

PATRICIA DO NASCIMENTO BORDALLO

ESCAJEADO

AVALIAÇÃO DA VARIACÃO SOMACLONAL POR MARCADORES

**AVALIAÇÃO DA VARIACÃO SOMACLONAL POR MARCADORES
RAPD EM CULTIVARES DE BATATA CULTIVADOS *in vitro***

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Curso de Fitotecnia,
para obtenção do título de
"Magister Scientiae".

VIÇOSA

MINAS GERAIS - BRASIL

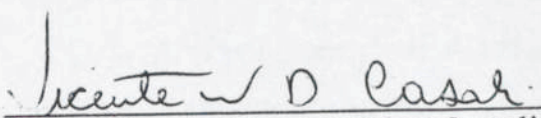
JULHO - 1997

PATRICIA DO NASCIMENTO BORDALLO

**AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO SOMACLONAL POR MARCADORES
RAPD EM CULTIVARES DE BATATA CULTIVADOS *in vitro***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Curso de Fitotecnia, para obtenção do título de "Magister Scientiae".

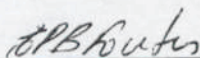
APROVADA: 21 de fevereiro de 1997.



Prof. Vicente Wagner Dias Casali



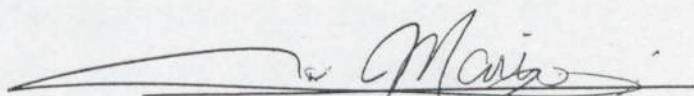
Prof. Luiz Antônio dos Santos Dias



Prof^ª. Elizabeth Pacheco B. Fontes
(Conselheiro)



Prof. Cosme Damião Cruz
(Conselheiro)



Prof. José Maria
(Orientador)

AGRADECIMENTO

A Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do

Aos meus pais Terezinha e Carlos Alberto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo suporte financeiro.

Ao Dr. José Amauri Buso, chefe-técnico no Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (CNPq)/Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), pela prestação no fornecimento das plântulas *in vitro*.

Ao Professor José Maria, pela orientação e pela liberdade para a realização desta pesquisa.

A Professora Elizabeth Pacheco Batista Diniz, pelo interesse, pela amizade e, principalmente, pelo apoio e pela confiança demonstrados durante o desenvolvimento desta tese.

Ao Professor Cosme Damião Cruz, pelos conselhos e pela disponibilidade.

A todas as pessoas que trabalharam no Núcleo de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (NBIOAGRO), pela cede de material e pelo apoio e auxílio durante a realização dos experimentos.

Ao Professor e meu amigo Dr. José Domingos da Silva, mentor intelectual deste trabalho, pelo apoio, pelo interesse e pela amizade dispensada em todos os momentos.

As meus colegas Aurora, Célia, Genilda, Heide, Marcio, Marília, Ney, Philippe, Valber, Adésia, Fabiana, Fátima, Gláucia, João, José Edison, Júlio, Marília, Marley, Nelson, Osvaldo, Pituca, Pratinho, Soninha e Willian, pela ajuda, pela amizade e pelas boas conversas.

À Maria e ao Vicente, pelo convívio agradável.

À Paula e ao Carlos PE, pela ajuda indispensável e pela paciência que tiveram ao longo do trabalho.

AGRADECIMENTO

À Marta, pela amizade, pela dedicação, pelo carinho e pelas aulas de Genética.

Ao Gestor, pelo carinho e pela dedicação em todas as horas.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do Curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo suporte financeiro.

Ao Dr. José Amauri Buso, chefe-técnico do Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (CNPq)/Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), pela presteza no fornecimento das plântulas *in vitro*.

Ao Professor José Maria, pela orientação e pela liberdade para a realização desta pesquisa.

À Professora Elizabeth Pacheco Batista Fontes, pelo interesse, pela amizade e, principalmente, pelo apoio e pela confiança demonstrados durante o desenvolvimento desta tese.

Ao Professor Cosme Damião Cruz, pelos conselhos e pela disponibilidade.

A todas as pessoas que trabalham no Núcleo de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), pela cessão de material e pelo apoio e auxílio durante a realização dos experimentos.

Ao Professor e meu amigo Derly José Henriques da Silva, mentor intelectual deste trabalho, pelo apoio, pelo interesse e pela amizade dispensada em todos os momentos.

Aos meus colegas Aurora, Célia, Geraldo, Haiko, Marcelo, Marília, Ney, Phellippe, Valber, Acássia, Fabiana, Fafá, Gláucia, João, José Edson, Júlio, Marília, Marley, Nelson, Osvaldo, Pituca, Priminho, Soninha e Willam, pela ajuda, pela amizade e pelas boas conversas.

À Mara e ao Vicente, pelo convívio agradável.

À Paula e ao Carlos PE, pela ajuda indispensável e pela paciência que tiveram ao me treinar.

À Marta, pela amizade, pela dedicação, pelo carinho e pelas aulas de Genética.

Ao Gaston, pelo carinho e pela dedicação em todas as horas.

À Valéria e à Renata, pela amizade e pela confiança.

Aos meus amigos Débora, Marcelinho e Marcos Godoy, por estarem presentes quase que diariamente na minha (re)passagem por Viçosa, tornando-a muito, mas muito mesmo, melhor. Valeu!

Ao Celso Moretti, o primeiro de uma série de agradecimentos, pelo companheirismo.

A Fagoni, Carlos Martinez e Chicão, pela amizade.

À Hannah, por alegrar ainda mais meus dias.

À minha família e aos meus muitos amigos, que não estiveram sempre por perto durante a realização deste trabalho, mas, com certeza, torceram sempre por mim.

A Deus, por tudo e por todos os momentos.

BIOGRAFIA

PATRICIA DO NASCIMENTO BORDALLO, filha de Carlos Alberto Bordallo e Terezinha do Nascimento Bordallo, nasceu no Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro.

Em abril de 1992, graduou-se Engenheira-Agrônoma pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG.

No segundo semestre de 1993, iniciou o Curso de Mestrado em Fitotecnia nessa mesma Universidade.

2.3. Variação somacional	4
2.4. Avaliação da variação somacional	8
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1. Experimento I: avaliação de meios de cultivo para crescimento e desenvolvimento das plântulas de batata in vitro	11
3.1.1. Descrição do ensaio	11
3.1.2. Análise estatística	12
3.2. Experimento II: estudo da concentração de plântulas para produção de tubos	12
3.2.1. Descrição do ensaio	12
3.2.2. Análise estatística	12

	Página
3.3. Experimento III: estudo da variação somaclonal baseada na diversidade genética entre clones de batata	12
3.3.1. Descrição dos ensaios	12
3.3.1.1. Indução de calos	12
3.3.1.2. Extração do DNA de plantas	13
3.3.1.3. Extração do DNA de calos	14
3.3.1.4. Processo de amplificação do DNA	15
3.3.1.5. Eletroforese do produto de amplificação	16
3.3.1.6. Análise estatística	16
3.3.1.6.1. Medida de dissimilaridade	16
3.3.1.6.2. Medidas de agrupamento	17
3.3.1.6.2.1. Método de agrupamento de Tchebichev	17
3.3.1.6.2.2. Método de agrupamento do Vizinho Mais Próximo	17
	Página
EXTRATO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Batata: características culturais.....	3
2.2. Embriogênese somática e semente sintética	4
2.3. Variação somaclonal	4
2.4. Avaliação da variação somaclonal	8
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1. Experimento I: avaliação de meios de cultivo para crescimento e desenvolvimento das plântulas de batata <i>in vitro</i>	11
3.1.1. Descrição do ensaio.....	11
3.1.2. Análise estatística	12
3.2. Experimento II: estudo da concentração de picloram para indução de calos.....	12
3.2.1. Descrição do ensaio.....	12
3.2.2. Análise estatística	12

	Página
3.3. Experimento III: estudo da variação somaclonal baseado na diversidade genética entre clones de batata	12
3.3.1. Descrição dos ensaios	12
3.3.1.1. Indução de calos.....	12
3.3.1.2. Extração do DNA de plantas	13
3.3.1.3. Extração do DNA de calos.....	14
3.3.1.4. Processo de amplificação do DNA.....	15
3.3.1.5. Eletroforese do produto de amplificação.....	16
3.3.1.6. Análise estatística	16
3.3.1.6.1. Medida de dissimilaridade.....	16
3.3.1.6.2. Métodos de agrupamento	17
3.3.1.6.2.1. Método de agrupamento de Tocher	17
3.3.1.6.2.2. Método de agrupamento do Vizinho Mais Próximo.....	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1. Experimento I: avaliação de meios de cultivo para crescimento e desenvolvimento das plântulas de batata <i>in vitro</i>	19
4.2. Experimento II: estudo da concentração de picloram para indução de calos.....	26
4.3. Experimento III: estudo da variação somaclonal baseado na diversidade genética entre clones de batata	26
5. RESUMO E CONCLUSÕES	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

EXTRATO

BORDALLO, Patricia do Nascimento, M.S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 1997. **Avaliação da variação somaclonal por marcadores RAPD em cultivares de batata cultivados *in vitro*.** Professor Orientador: José Maria. Professores Conselheiros: Elizabeth Pacheco Batista Fontes e Cosme Damião Cruz.

Três meios de cultivo foram testados com o objetivo de avaliar o mais indicado para o desenvolvimento e crescimento das variedades Baraka, Bintje e Contenda. Utilizaram-se o meio MS suplementado com sacarose 3% e vitaminas, o meio MS com sacarose 3%, vitaminas e ácido giberélico 1,4 $\mu\text{mol/L}$ e o meio MS modificado. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com seis repetições e cinco plantas por parcela. Plântulas no meio MS + GA₃ apresentaram a maior média de número de folhas definitivas e também maior média de comprimento de parte aérea para todas as variedades. Para determinar a concentração ideal de picloram à indução de calejamento, um experimento foi realizado, testando-se as seguintes concentrações: 0,0; 0,0165; 0,165; e 1,65 $\mu\text{mol/L}$ por 32 dias. O melhor resultado foi obtido com 1,65 $\mu\text{mol/L}$. Calos foram induzidos, usando-se folha e

caule como explantes das variedades comerciais Baraka, Bintje, Contenda, Baronesa e Achat em meio MS suplementado tanto com picloram 1,65 $\mu\text{mol/L}$ quanto com 2,4-D 11,5 $\mu\text{mol/L}$. Após 70 e 90 dias de calejamento, os DNAs das 40 amostras de calos foram analisados num estudo comparativo entre as duas fontes de explantes das cinco variedades e de ambos os reguladores de crescimento. Para isso, 20 "primers" de seqüência arbitrária foram testados. Para a variedade Baraka, caule como explante, picloram e 90 dias de calejamento foram os tratamentos que induziram à maior variação somaclonal. Para Bintje, os tratamentos foram folha, picloram e 70 dias. Dos 20 "primers" testados, 14 apresentaram polimorfismo para a variedade Contenda quando submetida ao tratamento que utilizou caule como explante, picloram e 70 dias de calejamento. Dentre os genótipos analisados, a variedade Baronesa apresentou o maior número de fragmentos polimórficos para todos os tratamentos. A variedade Achat mostrou-se mais suscetível à variação somaclonal quando submetida aos tratamentos que utilizaram 2,4-D, 90 dias de calejamento e tanto caule e folha como explante. O maior tempo de cultivo não teve grande influência na variação somaclonal da maioria das variedades, exceto 'Baraka' e 'Achat'. O fator genótipo foi o mais importante, pois cada variedade teve desempenho distinto do das outras, no que concerne à taxa de variação somaclonal.

1. INTRODUÇÃO

A cultura da batata (*Solanum tuberosum* L.) é de âmbito internacional, sendo parte integral da dieta de grande proporção da população mundial. Sua produção no Brasil foi de 2.359.000 toneladas em 91/92 e, nesse mesmo período, teve rendimento de 14.594 kg/ha (IBGE, 1994). Também, é a hortaliça com a qual o país tem maior gasto com importação, chegando à casa dos 8.300 milhões de dólares/ano.

Sendo uma espécie tetraplóide, o uso das sementes botânicas em cultivos comerciais é impraticável, em razão da baixa fertilidade e do alto nível de segregação. Isso indica que sementes sintéticas podem ser utilizadas como alternativa para produtores. Para produção de sementes sintéticas, são utilizados embriões somáticos, que por sua vez precisam apresentar fidelidade clonal. Contudo, um dos principais problemas no trabalho *in vitro* é a expressão da variação somaclonal.

A variação somaclonal inclui todo tipo de variação encontrada entre plantas ou células de culturas de tecido de qualquer tipo. Vários fatores afetam a natureza e a freqüência da variação somaclonal. O genótipo é um dos principais fatores que afetam a variação, visto que existem diversas evidências demonstrando o envolvimento de um componente genético na predisposição à variação somaclonal. O nível de ploidia da planta deve ser observado, uma vez que poliplóides exibem

maior variação que os diplóides. O tipo e a idade do tecido usado como explante influenciam a variação, uma vez que, quanto mais velho e especializado é o tecido, mais sujeito à variação ele está. Reguladores de crescimento usados para induzir calejamento também podem levar à variação somaclonal, visto que alteram a taxa de multiplicação celular. Por fim, parece haver correlação entre o tempo da cultura *in vitro* e o acúmulo de variações cromossômicas (KARP, 1994).

Sendo, portanto, o grau de variação somaclonal função de vários fatores, faz-se necessário o uso de técnicas mais eficazes e eficientes na sua detecção. Existem diversas técnicas para detectar as variações genéticas, como análises fenotípica, citológica e isoenzimática, marcadores RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism") e RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA"). Esses dois últimos se baseiam na análise da variação genética em nível de DNA, obtido de amostras de tecido vegetal.

O objetivo geral deste estudo foi analisar o efeito de folha e caule como fontes de explante, picloram e 2,4-D como reguladores de crescimento em dois tempos de calejamento, 70 e 90 dias, na variação somaclonal de cinco variedades comerciais de *Solanum tuberosum*, por marcadores RAPD. Os objetivos específicos foram os seguintes:

- a) Avaliação de três meios de cultivo para desenvolvimento da plântula.
- b) Estudo da concentração de picloram para indução de calo.
- c) Estudo da diversidade genética entre calos e a planta-matriz.

2.2. Embriões somáticos e sementes sintéticas

Uma das potencialidades da biotecnologia de plantas está na produção de grande número de plantas idênticas com o mesmo genótipo. A embriologia somática fornece a oportunidade única em biotecnologia de plantas para gerar grande número de cópias genéticas idênticas, facilitando o manejo, armazenamento e distribuição.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Batata: características culturais

A cultura da batata (*Solanum tuberosum* L.) é de âmbito internacional, sendo parte integral da dieta de grande proporção da população mundial. Sua produção no Brasil, nos últimos anos, tem oscilado em torno de dois milhões de toneladas (MÜLLER, 1988). Mundialmente, é a quinta entre as maiores culturas em produção, só perdendo para trigo, arroz, milho e cevada (HOOKER, 1981).

Por ser uma espécie tetraplóide, ocorre um alto nível de segregação, o que torna o emprego das sementes botânicas impraticável. Isso é devido à baixa fertilidade e à variação fenotípica, inviabilizando o seu uso pelos produtores, por não garantirem a estabilidade clonal da planta (GARDNER e SNUSTAD, 1986). O item que mais encarece o custo da produção de batata é o emprego de batatas-semente de boa qualidade, que corresponde a aproximadamente 50% do custo total da produção (ZAIHAF, 1988).

2.2. Embriogênese somática e semente sintética

Uma das potencialidades da biotecnologia de plantas está na produção de grande número de plantas idênticas com o mínimo de despesas. A embriogênese somática fornece a oportunidade única em biotecnologia de plantas para gerar grande número de cópias geneticamente idênticas, facilitando o manejo mecanizado, o armazenamento, a disseminação e o plantio (AMMIRATO, 1988).

As embriogêneses somática, adventícia ou assexual são termos usualmente empregados para designar a formação de embriões originados de células individuais ou de agregados celulares provenientes de tecidos somáticos (HACCIUS, 1978). A produção de embrião somático baseia-se no conceito da totipotencialidade das células vegetais postulado por HARBERLANDT (1902), que é a habilidade das células da planta de regenerarem uma nova planta.

Uma vez que os embriões somáticos são estruturalmente similares aos embriões zigóticos, torna-se vantajoso combinar a eficiência e o baixo custo das sementes como fonte de propágulos com a produção clonal massal *in vitro* de embriões a partir de células somáticas. A inserção de seqüências gênicas em células somáticas pode também permitir que embriões somáticos transgênicos sejam produzidos e multiplicados em grande escala, em sistemas automatizados (GRAY e PUROHIT, 1991).

2.3. Variação somaclonal

Um dos principais problemas da cultura *in vitro* é o surgimento de variação somaclonal. Denomina-se variação somaclonal ao conjunto de mudanças genéticas ocorridas em órgãos e tecidos após alguma fase *in vitro*. Essa variação tem recebido grande atenção dos melhoristas em várias culturas, por induzir variabilidade genética adicional (LARKIN e SCOWCROFT, 1981), e pode originar-se espontaneamente ou ser

induzida sob pressão imposta nos estádios iniciais de crescimento celular ou de diferenciação de brotos. Esse processo tem sido utilizado para o desenvolvimento de tolerância a estresses e à toxidez por minerais e herbicidas e de resistência a doenças, dentre outros.

Visto que variação somaclonal inclui todo tipo de variação encontrado entre plantas ou células derivadas de cultura de tecidos de qualquer tipo (SKIRVIN et al., 1993), quando a meta é obter fidelidade clonal, o controle da variação somaclonal torna-se um desafio (AMMIRATO, 1991).

A variação somaclonal é mais freqüentemente associada com formação de calos e regeneração adventícia de brotos (SKIRVIN et al., 1993). Por essa razão, micropropagadores comerciais não poupam esforços para evitar formação de calos selecionando somente brotos derivados a partir de gemas axilares (KARP, 1989), vindo a representar um dos maiores obstáculos na micropropagação via embriões somáticos (DE KLERK, 1990). A natureza dessa variação é ainda bastante polêmica e controvertida e, mesmo não podendo ser controlada, é um método útil para induzir variabilidade genética (DOLEZEL et al., 1986). Geneticistas interessados em explorar variação somaclonal devem encorajar a formação de brotações adventícias e o desenvolvimento de calos (SKIRVIN et al., 1993). A presença de variação somaclonal foi demonstrada entre brotações adventícias derivadas de plantas aromáticas, brotações adventícias *ex vitro* de folhas e de cultura de calos (SKIRVIN e JANICK, 1976a; SKIRVIN e JANICK, 1976b; JANICK et al., 1977; MOYER e COLLINS, 1983; GRIESBACH e SEMENIUK, 1987). Contudo, a variação não é limitada a calos regenerantes, uma vez que considerável variação tem sido descrita para características morfológicas (forma da flor e da folha e altura de planta), viabilidade de pólen e número de cromossomos em plantas regeneradas diretamente a partir de explantes de folha sem formação intermediária de calos (EVANS, 1988).

A quantidade de variação que se desenvolve sob condições de regeneração adventícia pode ser maior do que aquela obtida usando mutagênicos. Os tipos de variação obtidos pelos dois métodos podem se sobrepor, mas, em alguns casos, variações particulares somente são observadas *in vitro* e não com tratamentos mutagênicos (GAVAZZI et al., 1987). É razoável dizer que a ocorrência relativa de dominância em variante somaclonal talvez apresente ordem de magnitude maior do que em mutações induzidas (LARKIN, 1987). Essa maior incidência de variações *in vitro* torna a variação somaclonal um atrativo para melhoristas de plantas, uma vez que elimina o estágio de isolamento e purificação de caracteres recessivos para se trabalhar com eles. A quantidade de variabilidade esperada também pode estar relacionada ao nível de ploidia do clone parental (SKIRVIN et al., 1993). Em diplóides, como milho e tomate, anormalidades cromossômicas em geral entre progênies de somaclones são raras, enquanto em espécies poliplóides, como trigo e aveia, elas são mais freqüentes.

SHEPARD (1981) tem descrito a extensiva variação observada entre plantas regeneradas de protoplastos da variedade de batata Russet Burbank, em que variantes resistentes a *Phytophthora infestans* e *Alternaria solani* foram encontradas (SCOWCROFT, 1984). Variação somaclonal foi confirmada para muitas outras variedades de batata, como 'Maris Bard' e 'Bintje'. De modo significativo, variação somaclonal em batata tem sido usada como opção de plantio no Reino Unido, nos EUA e na Alemanha.

Muitos mecanismos têm sido identificados ou propostos, os quais incluem mudanças na estrutura e, ou, número de cromossomos, mutação de ponto, mudanças na expressão de um gene como resultado de mudanças estruturais no cromossomo, ativação de elementos transponíveis, perda da cromatina, amplificação do DNA, "crossing-over" somático, redução somática e mudanças no DNA das organelas citoplasmáticas (RAO et al., 1992). A freqüência de variação somaclonal tem sido associada a quatro variáveis críticas: genótipo, origem do

explante, duração e condições da cultura, como o uso de reguladores de crescimento (EVANS e SHARP, 1988).

Genótipo é uma importante variável que pode influenciar a freqüência de regeneração e a de somaclones. Isso é bem evidente em batata, em que foram encontradas diferenças no número de plantas, regeneradas em cultivares em condições idênticas (GUNN e SHEPARD, 1981). É possível identificar cultivares com maior tendência à variação somaclonal, denotando o envolvimento de um componente genético na predisposição à variação somaclonal (KARP, 1994). Isso pode ser exemplificado por diferenças encontradas entre cultivares de batata (JACOBSEN, 1981), alfafa (NAGARAJAN e WALTON, 1987) e *Begonia haemalis* (ROEST et al., 1981).

Fonte de explante é considerada como a variável crítica mais freqüente para variação somaclonal. Nem todos os explantes são iguais em termos de regeneração; logo, é provável que procedimentos seletivos possam mostrar diferenças entre os explantes. MURASHIGE e NAKANO (1967) verificaram que seções mais velhas de caule produziram calos com maior freqüência de células poliplóides. DE JONG e CUSTERS (1986) observaram maior variação somaclonal em plantas regeneradas de calos induzidos de epiderme de pétala de crisântemo em relação às plantas regeneradas de calos induzidos do ápice.

A correlação entre duração da cultura e acúmulo de variações cromossômicas foi primeiro documentada para *Daucus carota* (SMITH e STREET, 1974). Segundo EVANS e SHARP (1988), quanto maior o tempo de cultura, maior variação cromossômica pode ocorrer. Enquanto culturas de células podem conter muitas células anormais, a regeneração atua como um crivo, reduzindo a freqüência de plantas aneuplóides. Em alguns casos, somente, ou predominantemente, as plantas diplóides têm sido regeneradas, apesar da presença de células anormais nas culturas usadas para regeneração.

Sabe-se que reguladores de crescimento podem influenciar a freqüência de alterações cariotípicas em cultura de células. GHOSH e

GADGIL (1979) relacionaram as mudanças no nível de ploidia como sendo função do balanço endógeno de reguladores de crescimento. No entanto, DOLEZEL e NOVAK (1984), estudando o efeito de diferentes reguladores de crescimento em *Tradescantia*, não encontraram evidências de seus efeitos mutagênicos. Seu efeito parece ser indireto pela promoção de divisão celular rápida em determinados níveis de ploidia (KARP, 1989). Assim, auxinas como o 2,4-D agiriam como agente seletivo para linhagem de células mutantes, preexistentes no explante original ou geradas na fase de calos (NOVAK, 1981). Frequentemente, 2,4-D é considerado ser o responsável pela variabilidade cromossômica (SINGH et al., 1975). O uso de 2,4-D em substituição à ANA em meio de cultura para batata aumenta a frequência de plantas anormais (SHEPARD, 1981).

2.4. Avaliação da variação somaclonal

Muitas estratégias podem ser usadas para avaliar a integridade genética de clones derivados de plantas *in vitro*, mas muitas delas possuem limitações. Análises cariotípicas não podem revelar alteração em genes específicos ou arranjos cromossômicos pequenos. Marcadores isoenzimáticos constituem um método apropriado para detecção de mudanças genéticas - embora sejam sujeitos à variação ontogênica - e são limitados em número, e apenas regiões codificadas do DNA de proteínas solúveis podem ser amostradas (ISABEL et al., 1993). Além disso, os resultados isoenzimáticos são frequentemente equivocados, em razão de efeitos epigenéticos e, ou, de desenvolvimento na expressão da isozima (ORTON, 1983).

Pode-se realizar uma análise mais precisa da variação somaclonal, utilizando marcadores moleculares, que se baseiam no estudo das alterações ocorridas em nível de DNA (TANKSLEY et al., 1989). Marcadores de RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism") são precisos para amostragem de várias regiões do

genoma e potencialmente ilimitados em número. Entretanto, a técnica de RFLP é complexa, demorada, onerosa e requer grande quantidade de tecido vegetal; aliado a isso, some-se o uso freqüente de radioatividade (ISABEL et al., 1993; NEWBURY e FORD-LLOYD, 1993).

Usando PCR ("Polymerase Chain Reaction") em conjunção com "primers" curtos de seqüências arbitrárias, marcadores RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA") (WILLIAMS et al., 1990) se mostraram sensíveis à detecção de variação entre indivíduos (ISABEL et al., 1993). As vantagens desta técnica sobre as outras são que grande número de amostras pode ser analisado econômica e rapidamente, enquanto apenas microquantidades de material são necessárias; as impressões do DNA específico obtido são independentes da expressão ontogênica; e a maioria dos genomas pode ser amostrada com um número de marcadores potencialmente ilimitado (ISABEL et al., 1993) e não envolve radioatividade. Identificou-se o polimorfismo pela ausência ou presença de bandas dos produtos de amplificação do DNA separados por eletroforese em gel de agarose (WAUGH e POWELL, 1992; NEWBURY e FORD-LLOYD, 1993).

3. MATERIAL E MÉTODOS

No presente trabalho foram utilizadas cinco variedades comerciais de batata (*Solanum tuberosum* L.), 'Baraka', 'Bintje', 'Contenda', 'Baronesa' e 'Achat', provenientes do CNPHortaliças/EMBRAPA.

Segmentos nodais com pelo menos duas gemas foram utilizados para propagação das plântulas em sais MS (1962) contendo 3% de sacarose e suplementado com mioinositol 0,6 mmol/L, cistina 83,2 µmol/L, glicina 26,6 µmol/L, tiamina HCl 2,9 µmol/L, piridoxina HCl 2,4 µmol/L, ácido nicotínico 4,0 µmol/L e ácido giberélico 1,4 µmol/L. O pH foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ (BUSO et al., 1989). As plântulas foram mantidas em sala de crescimento sob 1.000 lux, com fotoperíodo de 16 horas. O intervalo entre subcultivos foi de 40 dias.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Progênes de Hortaliças do Departamento de Fitotecnia e no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas do Núcleo de Biotecnologia Aplicada à Agricultura (BIOAGRO), pertencentes à Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG.

3.1. Experimento I: avaliação de meios de cultivo para crescimento e desenvolvimento das plântulas de batata *in vitro*

3.1.1. Descrição do ensaio

Três meios de cultivo foram testados com o objetivo de avaliar o mais apropriado para o crescimento e desenvolvimento das variedades em estudo. São eles:

MEIO 1: MS, vitaminas e 3% de sacarose (MURASHIGE e SKOOG, 1962).

MEIO 2: MS, vitaminas, 3% de sacarose e GA₃ 0,5 mg/L (BUSO et al., 1989; MURASHIGE e SKOOG, 1962).

MEIO 3: MS modificado (DODDS et al., 1986).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com seis repetições e cinco plantas por repetição, o que forneceu as médias das características avaliadas. As características avaliadas foram: número de folhas definitivas, número de nós, altura da planta, comprimento médio do internó e área foliar. O critério adotado na avaliação da área foliar foi de notas para a terceira folha completamente desenvolvida a partir do ápice caulinar, sendo a nota 0 = inexistência de folha, nota 1 = 0 - 2 mm, nota 2 = 2 - 4 mm, nota 3 = 4 - 6 mm, nota 4 = 6 - 8 mm e nota 5 = > 8 mm.

Neste experimento, apenas as variedades Baraka, Bintje e Contenda foram analisadas em duas épocas: 15 e 30 dias após a transferência dos segmentos nodais de 1 a 1,5 mm para os meios. As plântulas foram mantidas em sala de crescimento sob 1.000 lux e fotoperíodo de 16 horas.

3.1.2. Análise estatística

Realizaram-se análise de variância dos caracteres e teste de média para as fontes de variação, em que foram detectadas diferenças significativas.

3.2. Experimento II: estudo da concentração de picloram para indução de calos

3.2.1. Descrição do ensaio

A fim de determinar a concentração ideal de picloram para indução de calejamento, um experimento preliminar foi realizado com a variedade Contenda, testando-se as seguintes concentrações: 0,0; 0,0165 $\mu\text{mol/L}$; 0,165 $\mu\text{mol/L}$; e 1,65 $\mu\text{mol/L}$. A duração deste experimento foi de 32 dias.

3.2.2. Análise estatística

Foi feita apenas análise visual, reconhecendo-se a concentração que melhor propiciou o desenvolvimento de calos.

3.3. Experimento III: estudo da variação somaclonal baseado na diversidade genética entre clones de batata

3.3.1. Descrição dos ensaios

3.3.1.1. Indução de calos

Cada uma das cinco variedades foi submetida a oito tratamentos. Duas fontes de explante, caule e folha foram combinadas com dois reguladores de crescimento, picloram 1,65 $\mu\text{mol/L}$ e 2,4-D 11,5 $\mu\text{mol/L}$ (BONIN, 1988). Duas datas de avaliação foram determinadas, 70 e 90 dias. O Quadro 1 ilustra os tratamentos.

Quadro 1 - Descrição dos tratamentos utilizados no experimento de indução de calos

	Fonte de Explante	Reg. de Crescimento	Tempo de Calejamento
Tratamento 1	Folha	2,4-D (11,5 $\mu\text{mol/L}$)	70 dias
Tratamento 2	Caule	2,4-D (11,5 $\mu\text{mol/L}$)	70 dias
Tratamento 3	Folha	Picloram (1,65 $\mu\text{mol/L}$)	70 dias
Tratamento 4	Caule	Picloram (1,65 $\mu\text{mol/L}$)	70 dias
Tratamento 5	Folha	2,4-D (11,5 $\mu\text{mol/L}$)	90 dias
Tratamento 6	Caule	2,4-D (11,5 $\mu\text{mol/L}$)	90 dias
Tratamento 7	Folha	Picloram (1,65 $\mu\text{mol/L}$)	90 dias
Tratamento 8	Caule	Picloram (1,65 $\mu\text{mol/L}$)	90 dias

3.3.1.2. Extração do DNA de plantas

Foi utilizado o método de DOYLE e DOYLE (1990), com modificações. Amostras de tecidos pré-armazenados a -80°C foram maceradas em nitrogênio líquido e acondicionadas em tubos de polipropileno com 6 mL do tampão de extração, previamente aquecido a 65°C , contendo CTAB 2%, NaCl 1,4 mol/L, EDTA 20 mmol/L, pH 8,0, Tris-HCl 100 mmol/L, pH 8,0, PVP 1% e β -mercaptoetanol 0,2%.

Os tubos foram incubados em banho-maria a 65°C , durante 60 minutos, sendo levemente agitados a cada 10 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado em centrífuga refrigerada Beckman MJ, a 13.000 rpm, rotor JA-20, por 10 minutos. Ao sobrenadante obtido foi adicionado volume igual de CIA (clorofórmio:álcool isoamílico, 24:1), e os tubos foram invertidos diversas vezes. A fase orgânica foi separada por centrifugação a 14.000 rpm, por 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e extraído mais duas vezes com clorofórmio: isoamil, sendo os ácidos nucleicos precipitados com 2/3 do volume de isopropanol, por 12 horas a -20°C . O precipitado foi sedimentado por centrifugação por 10 minutos a 14.000 rpm, ressuspenso em 500 μL de Tris-EDTA (pH

ressuspendido em 35 μ L de tampão Tris-EDTA (pH 8,0) e quantificado em fluorômetro (Hoefer DyNA Quant 200).

3.3.1.4. Processo de amplificação do DNA

As reações de amplificação foram feitas num volume final de 25 μ L, cada uma contendo Tris-HCl 10 mmol/L (pH 8,0), KCl 50 mmol/L, MgCl₂ 2,4 mmol/L, desoxirribonucleotídios (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) 0,2 mmol/L de cada, oligonucleotídios iniciadores (“primers”) 0,4 μ mol/L, taq polimerase 1 unidade e DNA 30 ng. O processo de amplificação foi realizado em termociclador “Perkin Elmer Cetus, modelo 9600”, utilizando-se um programa de 40 ciclos de 94°C por 15 segundos, 35°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, seguido por 7 minutos a 72°C, e finalizando com 4°C até a retirada das amostras do equipamento.

Os “primers” utilizados, de 10 nucleotídios, foram adquiridos na “Operon Technologies” (California, EUA), e sua relação está descrita no Quadro 2, com as respectivas seqüências de bases.

Quadro 2 - Relação de “primers” utilizados no processo de amplificação e respectivas seqüências de bases

“Primer”	Seqüência (5' para 3')	“Primer”	Seqüência (5' para 3')
OPA09	GGGTAACGCC	OPQ17	GAAGCCCTTG
OPA10	GTGATCGCAG	OPR11	GTAGCCGTCT
OPA11	CAATCGCCGT	OPR12	ACAGGTGCGT
OPB07	GGTGACGCAG	OPS03	CAGAGGTCCC
OPB08	GTCCACACGG	OPS05	TTTGGGGCCT
OPC09	CTCACCGTCC	OPS11	AGTCGGGTGG
OPD01	ACCGCGAAGG	OPS13	GTCGTTCTTG
OPD04	TCTGGTGAGG	OPS14	AAAGGGGTCC
OPQ11	TCTCCGCAAC	OPT14	AATGCCGCAG
OPQ14	GGACGCTTCA	OPT17	CCAACGTCGT

3.3.1.5. Eletroforese do produto de amplificação

Após a amplificação, os fragmentos de DNA obtidos foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2% contendo brometo de etídio 0,1 µg/ml e tampão TBE (Tris 89 mmol/L, ácido bórico 89 mmol/L e EDTA 2 mmol/L), a 80 volts. A cada amostra foram adicionados 3 µl de corante (azul-de-bromofenol 0,25% e sacarose 40%). Cada bateria de amostras foi aplicada ao gel, tendo como referência os produtos de amplificação da planta-matriz em relação aos tratamentos a que cada variedade se submeteu. Para arquivar os resultados, os géis foram fotografados, sob luz ultravioleta, com câmara Polaroid.

3.3.1.6. Análise estatística

Foi realizada a análise de agrupamento dos indivíduos em cada variedade de batata, adotando-se como medida de dissimilaridade o complemento aritmético do índice de Jaccard e, como técnicas de agrupamento, os métodos de Tocher e do Vizinho Mais Próximo.

3.3.1.6.1. Medida de dissimilaridade

Adotou-se o complemento aritmético do coeficiente de Jaccard, que é dado por:

$$J = a / a + b + c$$

em que

a = 1 - 1 : número de coincidência do tipo "1" e "1";

b = 1 - 0 : número de discordância do tipo "1" e "0"; e

c = 0 - 1 : número de discordância do tipo "0" e "1".

sendo

1 = presença da banda; e

0 = ausência da banda.

O complemento aritmético expresso por DJ é dado por

$$DJ = 1 - J.$$

3.3.1.6.2. Métodos de agrupamento

3.3.1.6.2.1. Método de agrupamento de Tocher

O método de Tocher adota o critério de que a média das medidas de dissimilaridade dentro de cada grupo deve ser menor que as distâncias médias entre quaisquer grupos.

O método requer a obtenção da matriz de dissimilaridade, sobre a qual é identificado o par de indivíduos mais similar, que formarão o grupo inicial. A partir daí é avaliada a possibilidade de inclusão de novos indivíduos, adotando-se o critério anteriormente citado.

A entrada de um indivíduo em um grupo sempre aumenta o valor médio da distância dentro desse grupo. Assim, pode-se tomar a decisão de incluir um indivíduo em um grupo, por meio da comparação entre o acréscimo no valor médio da distância dentro do grupo e um nível máximo permitido, que pode ser estabelecido arbitrariamente, ou adotar, como tem sido geralmente feito, o valor máximo da medida de dissimilaridade encontrado no conjunto das menores distâncias envolvendo cada indivíduo (CRUZ e REGAZZI, 1994).

3.1.6.1.2.2. Método de agrupamento do Vizinho Mais Próximo

Neste método, identificaram-se, na matriz de dissimilaridade, indivíduos mais similares, os quais são reunidos, formando o grupo inicial. Calcularam-se então as distâncias daquele grupo em relação aos demais indivíduos e, nos estádios mais avançados, em relação a outros grupos já formados.

O processo de identificação das entidades (grupos ou indivíduos) mais similares se repete sobre a nova matriz de dissimilaridade, cuja dimensão é reduzida a cada passo e se finaliza quando todos os indivíduos são reunidos em um único grupo.

A distância entre um indivíduo k e um grupo formado pelos indivíduos i e j , para $k \neq i, j$, é dada por

$$d_{(ij)k} = \min \{d_{ik}; d_{jk}\}$$

ou seja, $d_{(ij)k}$ é dada pelo menor elemento do conjunto das distâncias dos pares de indivíduos (i e k) e (j e k).

A distância entre dois grupos é dada por

$$d_{(ij)(kl)} = \min \{d_{ik}; d_{il}; d_{jk}; d_{jl}\}$$

isto é, a distância entre dois grupos formados, respectivamente, pelos indivíduos (i e j) e (k e l) é dada pelo menor elemento do conjunto, cujos elementos são as distâncias entre os pares dos indivíduos (i e k), (i e l), (j e k) e (j e l) (CRUZ e REGAZZI, 1994).

Quadro 3 - Resultado da análise de variância de cinco características em três variedades de batata (Baroka - Bataje e Condição) avaliadas a três meios de cultivo *in vitro* e analisadas em duas datas (épocas), 15 e 30 dias após a transferência dos segmentos nodais para os meios de cultivo. ENT: comprimento médio de entrenó; ALT: altura da planta; FOLDEF: número de folhas definitivas; NNÓS: número de nós e ÁREA-FOL: área foliar

Característica	CV	QM				
		ENT	ALT	FOLDEF	NNÓS	ÁREA-FOL
Variação	1	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Variação	2	2,4799	2,4799	13,7091	10,0000	23,1567
Variação	3	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Variação	4	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Variação	5	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Variação	6	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Variação	7	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Variação	8	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Variação	9	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Variação	10	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Variação	11	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Variação	12	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Variação	13	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Variação	14	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Variação	15	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Variação	16	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Variação	17	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Variação	18	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Variação	19	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Variação	20	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Variação	21	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Variação	22	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Variação	23	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Variação	24	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Variação	25	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Variação	26	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Variação	27	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Variação	28	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Variação	29	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Variação	30	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Variação	31	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Variação	32	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Variação	33	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Variação	34	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Variação	35	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Variação	36	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Variação	37	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Variação	38	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Variação	39	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Variação	40	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Variação	41	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Variação	42	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Variação	43	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Variação	44	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Variação	45	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Variação	46	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Variação	47	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Variação	48	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Variação	49	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Variação	50	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Experimento I: avaliação de meios de cultivo para crescimento e desenvolvimento das plântulas de batata *in vitro*

Com o objetivo de avaliar qual o meio de cultivo mais apropriado para o crescimento e desenvolvimento de plântulas de batata, três meios de cultivo foram testados para análise do seu comportamento quanto a número de nós, comprimento médio de entrenó, altura de planta, número de folhas definitivas e área foliar.

Os resultados da análise de variância do comprimento médio de entrenós de três variedades de batata avaliadas em duas épocas revelaram a inexistência de diferença significativa para o efeito de época e da interação época x variedade. Apenas se detectou a existência de diferença significativa para variedades. Para esta variável, o coeficiente de variação que mede a precisão experimental foi de 26,916 % (Quadro 3).

Quadro 3 - Resumo da análise de variância de cinco características em três variedades de batata (Baraka, Bintje e Contenda) submetidas a três meios de cultivo *in vitro* e avaliadas em duas datas (épocas), 15 e 30 dias após a transferência dos segmentos nodais para os meios de cultivo. ENT: comprimento médio de internó, ALT: altura da planta, FOLDEF: número de folhas definitivas, NNÓS: número de nós e ÁREAFOL: área foliar

FV	GL	QM				
		ENT	ALT	FOLDEF	NNÓS	ÁREAFOL
Meio (M)	2	0,1989	6,9592 **	3,8341	1,5548	1,5308
Varied. (V)	2	2,4799 **	29,3410 **	13,3691 **	10,0000 **	23,1597 **
Época (E)	1	0,007837	103,5077 **	76,7602 **	100,8233 **	26,9000 **
M x V	4	0,1336	3,5882 *	1,5711	0,8019	0,6241
M x E	2	0,001073	2,0609	0,5720	0,7914	0,5298
V x E	2	0,02967	2,3126	4,7980 *	4,6734 *	2,2073 *
M x V x E	4	0,04314	0,3906	0,1440	0,4707	0,2097
Resíduo	90	0,08441	1,0633	1,5383	1,2225	0,6914
Média		1,0794	4,3371	4,6625	4,1350	2,0530
C.V. %		26,916	23,776	26,602	26,738	40,504

* $P < 0,05$.

** $P < 0,01$.

Apesar da existência de significância estatística, observaram-se neste experimento coeficientes de variação considerados altos (Quadro 3), mas que se tornam admissíveis quando comparados com os encontrados por SCHMILDT (1994), que apresentou valores de coeficiente de variação de até 140%, para experimentos envolvendo cultivo *in vitro*. O desempenho das três variedades para crescimento médio de entrenós em duas épocas de avaliação mostrou que houve diferença estatística das variedades Baraka e Bintje em relação à 'Contenda', apresentando as duas primeiras médias superiores à desta última (Quadro 4).

Quadro 4 - Comparação entre médias de cinco repetições em relação ao comprimento do intrínseco de três variedades de batata avaliadas em duas épocas

Variedade	Época		Média
	15 Dias	30 Dias	
Baraka	1,1700	1,2261	1,1980 a
Bintje	1,2861	1,2372	1,2617 a
Contenda	0,7567	0,8006	0,7786 b
Média	1,0709	1,0879	1,0794

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Com relação à altura da planta, a variedade Bintje teve desempenho superior ao da 'Baraka', que por sua vez foi superior ao da 'Contenda', apresentando diferenças significativas entre as médias (Quadro 5).

Quadro 5 - Comparação entre médias de cinco repetições em relação à altura da planta de três variedades de batata avaliadas em duas épocas

Variedade	Época		Média
	15 Dias	30 Dias	
Baraka	3,5467	5,1172	4,3319 b
Bintje	4,3567	6,1283	5,2425 a
Contenda	2,1711	4,7028	3,4369 c
Média	3,3581 A	5,3161 B	4,3371

Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si, pelo teste F, a 1% de probabilidade.

Aos 30 dias, as variedades Bintje e Contenda apresentaram número de folhas definitivas superior ao da 'Baraka' (Quadro 6); para número de nós, também aos 30 dias, 'Bintje' e 'Contenda' mostraram-se superiores à variedade Baraka (Quadro 7).

Quadro 6 - Comparação entre médias de cinco repetições em relação ao número de folhas definitivas de três variedades de batata avaliadas em duas épocas

Variedade	Época		Média
	15 Dias	30 Dias	
Baraka	3,5105 aA	4,4094 bA	3,9600
Bintje	4,0694 aB	5,8877 aA	4,9786
Contenda	3,8783 aB	6,2194 aA	5,0488
Média	3,8194	5,5055	4,6625

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Quadro 7 - Comparação entre médias de cinco repetições em relação ao número de nós de três variedades de batata avaliadas em duas épocas

Variedade	Época		Média
	15 Dias	30 Dias	
Baraka	2,9316 aB	4,1738 bA	3,5527
Bintje	3,6416 aB	5,5166 aA	4,5791
Contenda	2,9338 aB	5,6138 aA	4,2738
Média	3,1690	5,1014	4,1352

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Com relação à área foliar, 'Baraka' e 'Bintje' tiveram desempenho inferior ao da variedade Contenda (Quadro 8). Esse menor desempenho das variedades 'Bintje' e 'Baraka' em relação à 'Contenda' pode ser compensado pelo maior número de folhas.

Quadro 8 - Comparação entre médias de cinco repetições em relação à área foliar de três variedades de batata avaliadas em duas épocas

Variedade	Época		Média
	15 Dias	30 Dias	
Baraka	0,9872 bB	1,7000 bA	1,3436
Bintje	1,5361 abB	2,2477 bA	1,8919
Contenda	2,1383 aB	3,7083 aA	2,9233
Média	1,5538	2,5520	2,0529

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Coletivamente, esses resultados demonstraram que a variedade Bintje teve desempenho superior ao das outras, indicando que essa variedade é mais bem adaptada ao cultivo *in vitro* e, ou, é geneticamente mais vigorosa, embora seja essa uma característica atribuída a todas as três variedades utilizadas nesse experimento (SANTOS et al., 1986).

Além do efeito do genótipo, o meio e o tempo de cultivo, associados com as interações desses fatores, são altamente significantes, tanto para número de folhas definitivas como para altura da planta (FONDONG et al., 1994). Assim, os genótipos analisados

foram submetidos a diversos meios de cultura, a fim de avaliar o efeito do meio no desenvolvimento da parte aérea.

A comparação dos meios de cultivo, em relação à altura da planta, indicou que cada variedade respondeu diferentemente aos meios utilizados. Para a variedade Baraka, os meios MS e MS+GA₃ apresentaram diferenças significativas entre si e mostram-se superiores ao MS modificado. Para a variedade Bintje, houve diferença significativa entre o meio MS+GA₃ e os meios MS e MS modificados, sendo a média do primeiro superior às médias dos outros dois. Para a variedade Contenda, os meios de cultivo não apresentaram diferença estatística significativa (Quadro 9). Esses resultados são consistentes com aqueles descritos por FONDONG et al. (1994), no que diz respeito ao papel do GA₃ de ser dependente do genótipo.

Quadro 9 - Comparação entre médias de cinco repetições em relação à altura da planta de três variedades de batata avaliadas em três meios de cultivo *in vitro*

Variedade	Meio			Média
	MS	MS + GA ₃	MS Modificado	
Baraka	4,8500 aA	4,6683 bA	3,4775 bB	4,3319
Bintje	4,9417 aB	6,0833 aA	4,7025 aB	5,2429
Contenda	3,7533 bA	3,2283 cA	3,3291 bA	3,4369
Média	4,5150	4,6600	3,8364	4,3371

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Quanto ao efeito do meio sobre o número de folhas definitivas, as variedades também se comportaram de forma distinta, ressaltando-se que, embora 'Bintje' e 'Contenda' não diferissem significativamente entre si, a variedade Baraka mostrou-se estatisticamente inferior. Ao proceder à análise das médias dos meios de cultivo, notou-se que plantas no meio MS+GA₃ possuíam a maior média de número de folhas definitivas para todas as variedades, em comparação com os outros meios (Quadro 10). O mesmo se observou ao analisar o Quadro 9, em que a média do meio MS+GA₃ foi superior à dos outros meios para altura de planta. De acordo com BOCCON-GIBOD (1989), a adição externa de GA₃ em meio de cultivo *in vitro* tem o seguinte papel: estimulação do crescimento do meristema, indução da alongação do caule e ativação do crescimento do embrião.

Quadro 10 - Comparação entre médias de cinco repetições em relação ao número de folhas definitivas de três variedades de batata avaliadas em três meios de cultivo *in vitro*

Variedade	Meio			Média
	MS	MS + GA ₃	MS Modificado	
Baraka	4,1383	4,2325	3,5091	3,9600 b
Bintje	4,8000	5,6941	4,4416	4,9786 a
Contenda	5,1666	4,9758	5,0041	5,0488 a
Média	4,7016	4,9675	4,3183	4,6624

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Dentre os resultados testados, o meio MS modificado apresentou a menor média para altura de planta (Quadro 9) e folhas definitivas (Quadro 10). Similarmente, MARTINEZ (1994) demonstrou que o meio MS modificado teve o pior desempenho dentre os quatro meios de cultivo *in vitro* testados.

O meio de cultivo MS+GA₃ foi o escolhido para dar prosseguimento aos experimentos. As plantas cultivadas nesse meio possuíam melhor aspecto visual que as cultivadas nos outros dois meios para todas as três variedades analisadas, apesar de não diferirem estatisticamente entre os outros meios para a variedade Contenda e terem desempenho similar ao do meio MS para a variedade Baraka, e, ainda, apresentaram-se como a melhor opção para a variedade Bintje em relação à característica altura de plantas.

4.2. Experimento II: estudo da concentração de picloram para indução de calos

Dentre as quatro concentrações utilizadas, o melhor resultado foi obtido com 1,65 µmol/L de picloram. Com 0,0 e 0,0165 µmol/L não houve formação e calos após 32 dias. Com 0,165 µmol/L de picloram, após esse mesmo período a formação de calos foi incipiente.

4.3. Experimento III: estudo da variação somaclonal baseado na diversidade genética entre clones de batata

Com a finalidade de avaliar a variação somaclonal entre os tratamentos testados para calejamento, amostras de DNA de calos induzidos para cada tratamento foram amplificadas por RAPD. Foram utilizados 20 oligonucleotídios iniciadores de seqüências aleatórias.

No Quadro 11, encontra-se a descrição dos “primers” testados e daqueles que evidenciaram bandas polimórficas no processo de amplificação do DNA dos calos formados após os oito tratamentos e da planta-matriz de cada uma das cinco variedades. O número de “primers” que apresentaram polimorfismo foi de 5 para ‘Baraka’, 4 para ‘Bintje’, 16 para ‘Contenda’, 7 para ‘Baronesa’ e 4 para ‘Achat’.

Quadro 11 - Relação dos "primers" que apresentaram polimorfismo dentro de cada tratamento e variedade. Os números de 1 a 8 correspondem aos respectivos tratamentos

Primer	BARAKA								BINTJE								CONTENDA							
	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8
OPA-09																								
OPA-10																			X					
OPA-11																								
OPB-07																			X					
OPB-08	X	X	X	X	X	X	X	X											X					
OPC-09																			X					
OPD-01																			X					
OPD-04	X	X	X	X	X	X	X	X											X					
OPQ-11																			X					
OPQ-14									X										X	X				
OPQ-17																			X					
POR-11	X				X		X	X									X		X					
POR-12																			X					
OPS-03	X	X	X		X	X	X	X	X										X					
OPS-05																			X					
OPS-11																			X					
OPS-13						X	X																	
OPS-14																								
OPT-14									X	X	X	X	X	X	X	X			X					
OPT-17									X	X	X	X	X	X	X	X			X					

Primer	BARONESA								ACHAT							
	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8
OPA-09	X	X	X	X	X	X	X	X								
OPA-10	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
OPA-11																
OPB-07	X	X	X	X	X	X	X	X								
OPB-08																
OPC-09															X	
OPD-01																
OPD-04																
OPQ-11	X	X	X	X	X											
OPQ-14																
OPQ-17	X	X	X	X	X	X	X	X								
OPR-11																
OPR-12	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
OPS-03															X	X
OPS-05																
OPS-11																
OPS-13																
OPS-14																
OPT-14	X	X	X	X	X	X	X	X								
OPT-17																

Pelo método de Tocher, houve a formação de dois grupos para a variedade Baraka. O Grupo (1) era formado pelos calos provenientes dos Tratamentos 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 8 e pela planta-matriz, enquanto o Grupo (2) era formado pelos calos provenientes do Tratamento 7 (Quadro 12). O dendrograma feito a partir do agrupamento pelo método do Vizinho Mais Próximo (Figura 1) caracterizou, em forma de porcentagem, a distância entre os indivíduos. Os dois métodos mostraram que o Tratamento 7 (caule, picloram e 90 dias de calejamento) foi o mais efetivo na indução da variação somaclonal, o que indica, neste caso, a interação entre o explante e o regulador de crescimento, favorecendo a variação. Plantas regeneradas de diferentes tecidos podem apresentar diferenças quanto à variação somaclonal. KARP (1994) citou que frequências mais altas de octoplóides e aneuplóides no nível de octoploidia foram encontradas em plantas de batata regeneradas de protoplastos de tubérculos, em comparação com as de protoplastos do mesófilo.

A variedade Bintje mostrou a formação de três grupos distintos pelo método de Tocher (Quadro 13). O Grupo (1) englobou os calos formados pelos Tratamentos 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8, o Grupo (2) pela planta-matriz e o Grupo (3) pelos calos formados pelo Tratamento 1, sendo também os indivíduos resultantes deste tratamento os mais geneticamente distantes, pela análise da Figura 2. O Tratamento 1, que induziu mais a variação somaclonal, constou de picloram, folha como explante e 70 dias de calejamento. Nesse caso houve inversão do resultado esperado, já que para as mesmas condições seria esperado que aos 90 dias houvesse maior número de fragmentos polimórficos do que aos 70 dias, contrariando a premissa de que prolongados períodos de cultivo *in vitro* resultem em aumento da frequência de aberrações cromossômicas (BAYLISS, 1980; LARKIN, 1987; KARP, 1994). Uma possível explicação para esse fato pode estar na preexistência de células mutantes no explante utilizado.

Quadro 12 - Formação de grupos, para a variedade Baraka, pelo método de Tocher. Os números de 1 a 8 correspondem aos tratamentos utilizados para induzir calejamento, e o 9 corresponde à planta-matriz

Grupo	Tratamentos
(1)	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9
(2)	7

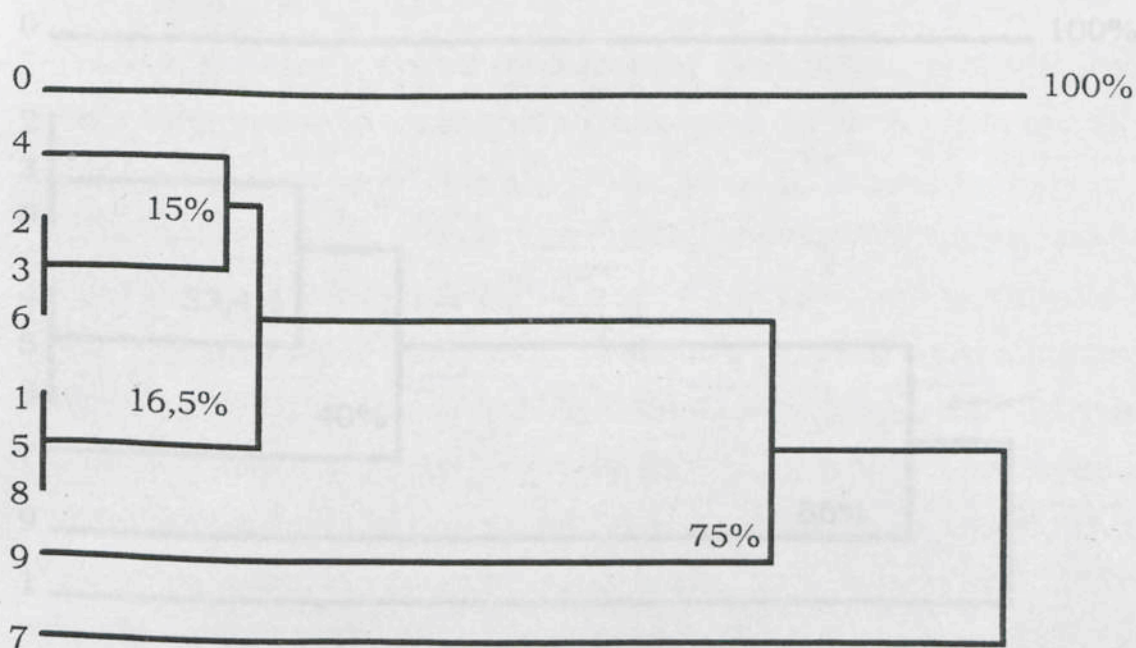


Figura 1 - Agrupamento pelo método do Vizinho Mais Próximo para a variedade Baraka. Os números de 1 a 8 correspondem aos tratamentos utilizados para induzir calejamento, e o 9 corresponde à planta-matriz.

Quadro 13 - Formação de grupos, para a variedade Bintje, pelo método de Tocher. Os números de 1 a 8 correspondem aos tratamentos utilizados para induzir calejamento, e o 9 corresponde à planta-matriz

Grupo	Tratamentos
(1)	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8
(2)	9
(3)	1

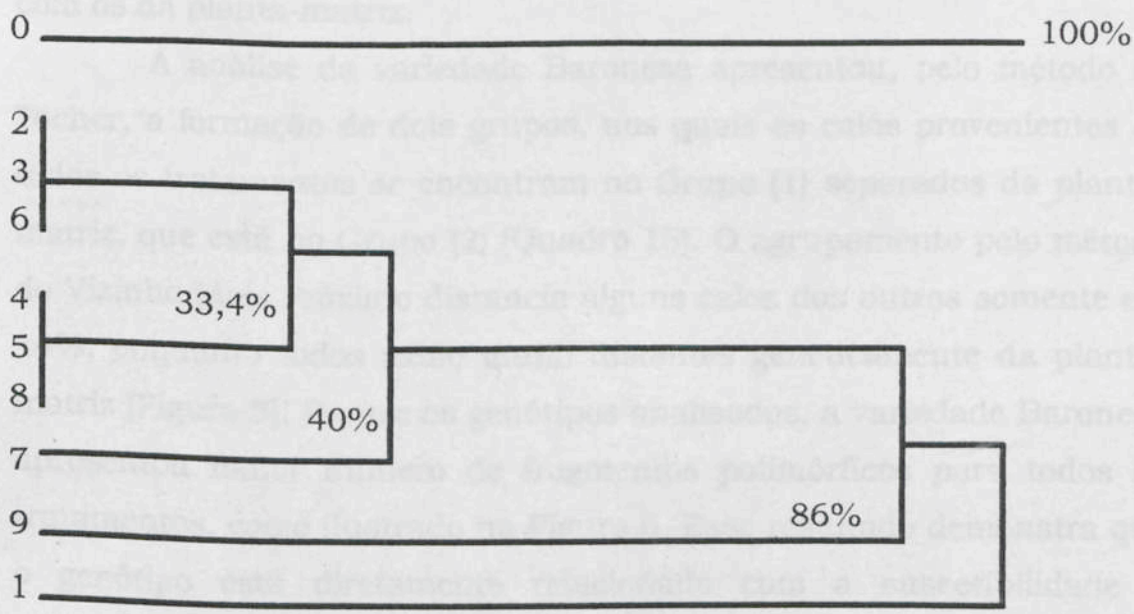


Figura 2 - Agrupamento pelo método do Vizinho Mais Próximo para a variedade Bintje. Os números de 1 a 8 correspondem aos tratamentos utilizados para induzir calejamento, e o 9 corresponde à planta-matriz.

Dos 20 "primers" testados em 'Contenda', 14 apresentaram polimorfismo para os calos provenientes do Tratamento 3 (caule como explante, picloram e 70 dias de calejamento). A formação de grupos pelo método de Tocher (Quadro 14) e o dendrograma feito a partir do agrupamento pelo método do Vizinho Mais Próximo (Figura 3) confirmaram o resultado deste tratamento, que apresentou indivíduos mais distantes geneticamente dos outros e da planta-matriz. Esse efeito significativo do picloram contradiz dados da literatura, visto que o 2,4-D tem sido descrito como o regulador de crescimento mais eficiente em provocar variação somaclonal. Provavelmente, tal efeito significativo seja resultado da interação entre as variáveis, posto que DOLEZAL e NOVAK (1984) não encontraram nenhuma evidência de que o 2,4-D, ou outro regulador de crescimento fosse mutagênico. A Figura 4 ilustra o resultado obtido, pela qual se pode observar que os produtos da amplificação separados em gel de agarose dos calos provenientes do Tratamento 3 apresentaram fragmentos polimórficos, em comparação com os da planta-matriz.

A análise da variedade Baronesa apresentou, pelo método de Tocher, a formação de dois grupos, nos quais os calos provenientes de todos os tratamentos se encontram no Grupo (1) separados da planta-matriz, que está no Grupo (2) (Quadro 15). O agrupamento pelo método do Vizinho Mais Próximo distancia alguns calos dos outros somente em 14%, enquanto todos estão muito distantes geneticamente da planta-matriz (Figura 5). Dentre os genótipos analisados, a variedade Baronesa apresentou maior número de fragmentos polimórficos para todos os tratamentos, como ilustrado na Figura 6. Esse resultado demonstra que o genótipo está diretamente relacionado com a suscetibilidade à variação somaclonal, como descrito por ROEST et al. (1981), que observaram 43% de variação em uma variedade de *Begonia haemalis* e apenas 7% em outra variedade. Da mesma forma, diferenças na

Dos 20 "primers" testados em 'Contenda', 14 apresentaram polimorfismo para os calos provenientes do Tratamento 3 (caule como explante, picloram e 70 dias de calejamento). A formação de grupos pelo método de Tocher (Quadro 14) e o dendrograma feito a partir do agrupamento pelo método do Vizinho Mais Próximo (Figura 3) confirmaram o resultado deste tratamento, que apresentou indivíduos mais distantes geneticamente dos outros e da planta-matriz. Esse efeito significativo do picloram contradiz dados da literatura, visto que o 2,4-D tem sido descrito como o regulador de crescimento mais eficiente em provocar variação somaclonal. Provavelmente, tal efeito significativo seja resultado da interação entre as variáveis, posto que DOLEZAL e NOVAK (1984) não encontraram nenhuma evidência de que o 2,4-D, ou outro regulador de crescimento, fosse mutagênico. A Figura 4 ilustra o resultado obtido, pela qual se pode observar que os produtos da amplificação separados em gel de agarose dos calos provenientes do Tratamento 3 apresentaram fragmentos polimórficos, em comparação com os da planta-matriz.

A análise da variedade Baronesa apresentou, pelo método de Tocher, a formação de dois grupos, nos quais os calos provenientes de todos os tratamentos se encontram no Grupo (1) separados da planta-matriz, que está no Grupo (2) (Quadro 15). O agrupamento pelo método do Vizinho Mais Próximo distancia alguns calos dos outros somente em 14%, enquanto todos estão muito distantes geneticamente da planta-matriz (Figura 5). Dentre os genótipos analisados, a variedade Baronesa apresentou maior número de fragmentos polimórficos para todos os tratamentos, como ilustrado na Figura 6. Esse resultado demonstra que o genótipo está diretamente relacionado com a suscetibilidade à variação somaclonal, como descrito por ROEST et al. (1981), que observaram 43% de variação em uma variedade de *Begonia haemalis* e apenas 7% em outra variedade. Da mesma forma, diferenças na

Quadro 14 - Formação de grupos para a variedade Contenda pelo método de Tocher. Os números de 1 a 8 correspondem aos tratamentos utilizados para induzir calejamento, e o 9 corresponde à planta-matriz

Grupo	Tratamentos
(1)	1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9
(2)	3

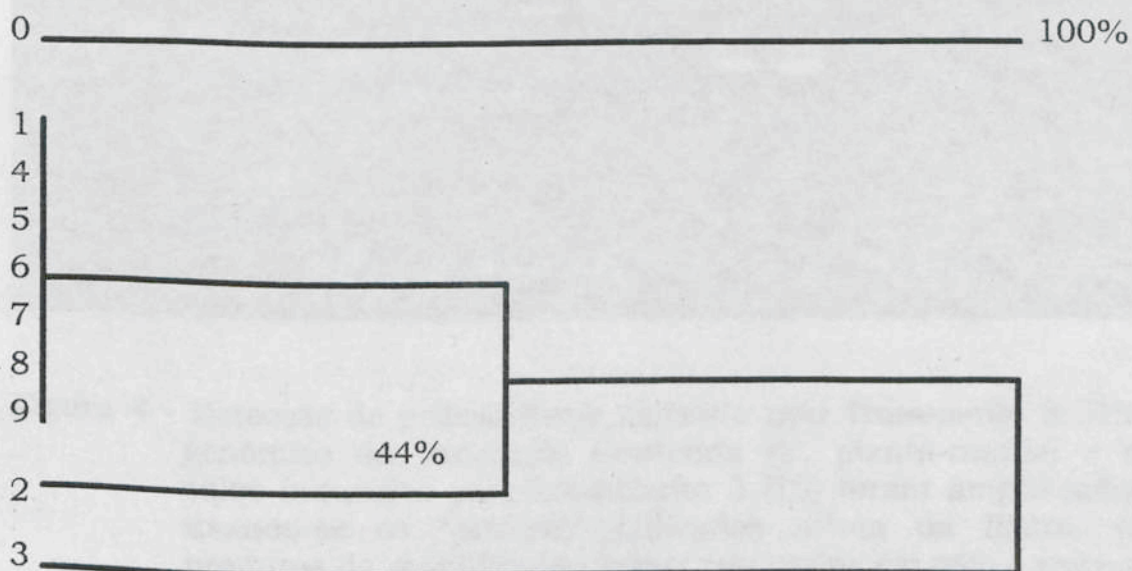


Figura 3 - Agrupamento pelo método do Vizinheiro Mais Próximo para a variedade Contenda. Os números de 1 a 8 correspondem aos tratamentos utilizados para induzir calejamento, e o 9 corresponde à planta-matriz.

Quadro 12 - Descrição do grupo para a variedade Barense pelo método de Taylor. Os indivíduos de 1 a 8 correspondem aos tratamentos utilizados para induzir calos, e o 9 corresponde a planta matriz.

Grupo	Indivíduos
(1)	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,
(2)	9

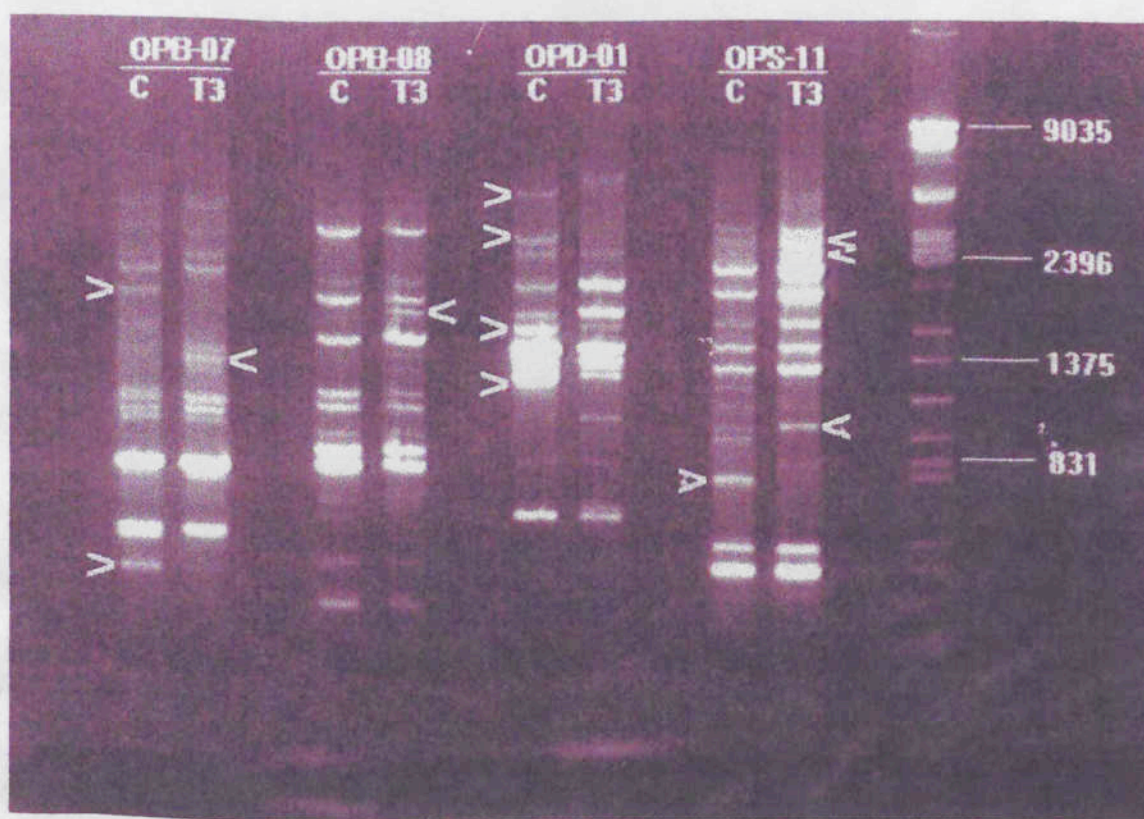


Figura 4 - Detecção de polimorfismo causado pelo Tratamento 3. DNA genômico da variedade Contenda (C, planta-matriz) e os calos induzidos pelo Tratamento 3 (T3) foram amplificados, usando-se os "primers" indicados acima da figura. Os produtos da amplificação foram separados em géis e agarose 1,2% contendo brometo e etídio. As variáveis atuantes no referido tratamento são: caule como explante, 70 dias de calejamento e picloram como regulador de crescimento. A posição de migração eletroforética de padrões de DNA em pares de base está apresentada à direita da figura. As setas indicam as bandas polimórficas.

Quadro 15 - Formação de grupos para a variedade Baronesa pelo método de Tocher. Os números de 1 a 8 correspondem aos tratamentos utilizados para induzir calejamento, e o 9 corresponde à planta-matriz

Grupo	Indivíduos
(1)	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,
(2)	9

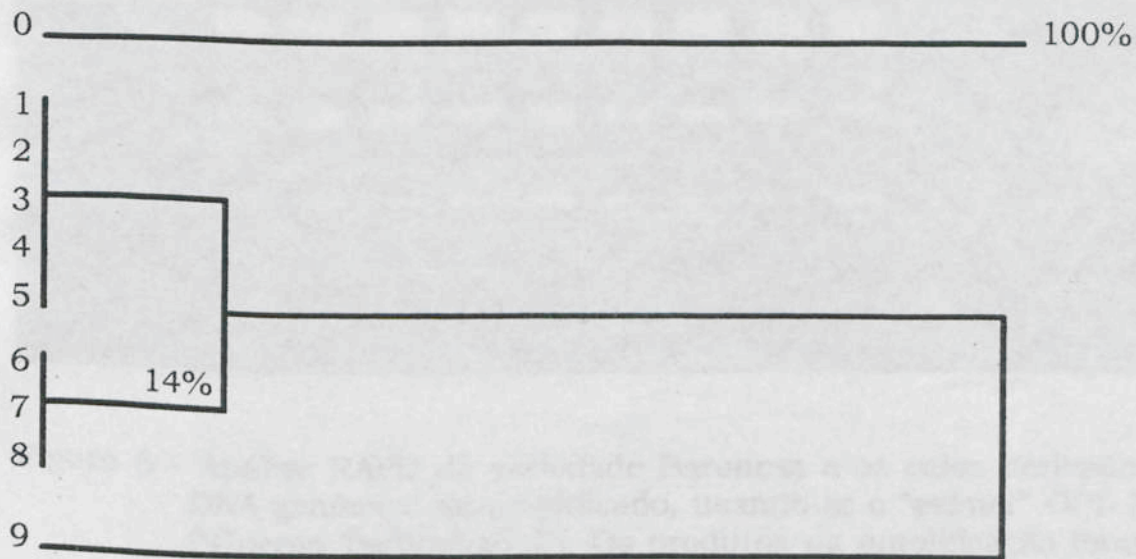


Figura 5 - Agrupamento pelo método do Vizinho Mais Próximo para a variedade Baronesa. Os números de 1 a 8 correspondem aos tratamentos utilizados para induzir calejamento, e o 9 corresponde à planta-matriz.

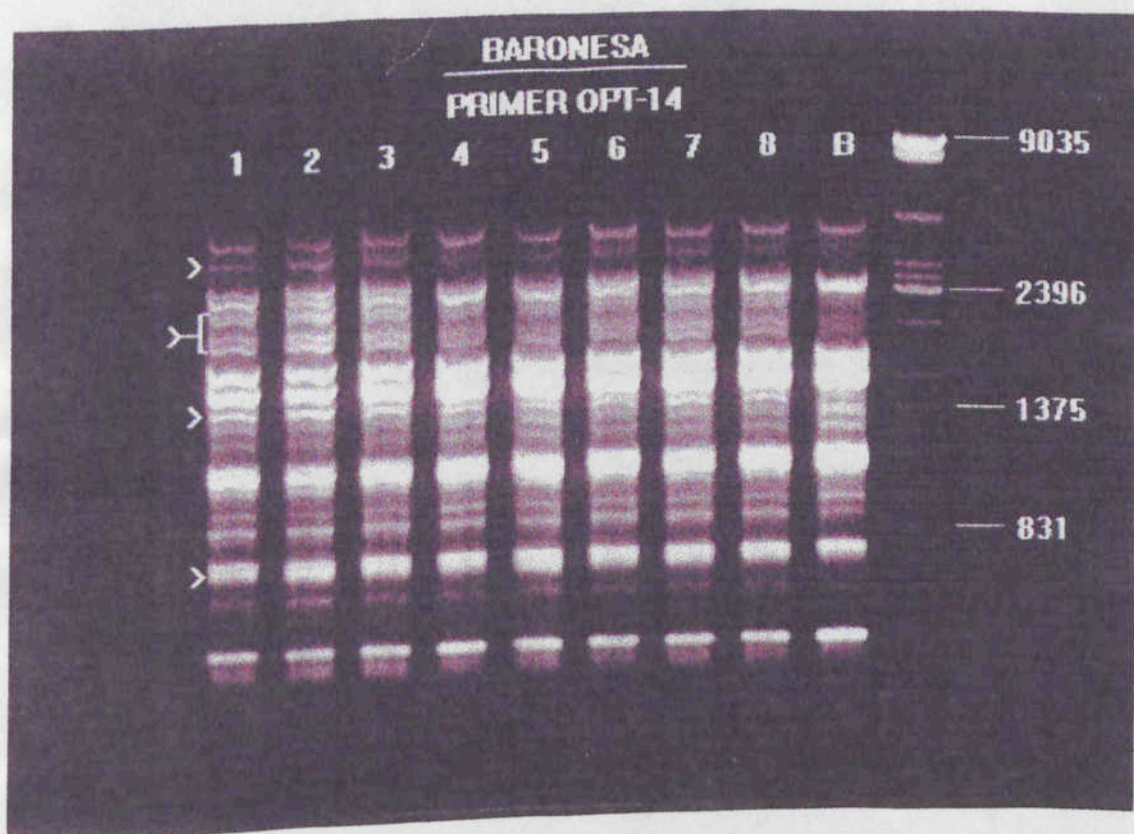


Figura 6 - Análise RAPD da variedade Baronesa e os calos derivados. DNA genômico foi amplificado, usando-se o "primer" OPT-14 ("Operon Technologies"). Os produtos da amplificação foram amplificados em géis de agarose 1,2%. As setas indicam a posição de bandas polimórficas. As colunas de 1 a 8 correspondem aos respectivos tratamentos. A coluna B indica a planta-matriz. A posição de migração eletroforética de padrões de DNA em pares de base é indicada à direita da figura.

variação somaclonal foram descritas entre variedades de trigo de inverno e de primavera (GALIBA et al., 1985) e diferentes cultivares de alfafa (NAGARAJAN e WALTON, 1987) e centeio (LINACERO e VAZQUEZ, 1986). KARP et al. (1982), trabalhando com duas variedades de batata, constataram que, embora aneuploidia fosse freqüente em ambas as variedades, a natureza da variação diferiu. Regenerantes da variedade Maris Bard têm alto número de cromossomos (46-96) e amplo limite de aneuploidia, enquanto no cultivar Fortyfold a maior proporção de plantas teve seus números de cromossomos próximos do número normal. RIETVELD et al. (1993) também encontraram diferenças no aparecimento de variação somaclonal em três cultivares de batata, em que os somaclones do cultivar Russet Burbank possuíam maior variabilidade que os dos cultivares Kennebek e Superior.

Na variedade Achat, o método de Tocher dividiu os tratamentos em dois grupos, nos quais os calos provenientes dos Tratamentos 6 e 8 se encontram no Grupo (2) e os demais, no Grupo (1) (Quadro 16). O agrupamento pelo método do Vizinho Mais Próximo também distanciou os indivíduos provenientes desses dois tratamentos dos demais (Figura 7). Esses dois tratamentos evidenciaram a influência do tempo de calejamento, aliado ao uso do 2,4-D, em promover maior variação somaclonal do que os demais. Segundo LARKIN (1987), algumas variações parecem aumentar com a duração do cultivo *in vitro* e, quando é minimizada a duração da fase de calo, deve-se admitir que será minimizada também a variação somaclonal.

Quadro 16 - Formação de grupos para a variedade Achat pelo método de Tocher. Os números de 1 a 8 correspondem aos tratamentos utilizados para induzir calejamento, e o 9 corresponde à planta-matriz

Grupo	Indivíduos
(1)	1, 2, 3, 4, 5, 7, 9
(2)	6, 8

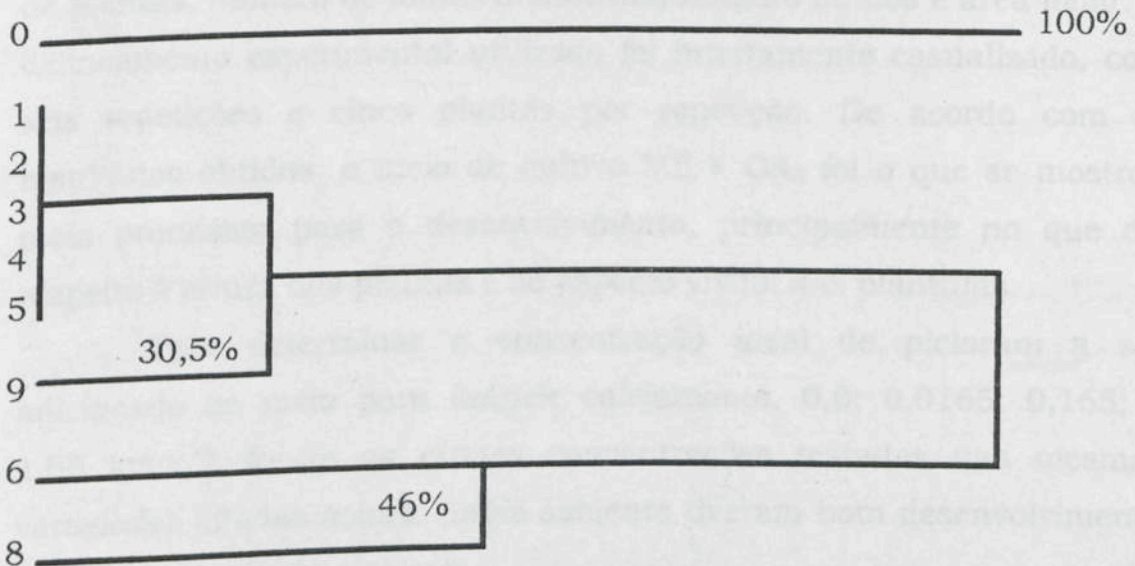


Figura 7 - Agrupamento pelo método do Vizinheiro Mais Próximo para a variedade Achat. Os números de 1 a 8 correspondem aos tratamentos utilizados para induzir calejamento, e o 9 corresponde à planta-matriz.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Com o objetivo de determinar o meio de cultivo mais apropriado para o perfeito desenvolvimento das plântulas de batata, cinco características foram avaliadas em duas épocas diferentes, aos 15 e 30 dias após a transferência do segmento nodal das variedades Baraka, Bintje e Contenda. Foram elas: crescimento médio de entrenós, altura de plantas, número de folhas definitivas, número de nós e área foliar. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com seis repetições e cinco plantas por repetição. De acordo com os resultados obtidos, o meio de cultivo MS + GA₃ foi o que se mostrou mais promissor para o desenvolvimento, principalmente no que diz respeito à altura das plantas e ao aspecto visual das plântulas.

Para determinar a concentração ideal de picloram a ser adicionado ao meio para induzir calejamento, 0,0; 0,0165; 0,165; e 1,65 $\mu\text{mol/L}$ foram as quatro concentrações testadas nas mesmas variedades citadas acima. Calos somente tiveram bom desenvolvimento sob 1,65 $\mu\text{mol/L}$ de picloram.

As variedades Baraka, Bintje, Contenda, Baronesa e Achat foram submetidas a oito tratamentos, com o objetivo de avaliar os efeitos do genótipo, da fonte de explante, do tempo de cultivo e do regulador de crescimento na variação somaclonal. Duas fontes de

explante, caule e folha foram combinadas com dois reguladores de crescimento, picloram a 1,65 $\mu\text{mol/L}$ e 2,4-D a 11,5 $\mu\text{mol/L}$, em duas datas de avaliação, 70 e 90 dias.

Amostras do DNA das plantas-matriz e dos calos derivados dos tratamentos foram isolados e amplificados com o auxílio de 20 "primers". Os produtos de amplificação foram utilizados para determinar a distância genética entre os calos e estes da planta-matriz, dentro de cada cultivar, pelos métodos de agrupamento de Tocher e do Vizinho Mais Próximo, utilizando-se como medida de dissimilaridade o complemento aritmético do coeficiente de Jaccard.

Para a variedade Baraka, caule como explante, picloram e 90 dias de calejamento foram as variáveis que levaram à maior variação somaclonal. Para Bintje, as variáveis foram folha, picloram e 70 dias. Dos 20 "primers" testados, 14 apresentaram polimorfismo para a variedade Contenda quando submetida ao tratamento que utilizou caule como explante, picloram e 70 dias de calejamento. Os três primeiros resultados indicam que o uso do picloram levou à maior variação somaclonal que o 2,4-D, sendo este último o mais utilizado em trabalhos relacionados a calejamento e variação somaclonal.

Dentre os genótipos analisados, a variedade Baronesa apresentou o maior número de fragmentos polimórficos para todos os tratamentos. Isso demonstra que o genótipo, nesse caso, esteve diretamente relacionado com a suscetibilidade à variação somaclonal. A variedade Achat mostrou-se mais suscetível à variação somaclonal quando submetida aos tratamentos que utilizaram 2,4-D, 90 dias de calejamento e tanto caule e folha como explante.

O tempo de cultivo não teve grande influência na variação somaclonal para a maioria das variedades, exceto para 'Baraka' e 'Achat'. O fator genótipo foi o mais importante, pois cada variedade teve desempenho distinto em relação ao das outras, no que concerne à taxa de variação somaclonal, aliado às variáveis em estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMMIRATO, P.V. Embriogênese somática e semente sintética. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE BIOTECNOLOGIA DE PLANTAS, 1988, **Resumos...**, 1988. p. 54-61.
- AMMIRATO, P.V. Embriogênese somática e semente sintética. In: CROCOMO, O.J., SHARP, W.R., MELO, M. (Eds.). **Biotechnologia para a produção vegetal**. 1991. p. 189-221.
- ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. Rio de Janeiro: IBGE. 1994. v.54, p. 3-36.
- BAYLISS, M.W. Chromosomal variation in plant tissue culture. **Int. Rev. Cytol.**, v. 11A, p. 113-143, 1980.
- BOCCON-GIBOD, J. Les besoins nutritifs des tissus cultivés en conditions aseptiques en la culture *in vitro* et ses applications horticoles. **Technique et Documentation**, Paris, p. 31-36, 1989.
- BONIN, V. Obtenção e multiplicação *in vitro* de batateiras (*Solanum tuberosum* L.) isentas de vírus Y (PVY). Viçosa, MG: UFV, 1988. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 1988.
- BUSO, J.A., INOUE, A.K., REIFSCHENEIDER, F.J.B. et al. Produção de batata-semente pré-básica no Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças CNPH-EMBRAPA. In: HIDALGO, O.A., RINCÓN, H. (Eds.). **Avances en la producción de tuberculo-semilla de papa en los países del cono sur**. Centro Internacional de La Papa (CIP), 1989. p.91-92.

- CRUZ, C.D., REGAZZI, A.J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa, MG: UFV, 1994. p.299-302.
- DE JONG, J., CUSTERS, J.B.M. Induced changes and flowering of chrysanthemum after irradiation and *in vitro* culture of pedicels and petals epidermis. **Euphyt.**, v.35, p.137-48, 1986.
- DE KLERK, G.J. How measure somaclonal variation. **Acta Bot. Neerl.**, v.39, n.2, p.129-44, 1990.
- DOLEZEL, J., NOVAK, F.J. Effect of plant tissue culture media on the frequency of somatic mutation in *Tradescantia* stamen hair. **Z. Pflanzenphysiol**, v.144, p.51-58, 1984.
- DOLEZEL, J., NOVAK, F.J., HAVEL, L. Citogenetics of garlic (*Allium sativum* L.) *in vitro* culture. **Czechoslovakia: Czecheslok Academ. of Sciences**, v. 282, p. 11-19, 1986.
- DODDS, J.H., SILVA-RODRÍGUEZ, D., BRYAN, E. Transport, receipt and propagation of *in vitro* potato plantlets. **International Potato Center (CIP)**, 1986. p.12-13.
- DOYLE, J.J., DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.
- EVANS, D.A., SHARP, W.R. Somaclonal and Gametoclonal Variation. In: EVANS, D.A., SHARP, W.R., AMMIRATO, P.V. (Eds.). **Handbook of plant cell culture**. New York: Macmillan, v.4, p. 97-132. 1988.
- EVANS, D.A. Applications of somaclonal variation. In: MIZRAHI, A.R.L. (Ed.). **Biotechnology in agriculture**. New York, 1988. p. 203-223.
- EVANS, D.E., GAMBORG, O.L. Chromosome stability of cell suspension cultures of *Nicotiana* spp. **Plant Cell Rep.**, v.1, p. 104-107, 1984.
- FONDONG, V.N., MARTIN, C., NANA, F.S. Effect on GA₃ on the *in vitro* growth and development of four potato (*Solanum tuberosum*) genotypes. In: **Triennial Symposium of the International Society for Tropical Root Crops-Africa Branch**, 5, 1994. **Proceedings...** 1994. p. 145-148.
- GALIBA, G., KERTESZ, Z., SULKA, J. et al. Differences in somaclonal variation in three winter wheat *Triticum aestivum* varieties. **Cereal Res. Commun.**, v. 13, p. 342-350, 1985.
- GARDNER, E.J., SNUSTAD, P. **Genética**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1986. 497p.

- GAVAZZI, G., TONELLI, C., TODESCO, G. et al. Somaclonal variation versus chemically induced mutagenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). **Theor. Appl. Genet.**, v. 74, p. 733-738, 1987.
- GHOSH, A., GADGIL, V.N. Sheft in ploidy of callus tissues. A function of growth substances. **Indian J. Exp. Biol.**, v.17, p. 562-564, 1979.
- GRAY, D.J., PUROHIT, A. Somatic embryogenesis and development of synthetic seed technology. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.10, n.1, p. 33-61, 1991.
- GRIESBACH, R.J., SEMENIUK, P. Use of somaclonal variation in the improvement of *Eustoma grandiflorum*. **J. Hered.**, v.78, p. 114-116, 1987.
- GUNN, R.E., SHEPARD, J.F. Regeneration of plants from mesophyll-derived protoplasts of Britsch potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars. **Plant Sci. Lett.**, v.22, p. 97-101, 1981.
- HARBERLANDT, G. Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. **Sitzungsber. Math. Naturwiss. Kl. Kais. Akad. Wiss. Wien**. v.111, p. 69-92, 1902.
- HACCIUS, B. Question of unicellular origin of non-zygotic embryos in callus cultures. **Phytomorphology**, v.28, p.74-81, 1978.
- HOOKER, W.J. The potato. In: HOOKER, W.J. (Ed.). **Compendium of Potato Diseases**. St. Paul, Minnesota: American Phytopathological, 1981. p. 1-4.
- ISABEL, N., TREMBLAY, L., MICHAUD, M. et al. RAPDs as an aid to evaluate the genetic integrity of somatic embryogenesis - derived populations of *Picea mariana* (Mill.) B.S.P. **Theor. Appl. Genet.**, v.86, p. 81-87, 1993.
- JACOBSEN, E. Polyploidization in leaf callus tissue and in regenerated plants of dihaploid potato. **Plant Cell, Tissue and Org. Cult.**, v.1, p.77-84, 1981.
- JANICK, J., SKIRVIN, R.M., JANDERS, R.B. Comparison of *in vitro* and *in vivo* tissue culture systems in scented geraniums. **J. Hered.** v.68, p. 62- 64, 1977.
- KARP, A., NELSON, R.S., THOMAS, E. et al. Chromosome variation in protoplast derived potato plants. **Theor. Appl. Genet.**, v. 63, p. 265-272, 1982.
- KARP, A. Can genetic instability be controlled in plant tissue culture? **IAPTC Newsletter**, v.58, p. 2-11, 1989.

- KARP, A. Variação somaclonal: aspectos fundamentais. **ABCTP Notícias**, n.22, p.2-8, 1994.
- LARKIN, P.J. Somaclonal variation: history, method, and meaning. **Iowa State J. of Res.** v.61, p. 393-434. 1987.
- LARKIN, P.I., SCOWCROFT, W.R. Somaclonal variation a novel source of variability from well cultures for plant improvement. **Theor. Appl. Genet.**, v. 60, p. 197-214, 1981.
- 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. et al. (Eds.). **Genetic manipulation in plant breeding**. Berlin, 1986. p. 479-481.
- MARTINEZ, J.I.O. Efecto de cuatro medios de cultivo sobre el desarrollo de cuatro variedades de papa (*Solanum tuberosum*) en condicion fotoautotrófica *in vitro*. **II Reunión Nacional de la Papa. Compendio de Exposiciones. PROINPA-UPS/SEPA-PROSEMPA**. p. 43-44, 1994.
- MOYER, J.W., COLLINS, W.W. "Scarlet" sweet potato. **HortScience**, v.18, p. 111-112, 1983.
- MÜLLER, M.C. Situação atual da cultura da batata no Brasil e o Programa Nacional de Produção e Abastecimento. In: ENCONTRO NACIONAL DE PRODUÇÃO E ABASTECIMENTO DE BATATA, 2, 1988. **Anais...** CNPq/EMATER, 1988. p. 22
- MURASHIGE, T., SKOOG, F.A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, n.3, p. 473-97, 1962.
- MURASHIGE, T., NAKANO, R. Chromosome complement as a determinant of the morphogenetic potential of tobacco cells. **Ann. J. Bot.**, v.54, p.963-970, 1967.
- NAGARAJAN, P., WALTON, P.D.A comparison of somatic chromosomal instability in tissue culture regenerants from *Medicago media* Pers. **Plant Cell Rep.**, v.6, p.109-113, 1987.
- NEWBURY, H.J., FORD-LLOYD, B.V. The use of RAPD for assessing variation in plants. **Plant Growth Regulation**, v.12, p.43-51, 1993.
- NOVAK, F.J. Chromosomal characteristics of long term callus cultures of *Allium sativum* L. **Cytol.** v.46, p. 371-379, 1981.

- ORTON, T.J. Experimental approaches to the study of somaclonal variation. **Plant Mol. Biol. Rep.**, v.1, p. 67-76, 1983.
- RAO, I.M., ROCA, W.M., AYARZA, M.A. et al. Somaclonal variation in plant adaptation to acid soil in the tropical forage legume *Stylosanthes guianensis*. **Plant and Soil**, v.146: p. 21-30, 1992.
- RIETVELD, R.C., BRESSAN, R.A., HASEGAWA, P.M. Somaclonal variation in tuber disc-derived populations of potato. II. Differential effect of genotype. **Theor. Appl. Genet.**, v.87, p. 305-313, 1993.
- ROEST, S., VAN BERKEL, M., BOKELMANN, G.S. The use of an *in vitro* adventitious bud technique for mutation breeding of *Begonia hiemalis*. **Euphyt.**, v.19, p. 381-388, 1981.
- SANTOS, M.M.F.B., ANDRIGUETO, J.R., CAMARGO, C.P. **Descrição de cultivares de batata**. Brasília: Secretaria Nacional de Produção Agropecuária, Coordenadoria de Sementes e Mudas, 1986. 40 p.
- SCHMILDT, E.R. **Enraizamento In Vitro e Ex Vitro de Ramos de Mamoeiro (*Carica papaya* L.)**. Viçosa, MG: UFV, 1994. 84p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa. 1994.
- SCOWCROFT, W.R. Genetic variability in tissue culture: impact on germplasm conservation and utilization. **IBPGR Report**, october, p.10, 1984.
- SHEPARD, J.F. Protoplasts as sources of disease resistance in plants. **Ann. Rev. Phytopathol.** v.19, p. 145-155, 1981.
- SINGH, B.D., KAO, K.N., MILLER, R.A. Karyotypic changes and selection pressure in *Haplopappus gracilis* suspension cultures. **Can. J. Genet. Cytol.** v.17, p. 109-116, 1975.
- SKIRVIN, R.M., JANICK, J. Tissue culture-induced variation in scented *Pelargonium* spp. **J. Amer. Soc. Hortic. Sci.** v.101, p. 281-290, 1976a.
- SKIRVIN, R.M., JANICK, J. "Velvet Rose" *Pelargonium*, a scented geranium. **HortScience**, v.11, p. 61- 62, 1976b.
- SKIRVIN, R.M., NORTON, M., McPHEETERS, K.D., Somaclonal variation: has it proved useful for plant improvement? **Acta Horticulturae**, v.336, p. 333-340, 1993.
- SMITH, S.M., STREET, H.E. The decline of embryogenic potential as callus and suspension cultures of carrot (*Daucus carota* L.) are serially subcultured. **Ann. Bot.**, v.38, p. 233-241, 1974.

TANKSLEY, S.D., YOUNG, N.D., PATERSON, A.H. et al. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. **Biotechnol.**, v.7, p. 257-264, 1989.

WAUGH, R., POWELL, W. Using RAPD markers for crop improvement. **Tibtech**, v.10, p. 186-191, 1992.

WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J. et al. DNA polymorphisms amplified of arbitrary primers are useful as genetics markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p. 6531- 6535, 1990.

ZAIDHAFT, J.F. Irregularidades da oferta de batata-consumo no Brasil. ENCONTRO NACIONAL DE PRODUÇÃO E ABASTECIMENTO DE BATATA, 2, 1988. **Anais...** CNPq/EMATER, 1988. p. 35.