

VARIABILIDADE FENOTÍPICA DE SOMACLONES DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA M.111, NA MULTIPLICAÇÃO E ENRAIZAMENTO *IN VITRO*

DANTAS, Adriana C. de M.¹; FORTES, Gerson R. de L.²;
NEZI, Adriano N.¹; SILVA, João B.³

¹UFPEL/FAEM - Depto. de Fitotecnia, Campus Universitário s/n, Cx. P. 354. 96010.900 Pelotas RS e-mail: aluminio@cca.ufsc.br

²EMBRAPA Clima Temperado, C.P. 403, 96001-970, Pelotas-RS.

³Instituto de Física e Matemática, UFPEL, Pelotas, RS

(Recebido para publicação em 04/11/1999)

RESUMO:

Algumas cultivares de porta-enxerto de macieira apresentam maior tendência de variação somaclonal do que outras, ocorrendo variabilidade entre plantas regeneradas de uma mesma espécie. Devido a isso, objetivou-se avaliar a variabilidade quanto a capacidade de proliferação de brotos e de enraizamento *in vitro* de somaclones do porta-enxerto de macieira M.111, oriundos da regeneração de calos, em meio com alumínio. Transferiram-se as brotações regeneradas para meio de multiplicação contendo sais e vitaminas de MS com sais de nitrogênio reduzidos a $\frac{3}{4}$, 100,0 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 30g.L⁻¹ de sacarose, 6g.L⁻¹ de ágar, 2 mg.L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP) e 0,1 mg.L⁻¹ de ácido naftaleno acético (ANA), com pH ajustado para 5,9, antes da colocação do ágar. Os somaclones foram subcultivados duas vezes, em intervalos de 30 dias, colocando-se 7 (sete) explantes por frasco. Para o enraizamento, retirou-se brotações oriundas da multiplicação e inoculou-se em meio com sais de MS reduzido a $\frac{1}{2}$, 100,0 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 30,0 g.L⁻¹ de sacarose, 6,0 g.L⁻¹ de ágar, 1,0 μ M de ácido indol butírico (AIB), ajustando-se o pH para 5,9 antes da colocação do ágar. O material foi mantido por três dias no escuro. Testaram-se 4 somaclones e o porta-enxerto M.111, com três repetições de 16 plantas cada, segundo delineamento de blocos ao acaso. Os explantes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25 \pm 2 °C, fotoperíodo de 16 horas sob intensidade luminosa de 19 μ E.m⁻².s⁻¹. Para a cultivar M.111, apenas dois somaclones foram superiores na formação de brotos, porém, para o comprimento estes foram inferiores formando "rosetas", não desenvolvendo entre-nós, entretanto, apresentando diferenças significativas para percentagem e número de raízes. Observou-se pelos resultados obtidos neste trabalho que houve variabilidade no material testado, o que pode ser devido a existência de um componente genotípico e fenotípico na instabilidade.

Palavras chaves: *Malus* sp., porta-enxerto, variação somaclonal, micropropagação.

ABSTRACT

PHENOTYPIC VARIABILITY IN SOMACLONES OF THE APPLE ROOTSTOCK CV. M.111, DURING MULTIPLICATION AND ROOTING *IN VITRO*. Some apple cultivars are more prone to show somaclonal variation than others within the same species. Thus the purpose of this work was to evaluate the variability during the *in vitro* multiplication and rooting of the apple rootstock cv. M.111 explants, originated from shoots formed from callus grown in a medium containing aluminum. The regenerated shoots were transferred to a multiplication medium containing MS salts and vitamins. In this medium nitrogen was reduced to $\frac{3}{4}$ strength and added of: myo-inositol (100.0 mg.L⁻¹); sucrose (30.0 g.L⁻¹); agar (6.0 g.L⁻¹); BAP (2.0 mg.L⁻¹); and NAA (0.1 mg.L⁻¹). The pH was adjusted to 5.9 before agar addition and autoclaving. The somaclones were subcultured twice in 30-day intervals. Then seven explants were inoculated in flasks containing the above medium. For the rooting studies shoots were taken from the multiplication phase and inoculated in a half strength MS medium added of: myo-inositol (100.0 mg.L⁻¹); sucrose (30.0 g.L⁻¹); agar (6.0 g.L⁻¹); IBA (1.0 μ M). The pH was adjusted to 5.9 before

adding the agar component. All inoculated material was kept remained in a dark room for three days. Four somaclones were tested with three replicates and 16 explants/replication in a randomized complete block design. After, the explants were brought to a growth room with 25 \pm 2 °C, under a 16 hour photoperiod at light intensity of 19 μ E.m⁻².s⁻¹. Two somaclones had higher number of shoot formed, however their length were shorter forming rosette with no internode formation. It was also detected a significant difference for rooting percentage and number of roots between somaclones. It could be detected that the worked material had variation which may resulted from both genetic and phenotic components.

Key words: *Malus* sp., rootstock, somaclonal variation, micropropagation.

INTRODUÇÃO

O melhoramento de porta-enxerto de macieira, é considerado mais caro do que o de copa, pois exige períodos longos para testes. Sendo necessário que a copa enxertada esteja em plena produção para que então, o potencial do porta-enxerto seja analisado (CUMMING e ALDWINCKLE, 1983 e FERREE e CARLSON, 1987).

Algumas restrições ocorrem no melhoramento convencional, que são limitantes às fruteiras, como o período juvenil muito longo, representado por um único genótipo e altamente selecionado. Assim como, a dificuldade na seleção em detectar recombinações infrequentes ou raras; dependência no melhoramento convencional sobre o tempo de gerar ciclos de recombinações, espaço para crescer a população necessária e para recuperar recombinantes superiores, dificultando a identificação e avaliação de recombinantes desejáveis (JANICK *et al.*, 1996).

Algumas destas limitações podem ser superadas pelas novas estratégias de avanços biotecnológicos. O uso da regeneração de plantas a partir de tecidos somáticos, vem sido utilizado com sucesso, como um sistema de transferência de genes, oferecendo uma oportunidade para o melhoramento genético em macieira. A macieira é conhecida pela habilidade de produzir linhagens ao acaso. Entretanto, mutações em tecidos somáticos quer elas sejam inerentes ou induzidas podem ser facilmente descobertas durante a regeneração de células *in vitro*. Isto oferece um potencial promissor para exploração da variação somaclonal em macieira (KORBAN e CHEN, 1992).

O porta-enxerto de macieira M.111 foi obtida de hibridação entre Northern Spy e MI 793 (FERREE e CARLSON, 1987). É classificado como semi-vigoroso, superando a capacidade de crescimento da cultivar M.106. Induz precocidade média, sendo resistente ao ataque do

pulgão lanígero e pouco suscetível à *Phytophthora cactorum* que causa a podridão do colo (CASTRO, 1992, DENARDI, 1998).

Por estas características, este porta-enxerto pode ser utilizado para obtenção de variabilidade genética, no sentido de demonstrar o envolvimento de um componente genético na predisposição a variação somaclonal. Algumas cultivares apresentam maior tendência de variação somaclonal do que outras. Essas características variantes em plantas regeneradas a partir de calos ou células em suspensão são herdáveis e transmitidas aos descendentes (ILLG, 1990), podendo ser utilizadas como uma forma de obtenção de variabilidade genética para uso no melhoramento de plantas (EVANS & SHARP, 1986).

Um dos primeiros requerimentos para um sistema de multiplicação clonal e estabelecimento de plantas frutíferas *in vitro*, é a de otimização das condições básicas necessárias para realizar a proliferação de brotos vigorosos. Em muitos trabalhos foram obtidas taxas variadas de proliferação entre cultivares de uma mesma espécie (WILKINS e DODDS, 1983).

Com este trabalho objetivou-se, avaliar a variabilidade fenotípica quanto a capacidade de proliferação de brotos e de enraizamento *in vitro* de somaclones do porta-enxerto de macieira M.111, oriundos da regeneração de calos em meio com alumínio.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no laboratório de cultura de tecidos do Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado, Pelotas, RS, utilizando-se porta-enxerto de *Malus* sp., cultivar M.111.

Multiplicação "in vitro"

Transferiram-se explantes de brotações regeneradas de calos em meio com alumínio, para um meio de multiplicação contendo os sais e vitaminas de MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), com nitrogênio reduzido a $\frac{3}{4}$, 100,0 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 30g.L⁻¹ de sacarose, 6g.L⁻¹ de ágar, 2 mg.L⁻¹ de benzil amino purina (BAP) e 0,1 mg.L⁻¹ de ácido naftaleno acético (ANA), em pH ajustado para 5,9, antes da colocação do ágar. Os meios foram autoclavados durante 20 minutos à temperatura de 121°C, sob 1,5 atm de pressão.

As brotações foram subcultivadas por mais duas vezes, em intervalos de 30 dias, colocando-se sete explantes por frasco de 250 ml com 40 ml do meio, os quais foram tampados com folha de papel alumínio.

Os explantes foram numerados em grupos (42, 44, 65, 66, 82 e 88) e mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas sob radiação de 25µE.m⁻².s⁻¹, provenientes de lâmpadas fluorescentes de 40W tipo branca fria.

Enraizamento "in vitro"

Retiraram-se brotações oriundas de multiplicação e prepararam-se microestacas com aproximadamente 3 cm de comprimento. Inocularam-se essas microestacas em sais de MS reduzido a $\frac{1}{2}$, 100,0 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 30,0 g.L⁻¹ de sacarose, 6,0 g.L⁻¹ de ágar, 1,0 µM de ácido indol butírico (AIB), ajustando-se o pH para 5,9 antes da colocação do ágar. Após, fez-se a inoculação em câmara de fluxo laminar, colocando-se 16 explantes por frasco de 500 ml contendo 60 ml do meio de cultura e tampados com papel de alumínio. Após inoculado, o material foi transferido para sala de crescimento, onde permaneceu três dias no escuro.

Delineamento Experimental e análise estatística

Para avaliação dos somaclones quanto a multiplicação e o enraizamento, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado usando-se para os tratamentos (somaclones) diferentes repetições (3 ou 4) para multiplicação e três repetições para enraizamento. Os dados foram submetidos a análise de variação, e as médias comparadas pelo teste de Duncan ($\alpha=0,05$). As variáveis analisadas foram: número e comprimento das brotações; percentagem de enraizamento, número de raízes e comprimento das raízes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O somaclone 44 teve mais formação de brotos, seguido do somaclone 65. O restante dos somaclones não diferiram quanto a esta variável. O somaclone 80 produziu brotações com maior comprimento porém teve menor número de brotações. O somaclone 42 teve as brotações com o menor comprimento do que as demais (Figura 1). De forma geral, os somaclones que apresentaram brotações com menor comprimento formando "rosetas", não desenvolvendo entrenós, ou então estes não cresceram.

OLIVEIRA (1997), trabalhando com o porta-enxerto Marubakaido observou grande diferença entre os diversos somaclones oriundo de organogênese indireta em multiplicação, os quais foram submetidos à presença de diferentes concentrações de alumínio.

Alguns autores tem mostrado que genótipos de uma mesma espécie respondem diferentemente à indução de brotação *in vitro* (NEHRA *et al.*, 1992; CHEVREAU *et al.*, 1989). A variabilidade genotípica na formação de brotos em macieira é evidente, não somente na freqüência de regeneração mas, também na formação e desenvolvimento de gemas adventícias (KORBAN e RIEMER, 1990).

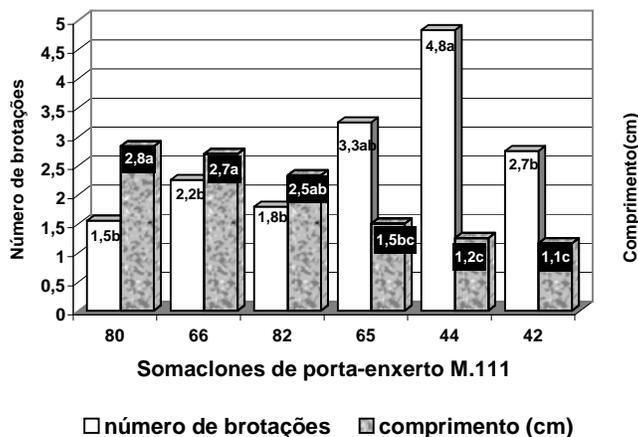


Figura 1 - Número e comprimento de brotações de somaclones de porta-enxerto de macieira M.111. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 1999. (Médias seguidas de mesma letra minúscula, dentro de cada uma das variáveis não diferem entre si pelo teste Duncan ($\alpha=0,05$)).

Na percentagem de enraizamento, a testemunha apresentou maior valor do que os somaclones 42 e 66 (Figura 2).

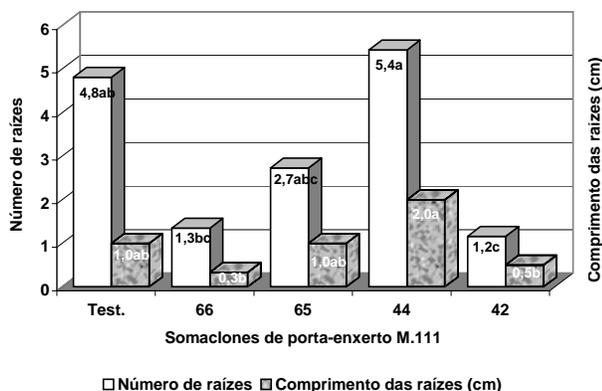


Figura 2 - Percentagem de enraizamento de somaclones de porta-enxerto M.111. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 1999. (Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste Duncan, $\alpha=0,05$).

Em relação a percentagem e ao número de raízes, a testemunha que teve mais altos valores não diferiu do somaclone 44, entretanto foi superior aos demais somaclones. De um modo geral, o comprimento médio das raízes de todos os somaclones foram inferiores a testemunha (Figura 3 e 4).

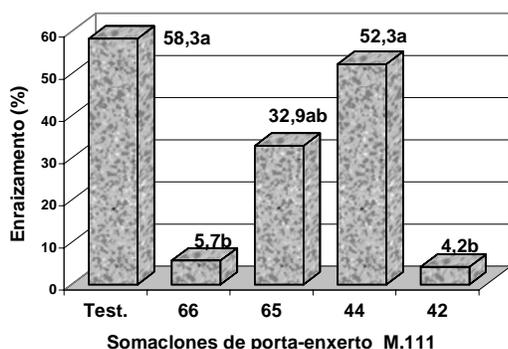


Figura 3 - Número e comprimento de raízes de somaclones de porta-enxerto de macieira M.111. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 1999. (Médias seguidas de mesma letra, dentro de cada uma das variáveis não diferem entre si pelo teste Duncan, $\alpha=0,05$).

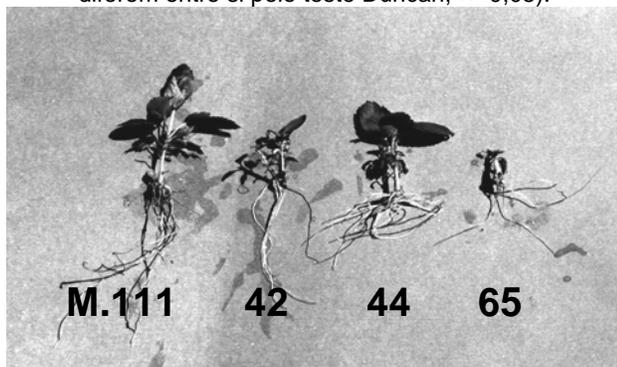


Figura 4 - Variabilidade fenotípica no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto M.111 e seus somaclones. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 1999.

LARKIN (1987) relatou uma grande variabilidade entre plantas regeneradas de uma mesma espécie. Diferenças dentro de mesma espécie, foram descritas entre variedades de trigo de inverno e de primavera (GALIBA *et al.*, 1985), em centeio (LINACERO & VASQUEZ, 1986) e soja (FREYTAG *et al.*, 1989). Trabalhos sobre instabilidade cromossômica em calos derivados de diferentes tecidos da planta tem indicado que a fonte de explante, assim como genótipo são fatores importantes, apresentando diferenças quanto à variação somaclonal (MURASHIGE & NAKANO, 1967).

De acordo com BATHIA *et al.* (1985), a variação somaclonal pode ter sua origem na ausência de controle, durante a fase de calo, ou quando está submetido a uma condição de estresse; neste caso, representada pela presença de sais de alumínio livre no meio de cultura. Este estresse possivelmente, pode estar induzindo uma taxa de mutação superior à taxa de reparo de DNA ou induzindo o aparecimento de instabilidade latente, como a quebra de cromossoma ou transposição de DNA. Mas neste, é necessário estudos posteriores a nível molecular, para que se comprove este envolvimento.

CONCLUSÕES

Os somaclones do porta-enxerto M.111, oriundo da calogênese em tecido somático, apresentam variabilidade genética quanto à capacidade de brotação e enraizamento dos somaclones, diferindo fenotipicamente da planta doadora.

Estes somaclones, apresentam diferenças em suas características morfológicas, podendo ser utilizado em um estudo posterior, podendo ser selecionados através de análise molecular, os somaclones que expressem resistência ao alumínio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BATHIA, C.R.; JOSHUA, D.C.; MATHEWS, H. Somaclonal variation: A genetic interpretation based on the rate of spontaneous chromosomal aberration and mutations. **Trends Research**, p.317-326, 1985.
- CASTRO, H. Portainjertos para el manzano. **Michigan Apple Clone**, 1992. p.14-23.
- CHEVREAU, E.; SKIRVIN, R.M.; ABU-QAOU, H.A.; KORBAN, S.S.; SULLIVAN, J.G. Adventitious shoot regeneration from leaf tissue of three pear (*Pyrus sp.*) cultivars *in vitro*. **Plant Cell Reports**, v.7, p.688-691, 1989.
- CUMMING, J.N.; ALDWINKLE, H.S. Breeding apple rootstocks. **Plant Breeding Review**, v.1, p.294-394, 1983.
- DENARDI, F. Porta-enxertos para macieira tendências e perspectivas. In: I ENCONTRO NACIONAL SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, I INFRUTE, 29 out. a 01 nov, Fraiburgo: **Apostila...** Fraiburgo: EPAGRI, 1998.
- EVANS, D.A. SHARP, W.R. Applications of somaclonal variation. **Biotechnology**, v.4, p.528-532., 1986.
- FERREE, D.C.; CARLSON, R.F. Apple rootstocks. In: ROM, R.C.; CARLSON, R.F. ed., **Rootstocks for Fruit Crops**, 1987. p.107-143.
- FREYTAG, A.H.; RAO-ARELLI, A.P. ANAND, S.C.; WRATHER, J.A. OWENS, L.D. Somaclonal variation in soybean plants regenerated from tissue culture. **Plant Cell Reports**, v.8, p.199-202, 1989.
- GALIBA, G.; KERTESZ, Z.; SULKA, J.; SAGI, L. Differences in somaclonal variation in three winter wheat *Triticum aestivum* varieties. **Cereals Research Communications**, v.13, p.342-350, 1985.

- ILLG, R.D. Variação somaclonal. In: TORRES, A. ; CALDAS, L.S. ed. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1990. p.287-295.
- JANICK, J.; CUMMINS, J.N.; BROWN, S.K.; HAMMAT, M. Apple. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. ed. **Tree and Tropical Fruits**, Fruit Breeding, v.1.: cap.1, 1996. p 1-77.
- KORBAN, S.S.; CHEN, H. Apple. In: HAMMERSCHLAG, F.A.; LITZ, R.E. ed. **Biotechnology of perennial fruit crops**, Wallingford: C.A.B. International, cap. 2, 1992, p. 203-227.
- KORBAN, S.S.; RIEMER, S.E. Genetics and histology of powdery mildew resistance in apple. **Euphytica**, v.48, p.261-267, 1990.
- LARKIN, P.J. Somaclonal variation, history, method and meaning. **Iowa State Journal of Research**, v.61, p.122-128, 1987.
- LINACERO, R.; VAZQUEZ, A.M. Somaclonal variation in plants regenerated from embryo calluses in rye (*Secale cereale* L. In: HORN, W.; JENSEN, C.J.; ODEBACH, W.; SCHIEDER, O. **Genetic manipulation in plant breeding**, Berlin:Springer-Verlag, 1986, p. 479-481.
- MURASHIGE, T.; NAKANO, R. Chromosome complement as a determinant of the morphogenetic potential of tobacco cells. **American Journal of Botany**, v.54, p.963-970, 1967.
- MURASHIGE, T; SKOOG, F.I. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- NEHRA, N.S.; KARTHA, K.K.; STUSHBOFF, C.; GILES, K. The influence of plant growth regulator concentrations and callus age on somaclonal variation in callus culture regenerants of strawberry. **Plant Cell Tissue and Organ culture**, v.29, p.257-268, 1992.
- OLIVEIRA, M.F. **Calogênese e organogênese in vitro do porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido (*Malus prunifolia* Willd, Borkh), em presença de alumínio**. Pelotas: Universidade de Federal de Pelotas, 1997. 52f. Dissertação (mestrado) – Fitomelhoramento.
- WILKINS, P.; DODDS, J.H. Tissue culture propagation of temperate fruit trees. In: DODDS, J.H. ed. **Tissue Culture of Trees**. Sydney: AVI Publishing Company, 1983, p.56-79.