, p. 51–59, 2010.

ZHANG, M. et al. Limited tissue culture-induced mutations and linked epigenetic modifications in F1 hybrids of sorghum pure lines are accompanied by

increased transcription of DNA methyltransferases and 5-methylcytosine glycosylases. **Plant Journal**, v.57, p. 666-679, 2009.

WENZL, P. et al. Diversity Arrays Technology (DArT) for whole-genome profiling of barley. **Proceedings of the National Academy Science**, v. 101, n. 26, p.9915–9920, 2004.

ZUCCHI, M.I. et al. Genetic instability of sugarcane plants derived from meristem cultures. **Genetics and Molecular Biology**, v.25, p. 91-96, 2002.

ANEXOS

ANEXO A - Caracterização morfológica da cultivar de batata Asterix por descritores necessários à proteção legal (COLLARES et al., 2002).

Formato do broto	Oval
Coloração da base do broto	Vermelho-púrpura
Intensidade de coloração da base do broto	Média-forte
Pubescência da base do broto	Pouca
Aspectos do ápice do broto	Fechado- médio
Intensidade de primórdios radiculares do broto	Baixa-média
Comprimento da brotação lateral do broto	Curto
Tipo de planta em relação à folhagem	Intermediária
Hábito de crescimento da planta	Ereto
Pigmentação da haste da planta	Forte
Asas na planta	Retas
Inserção das folhas	Aguda (< 45°)
Fechamento das folhas	Médio– aberto
Pigmentação na nervura principal	Presente
Tamanho dos folíolos	Médio
Largura dos folíolos	Médio
Coalescência nos folíolos	Ausente/ rara
Ondulação das bordas nos folíolos	Débil
Frequência de folíolos secundários	Média
Frequência de flores	Presente
Comprimento do pedúnculo floral	Médio - longo
Pigmentação do pedúnculo floral	Presente
Coloração da parte interna da corola	Vermelho – púrpura
Pigmentação na parte interna da corola, em flores coloridas	Forte
Pigmentação na parte externa da corola, em flores brancas	Nula
Ciclo vegetativo	Precoce (< 90 dias)
Formato dos tubérculos	Oval (110-150)
Profundidade dos olhos	Rasos
Aspereza da película	Lisa
Cor da película	Vermelha
Cor da polpa	Amarela clara
Esverdeamento dos tubérculos	Ausente/ muito fraco

ANEXO B - Caracterização morfológica da cultivar de batata Atlantic por descritores necessários à proteção legal (COLLARES et al., 2002).

Formato do broto	Estreito
Coloração da base do broto	Vermelho-púrpura
Intensidade de coloração da base do broto	Média/ forte
Pubescência da base do broto	Pouca
Aspectos do ápice do broto	Médio
Intensidade de primórdios radiculares do broto	Baixa/ média
Comprimento da brotação lateral do broto	Curto/ médio
Tipo de planta em relação à folhagem	Intermediária
Hábito de crescimento da planta	Ereto
Pigmentação da haste da planta	Ausente
Asas na planta	Retas
Inserção das folhas	Obtusa (> 45°)
Fechamento das folhas	Médio
Pigmentação na nervura principal	Ausente
Tamanho dos folíolos	Médio
Largura dos folíolos	Médio
Coalescência nos folíolos	Ausente/ rara
Ondulação das bordas nos folíolos	Débil
Frequência de folíolos secundários	Média
Frequência de flores	Presente
Comprimento do pedúnculo floral	Curto/ médio
Pigmentação do pedúnculo floral	Ausente
Coloração da parte interna da corola	Vermelha – púrpura
Pigmentação na parte interna da corola, em flores coloridas	Fraca
Pigmentação na parte externa da corola, em flores brancas	Ausente
Ciclo vegetativo	Precoce (< 90 dias)
Formato dos tubérculos	Oval (110-150)
Profundidade dos olhos	Rasos
Aspereza da película	Áspera
Cor da película	Amarela
Cor da polpa	Branca
Esverdeamento dos tubérculos	Médio

APÊNDICES

APÊNDICE A – Matriz de similaridade genética, utilizando três primers microssatélites, entre o controle e os rametes 5D, 14A, 14D e 16D da cultivar Atlantic de batata durante os subcultivos. UFSM, Santa Maria, RS, 2010.

	Controle	5D3SC	5D12SC	14A3SC	14A6SC	14A9SC	14A12SC	14D3SC	14D6SC	14D12SC	16D3SC	16D12SC
Controle	1.0000											
5D3SC*	0.6286	1.0000										
5D12SC	0.6207	0.8125	1.0000									
14A3SC	0.7895	0.8294	0.6286	1.0000								
14A6SC	0.6667	0.6667	0.7333	0.6667	1.0000							
14A9SC	0.3200	0.5000	0.5455	0.4516	0.4615	1.0000						
14A12SC	0.7059	0.7027	0.6452	0.7500	0.8571	0.4444	1.0000					
14D3SC	0.6857	0.7895	0.6875	0.7805	0.7778	0.5000	0.9189	1.0000				
14D6SC	0.6486	0.7500	0.6471	0.7442	0.7368	0.5333	0.8718	0.9500	1.0000			
14D12SC	0.4000	0.4848	0.4444	0.3889	0.5806	0.3478	0.5625	0.6061	0.5714	1.0000		
16D3SC	0.5000	0.5143	0.5517	0.4737	0.6667	0.3200	0.6471	0.6286	0.6486	0.6000	1.0000	
16D12SC	0.5185	0.6667	0.7500	0.5455	0.7143	0.6000	0.6897	0.7333	0.6875	0.5600	0.6667	1.0000

* 3SC=terceiro subcultivo; 6SC=sexto subcultivo; 9SC=nono subcultivo; 12SC=décimo segundo subcultivo.

APÊNDICE B – Matriz de similaridade genética, utilizando dois primers microssatélites, entre os rametes da cultivar Asterix de batata durante os subcultivos, cultivo hidropônico e em campo .Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

	33A3SC	33A6SC	33AA12SC	33AC	33D6SC	33D12SC	33DC	20D6SC	20D9SC	20D12SC	20DH
33A3SC	1.0000										
33A6SC	1.0000	1.0000									
33AA12SC	0.8000	0.8000	1.0000								
33AC	0.6667	0.6667	0.5000	1.0000							
33D6SC	1.0000	1.0000	0.8000	0.6667	1.0000						
33D12SC	0.5000	0.5000	0.4444	0.2857	0.5000	1.0000					
33DC	1.0000	1.0000	0.8000	0.6667	1.0000	0.5000	1.0000				
20D6SC	0.6667	0.6667	0.5714	0.4000	0.6667	0.8000	0.6667	1.0000			
20D9SC	1.0000	1.0000	0.8000	0.6667	1.0000	0.5000	1.0000	0.6667	1.0000		
20D12SC	1.0000	1.0000	0.8000	0.6667	1.0000	0.5000	1.0000	0.6667	1.0000	1.0000	
20DH	1.0000	1.0000	0.8000	0.6667	1.0000	0.5000	1.0000	0.6667	1.0000	1.0000	1.0000

* 3SC=terceiro subcultivo; 6SC=sexto subcultivo; 9SC=nono subcultivo; 12SC=décimo segundo subcultivo; C=condições de campo; H=condições de hidroponia.