

ORGANOGENESE DE CLONES DE MACIEIRA DE DIFERENTES MEIOS COM PICLORAM E ALUMÍNIO

OLIVEIRA Marisa de F¹., FORTES, Gerson R. de L²., SILVA, João B. da³., ANDRADE, Luciana B¹., FLORES, Rejane⁴, CAMARGO, Janine T¹.

¹ UFPEL/FAEM, Depto. de Fitotecnia - Campus Universitário- Caixa Postal 354, 96001-970, Pelotas, RS

² EMBRAPA-CPACT, Caixa Postal 403, 96001-970, Pelotas, RS

³ UFPEL/IFM, Inst. de Física e Matemática - Campus Universitário - Caixa Postal 354, 96001-900, Pelotas, RS
(Recebido para publicação em 04/12/98)

RESUMO

Utilizou-se, como explantes, brotações com duas gemas oriundas de brotações do porta-enxerto de macieira, cv. Marubakaido, cultivadas em diferentes concentrações de picloram e alumínio. Cada brotação foi caracterizada como um clone, designando-se letras A, B, C, D e E, quando provenientes de meio com 0,5 µM de picloram e 20,0 mgL⁻¹ de alumínio, pelas letras F, G, I, J e L quando em presença de 0,5 µM de picloram e 5,0 mgL⁻¹ de alumínio e por M quando em presença de 1,0 µM de picloram e 10,0 mgL⁻¹ de alumínio. Não houve diferença significativa quanto ao enraizamento, observando-se grande variabilidade entre os clones para as variáveis número médio de brotações e gemas e comprimento das brotações. Embora tenha ocorrido essas variações entre os clones, estas não foram detectadas através de análise isoenzimática. Provavelmente, utilizando-se marcadores moleculares baseados no DNA, tais como, RFLP ou RAPD, estas possíveis diferenças, poderiam ter sido identificadas.

Palavras-chave: **Malus prunifolia**, cultivo "in vitro", variação somaclonal.

ABSTRACT

APPLE CLONAL ORGANOGENESIS COMING FROM DIFFERENT MEDIA WITH PICHLORAM AND ALUMINIUM. It was used 2-bud microcuttings as explants which came from Marubakaido apples rootstock that had been cultivated in different pichloram and aluminium concentrations. Each shoot was described as a clone represented by the letters A, B, C, D and E when it came from a medium with 0.5 µM pichloram added to 20.0 mgL⁻¹ aluminium; and letters F, G, I, J and L for these in presence of 0.5 µM pichloram added to 5.0 mgL⁻¹ aluminium. A clone M was detected for 1.0 µM pichloram added to 10.0 mgL⁻¹ aluminium. No significant difference was obtained for rooting. On the other hand it was observed a lot of variability to the parameters: mean number of shoots and buds and shoot length. However, these differences were not detected by isoenzymatic analyses. It is suggested to use molecular markers based on DNA analyses such as: RFLP or RAPD in order to detect such differences.

Key words: **Malus prunifolia**, "in vitro" culture, somaclonal variation.

INTRODUÇÃO

A área brasileira com a cultura da macieira está estimada em 27.570 ha, com produção de aproximadamente 570.000 toneladas/ano, concentrando-se basicamente na região Sul (ABPM, 1997).

O porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido (*Malus prunifolia*) de origem japonesa, também conhecido como

Maruba, é um dos porta-enxertos mais promissores introduzidos no Brasil, pois este tem como principal característica ser resistente à podridão-do-colo (DENARDI, 1986).

Tem havido um crescente interesse na seleção de plantas de macieiras tolerantes ao alumínio que possam ser utilizadas em áreas com problemas de elevados níveis deste elemento químico no solo. Na maior parte dos solos ácidos, a toxidez provocada pelo alumínio é o principal fator limitante das culturas. Os efeitos fisiológicos da toxicidade do alumínio e os mecanismos de tolerância ainda não estão bem compreendidos (RENGEL, 1992).

A obtenção de variabilidade genética é busca constante nos programas de melhoramento. A variação somaclonal é a técnica que descreve as variações observadas entre os tecidos propagados através da cultura de tecidos (LARKIN & SCOWCROFT, 1981).

A variação somaclonal combinada com a seleção *in vitro* é uma alternativa eficiente para a obtenção de resistência à metais pesados (SHEPHERD, 1986). A presença de alterações genéticas pode ser avaliada através de características morfológicas, técnicas citológicas e ou de marcadores moleculares.

Alterações bioquímicas podem ser estudadas através de análises isoenzimáticas (MAHESWARAN & WILLIAMS, 1987). A eletroforese de isoenzimas é técnica simples que utiliza pequenas quantidades de tecidos diferenciados ou indiferenciados, sem necessitar de prévia purificação das proteínas, além de refletir o estado fisiológico dos tecidos (SCANDALIOS & SORENSON, 1977).

Objetivou-se avaliar a organogênese de clones de macieira cv. Marubakaido provenientes de meio de cultura com alumínio e picloram e, posteriormente, identificar alterações através de análise isoenzimática.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Clima Temperado. Utilizou-se brotações de macieira cultivadas em diferentes concentrações de picloram e alumínio. Cada brotação foi caracterizada como um clone, denominando-se pelas letras A, B, C, D e E, quando provenientes de meio com 0,5 µM de picloram e 20,0 mgL⁻¹ de alumínio (Al₂(SO₄)₃ · 18 H₂O), pelas letras F, G, I, J e L quando em presença de 0,5 µM de picloram e 5,0 mgL⁻¹ de alumínio e por M quando em presença de 1,0 µM de picloram e 10,0 mgL⁻¹ de alumínio. Internódios com duas gemas foram colocados individualmente em tubos de ensaio (20 x 150mm) com 10ml de meio. Utilizou-se o meio MS (Murashige & Skoog, 1962) acrescentando 100,0 mgL⁻¹ de mio-inositol, 30,0

g L^{-1} de sacarose, 6,0 g L^{-1} de ágar, 2,0 mg L^{-1} de BAP, 0,1 mg L^{-1} de ANA e 20,0 mg L^{-1} de alumínio. O pH foi ajustado para 4,0, conforme ECKERT (1992). A inoculação foi em câmara de fluxo laminar, foram transferindo-se os frascos para sala de crescimento com 25 ± 2 °C, 16 horas de fotoperíodo e luminância de ± 2000 lux, com de lâmpadas branca-fria de 40w. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados com cinco repetições e cada repetição com cinco explantes.

Para o experimento de enraizamento foram utilizados os sais de MS reduzido à metade e as vitaminas de MS, adicionados de 100,0 mg L^{-1} de mio-inositol, 30,0 g L^{-1} de sacarose, 6,0 g L^{-1} de ágar e 1,0 μ M de AIB, ajustando-se o pH para 5,9 antes da colocação do ágar, conforme ZANOL (1996). A inoculação foi realizada em câmara de fluxo laminar, colocando-se um explante por tubo (20 x 50mm), com 10ml de meio e os tubos vedados com papel alumínio. Utilizou-se, como explante, brotações provenientes de meio com alumínio. Após a inoculação os tubos foram transferidos para a sala de crescimento, onde permaneceram no escuro por três dias, após foram mantidos a 25 ± 2 °C, 16 horas de fotoperíodo e luminância de ± 2000 lux, com lâmpadas branca-fria de 40w. As variáveis analisadas foram: número médio de brotações e gemas e comprimento das brotações, número de raízes primárias e secundárias e comprimento das raízes primárias. Avaliou-se a variabilidade deste material através de isoenzimas. As isoenzimas foram: fosfatase ácida (FAC), peroxidase (perox) e 6 fosfogluconato

desidrogenase (6-PGD). Utilizou-se colunas de gel horizontal de poliacrilamida na concentração de 6% para FAC, 5% para Perox e 5% + 2% de amido solúvel para 6-PGD. Usou-se sistemas de tampões descritos por SCANDALIOS (1969), para corrida e revelação das isoenzimas de FAC e peroxidase. Para 6-PGD usou-se sistema descontínuo como descrito por SCHIELDS *et al.*, (1983) e para revelação da isoenzima, usou-se o método empregado por TANKSLEY (1983).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve efeito significativo do fator tratamento (clones nos meios com diferentes concentrações de picloram e alumínio), para as variáveis número médio de brotações e gemas e comprimento das brotações (Tabela 1 e 2).

Apesar do material inicial ser oriundo de uma única planta, observou-se uma grande diferença entre os diversos clones. Esta variação pode ter ocorrido porque o material provém de organogênese indireta e foi submetido à diferentes concentrações de alumínio, acrescido do efeito do picloram que é uma potente auxina que induz grande proliferação celular. O surgimento de diferenças entre plantas regeneradas de cultura de tecidos, via formação de calo, comumente apresentam fenótipos variantes, como observado por ILLG (1990). Por outro lado, HAGEN *et al.* (1990), mencionam ser o picloram uma potente auxina para indução e crescimento de calos.

TABELA 1 - Análise de variação para o número médio de gemas, brotações e comprimento das brotações do porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 1999

Causa da Variação	GL	Quadrado Médio		
		Número médio de gemas	Número médio de brotações	Comprimento brotações (cm)
Tratamento (A)	36	16,813 *	0,882 *	8,394 *
Resíduo	216	5,960	0,335	3,256
C.V.(%)		67,04	36,55	109,60

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

Sabe-se que o alumínio, afeta, principalmente, o sistema radicular (CAMBRAIA *et al.*, 1991). No entanto, no ensaio realizado não houve diferença significativa entre os clones para as variáveis número de raízes primárias e secundárias e comprimento das raízes primárias.

Não se detectou variação através de análise de isoenzimas, embora tenha ocorrido grande variabilidade entre os clones para as variáveis número médio de brotações e gemas e comprimento das brotações. Provavelmente, utilizando-se marcadores moleculares baseados no DNA, tais

como, RFLP (restriction fragment length polymorphism) ou RAPD (random amplified polymorphic DNA), essas diferenças poderiam ser identificadas. Estas técnicas tem sido usadas para identificar um grande número de macieiras (KOLLER *et al.*, 1993), bem como outras frutíferas (CHAPARRO *et al.*, 1994; GRAHAM *et al.*, 1994).

No experimento de enraizamento, não houve diferença significativa entre os tratamentos (clones procedentes de meios com diferentes concentrações de alumínio e picloram) para todas as variáveis analisadas (Tabela 3)

TABELA 2- Número médio de brotações e gemas, comprimento das brotações do porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 1999

Clone	Número médio de brotações	Número médio de gemas	Comprimento das brotações (cm)
A3	4,48 a	45,73 a	3,95 a
G3	4,07 a	34,24 abc	3,31 abc
I2	3,77 ab	36,49 ab	3,41 ab
E3	3,45 ab	34,99 ab	3,22 abcd
C1	3,12 abcd	38,39 ab	3,40 ab
D3	3,11 abcd	20,93 abcdef	2,64 abcdef
B2	3,09 abcd	32,46 abc	2,54 abcdefgh
C3	2,76 abcde	28,28 abcd	2,62 abcdefg
I4	2,46 abcdef	17,44 abcdefg	2,42 abcdefghi
B3	2,46 abcdef	20,28 abcdefg	2,28 bcdefghi
G1	2,44 abcdef	25,37 abcde	2,82 abcde
E2	2,17 abcdef	17,63 abcdefg	2,18 abcdefghi
G2	2,16 abcdef	19,58 abcdefg	2,54 abcdefgh
F1	1,77 abcdef	1,03 bcdefg	1,31 bcdefghi
D1	1,77 abcdef	16,85 abcdefg	2,38 abcdefghi
C2	1,62 abcdef	16,08 abcdefg	1,78 abcdefghi
D5	1,57 abcdef	16,91 abcdefg	1,95 abcdefghi
B1	1,22 bcdef	13,29 abcdefg	1,02 cdefghi
J1	1,21 bcdef	13,12 abcdefg	1,92 abcdefghi
E1	1,14 bcdef	5,63 defg	1,00 cdefghi
J2	1,10 bcdef	7,12 cdefg	0,92 defghi
D2	0,99cdef	10,56 bcdefg	1,78 abcdefghi
M1	0,88 cdef	5,65 defg	0,70 efghi
I3	0,83 cdef	5,53 defg	0,88 defghi
A1	0,76 def	4,86 defg	0,42 fghi
I1	0,76 def	9,27 bcdefg	1,50 bcdefghi
A2	0,70 def	4,04 defg	0,55 efghi
F2	0,67 def	5,71 defg	0,67 efghi
E4	0,67 def	3,83 defg	0,80 efghi
D4	0,60 def	4,91 defg	1,14 bcdefghi
C4	0,52 ef	4,73 defg	1,14 bcdefghi
F3	0,52 ef	2,67 efg	0,40 fghi
L2	0,38 ef	2,98 efg	0,32 fghi
L4	0,35 f	0,99 g	0,17 hi
L3	0,35 f	1,51 fg	0,24 ghi
F4	0,25 f	1,61 fg	0,28 fghi
L1	0,25 f	1,36 fg	0,14 i

TABELA 3 - Análise de variação para o número de raízes primárias e secundárias, comprimento das raízes primárias do porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 1999

Causa da variação	GL	Quadrado Médio		
		Número de raízes primárias	Número de raízes secundárias	Comprimento das raízes primárias (cm)
Tratamento (A)	28	0,384 ns	4,759 ns	4,433 ns
Resíduo	136	0,350	4,081	4,109
C.V.(%)		32,67	55,30	66,13

^{NS} Não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

CONCLUSÕES

Os clones diferem entre si quanto ao número de brotações e gemas e comprimento das brotações;

Os clones não diferem com respeito ao enraizamento *in vitro*;

Pela análise isoenzimática não se observa variação entre os clones.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABPM / DERAL / AGAPOMI / APFCT / ICEPA-SC / IBGE, FRAIBURGO, s.p.; 1997.
 CAMBRAIA, J.; SILVA, M.A.; CANO, M.A.O.; SANTANA, R. Método simples para avaliação de cultivares de sorgo quanto à tolerância ao alumínio. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v.3, n.2, p.87-96, 1991.
 CHAPARRO, J.X.; WERNER, D.J.; OMALLEY, D.º; SEDEROFF, R.R. Targeted mapping and linkage analysis of morphological isozyme

- and RAPD markers in peach. **Theor. Appl. Genet.** V.87, p.805-815, 1994.
- DENARDI, F. Porta-enxertos. In: EMPASC. **Manual da cultura da macieira**. Florianópolis, 1986, p.92-132.
- ECKERT, M. **Efeito do alumínio tóxico na divisão celular em ponta de raiz de cevada**. Pelotas: UFPEL. 1992. 85p. Dissertação (Mestrado).
- GRAHAM, J.; McNICOL, R.J.; GERIG, K.; VANDEVEN, W.T.G. Identification of red raspberry cultivars and assessment of their related-ness using fingerprints produced by random primers. **HortScience**. v.69, n.1, p.123-130, 1994.
- HAGEN, S.R.; TOURNEAU, D.L.; MUNETA, P.; BROWN, J. Initiation and culture of potato tuber callus tissue with picloram. **Plant Growth Regulation**, v.9, p.341-345, 1990.
- ILLG, R.D. Variação Somaclonal. In: TORRES, A.C. & CALDAS, L.S. (ed). **Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas**. Brasília:ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. p.287-295.
- KOLLER, B.; LEHMANN, A. .; McDERMOTT, J.M.; GESSLER, C. Identification of apple cultivars using RAPD markers. **Theor. Appl. Genet.** V.85, p.901-904, 1993.
- LARKIN, P. J.; SCOWCROFT, W. R. Somaclonal variation a novel of variability from cell cultures for plant improvement. **Theor. Appl. Genet.**, v. 60, p. 197-214, 1981.
- MAHESWARAM, G.; WILLIAMS, E. G. Uniformity of plant regenerated by direct somatic embryogenesis from zygotic embryos of *Trifolium repens*. **Ann. Bot.** v. 59, p. 93-97, 1987.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.I. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**. v.15, p.473-497, 1962.
- RENGEL, W. Role of calcium in aluminum toxicity. **New Phytol.**, v.121, p.499-513, 1992.
- SCANDALIOS, J.G.; SORENSON, J. C. Isozymes in plant tissue culture. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y. P. S. **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture**. New York: Springer Verlag, 1977, p. 719-730, cap. 7.
- SCANDALIOS, J.G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. **Biochemical Genetics**, New York, v.e, p.37-79, 1969.
- SHEPERD, S. L. K. Seleção *in vitro*. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. p. 297-309.
- SHIELDS, C.R.; ORDON, T.J.; STUBER, C.W. An outline of general resource needs and procedures for the eletrophoretic separation of active enzymes from plant tissue. In: TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J. (eds.). **Isozymes in plant genetics and breeding**. Part. Amsterdam: Elsevier, 1983. P.443-468.
- TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J. (eds.). **Isozymes in plant genetics and breeding**. Part. Amsterdam: Elsevier, 1983. P.469-515.
- ZANOL, G.C. **Enraizamento *in vitro* do porta-enxerto Marubakaido (*Malus prunifolia*) afetado pela exposição de períodos de escuro, concentrações de ácido indol butírico e floroglucinol**. Pelotas: UFPEL. 1996. 81p. Dissertação (Mestrado)