



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

**IDENTIFICAÇÃO DE VARIAÇÃO SOMACLONAL EM
BATATA
(*Solanum tuberosum* L.) ATRAVÉS DE
MARCADORES MORFOLÓGICOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Gisele Santiago

PPGA

Santa Maria, RS, Brasil

2007

**IDENTIFICAÇÃO DE VARIAÇÃO SOMACLONAL EM BATATA
(*Solanum tuberosum* L.) ATRAVÉS DE MARCADORES
MORFOLÓGICOS**

por

Gisele Santiago

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de concentração em Produção Vegetal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), com requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Agronomia**

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

Santa Maria, RS, Brasil

2007

© 2006

Todos os direitos autorais reservados a Gisele Santiago. A produção de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser realizada com autorização por escrito do autor.

Endereço: Rua Visconde de Pelotas, Nº1455, Aptº 110, Edifício Bulgária, Centro – Santa Maria – RS, 97015-040

Fone (055)30251381 ou 84033711; End. Eletr: giselesantiago@smail.ufsm.br

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

A comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

IDENTIFICAÇÃO DE VARIAÇÃO SOMACLONAL EM BATATA
(*Solanum tuberosum* L.) ATRAVÉS DE MARCADORES MORFOLÓGICOS

Elaborada por

Gisele Santiago

Com requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Agronomia

COMISSÃO EXAMINADORA:

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

Márcia Wulff Schuch, Dr^a

Dilson Antônio Bisognin, PhD

Santa Maria, 28 de fevereiro de 2007

Ao meu esposo Pedro Antonello,
Aos meus sogros Carlos Alberto e Júlia Graciela Antonello e
Ao meu cunhado Carlos Daniel Antonello

Dedico...

AGRADECIMENTOS

Agradeço à certeza de esperar em Deus e em dias melhores.

A Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pela oportunidade da realização do mestrado.

A CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

A professora Lia Rejane Silveira Reiniger pela orientação e amizade.

A professora Lenira Maria Nunes Sepel e ao professor Élgion Lúcio Loreto que deram a primeira oportunidade para que eu trilhasse o caminho da pesquisa e por sempre poder contar com vocês.

Aos professores Sidinei José Lopes e Dilson Antônio Bisognin pela co-orientação, amizade e colaboração no desenvolvimento do trabalho.

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

A minha querida amiga Joelma Dutra Fagundes pela amizade, paciência e por sempre acreditar que poderíamos vencer mais essa etapa.

Ao Marciel Redin e ao Jovani Zalamena pela ajuda fundamental na condução dos experimentos de campo.

A Betânia Brum pelo auxílio inestimável com as análises estatísticas.

Aos colegas de laboratório Andressa Flores, Cândida Eliza Manfio, Diego Pascal Golle, Geórgia Figueiredo, Aline Pains, Joana Graciela Hanauer e Daniel Waldow pela colaboração.

E a todos os amigos e colegas da Fitotecnia pela amizade, descontração e esclarecimentos das dúvidas durante o trabalho.

Obrigada !

Resumo

Dissertação de mestrado

Programa de Pós-Graduação em Agronomia

Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

IDENTIFICAÇÃO DE VARIAÇÃO SOMACLONAL EM BATATA (*Solanum tuberosum* L.) ATRAVÉS DE MARCADORES MORFOLÓGICOS

AUTORA: Gisele Santiago

ORIENTADORA: Lia Rejane Silveira Reiniger

Local e data da defesa: Santa Maria, 28 de fevereiro de 2007

A batata (*Solanum tuberosum* L.) é a quarta cultura em importância econômica no mundo depois do trigo, do milho e do arroz. Conseqüentemente, a pesquisa com esta espécie pode trazer benefícios para um considerável número de pessoas. A cultura de tecidos tem contribuído no melhoramento genético da batata no sentido de obtenção de plantas livres de vírus e micropropagação de genótipos elite. No entanto, plantas regeneradas a partir de cultura de tecidos podem exibir variação em importantes caracteres agrônômicos. A variação induzida por cultura de tecidos é chamada de variação somaclonal. A ocorrência de variação somaclonal pode ser identificada ainda *in vitro* por parâmetros auxiliares como a taxa de multiplicação. Em campo, o emprego de marcadores morfológicos pode ser usado para identificar somaclones. O trabalho teve como objetivos: avaliar o comportamento *in vitro* das cultivares Asterix e Macaca de batata através da taxa de multiplicação observada durante um período de oito meses. Identificar variantes somaclonais provenientes do cultivo *in vitro* das cultivares Asterix e Macaca através de marcadores morfológicos; avaliar o efeito do genótipo, do tempo de subcultivo e do tipo de explante sobre a ocorrência de variantes somaclonais. Foi empregada a taxa de multiplicação na tentativa de identificar a ocorrência de variação somaclonal na cultivares de batata Asterix e Macaca com três fontes de explantes (ápice caulinar, segmento nodal e calo) e dois tempos de subcultivo (70 meses-clone velho e 12 meses-clone novo). A caracterização morfológica das plantas e tubérculos básicos foi efetuada segundo metodologia descrita por COLLARES (2002) baseada nos descritores mínimos da batata. A taxa de multiplicação da cultivar Macaca foi maior que a de Asterix e o comportamento da de Macaca oscilou entre valores extremos diferente do observado em Asterix. A taxa de multiplicação *in vitro* depende da cultivar. Através da caracterização morfológica foi possível identificar que as cultivares Asterix e Macaca apresentaram comportamento diferente quanto à estabilidade dos caracteres morfológicos ao passarem por cultivo *in vitro*. O explante derivado de calo apresentou a maior ocorrência de variantes somaclonais, tanto para os tratamentos que incluíram Asterix como Macaca. Os tempos de subcultivo de 70 meses e 12 meses não foram adequados para manutenção dos caracteres diagnósticos das cultivares Asterix e Macaca devido à ocorrência de variantes somaclonais. Foi possível identificar variantes somaclonais nos tratamentos que incluíram Asterix e Macaca através dos descritores mínimos da batata.

Palavras-chaves: *Solanum tuberosum* L., variação somaclonal, marcadores morfológicos.

ABSTRACT
MASTER thesis
Graduation Program in Agronomy
Universidade Federal de Santa Maria – RS, Brazil

IDENTIFICATION OF SOMACLONAL VARIATION IN POTATO (*Solanum tuberosum* L.) THROUGH MORPHOLOGICAL MARKERS

AUTHOR: Gisele Santiago
ADVISOR: Lia Rejane Silveira Reiniger
Location and date of presentation: Santa Maria, february 28th , 2007

The potato (*Solanum tuberosum* L.) is the fourth culture in economic importance in the world after the wheat, of the maize and the rice. Consequently, the research with this species can bring benefits for a considerable number of people. Tissue culture has contributed in the genetic improvement of the potato in the direction of attainment of free plants of virus and micropropagation of elite genotypes. However, plants regenerated from tissue culture can show variation in agronomic characteristics important. The induced variation by tissue culture is called somaclonal variation. The occurrence of somaclonal variation can be identified *in vitro* for parameters still auxiliary as the multiplication rate. In field, the use of morphologic markers can be used to identify somaclones. The work had as objective: To evaluate the behavior *in vitro* of cultivating them of potato Asterix and Macaca through the multiplication rate observed during a period of eight months. Identify variant somaclonais proceeding of the culture *in vitro* of them cultivate Asterix and Macaca through morphological markers. To evaluate the genotype effect, culture-age effect and the type of explant on the occurrence of somaclones. Multiplication rate was used in the attempt to identify the occurrence of somaclonal variation in cultivating of potato Asterix and Macaca with three sources of explantes (apex stems, stems and callus) and two ages of subculture (70 months- old clone and 12 months- new clone). The morphological characterization of the plants and basic tubercles was effected according to described methodology for COLLARES (2002) based in the minimum describers of the potato (*Solanum tuberosum* L.). The multiplication rat of cultivating Macaca was greater that of Asterix and the behavior of the multiplication rate of Macaca oscillated between extreme values different of the observed one in Asterix. The rate multiplication depends on cultivar. Through the morphological characterization it was possible to identify that to cultivate them Asterix and Macaca had presented different behavior how much to the stability of the morphologic characteristics when passing for culture *in vitro*. The explante derived from callus in such a way presented the biggest occurrence of somaclonais variants for the treatments that had included Asterix as Macaca. The age of subculture of 70 months and 12 months had not been adjusted for maintenance of disgnostic characteristics of them to cultivate Asterix and Macaca due to occurrence of somaclones. It was possible to identify variant somaclonais in the treatments that had included Asterix and Macaca through the minimum describers of the potato.

Key Words: somaclonal variation, *Solanum tuberosum* L., morphological markers.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Taxa de multiplicação de explantes de ápice caulinar, segmento nodal e derivado de calo das cultivares Asterix e Macaca de batata durante 240 dias de observação. Santa Maria, RS, 2006.....30

CAPÍTULO II

Tabela 1. Tipo de explante e clones originados de micropropagação e avaliados para características morfológicas de planta, tubérculo, inflorescência e brotos das cultivares Asterix e Macaca de batata. Santa Maria, RS, 2006.....49

Tabela 2. Descritores Mínimos da Batata (*Solanum tuberosum* L.) empregados na caracterização morfológica de somaclones das cultivares Asterix e Macaca. Santa Maria, RS, 2006.....49

Tabela 3. Características morfológicas para as quais foram identificados variantes somaclonais nos tratamentos com a Asterix de acordo com a caracterização feita por Collares (2002) para a cultivar através de descritores mínimos da batata. Santa Maria, RS, 2006.....52

Tabela 4. Características morfológicas para as quais foram identificados variantes somaclonais nos tratamentos com a cultivar Macaca em comparação descrição de algumas características feitas por Bisognin (1996) e Binsfeld (1992). Santa Maria, RS, 2006.....53

Tabela 5. Formato do broto de clones velhos e novos de ápice caulinar, segmento nodal e derivado de calo das cultivares Asterix e Macaca de batata. Santa Maria, RS, 2006.....53

Tabela 6. Intensidade de primórdios radiculares de clones velhos e novos de ápice caulinar, segmento nodal e derivado de calo das cultivares Asterix e Macaca de batata. Santa Maria, RS, 2006.....54

Tabela 7. Comprimento da brotação lateral de clones velhos e novos de ápice caulinar, segmento nodal e derivado de calo das cultivares Asterix e Macaca de batata. Santa Maria, RS, 2006.....	54
Tabela 8. Pubescência da base do broto de clones velho e novo das cultivares Asterix e Macaca de batata. Santa Maria, RS, 2006.....	55
Tabela 9. Coloração da base do broto de clones velhos e novos de ápice caulinar, segmento nodal e derivado de calo das cultivares Asterix e Macaca de batata. Santa Maria, RS, 2006.....	55
Tabela 10. Pigmentação da haste da planta de clones velhos e novos de ápice caulinar, segmento nodal e derivado de calo das cultivares Asterix e Macaca de batata. Santa Maria, RS, 2006.....	55
Tabela 11. Intensidade da pigmentação da parte interna da corola de clones velhos e novos de ápice caulinar, segmento nodal e derivado de calo das cultivares Asterix e Macaca de batata. Santa Maria, RS, 2006.....	56
Tabela 12. Pigmentação do pedúnculo floral em explantes de ápice caulinar, segmento nodal e derivado de calo das cultivares Asterix e Macaca de batata. Santa Maria, RS, 2006.....	56
Tabela 13. Tipo de planta em relação à folhagem dos explantes de ápice caulinar, segmento nodal e derivado de calo em clones velho e novo das cultivares Asterix e Macaca de batata. Santa Maria, RS, 2006.....	57
Tabela 14. Ondulação da borda dos folíolos de clones velhos e novos de ápice caulinar, segmento nodal e derivado de calo das cultivares Asterix e Macaca de batata. Santa Maria, RS, 2006.....	57
Tabela 15. Hábito de crescimento da planta de clones velhos e novos de ápice caulinar, segmento nodal e derivado de calo das cultivares Asterix e Macaca de batata. Santa Maria, RS, 2006.....	58

Tabela 16. Coalescência dos folíolos de clones velho e novo das cultivares Asterix e Macaca de batata. Santa Maria, RS, 2006.....	58
Tabela 17. Efeito principal do formato do tubérculo entre as cultivares Asterix e Macaca de batata. Santa Maria, RS, 2006.....	59
Tabela 18. Efeito principal da aspereza da película do tubérculo entre as cultivares Asterix e Macaca de batata. Santa Maria, RS, 2006.....	59
Tabela 19. Cor da película de tubérculos dos explantes de ápice caulinar, segmento nodal e derivado de calo em clones velho e novo das cultivares Asterix e Macaca de batata. Santa Maria, RS, 2006.....	60
Tabela 20. Intensidade da coloração da base do broto de clones velhos e novos de ápice caulinar, segmento nodal e derivado de calo das cultivares Asterix e Macaca de batata. Santa Maria, RS, 2006.....	60
Tabela 21. Asas da planta de clones velho e novo das cultivares Asterix e Macaca de batata. Santa Maria, RS, 2006.....	61
Tabela 22. Asas da planta de clones velho e novo das cultivares Asterix e Macaca de batata. Santa Maria, RS, 2006.....	61
Tabela 23. Inserção das folhas de clones velhos e novos de ápice caulinar, segmento nodal e derivado de calo das cultivares Asterix e Macaca de batata. Santa Maria, RS, 2006.....	61
Tabela 24. Fechamento das folhas de clones velhos e novos de ápice caulinar, segmento nodal e derivado de calo das cultivares Asterix e Macaca de batata. Santa Maria, RS, 2006.....	62

Tabela 25. Freqüência de folíolos secundários de clones velhos e novos de ápice caulinar, segmento nodal e derivado de calo das cultivares Asterix e Macaca de batata. Santa Maria, RS, 2006.....62

Tabela 26. Cor da polpa de tubérculos de clones velhos e novos de ápice caulinar, segmento nodal e derivado de calo das cultivares Asterix e Macaca de batata. Santa Maria, RS, 2006.....63

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Taxa de multiplicação *in vitro* das cultivares Asterix e Macaca durante o tempo observado de 240 dias em função do seno. 30

Figura 2. Taxa de multiplicação *in vitro* observada durante o período de oito meses de subcultivo. (a) Asterix, clone velho (T1) e explantes de ápice (E1), segmento nodal (E2) e calo (E3); (b) Asterix, clone novo (T2) e tipos de explantes; (c) Macaca, clone velho e tipos de explantes e (d) Macaca, clone novo e tipos de explantes. 31

CAPÍTULO II

Figura 1. A) Tratamento com Asterix apresentando haste principal sem pigmentação e asas retas. B) Tratamento com Asterix onde ocorreram flores com coloração violeta ametista claro. C) Tratamento com Macaca registrando ocorrência de haste principal pigmentada e asas onduladas. D) Tratamento com Macaca onde se identificou flor com alteração no número de lóbulos (pentâmero) e variação na intensidade da coloração. 63

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A - Descrição qualitativa para os 12 tratamentos utilizando os descritores mínimos da batata. Santa Maria, RS, 2006. 72

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE APÊNDICES	13
INTRODUÇÃO GERAL	15
REVISÃO DE LITERATURA	17
CAPÍTULO I	23
RESUMO	23
ABSTRACT	24
INTRODUÇÃO	25
MATERIAL E MÉTODOS	26
RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
CONCLUSÃO	29
CAPÍTULO II	32
RESUMO	32
ABSTRACT	33
INTRODUÇÃO	34
MATERIAL E MÉTODOS	36
RESULTADOS	37
DISCUSSÃO	43
CONCLUSÃO	47
CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
REFERÊNCIAS	65

IDENTIFICAÇÃO DE VARIAÇÃO SOMACLONAL EM BATATA (*Solanum tuberosum* L.) ATRAVÉS DE MARCADORES MORFOLÓGICOS

INTRODUÇÃO GERAL

A batata é a quarta cultura em importância econômica no mundo depois do trigo, milho e arroz. No Brasil em 2006, foram produzidos 3,125 milhões de toneladas em uma área de 140,8 mil hectares com produtividade média de 20,865 kg/ha. O Rio Grande do Sul detém 9,1% da produção nacional, menor apenas que a de Minas Gerais (32,1%), São Paulo (26,6%) e Paraná (17,5%). Embora ocupe posição de destaque na produção nacional de batata, o Estado vem diminuindo sua participação em termos de produtividade. A queda da produtividade está relacionada à diminuição da área cultivada e à utilização de batata-semente de baixa qualidade fitossanitária.

A perda de qualidade fitossanitária, em culturas de propagação vegetativa como a batata, ocorre devido à degenerescência das culturas. A recuperação de plantas livres de vírus pode ser feita através cultura de ápices caulinares, que é uma das técnicas da cultura de tecidos de plantas. Geralmente, a cultura de ápices caulinares preserva a identidade genotípica das plantas regenerantes, devido à estabilidade genética das células meristemáticas.

No entanto, sabe-se que a cultura de tecidos pode introduzir variabilidade genética ao material micropropagado. A variação induzida pela cultura de tecidos em plantas regeneradas é chamada de variação somaclonal. A variação somaclonal pode ser uma vantagem quando se busca o aumento da variabilidade genética em culturas de base genética estreita ou uma desvantagem quando empregada na multiplicação de genótipos elite devido à perda dos caracteres agrônômicos importantes. Existem várias metodologias e técnicas empregadas na identificação de variação somaclonal tais como: avaliação da taxa de multiplicação, marcadores morfológicos, bioquímicos e moleculares.

Este trabalho tem como objetivos:

- Avaliar a taxa de multiplicação *in vitro* das cultivares de batata Asterix e Macaca através da taxa de multiplicação observada durante um período de oito meses de subcultivo.
- Identificar variantes somaclonais provenientes do cultivo *in vitro* das cultivares Asterix e Macaca através de marcadores morfológicos.
- Avaliar o efeito do genótipo, do tempo de subcultivo e do tipo de explante sobre a ocorrência de variantes somaclonais.

REVISÃO DE LITERATURA

Cultura de Ápices Caulinares e Micropropagação

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

A recuperação de plantas livres de vírus pode ser efetuada através da cultura de ápices caulinares. Essa técnica utiliza o ápice caulinar, que compreende o meristema apical com primórdios foliares subjacentes e pode incluir também as folhas emergentes (CLARK, 1997). As células do meristema apical estão divididas conceitualmente em três regiões: a zona central (células meristemáticas indiferenciadas) flanqueada em ambos os lados pela zona periférica que é flanqueada externamente pela zona de formação de órgãos. As três regiões estão sob o meristema em arco que dará origem ao sistema vascular (este ainda sem conexão com o meristema apical) e demais estruturas da haste da planta (CLARK, 1997). O emprego do ápice caulinar para obtenção de plantas livres de vírus baseia-se na premissa de que a concentração de patógenos diminui, progressivamente, no corpo da planta com o decréscimo do estágio de desenvolvimento das folhas, chegando a ser nula no ápice (TORRES et al., 1998).

A utilização da cultura de ápices caulinares é importante em plantas de propagação vegetativa, tais como a batata (*Solanum tuberosum* L.), batata-doce (*Ipomea batatas*), alho (*Allium sativum*) e mandioca (*Manihot esculenta*), pois proporciona a produção de mudas de alta qualidade fitossanitária e estabilidade genética.

A busca por qualidade fitossanitária em plantas de batata iniciou com Morel & Martin em 1955 que obtiveram plantas regeneradas *in vitro* a partir de ápices caulinares livres dos vírus A, X e Y (TORRES et al., 1998). Posteriormente, Sip (1972) obteve plantas livres do vírus S da batata (PVS) quando utilizou meristemas com tamanho variando entre 0,3 a 0,5 mm de comprimento. Após a limpeza clonal, os explantes são multiplicados *in vitro* pela cultura de partes aéreas, considerada capaz de perpetuar a fidelidade genética do material propagado (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

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

Ápices caulinares micropropagados preservam, na maioria dos casos, a identidade do genótipo regenerado, uma vez que as células do meristema apical mantêm mais uniformemente a estabilidade genética (TORRES et al., 1998). Todavia, não deve ser ignorado que a cultura de tecidos pode conduzir à ampliação da variabilidade genética. As variações induzidas por cultura de tecidos em plantas regeneradas são chamadas de variação somaclonal (LARKIN & SCOWCROFT, 1981).

Origem genética e epigenética da variação somaclonal

A variação somaclonal é de natureza imprevisível, podendo ser herdável (genética) ou não herdável (epigenética). Os variantes somaclonais, quando de natureza herdável, podem apresentar tanto caracteres agrônômicos importantes para o melhoramento vegetal como perda dos mesmos. Algumas das mudanças genéticas são devidas a alterações no nível de ploidia, rearranjos e recombinações cromossômicas, migração de elementos de transposição e mutação gênica (JAIN, 2001; KAEPLER et al., 2000).

As alterações no nível de ploidia das células provenientes de cultura de tecidos, principalmente as derivadas de calo, podem causar alterações fenotípicas na anatomia, na fisiologia e no metabolismo das plantas regeneradas. A variação no nível de ploidia, seja o aumento ou a diminuição, pode ser estimulada pelo ambiente de cultivo ou ser uma condição existente *in vivo* na planta. Em algumas espécies diplóides de orquídeas, como por exemplo, *Spathoglottis plicata*, os tecidos diferenciados apresentam células diplóides normais ($2n=2X$) junto a células que passaram por endoduplicações, isto é, o DNA mitótico replicado nas células somáticas não é seguido por ciclo de divisão celular, modificando o nível de ploidia (YANG & LOH, 2004). Essa espécie apresenta uma condição mixoplóide *in vivo* e mesmo sem passar pelo estágio de calo, se esses tecidos forem utilizados como

fonte de explante podem aumentar a incidência de variantes somaclonais (YANG & LOH, 2004).

Rearranjos e recombinações cromossômicas são comuns em plantas regeneradas de cultura de tecidos, o que é consistente com a elevada frequência de variação fenotípica observada. Anormalidades citogenéticas, incluindo eventos de quebras cromossômicas e rearranjos cromossômicos, foram encontrados, tanto em cultura de células como entre plantas regeneradas de cultura de tecidos. Uma análise comparativa entre aveia e milho mostrou que eventos de quebra ocorrem com mais frequência do que mudança no nível de ploidia (OLHOFT & PHILLIPS, 1999). As translocações foram às anormalidades cromossômicas mais comuns observadas, seguidas por inversão e inserção/deleção que também ocorrem. A maioria dos eventos de quebras ocorria entre heterocromatina distal e o centrômero em milho ou dentro da heterocromatina centromérica em aveia. Essas observações levaram à formulação da hipótese de que a replicação da heterocromatina é posterior em células cultivadas *in vitro*, levando a eventos de pontes e quebras cromossômicas (OLHOFT & PHILLIPS, 1999). Os estudos sobre eventos de quebras cromossômicas apontam evidências de que o controle do ciclo celular normal, que evita a divisão celular antes da replicação completa dos cromossomos, pode estar perturbado pelas condições da cultura *in vitro*.

A migração de elementos de transposição ou transposons pode levar a ocorrência de variantes somaclonais. A constatação de que elementos de transposição são ativados durante a cultura de tecidos foi proposta, primeiramente, por Ahloowalia & Sherington (1985) estudando linhagens de trigo. O estresse causado pela cultura de tecidos parece ser um ambiente propício para ativar em plantas ou células elementos que fora da cultura de tecidos estariam em repouso (OLHOFT & PHILLIPS, 1999). Além dos elementos de transposição, os retrotransposons que se movem via RNA podem ser mobilizados durante a cultura de tecidos causando variações no genoma da planta. Em arroz, Hirochika et al. (1996) encontraram 15 novos retrotransposons da família *Tos* (*Tos* 6 a *Tos* 20) que estavam inativos (ou quase inativas) sob condições normais de crescimento e desenvolvimento e detectaram a ativação dos retrotransposons *Tos* 10, *Tos* 17 e *Tos* 19 durante o cultivo *in vitro*. Esses autores encontraram que o elemento *Tos* 17 aumentava o número de cópias para 5 a 30 cópias transpostas nas plantas regenerantes com o prolongamento do tempo de subcultivos.

Mudanças fenotípicas encontradas em plantas regeneradas e na progênie podem ser observadas através de mutações qualitativas, que resultam da mutação de genes de herança Mendeliana simples freqüentemente recessivos. Alguns desses mutantes foram observados em milho e incluem fenótipos com deficiência em clorofila, nanismo e estruturas reprodutivas alteradas (PHILLIPS et al., 1994). Mutações gênicas em plantas derivadas de cultura de tecidos também têm sido caracterizadas em nível de DNA e proteínas. Em plantas de milho regeneradas de cultivo *in vitro*, alelos mutantes *Adh1* foram identificados sendo devido a duas mutações de ponto independentes (KAEPLER et al., 2000).

Outros tipos de variação são devido a alterações epigenéticas que são de caráter transitório não herdável. Um dos principais mecanismos de variação epigenética é a alteração na metilação do DNA. A metilação do DNA é um mecanismo que indica se um gene está transcricionalmente ativo ou inativo. Em eucariotos, a principal função conhecida da metilação de DNA está ligada ao silenciamento gênico transcricional e pós-transcricional (LEWIN, 1998). A variação no padrão de metilação é considerada como um mecanismo básico para mutagênese induzida em cultura de tecidos, devido à elevada freqüência de variação fenotípica quantitativa, à ativação de elementos de transposição, a eventos de quebra da heterocromatina e à freqüência de mudança de seqüência observada em plantas regeneradas (KAEPLER et al., 2000). A variação nos padrões de metilação foi pesquisada por Kaepler et al., (1993) que identificaram variação substancial nos padrões de metilação de DNA entre famílias de regenerantes de milho da linhagem A188 derivadas de duas origens de embriões somáticos. Cada uma das famílias de plantas regeneradas tinha padrões de metilação únicos identificados através de 20 sondas cópia simples. Nesse estudo, uma freqüência de 33% das famílias não segregou entre a progênie R1, indicando que mudanças eram heterozigotas no regenerante primário. Também a hipometilação foi muito mais freqüente do que a hipermetilação.

Outro fenômeno considerado de origem epigenética seria a habituação (MEINS, 1983). A habituação, provavelmente provocada pela expressão gênica, envolvendo sítios básicos de síntese nas células. Por exemplo, a necessidade exógena de hormônios, como a auxina ou citocinina para células de fumo em cultura, pode ser perdida e as células se multiplicam sem a necessidade de adição de hormônios no meio.

Fatores associados à variação somaclonal

A ocorrência de variação somaclonal está associada a fatores como o genótipo, tipo de explante, tempo de subcultivo e meio de cultura (OLHOFT & PHILLIPS, 1999; JAIN, 2001).

As razões pelas quais alguns genótipos apresentam maior estabilidade genética ao passar pela cultura de tecidos ainda não são bem compreendidas. No entanto, o sucesso na iniciação, crescimento e diferenciação de cultivos *in vitro* varia entre genótipos em uma determinada espécie. O efeito da estabilidade entre genótipos que passam por cultura de tecidos tem sido tema de estudo em culturas como a aveia, o alho e a batata. Segundo MacCoy et al. (1982) as cultivares de aveia Lodi e Tippecanoe apresentaram diferenças quanto a estabilidade genética, as plantas regeneradas da cultivar Lodi mostraram 49% de anormalidades cromossômicas enquanto que a cultivar Tippecanoe apresentou somente 12%. Em alho, Al-Zahim et al. (1999) buscando variabilidade genética através de variantes somaclonais constataram que dentre as cinco cultivares avaliadas, Solent White apresentava uma frequência de variação de 21% em relação ao nível de ploidia de plantas regeneradas a partir de embriões somáticos. Já em batata, Bordallo et al. (2004) buscando genótipos estáveis para produção de sementes sintéticas constataram que dentre as cinco cultivares avaliadas, a cultivar Baronesa apresentou o mais alto nível de variação somaclonal e observaram que a cultivar Contenda o menor.

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

geral, são mais estáveis geneticamente se comparadas com as plantas regeneradas a partir de calo (ILLG, 1991).

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

Outro fator importante que pode aumentar a frequência de variantes somaclonais é a composição do meio de cultura. Existem evidências de que nutrientes não balanceados deficiências nutricionais e reguladores de crescimento em elevadas concentrações causam mutações. A deficiência em fósforo, por exemplo, também perturba o ciclo celular, pois esse elemento, juntamente com ciclinas, regula esse processo, uma vez que as quinases dependentes de ciclinas quando fosforiladas no sítio de ativação enviam a mensagem para iniciar a síntese de DNA, se nutrientes básicos estão em deficiência no meio de cultura pode ocorrer desequilíbrio de todo o ciclo celular (TAIZ & ZAIGER, 2002). Em estudo comparativo da estabilidade de genótipos de batata Bordallo et al. (2004) observaram que o regulador de crescimento Picloran promoveu aumento no número de variantes somaclonais nos diferentes genótipos quando comparado a auxina ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).

CAPÍTULO I

TAXA DE MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DAS CULTIVARES ASTERIX E MACACA DE BATATA

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento *in vitro* das cultivares Asterix e Macaca de batata através da taxa de multiplicação. Ápices caulinares, isolados em 2002 (clones novos), com 12 meses de subcultivo e clones em subcultivo há 70 meses (clones velhos) foram avaliados a cada 30 dias durante oito meses para a taxa de multiplicação *in vitro*. Um frasco de 10 mL, preenchidos com 20% de meio base MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962), 3,0% de sacarose, 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 0,6% de ágar, em pH 5,7, contendo um explante (ápice caulinar, segmento nodal ou derivado de calo) constituiu a unidade experimental. As subculturas foram realizadas em meio fresco de igual composição ao anterior, porém acrescidos de 1mg.L⁻¹ benzilaminopurina (BAP); 0,01mg.L⁻¹ ácido α -naftaleno acético (ANA); e 0,1mg.L⁻¹ ácido giberélico (GA₃). As culturas foram expostas em sala de crescimento à temperatura de 25^o±3^o C, intensidade luminosa de 20 μ mol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16h de luz. O experimento foi conduzido em delineamento blocos ao acaso, esquema tetrafatorial (cultivar x tempo de subcultivo x explante x tempo observado) com oito repetições para a variável taxa de multiplicação *in vitro*. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro. As cultivares Asterix e Macaca apresentaram respectivamente valores de 3,65 e 8,62 para taxa média de multiplicação. Sendo assim, a taxa de multiplicação *in vitro* depende da cultivar empregada.

Palavras-chave: batata, taxa de multiplicação, variação somaclonal.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the behavior *in vitro* of cultivating them of potato Asterix and Macaca through the multiplication rate. Apexes stems, isolated in 2002 (clones new), and clones in subcultivo has 70 months (clones old) had been evaluated to each 30 during eight months, being evaluated the multiplication tax *in vitro*. A bottle of 10 mL, filled with 20% of half base MS (MURASHIGE and SKOOG, 1962), 3.0% of sucrose, 100mg. L⁻¹ of myoinositol, 0.6% of agar, in pH 5,7, contend a uninodal segment constituted the experimental unit. The subcultures had been carried through in cool medium of equal composition to the previous one, however increased of benzylaminopurine (BA) 1mg.L⁻¹; α -naphthalenacetic acid (NAA) 0,01mg. L⁻¹; gibberellic acid (GA3) 0,1mg. L⁻¹. In the growth room, the cultures had been made use to and 3° C, luminous intensity of 20±perhaps displayed to the temperature of 25° illumination of $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and fotoperíodo of 16h of light. The experiment was lead in a completely randomized design, trifatorial project (cultivar x time of subcultivo x explante) with eight repetitions for the changeable tax of multiplication *in vitro*. The data had been submitted to the variance analysis and the averages had been compared by the test of Tukey in level of 5% of error probability. To cultivate them Asterix and Macaca had presented values 3,65 and 8,62 for average multiplication rate. Thus, to cultivate them and explantes had presented different behavior how much the of multiplication rate *in vitro*.

Key words: potato, growth rate, somaclonal variation.

INTRODUÇÃO

A batata (*Solanum tuberosum* L.) é a quarta cultura em importância econômica no mundo depois do trigo, do milho e do arroz; é cultivada em mais de 125 países e consumida por mais de um bilhão de pessoas (NASRIN, 2003). Conseqüentemente, a pesquisa com esta espécie pode trazer benefícios para um considerável número de pessoas.

A produção Brasileira de batata na safra de 2006 foi de 3,125 milhões de toneladas em uma área de 140,8 mil hectares com produtividade média de 20,865 kg/ha (IBGE, 2006). A produção de batata no Brasil concentra-se, principalmente, nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul. Minas Gerais é o maior produtor Brasileiro (32,1% da safra nacional), seguido de São Paulo (26,6%), Paraná (17,5%) e Rio Grande do Sul (9,1%) (IBGE, 2005). No Rio Grande do Sul, a queda na produção está relacionada à diminuição da área cultivada e utilização de batata-semente de baixa qualidade fitossanitária, sendo comum a utilização de semente própria pelos agricultores (IBGE, 2005; SECHIN, 1998).

A batata é uma cultura de propagação vegetativa que depende de material de alta qualidade fitossanitária, devido à suscetibilidade a doenças, principalmente, viroses. A obtenção de plantas livres de vírus ou limpeza clonal é conseguida através da cultura de tecidos. A cultura de tecidos compreende o crescimento e a multiplicação de células, tecidos e/ou órgãos sob condições controladas de nutrição, reguladores de crescimento, assepsia e fatores ambientais (CALDAS et al., 1998).

Uma das técnicas da cultura de tecidos que possibilita a limpeza clonal é a cultura de ápices caulinares. O meristema apical caulinar é formado por um conjunto de células, onde parte permanece indiferenciada e outra parte é direcionada à formação de órgãos e eventual diferenciação. Uma das principais vantagens dessa técnica no processo de recuperação de plantas livres de vírus é, na maioria dos casos, a manutenção do genótipo regenerado, devido às células do meristema manterem mais uniformemente a estabilidade genética (MURASHIGE, 1974; TORRES et al., 1998). Após a limpeza clonal, os explantes são multiplicados pela cultura de partes aéreas objetivando manter a fidelidade genética do material propagado (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

No entanto, sabe-se que a cultura de tecidos pode introduzir variabilidade genética ao material micropropagado. A variação induzida pela cultura de tecidos em plantas

regeneradas é chamada variação somaclonal (LARKIN & SCOWCROFT, 1981). A variação somaclonal é de natureza imprevisível e pode ser herdável (genética) ou não-herdável (epigenética). Sabe-se que a ocorrência de variação somaclonal pode ser originada devida a mutação e amplificação gênica, rearranjos e recombinação cromossômica, migração de elementos de transposição, alteração nos níveis de metilação do DNA e mudança no nível de ploidia (JAIN, 2001). Os principais fatores associados à ocorrência de variação somaclonal são o genótipo, tipo de explante, idade da cultura e meio de cultura (OLHOFT & PHILLIPS, 1999; JAIN, 2001).

A variação somaclonal pode ser uma ferramenta valiosa para fins de melhoramento quando se busca ampliar a variabilidade genética. No entanto, quando o objetivo é a manutenção de genótipos elite esse tipo de variação é indesejado.

A taxa de multiplicação pode servir como parâmetro auxiliar na detecção da variação somaclonal, no sentido de que incrementos neste índice podem indicar ocorrência de somaclones.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento *in vitro* das cultivares Asterix e Macaca de batata através da taxa de multiplicação de explantes de ápice caulinar, segmento nodal e derivado de calo de clones velho e novo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Clones regenerados a partir do isolamento de ápices caulinares na primavera de 2002, que estavam sendo subcultivados há 12 meses, denominados clones novos, e clones em subcultivo há 70 meses - clones velhos - foram micropropagados durante oito meses sendo avaliada a taxa de multiplicação *in vitro*, no Laboratório de Cultura de Tecidos do Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Ambos os clones são provenientes de diferentes plantas matrizes das cultivares Asterix e Macaca, previamente indexadas para as principais viroses, e foram cultivados em frascos com capacidade de 10 mL, preenchidos com 20% de meio base MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962) contendo 3,0% de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 0,6% de ágar, em pH 5,7. Após a regeneração, as partes aéreas foram micropropagadas e os explantes (ápices caulinares e segmentos nodais) foram transferidos para frascos contendo meio fresco de igual composição ao

anterior, porém acrescido dos fitorreguladores: 6-benzilaminopurina (BAP), 1 mg L⁻¹; ácido α -naftaleno acético (ANA), 0,01 mg L⁻¹; e ácido giberélico (GA₃), 0,1 mg L⁻¹. A partir deste primeiro subcultivo, a cada 30 dias, as culturas foram micropropagadas e inoculadas em frascos com meio fresco de idêntica composição. Na sala de crescimento, as culturas foram dispostas ao acaso e expostas à temperatura de 25 \pm 3 $^{\circ}$ C, intensidade luminosa de iluminação de 20 μ mol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16h de luz.

A avaliação do comportamento *in vitro* das culturas derivadas de diferentes explantes (ápices caulinares, segmentos nodais e calos) e clones das duas cultivares foram efetuadas a cada 30 dias após o início do experimento, imediatamente antes da micropropagação e inoculação dos explantes em meio fresco.

A taxa de multiplicação foi obtida através do somatório do número de ápices caulinar com o número de segmentos nodais sobre o total de explantes avaliados no período (Taxa de Multiplicação = n $^{\circ}$ de ápices caulinares + n $^{\circ}$ de segmentos nodais/Total de Explantes).

O experimento foi conduzido em delineamento blocos ao acaso, esquema tetrafatorial (cultivar x tempo de subcultivo x explante x tempo observado) com oito repetições para a variável taxa de multiplicação *in vitro*. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro com o auxílio do Software científico NTIA (EMBRAPA, 1997). Foi realizada análise complementar através do Software Table Curve buscando uma função que se ajustasse a taxa de multiplicação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A taxa de multiplicação *in vitro* variou com a cultivar (Tabela 1). As cultivares Asterix e Macaca apresentaram taxas médias de multiplicação estatisticamente significativas de 3,65 e 8,62, respectivamente (Tabela 1). As diferenças entre os resultados para taxa média de multiplicação entre as cultivares podem ser devidas ao efeito do genótipo. Segundo Mantell et al. (1994) as taxas de multiplicação variam com o genótipo e o tipo de explante empregado e refletem a capacidade de regeneração a cada subcultivo. Em estudo buscando meio de isolamento e multiplicação, Pereira & Fortes (2004) encontraram taxas médias variando entre 2,3 a 8,4 para as cultivares Baronesa, Eliza e Pérola. O resultado da taxa média de

multiplicação observado para a cultivar Macaca estão de acordo com dados encontrados por Pereira & Fortes (2003).

O tipo de explante utilizado não apresentou diferenças significativas para a taxa de multiplicação *in vitro*. Explantes de ápice caulinar e segmento nodal mostraram taxas médias de multiplicação de 6,74 e 6,94, respectivamente, enquanto que explantes derivados de calo apresentaram uma taxa média de 4,72 (Tabela 1) o que concorda com dados obtidos por Pereira & Fortes (2004).

A taxa de multiplicação das cultivares Asterix e Macaca apresentou comportamento de uma senóide, mostrando picos de multiplicação seguido de redução no período seguinte, esse comportamento foi observado durante todo período da avaliação (Figura 1). Através das taxa médias de multiplicação observou-se que a taxa de multiplicação para Asterix clone novo e velho de ápice caulinar variou entre valores de 2,2 a 4,6 no clone novo e 3,32 e 5,04 no clone velho (Figura 2a e 2b). Já a taxa de multiplicação encontrada para Asterix clone novo e velho de segmento nodal variou entre 2,2 a 4,5 e 3,3 a 4,4, respectivamente. Em Asterix clone novo e velho de calo foi observada uma taxa de multiplicação variando de zero a 5,2 e zero a 4,6, respectivamente. Para Macaca clone novo e velho de ápice caulinar foi observada uma taxa de multiplicação variando entre 6,4 a 16,3 e 3,9 a 18,03, respectivamente (figura 2c e 2d). Os valores da taxa de multiplicação para Macaca clone novo e velho de segmento nodal variaram entre 4,3 a 16,4 e 3,2 e 16,9. A taxa de multiplicação encontrada para Macaca clone novo e velho calo variou entre zero a 11,3 e zero a 12,8.

Pode-se constatar pelos resultados obtidos que a taxa de multiplicação da cultivar Macaca variou entre valores de zero a 18,03 ao longo dos oito meses de subcultivo (Figura 2c e 2d). Já a cultivar Asterix não apresentou oscilação entre valores extremos para a taxa de multiplicação (Figura 2a e 2b). Observa-se que a cultivar Macaca apresentou uma taxa de multiplicação até quatro vezes maior que Asterix. Segundo Withers & Williams (1998) altas taxas de multiplicação *in vitro* devem ser evitadas quando se busca manutenção da estabilidade do genótipo micropropagado. Sabe-se que plantas regeneradas a partir de cultura de tecidos são suscetíveis a indução de variabilidade genética gerada por variação somaclonal (LARKIN & SCOWCROFT, 1981).

A variação na taxa de multiplicação é uma evidência indireta de variação somática em culturas de calo de uva e de tabaco (MURASHIGE & NAKANO, 1965).

Os resultados obtidos para taxa de multiplicação mostraram que durante os oito meses de subcultivo os fatores cultivar, tipo de explante e tempo de subcultivo ainda não apresentaram sinais de diminuição no crescimento e na organogênese, isto é, as células não perderam a totipotência. Diferente do que acontece em cultura de calo de tabaco quando subcultivadas por um período de um ano e meio para formação de raízes e de um a três anos para a formação de gemas, onde ocorreu perda da totipotência (MURASHIGE & NAKANO, 1965). Embora as culturas avaliadas mantivessem o potencial morfogênético, é importante ressaltar que a variação na taxa de multiplicação, principalmente, para a cultivar Macaca pode ser indicativo de instabilidade genética.

Já o tempo de subcultivo, como indicam as comparações entre os resultados obtidos para os clones velhos e novos, não apresentou diferença significativa para a taxa de multiplicação *in vitro* (Tabela 1).

CONCLUSÕES

A taxa de multiplicação *in vitro* depende da cultivar utilizada. O tipo de explante, os clones velho e novo durante o período de 240 dias não afetaram a taxa de multiplicação.

Tabela 1. Taxa de multiplicação de explantes de ápice caulinar, segmento nodal e derivado de calo das cultivares Asterix e Macaca de batata durante 240 dias de observação. Santa Maria, RS, 2006.

Taxa de multiplicação		
Cultivar		
Macaca	8,6395	a
Asterix	3,6562	b
Explante		
Ápice caulinar	6,7531	a
Segmento nodal	6,9500	a
Derivado de calo	4,7406	a
Tempo observado em dias		
30	5,2833	a
60	6,4833	a
90	7,0916	a
120	7,1166	a
150	5,5333	a
180	4,3916	a
210	6,8500	a
240	6,4333	a

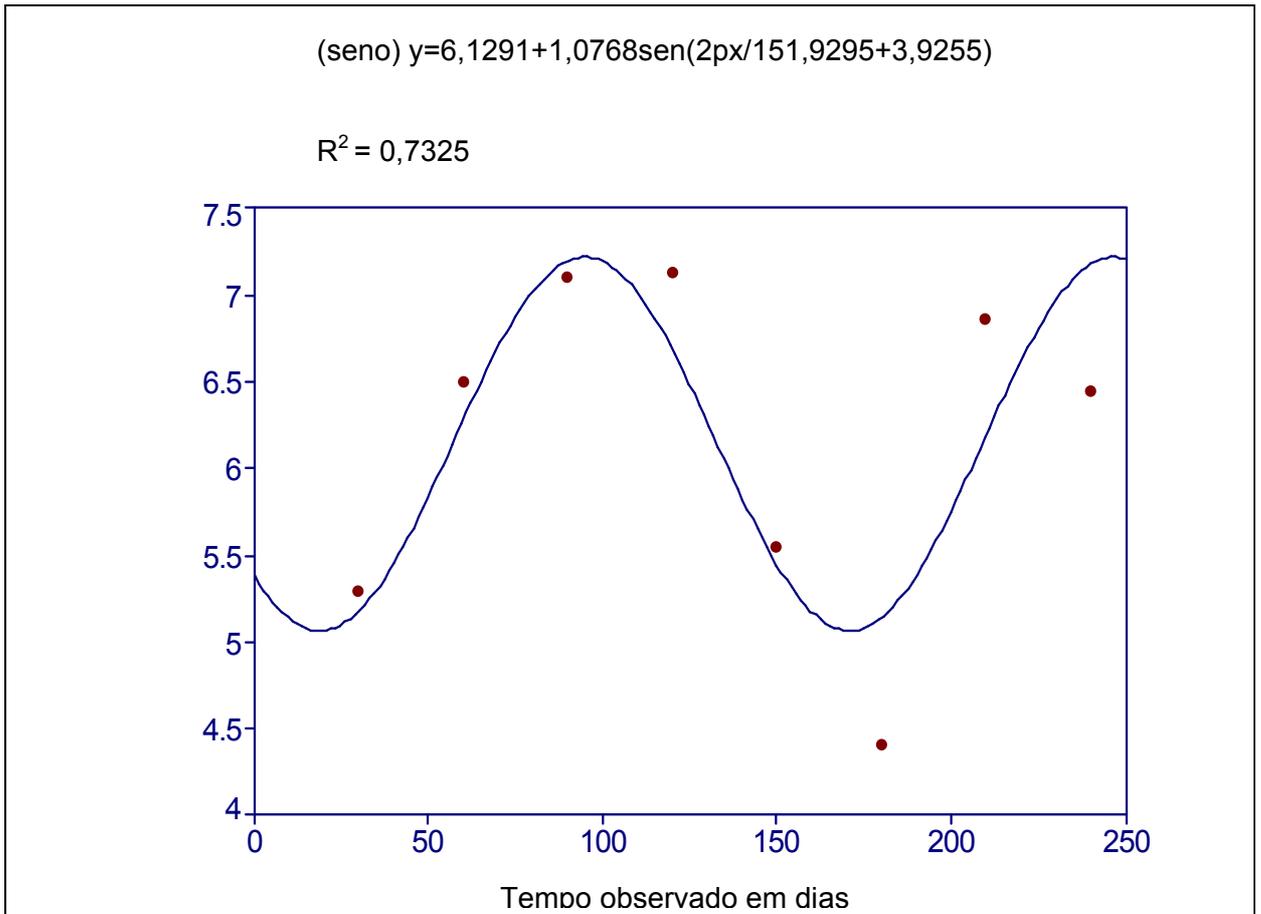


Figura 1. Taxa de multiplicação *in vitro* das cultivares Asterix e Macaca durante o tempo observado de 240 dias em função do seno.

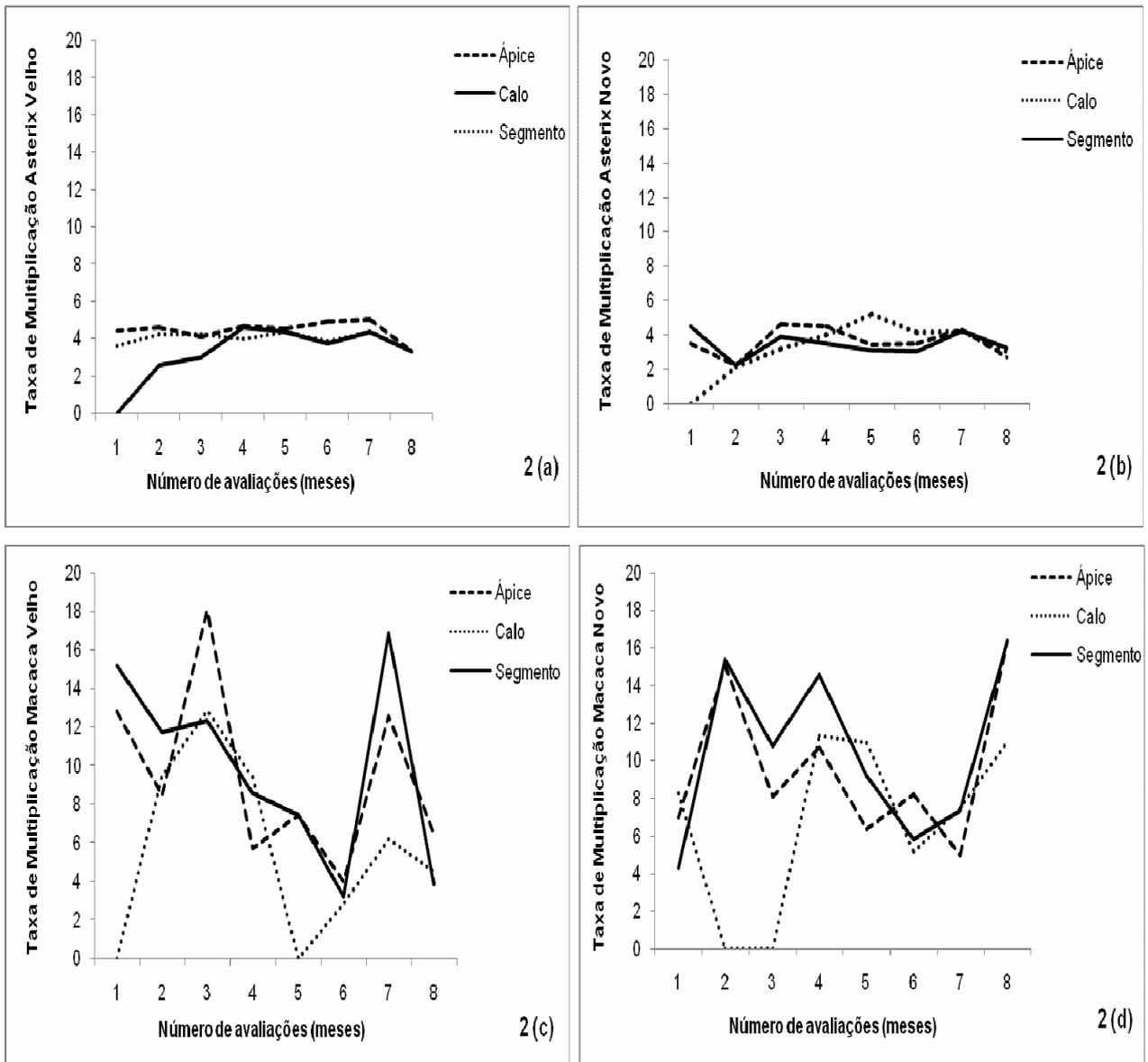


Figura 2. Taxa de multiplicação *in vitro* observada durante o período de oito meses de subcultivo. (a) Asterix, clone velho (T1) e explantes de ápice (E1), segmento nodal (E2) e calo (E3); (b) Asterix, clone novo (T2) e tipos de explantes; (c) Macaca, clone velho e tipos de explantes e (d) Macaca, clone novo e tipos de explantes.

CAPÍTULO II

VARIAÇÃO SOMACLONAL NAS CULTIVARES ASTERIX E MACACA DE BATATA IDENTIFICADA ATRAVÉS DE MARCADORES MORFOLÓGICOS

RESUMO

Plantas regeneradas a partir de cultura de tecidos podem exibir variação em características agronômicas importante. A variação induzida por cultura de tecidos é chamada de variação somaclonal e pode estar associada a fatores como o genótipo, tipo de explante, tempo de subcultivo e meio de cultura. O objetivo deste trabalho foi avaliar a variação somaclonal nas cultivares Asterix e Macaca de batata através dos marcadores morfológicos. A caracterização morfológica das cultivares de batata Asterix e Macaca foi efetuada em condições de campo na primavera-verão de 2005, em uma geração implantada a partir de tubérculos pré-básicos produzidos em telado no outono de 2005, estes eram provenientes de plantas pré-básicas oriundas de cultivo *in vitro*. A caracterização morfológica foi efetuada segundo metodologia descrita por COLLARES (2002) baseada nos descritores mínimos da batata. Os tratamentos consistiram da combinação de duas cultivares (Asterix e Macaca), de três tipos de explante (ápice caulinar, derivado de calo e segmento nodal) e dois tempos de subcultivo (velho – em subcultivo há 70 meses e novo – em subcultivo há 12 meses). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema trifatorial (cultivar x tempo de subcultivo x explante). As cultivares Asterix e Macaca revelaram diferenças quanto à estabilidade das características morfológicas avaliadas. O explante derivado de calo apresentou variantes somaclonais para treze e cinco descritores nos tratamentos com Asterix e Macaca, respectivamente. Os tempos de subcultivo de 70 meses e 12 meses não foram adequados para manutenção de características agronômicas importantes em ambas as cultivares. Sendo assim, foi possível identificar variantes somaclonais nos tratamentos que incluíram Asterix e Macaca através dos descritores mínimos da batata.

Palavras-chave: *Solanum tuberosum* L., variação somaclonal, marcadores morfológicos, tipo de explante, tempo de subcultivo.

ABSTRACT

Plants regenerated from tissue culture can show variation in agronomic important characteristics. The induced variation for tissue culture is called somaclonal variation and can be associated the factors as the genotype, explante type, age of subcultivo and culture medium. The objective of this work was to identify the occurrence of somaclones in potato to cultivars Asterix and Macaca through the minimum describers of the potato praised by the National Service of Protection Cultivars. The morphological characterization of cultivating them of potato Asterix and Macaca was effected in conditions of field in the 2005 spring-summer, in a generation implanted from daily pay-basic tubercles produced in greenhouse in the 2005 autumn-winter, these was proceeding from deriving daily pay-basic plants of culture in vitro. The morphological characterization was effected according to described methodology for COLLARES (2002) based in the minimum describers of the potato (*Solanum tuberosum* L.). The treatments had consisted of the combination of two to cultivars (Asterix and Macaca), of three explant types(apex stem, callus and nodal segment) and two times of subculture (old - in subculture it has 70 months and new - in subculture it has 12 months). The experimental design was completely randomized, in trifatorial project (cultivar x time of subculture x explant). Cultivars Asterix and Macaca had disclosed differences to them how much to the variability in the evaluated morphological characteristics. The callus explant presented somaclones for thirteen describers in the treatments that had included Asterix and five in the treatments that had included Macaca. The subculture times of 70 months and 12 months had not been adjusted for maintenance of important agronomic characteristics in both to cultivate them. Soon, it was possible to identify somaclones in the treatments that had included Asterix and Macaca through the minimum describers of the potato.

Key Words: *Solanun tuberosum* L, somaclonal variation, morphological markers, explant type effect, culture-age effect.

INTRODUÇÃO

As espécies cultivadas e silvestres de batata são dicotiledôneas pertencentes à família Solanaceae, gênero *Solanum*, o qual é constituído por, aproximadamente duas mil espécies, das quais cerca de 200 formam tubérculos (HAWKES, 1978).

A batata tem importância como alimento devido ser uma fonte relativamente barata de carboidratos que pode ser usada como complemento à dieta baseada em arroz. E ainda, é uma cultura de curta duração de alto rendimento e produção calórica que se constitui em fonte de nutrientes com elevada proporção de biomassa comestível (NASRIN, 2003).

A batata mais cultivada no mundo é uma espécie tetraplóide e o uso de semente botânica no cultivo comercial apresenta restrições devido à baixa taxa de germinação e ampla variabilidade na geração segregante (BORDALLO et al., 2004). Por esse motivo é empregada a propagação vegetativa de tubérculos-semente que requerem alta qualidade fitossanitária para manutenção de rendimento no campo. Um dos fatores que contribuem para perda em qualidade fitossanitária da batata, e conseqüente perda em produção, é a alta suscetibilidade a doenças, especialmente viroses. A batata é suscetível a importantes viroses como vírus do enrolamento da folha (*Potato leafroll virus* – PLRV) e ao vírus Y da batata (*Potato virus Y* - PVY) que fazem com que as cultivares percam gradualmente vigor e capacidade de produção com os cultivos continuados (DANIELS, 1995). Portanto, a alta estabilidade genética e qualidade fitossanitária do material propagativo de batata apresentam-se com pré-requisitos para melhoria nos resultados da cadeia produtiva da cultura.

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

preferencial devido a questão de custos, redução de espaço físico empregado e treinamento de pessoal. Por esses motivos, a técnica é importante na manutenção de bancos de germoplasma em centros de referência nacional como na Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária (EMBRAPA) e internacional - Centro Internacional de La Papa (CIP).

A fim de contornar os problemas de variabilidade introduzida pela micropropagação em bancos de germoplasma ou em centros de multiplicação é necessário conhecer quais as causas da variação somaclonal. Sabe-se que a variação somaclonal está associada a vários mecanismos e fatores. Os mecanismos que induzem a variação somaclonal incluem mutação e amplificação gênica, migração de elementos de transposição, alteração nos níveis de metilação do DNA, mudança no nível de ploidia, rearranjos e recombinação cromossômicos (JAIN, 2001; KAEPLER et al., 2000). A variação somaclonal está associada quatro fatores ou variáveis críticas, sendo eles: o genótipo, o tempo de subcultivo ou idade da cultura, a origem do explante e ao meio de cultura (OLHOFT & PHILLIPS, 1999).

Na multiplicação de cultivares elite de batata, esse tipo de variação é indesejado, podendo comprometer desde características diagnósticas da cultivar como cor de polpa, cor de película, formato do tubérculo até a resistência a doenças (BINSFELD, 1992). O monitoramento das características agrônômicas dos genótipos elite de batata pode ser feito através de marcadores morfológicos, bioquímicos e moleculares (BINSFELD, 1992; BORDALLO, 2004).

A caracterização morfológica consiste na anotação de descritores botânicos facilmente visíveis ou mensuráveis e que, a princípio expressam-se em todos os ambientes. Dessa forma a caracterização fixa-se basicamente em aspectos morfológicos e fenológicos, observados de forma sistemática por meio do uso de listas descritivas que conduzem à discriminação entre acessos (VALLS, 1988).

O fato de não existirem registros sobre a ocorrência de variação somaclonal nas cultivares de batata Asterix e Macaca sob influência do tempo de subcultivo e tipo do explante constituíram um incentivo para a realização do presente trabalho. Os objetivos deste trabalho foram identificar a ocorrência de somaclones em batata cultivares Asterix e Macaca através dos descritores mínimos da batata preconizados pelo Serviço Nacional de Proteção de Cultivares e avaliar o efeito do genótipo, do tempo de subcultivo e do tipo de explante sobre a ocorrência de variantes somaclonais.

MATERIAIS E MÉTODOS

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

As plântulas pré-básicas foram provenientes de cultivo *in vitro*. Os tubérculos pré-básicos foram produzidos em condições de telado (durante o outono de 2005). A produção dos tubérculos pré-básicos consistiu de quatro etapas:

- a) Transferência das culturas para meio nutritivo de igual composição àquela empregada na cultura de ápices caulinares para enraizamento.
- b) Aclimatização das plantas – transferência das plantas para meio de mesma composição, mas com o teor de sacarose reduzido para 1,5%, e abertura gradativa da vedação do frasco.
- c) Transferência para vasos contendo substrato Plantmax^R e acondicionados em telado para a produção de tubérculos pré-básicos (outono de 2005).
- d) Colheita dos tubérculos pré-básicos e armazenamento em câmara refrigerada a 20°C até a implantação do experimento.

O plantio dos tubérculos pré-básicos foi realizado durante a primavera de 2005. As plantas foram cultivadas no campo em parcelas de 30 covas espaçadas a 0,30m x 0,80m e manejadas de acordo com as recomendações da batata (BISOGNIN, 1996).

A caracterização morfológica foi efetuada segundo metodologia descrita por COLLARES (2002) seguindo os descritores mínimos para o registro de novas cultivares de batata (BRASIL, 1997).

As avaliações foram feitas na planta, inflorescência, tubérculo e broto. As características de planta foram avaliadas 50 dias após o plantio e as de inflorescência quando mais de 50% dos botões florais estavam abertos. Todos os caracteres de tubérculo, exceto cor de polpa, foram realizados logo após a colheita. A característica cor de polpa foi avaliada ao final do experimento e consistiu da

comparação dos tubérculos de cada tratamento com a cor da polpa de cultivares já descritas, a saber: Dakota Rose (polpa branca), SMASC148-A (polpa amarela clara) e SMID040-4Y (polpa amarela). As características de broto foram avaliadas 90 dias após a colheita. Para avaliar as características de broto de tubérculo foi efetuada a quebra da dormência com aspersão de ácido giberélico (GA_3) na concentração de 10 ppm e exposição à luz difusa em temperatura ambiente até que as brotações apresentassem tamanho de 1,5 a 2,0 cm (BRUNE & MELO, 1999).

O tamanho da amostra variou com o estágio e a característica avaliada. Para as características de planta e inflorescência foram avaliadas 20 plantas de cada cultivar/tempo de subcultivo/explante estudado e, para as características de tubérculo, 10 amostras de tubérculo.

Os tratamentos consistiram da combinação de duas cultivares (Asterix e Macaca), de três tipos de explante (ápice caulinar, derivado de calo e segmento nodal) e dois tempos de subcultivo (velho – em subcultivo 70 meses e novo – em subcultivo há 12 meses) (Tabela 1). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema trifatorial (cultivar x tempo de subcultivo x explante), com 20 repetições para as variáveis 1 até 19 e dez repetições para as variáveis 20 até 33 (Tabela 2), não foram avaliadas as características 25 e 26 por inexistência, na bibliografia, de parâmetros para comparação. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro com o auxílio do Software científico NTIA (EMBRAPA, 1997). As variáveis 8, 11, 12, 14, 17, 20, 22, 23, 27, 31, 32 e 33 foram transformadas para arco seno e a demais, para $(x)^{1/2}$.

RESULTADOS

Os tratamentos com a cultivar Asterix apresentaram variantes somaclonais para 20 dos 31 descritores morfológicos empregados de acordo com comparação feita com a descrição da cultivar (COLLARES, 2002) (Tabela 3). Os tratamentos com a cultivar Macaca apresentaram variantes somaclonais para sete dos 31 descritores morfológicos empregados em comparação feita com oito descritores disponíveis na literatura (BISOGNIN, 1996; BINSFELD, 1992) (Tabela 4).

O tipo de explante que apresentou menor número de variantes somaclonais foi diferente para os tratamentos com Asterix e Macaca. O ápice caulinar em Asterix

apresentou somaclones para o descritor morfológico coloração da parte interna da corola, em flores coloridas, formato do broto, coloração da base do broto e pigmentação da haste da planta. Já para Macaca, segmento nodal foi mais estável e apresentou variabilidade para a característica inserção das folhas e cor de polpa. O explante derivado de calo apresentou variantes somaclonais para treze descritores morfológicos nas duas cultivares (Tabelas 5 a 17).

O fator tempo de subcultivo de 70 meses (clone velho) apresentou 28 ocorrências (o número de características que apareceram modificadas) quantas vezes uma determinada característica apareceu modificada) de variação somaclonal estatisticamente significativas nos tratamentos. Já para o tempo de subcultivo de 12 meses (clone novo) foram registradas 15 ocorrências de variação somaclonal estatisticamente significativas nos tratamentos.

As características morfológicas avaliadas nos tratamentos com Asterix que apresentaram variantes somaclonais estatisticamente significativos foram comparadas com a descrição da cultivar feita por Collares (2002) e alocadas em quatro grupos: broto, pigmentação, planta e tubérculo.

Para broto a análise de variância revelou que a interação tripla cultivar (C) x tempo (T) x explante (E) e dupla cultivar (C) x tempo (T) foram estatisticamente significativas para as variáveis formato do broto, intensidade de primórdios radiculares, comprimento da brotação lateral e pubescência da base do broto. O formato de broto, nos tratamentos com Asterix, clone velho e novo de ápice caulinar (T3 e T4), foi cônico diferindo da descrição da cultivar que é oval (Tabela 5). A intensidade de primórdios radiculares encontrada nos tratamentos com Asterix, clones velho e novo de segmento nodal e derivado de calo (T1 e T6, T2 e T5) foi baixa diferindo significativamente da descrição da cultivar que é média (Tabela 6). O comprimento da brotação lateral encontrado nos tratamentos clone velho e novo de segmento nodal (T2 e T5) foi médio diferindo da descrição da cultivar que é curta (Tabela 7). A pubescência da base do broto predominante encontrada nos clones velhos foi média diferindo dos clones novos que foi pouca. Os variantes somaclonais ocorreram nos tratamentos com clones novos, pois apresentam pouca pubescência que difere da descrição da cultivar que média/intensa (COLLARES, 2002)(Tabela 8).

Para pigmentação a análise da variância revelou os efeitos da cultivar (C), tempo (T) e explante (E), da interação tripla C x T x E e da interação dupla E x C

para as variáveis coloração da base do broto, pigmentação na haste da planta, intensidade da pigmentação na parte interna da corola, em flores coloridas, pigmentação do pedúnculo floral e intensidade da coloração na base do broto. O caráter intensidade de coloração da base do broto não foi significativo para os tratamentos em Asterix, mostrando significância apenas para os efeitos principais. Os variantes somaclonais com coloração da base do broto azul-púrpura e verde foram identificados nos tratamentos com clones velho e novo de ápice caulinar (T3 e T4) (Tabela 9). A pigmentação da haste principal encontrada nos tratamentos com clones velhos e novos de ápice caulinar e derivado de calo (T3 e T4, T2 e T5) foi ausente/débil diferindo da descrição da cultivar que é forte (Tabela 10). A intensidade de pigmentação na parte interna da corola, em flores coloridas encontrada nos tratamentos com clones velhos e novos de ápice caulinar (T1 e T6) foi fraca/média diferindo da descrição da cultivar que é forte (Tabela 11). A pigmentação no pedúnculo floral foi ausente para os explantes de segmento nodal e calo diferindo significativamente da descrição da cultivar, no entanto, esteve presente para explante de ápice caulinar (Tabela 12). A pigmentação na nervura principal para todos os tratamentos foi ausente e a coloração da parte interna da corola para todos os tratamentos foi violeta ametista (BINSFELD, 1992), essas variáveis foram monomórficas e apresentaram resíduo igual à zero. No entanto, o registro é válido, pois contrastam com a descrição feita por Collares (2002) onde a pigmentação na nervura principal da cultivar Asterix é forte e a coloração da corola é vermelho-púrpura.

Para planta, em Asterix a análise de variância mostrou os efeitos da cultivar (C), do explante (E) e da interação tripla C x T x E para tipo de planta em relação à folhagem e ondulação da borda dos folíolos. Para o caráter tipo de planta em relação à folhagem fez-se o desdobramento de médias dos níveis de E dentro de T x C, nos tratamentos com clones velhos e novos de ápice e segmento nodal (T1, T6, T3 e T4) o fenótipo observado foi aberto diferindo da descrição da cultivar e dos tratamentos com clones velhos e novos de derivado de calo (T2 e T5)(COLLARES, 2002) (Tabela 13). Para a característica ondulação da borda dos folíolos as médias foram desdobradas com os níveis de T dentro de C x E, onde os tratamentos com clones velho e novo de segmento nodal (T1 e T6) apresentaram folíolos com ondulação média que contrasta com a descrição de folíolos com ondulação débil para a cultivar e dos tratamentos com clones velhos e novos de ápice caulinar e

derivado de calo (Tabela 14). Para hábito de crescimento a análise de variância mostrou que os efeitos da cultivar (C), tempo (T) e explante (E) e da interação tripla C x T x E foram significativos. Asterix apresenta hábito de crescimento ereto enquanto que os tratamentos com clone velho e novo de segmento nodal (T2 e T5) exibiram hábito de crescimento que variou de ereto a prostrado (Tabela 15). A análise de variância revelou que a coalescência dos folíolos foi significativa para os efeitos da cultivar (C) e do tempo (T) da interação dupla C x T, os tratamentos com clones velhos apresentaram coalescência dos folíolos freqüente diferente dos tratamentos com clones novos e da descrição da cultivar que é ausente/rara (Tabela 16). A análise de variância revelou resíduo igual a zero para característica ciclo vegetativo. No entanto, foram identificados somaclones de ciclo médio para os tratamentos clone novo de segmento nodal, clones velho e novo de ápice caulinar e derivado de calo.

Para tubérculo em Asterix, a análise de variância revelou efeito da cultivar (C) e da interação tripla C x T x E para formato do tubérculo, cor de polpa, aspereza da película e cor da película. O formato do tubérculo foi diferente entre as cultivares estudadas (Tabela 17). Também foi possível observar nos tratamentos que predominaram as formas longo e oval-alongado, distinta da descrição da cultivar que possui tubérculo oval (COLLARES, 2002). A cor da polpa dos tratamentos com Asterix foi significativa para o efeito principal da cultivar, embora tenham ocorrido variantes somaclonais com polpa branca no tratamento clone novo de segmento nodal (T6). A aspereza da película foi influenciada pelo efeito da cultivar e do tempo, somaclones com película reticulada foram observados nos tratamentos com clones velhos de segmento nodal, derivado de calo e ápice caulinar (T1, T2 e T3) enquanto que nos tratamentos com clones novos dos três tipos de explante (T4, T5 e T6) foram encontrados somaclones com película áspera (Tabela 18). A ocorrência de película áspera e reticulada não é característica da cultivar Asterix, que possui película lisa (COLLARES, 2002). Para a cor da película fez-se o desdobramento de médias dos níveis de E dentro de T x C, o tratamento com clone novo de ápice caulinar (T4) foi o único estável apresentado película vermelha, o tratamento com clone velho de segmento nodal (T1) apresentou 90% de somaclones com película amarela, os demais tratamentos tanto película vermelha como amarela (Tabela 19). As características profundidade dos olhos de tubérculos, freqüência de flores e

aspecto do ápice do broto não apresentaram variação morfológica em comparação com a descrição da cultivar.

As características avaliadas nos tratamentos com Macaca apresentaram variantes somaclonais foram comparadas com a descrição de somaclones em Macaca feita por Binsfeld (1992) e descrição encontrada para algumas características morfológicas (BISOGNIN, 1996) e separadas em quatro grupos: broto, pigmentação, planta e tubérculo.

Para broto, a análise de variância revelou que a interação tripla C x T x E para formato do broto. A maior variabilidade foi registrada para os tratamentos com clones velhos e novos de derivado de calo (T7 e T11), que apresentaram os formatos esférico, oval e cônico (Tabela 5). Não houve variação para intensidade de primórdios radiculares e comprimento da brotação lateral.

Para pigmentação, a análise de variância revelou que os efeitos principais (C), (T) e (E), a interação tripla C x T x E e dupla C x T foram estatisticamente significativas para as variáveis coloração da base do broto, intensidade da coloração da base do broto, pigmentação da haste principal, intensidade da pigmentação na parte interna da corola, em flores colorida e pigmentação do pedúnculo floral. A coloração da base do broto variou de vermelho-púrpura a verde nos tratamentos com clones velhos e novos de derivado de calo (T7 e T11) (Tabela 9). A intensidade da coloração da base do broto variou de fraca a média nos tratamentos com clones velhos e novos de derivado de calo e ápice caulinar (T7 e T11, T8 e T9) (Tabela 20). A ocorrência de somaclones com pigmentação na haste principal variando de ausente a forte foi identificada nos tratamentos com clones velho e novo de ápice caulinar (T8 e T9), os demais tratamentos mostraram pigmentação da haste intermediária. O caráter pigmentação da haste principal foi diferente da descrição da cultivar que apresenta pigmentação forte (BINSFELD, 1992) (Tabela 9). A coloração da flor da cultivar Macaca é violeta ametista com pontas brancas (BINSFELD, 1992), no entanto, a intensidade da coloração variou de média a forte nos tratamentos com clone velho e novo de derivado de calo (T7 e T11). Também foi registrada a ocorrência de uma flor no tratamento T7 com cinco lóbulos, esse tipo de somaclone já foi registrado por Binsfeld (1992) em trabalho com a mesma cultivar (Tabela 11, Figura 1.D). Os tratamentos com clones novos de ápice caulinar, segmento nodal e derivado de calo (T9, T10 e T11) apresentaram somaclones com ausência de pigmentação no pedúnculo floral enquanto que nos tratamentos com clones velhos

dos três tipos de explante o caráter foi estável. Os somaclones encontrados nos clones novos contrastam com a descrição da cultivar Macaca que possui pedúnculos pigmentados (BINSFELD, 1992) (Tabela 12).

Para planta, a análise de variância revelou o efeito da cultivar, das interações duplas C x T e C x E e da interação tripla C x T x E para as variáveis hábito de crescimento, asas da planta, inserção das folhas, fechamento das folhas, ondulação da borda dos folíolos e frequência de folíolos secundários. O hábito de crescimento nos tratamentos que incluíram Macaca apresentou diferenças para o efeito principal da cultivar (Tabela 15), além do efeito principal foram identificados somaclones com hábito semi-ereto. Para o caráter asas da planta ocorreu predominância de asas onduladas nos tratamentos com clones velhos, enquanto que nos tratamentos com clones novos predominaram asas retas. Asas onduladas foram encontradas nos explantes de segmento nodal e derivado de calo, enquanto que em ápice caulinar foram identificadas asas retas (Tabela 21 e 22). A inserção das folhas foi obtusa nos tratamentos com clones velho e novo de ápice caulinar e segmento nodal (T8 e T9, T10 e T12), esse tipo de somaclone confere a planta uma aparência aberta (Tabela 23). O fechamento das folhas variou entre médio e aberto nos tratamentos com clones velho e novo de derivado de calo (T7 e T11) (Tabela 24). A ondulação da borda dos folíolos variou de débil a média no tratamento com clone velho de derivado de calo (T7) e foi 100% média no tratamento com clone novo de ápice caulinar (T9). Os somaclones encontrados nesses tratamentos diferem da descrição da cultivar Macaca, que possui os bordos dos folíolos com ondulação débil (Tabela 14). A frequência de folíolos secundários variou de débil a muito-alta nos tratamentos com clones velho e novo de derivado de calo (T7 e T11) e de média a muito-alta nos tratamentos com clones velho e novo de ápice caulinar (T8 e T9). A maior ocorrência de somaclones foi identificada no tratamento com clone velho de derivado de calo (T7), onde 100% das plantas apresentaram incidência muito alta de folíolos secundários, diferindo da descrição da cultivar que é média (Tabela 25).

Para tubérculo em Macaca, a análise de variância revelou os efeitos principais da cultivar (C), do tempo (T) e da interação tripla C x T x E para formato do tubérculo, cor da película, aspereza da película e cor da polpa. O efeito principal da cultivar foi significativo para a variável formato do tubérculo, no entanto na descrição qualitativa dos tratamentos foram identificados tubérculos com formato oval e oval-alongado que contrastam com a descrição da cultivar que apresenta redondos

(BISOGNIN, 1996) (Tabela 17). A aspereza da película nos tratamentos que envolveram Macaca foi significativa para o efeito da cultivar e do tempo. Somaclones de película lisa foram identificados em maior quantidade no tratamento com clone novo de derivado de calo (T11) diferindo da descrição da cultivar que possui película áspera (BINSFELD, 1992) (Tabela 18). Somaclones com cor de polpa amarela clara foram identificados nos tratamentos com clones velho e novo de segmento nodal (T10 e T12) diferindo da descrição da cultivar que possui polpa branca (BISOGNIN, 1996) (Tabela 26). Não houve variação para profundidade dos olhos e esverdeamento dos tubérculos bem como para frequência de flores e cor da película.

DISCUSSÃO

Foi observado que as cultivares Asterix e Macaca diferiram quanto as características morfológicas avaliadas. A cor da película nos tratamentos com a cultivar Macaca foi 100% estável morfolologicamente, enquanto que em Asterix apenas o tratamento com clone novo de ápice caulinar foi 100% estável. As diferenças na estabilidade dos clones que passaram por micropropagação mostraram especificidade em nível de cultivar. O aparecimento de variantes somaclonais parece ser uma ocorrência comum em algumas espécies ou determinadas fontes de explante, por exemplo, o calo (MARASCHIN et al., 2002). Estudos sobre a frequência de aparecimento de variantes somaclonais indicam que uniformidade clonal é reconhecida agora como uma exceção mais do que uma regra (SKIRVIN et al., 1994).

Alta frequência de variação em características morfológicas (71,3%) já foi registrada por Binsfeld (1992) para a cultivar Macaca em plantas obtidas através do cultivo *in vitro* de segmento nodal. Também em batata, diferenças na estabilidade entre cultivares que passaram por cultivo *in vitro* foram avaliadas por Bordallo et al. (2004) quando testaram os efeitos de duas fontes de explante (folha e haste) induzidas a formarem calo e dois reguladores de crescimento (picloram e 2,4-D) nas cultivares Achat, Baraka, Baronesa, Bintje e Contenda observaram que Baronesa apresentou o mais alto nível de variação somaclonal e a cultivar Contenda o menor, com base em marcadores RAPD.

Resultados semelhantes foram encontrados por Al-Zahim et al. (1999) quando avaliaram a variabilidade genética em alho, constatando que, dentre as cinco

cultivares investigadas, 'Solent White' apresentava uma freqüência de variação de 21% maior em comparação com as demais. Os resultados deste trabalho corroboram com dados da literatura, pois identificamos efeito do genótipo nas cultivares para estabilidade genética durante a micropropagação.

O tipo de explante apresentou comportamento diferente quanto à ocorrência de variantes somaclonais para as duas cultivares. Nos tratamentos com Asterix, o ápice caulinar foi mais estável e, em Macaca, o segmento nodal, já o derivado de calo apresentou o maior número de variantes somaclonais de acordo com os descritores morfológicos em ambas as cultivares. Os resultados obtidos com Asterix e Macaca podem ser explicados devido às plantas regeneradas de explantes, que não passam por desdiferenciação, serem geneticamente mais estáveis se comparadas a plantas obtidas a partir de calo (JAIN, 2001). A ocorrência de variantes somaclonais para os explantes de ápice caulinar e segmento nodal pode ser devida não à estabilidade do tipo de explante, mas sim ao fator tempo de subcultivo. Em bananeira, Santos et al. (2004) encontraram 26% de variantes somaclonais em plantas regeneradas de ápice caulinar a partir do sexto subcultivo.

Os resultados de instabilidade genética em explantes de ápice caulinar e segmento nodal, em ambas as cultivares, indicaram que os dois tempos de subcultivos empregados neste trabalho não são adequados para a manutenção de características morfológicas diagnósticas das cultivares Asterix e Macaca, segundo a descrição da cultivar Asterix e algumas características da cultivar Macaca (COLLARES, 2002; BINSFELD, 1992; BISOGNIN, 1996). Os resultados mostraram que dos 31 descritores morfológicos empregados na identificação de somaclones apenas o formato do ápice do broto, a freqüência de flores e a profundidade dos olhos de tubérculos foram estáveis na cultivar Asterix.

Sabe-se que o tempo de subcultivo ou idade da cultura é um fator importante para manutenção da estabilidade genética das células que passam pela cultura de tecidos, independentemente se as células passam ou não por organogênese indireta. O aumento de variação somaclonal devido ao número de subcultivos foi relatado para várias culturas como a batata (BORDALLO et al., 2004), o tabaco (MURASHIGE, T & NAKANO, 1965), o milho (FLUMINHAM & KAMEYA, 1996), o arroz (KAWATA et al., 1995) e a bananeira (SANTOS & RODRIGUES, 2004). A identificação de somaclones nos tratamentos com clone novo para alguns caracteres diagnósticos importantes como hábito de crescimento da planta, cor da polpa, cor da

película e formato do tubérculo em ambas as cultivares mostraram que 12 meses de subcultivo já é suficiente para o surgimento de somaclones e não é adequado para manutenção desses caracteres. Em ápice caulinar de bananeira cultivar Pacovan, a partir do sexto subcultivo aparecem variantes somaclonais para cacho. Esses variantes causaram diminuição da massa fresca em 26%, sendo os cachos formados de reduzido valor comercial, trazendo prejuízos ao agricultor (SANTOS et al., 2004).

A identificação de modificações em características morfológicas em plantas de batata provenientes da cultura de calos vem sendo estudada de longa data por alguns autores Ahloowalia et al. (1981), Austin & Cassels (1983), Van-Harten et al. (1981), Sree et al. (1983) principalmente quanto a (ao): alterações na pilosidade, coloração e formato das folhas, variegação, vigor, coloração da haste principal, coloração da polpa e da periderme do tubérculo e ciclo vegetativo.

No presente trabalho foi observado alterações para formato das folhas, coloração da haste, coloração da polpa e película do tubérculo, coloração da base do broto, pubescência da base do broto, asas da planta, tamanho dos folíolos, largura dos folíolos, coalescência dos folíolos e pigmentação do pedúnculo floral, formato do broto, intensidade da coloração da base do broto, pubescência da base do broto, intensidade de primórdios radiculares do broto, comprimento da brotação lateral, pigmentação da haste da planta, inserção das folhas, fechamento das folhas, ondulação da borda dos folíolos, frequência de folíolos secundários, intensidade da pigmentação na parte interna da corola em flores coloridas.

Para planta, variantes somaclonais com hábito de crescimento semi-ereto foram registrados nos tratamentos que incluíram Asterix e Macaca. O hábito de crescimento ereto é dominante sobre o semi-ereto, a relação entre os outros dois tipos anteriores e o hábito prostrado ainda não estão bem definidas (ORTIZ & HUAMAN, 1996). A relação de dominância entre os hábitos de crescimento pode justificar a ocorrência de poucos variantes de hábito semi-ereto. Variantes somaclonais com asas onduladas foram identificados em Asterix. O tipo de asa ondulado é condicionado pelo gene C é dominante sobre reto (ORTIZ & HUAMAN, 1996). É possível que mutações ocorridas no alelo recessivo *c* tenham revertido para o alelo dominante C durante a micropropagação.

Para pigmentação, possivelmente, a variação somaclonal, nos tratamentos com Asterix e Macaca, esteja associada à modificação em genes que afetam a

distribuição de antocianina em diferentes órgãos da planta. É possível que tenham ocorrido modificações no gene *F*, que atua como um intensificador de pigmentação em flores e requer os genes *D* e *R* (ou *P*) para expressão. O locus *D* é necessário para a pigmentação em todas as plantas, enquanto que os loci *P* e *R* são responsáveis pela produção de pigmentos púrpura e vermelho (ORTIZ & HUAMAN, 1996). Contudo, deve-se ressaltar que as hipóteses acima expostas precisam ser confirmadas através de análises moleculares, não sendo possível concluir apenas com marcadores morfológicos, embora, os genes citados sejam de herança simples dominante.

Para tubérculo, variantes somaclonais com película amarela foram registrados para os tratamentos com Asterix. A variação para a característica cor de película pode estar associada a mutações nos locus *I*, locus *E*, genes *R* e *D*. O locus *I* controla a distribuição de pigmentos sobre a película do tubérculo, enquanto o locus *E* condiciona a distribuição de pigmentos vermelhos na periderme de tubérculos, olhos, hastes e flores. Os genes *E* e *R* juntos com *D* produzem pigmentos vermelhos de antocianina na periderme e feloderme de tubérculos de batata (ORTIZ & HUAMAN, 1996). A ocorrência de somaclones com cor de polpa branca identificados nos tratamentos que incluíram Asterix e variantes com polpa amarela clara em Macaca pode ser devido a uma mutação para produção de pigmentos, conforme apontaram Van-Harten et al. (1981) e Austin & Cassel (1983). A mesma ressalva do parágrafo anterior é feita para esta hipótese.

A identificação de variação somaclonal nos tratamentos com Asterix e Macaca para características, tais como cor da película, cor da polpa, formato do tubérculo e pigmentação da parte interna da corola indica a relevância do controle de fatores como tipo de explante e tempo de subcultivo para manutenção da estabilidade genética durante o cultivo *in vitro*. No entanto, deve-se registrar a ocorrência de somaclones com características desejáveis como película lisa nos tratamentos com Macaca.

CONCLUSÕES

Foi possível identificar variantes somaclonais nos tratamentos que incluíram Asterix e Macaca através dos descritores mínimos da batata.

A micropropagação continuada das cultivares Asterix e Macaca promoveu o aparecimento de variantes somaclonais, porém os somaclones das cultivares são diferentes quanto à estabilidade das características morfológicas ao passarem por cultivo *in vitro*.

O explante derivado de calo apresentou a maior ocorrência de variantes somaclonais tanto para os tratamentos que incluíram Asterix como Macaca.

O tempo de subcultivo de 12 meses já é suficiente para surgimento de variantes somaclonais nas cultivares Asterix e Macaca.

Tabela 1. Tipo de explante e clones originados de micropropagação e avaliados para características morfológicas de planta, tubérculo, inflorescência e brotos das cultivares Asterix e Macaca de batata. Santa Maria, RS, 2006.

Tratamento	Cultivar	Clone	Explante
T1	Asterix	Velho* (V)	Segmento Nodal (SN)
T2	Asterix	Velho	Derivado de Calo (DC)
T3	Asterix	Velho	Ápice Caulinar (AC)
T4	Asterix	Novo** (N)	Ápice Caulinar
T5	Asterix	Novo	Derivado de Calo
T6	Asterix	Novo	Segmento nodal
T7	Macaca	Velho	Derivado de Calo
T8	Macaca	Velho	Ápice Caulinar
T9	Macaca	Novo	Ápice Caulinar
T10	Macaca	Novo	Segmento nodal
T11	Macaca	Novo	Derivado de Calo
T12	Macaca	Velho	Segmento nodal

* clone subcultivado durante 70 meses; ** clone subcultivado durante 12 meses

Tabela 2. Descritores Mínimos da Batata (*Solanum tuberosum* L.) empregados na caracterização morfológica de somaclones das cultivares Asterix e Macaca. Santa Maria, RS, 2006.

Característica	Descrição da característica	Código para cada descrição
Broto		
1. Formato do broto	Esférico	1
	Oval	2
	Cônico	3
	Cilíndrico largo	4
	Cilíndrico estreito	5
2. Coloração da base do broto	Verde	1
	Vermelho-púrpura	2
	Azul-púrpura	3
3. Intensidade de coloração da base do broto	Fraca	3
	Média	5
	Forte	7
4. Pubescência da base do broto	Pouca	3
	Média	5
	Intensa	7
5. Aspecto do Ápice do Broto	Fechado	3

	Médio	5
	Aberto	7
6. Intensidade de primórdios radiculares	Baixa	3
	Média	5
	Alta	7
7. Comprimento da brotação lateral	Curto	3
	Médio	5
	Longo	7
<hr/>		
Planta		
8. Tipo de planta em relação à folhagem	Aberto	1
	Intermediária	2
	Fechada	3
9. Hábito de crescimento	Ereto	3
	Semi-ereto	5
	Prostrado	7
10. Pigmentação da haste	Ausente	1
	Débil	3
	Intermediária	5
	Forte	7
	Muito forte	9
11. Asas	Ausentes	1
	Retas	2
	Onduladas	3
	Dentadas	4
12. Inserção das folhas	Aguda (ângulo de inserção < 45°)	1
	Obtusa (ângulo de inserção > 45°)	2
13. Fechamento das folhas	Fechado	3
	Médio	5
	Aberto	7
14. Pigmentação na nervura principal	Ausente	1
	Presente	2
15. Tamanho dos folíolos	Pequeno	3
	Médio	5
	Grande	7
16. Largura dos folíolos	Estreito	3
	Médio	5
	Largo	7
17. Coalescência dos folíolos	Ausente/rara	1
	Freqüente	2
18. Ondulação das bordas dos folíolos	Ausente/muito rara	1
	Débil	3
	Média	5
	Forte	7
	Muito forte	9

19. Frequência de folíolos secundários	Nula/muito baixa	1
	Baixa	3
	Média	5
	Alta	7
	Muito alta	9
Inflorescência		
20. Frequência de flores	Ausente	1
	Presente	2
21. Comprimento do pedúnculo floral	Curto	3
	Médio	5
	Longo	7
22. Pigmentação do pedúnculo floral	Ausente	1
	Presente	2
23. Coloração na parte interna da corola	Branca	1
	Vermelho-púrpura	2
	Azul-púrpura	3
24. Intensidade de pigmentação na parte interna da corola, em flores coloridas	Fraca	3
	Média	5
	Forte	7
27. Ciclo Vegetativo	Precoce (<90 dias)	1
	Médio (90-110 dias)	2
	Longo (> 110 dias)	3
Tubérculos		
28. Formato dos tubérculos (100 x comprimento/largura)	Redondo (<110)	1
	Oval (110-150)	2
	Oval-alongado (151-170)	3
	Longo (>170)	4
29. Profundidade dos olhos	Rasos	1
	Médios	3
	Profundos	5
30. Aspereza da película	Lisa	1
	Áspera	3
	Reticula	5
31. Cor da película	Amarela	1
	Vermelha	2
32. Cor da polpa	Branca	1
	Creme	2
	Amarela clara	3
	Amarela intensa	4
33. Esverdeamento dos tubérculos	Ausente/muito fraco	1
	Fraco	3
	Médio	5
	Forte	7
	Muito forte	9

Tabela 3. Características morfológicas para as quais foram identificados variantes somaclonais nos tratamentos com a Asterix de acordo com a caracterização feita por Collares (2002) para a cultivar através de descritores mínimos da batata. Santa Maria, RS, 2006.

Descritor	Variante Somaclonal
Formato do broto	Esférico/cônico
Coloração da base do broto	Azul-púrpura
Intensidade de coloração da base do broto	Fraca
Pubescência da base do broto	Pouca/média
Comprimento da brotação lateral	Curto/médio
Hábito de crescimento da planta	Semi-ereto
Pigmentação da haste principal	Ausente/débil
Asas da planta	Retas/onduladas
Inserção das folhas	Obtusa
Pigmentação na nervura principal	Ausente
Coalescência dos folíolos	Freqüente
Ondulação da borda dos folíolos	Débil
Freqüência de folíolos secundários	Média/alta
Pigmentação no pedúnculo floral	Ausente
Pigmentação da parte interna da corola	Violeta Ametista
Intensidade de coloração na parte interna da corola	Fraca/média
Ciclo vegetativo	Médio
Formato dos tubérculos	Oval-along./longo
Aspereza da película	Áspera/reticulada
Cor da película	Amarela

Tabela 4 - Características morfológicas para as quais foram identificados variantes somaclonais nos tratamentos com a cultivar Macaca em comparação descrição de algumas características feitas por Bisognin (1996) e Binsfeld (1992). Santa Maria, RS, 2006.

Descritor	Variante Somaclonal
Hábito de crescimento	Semi-ereto
Pigmentação da haste principal	Ausente
Ondulação do bordo dos folíolos	Médio
Freqüência de folíolos secundários	Débil/alta/muito-alta
Intensidade de coloração parte interna da corola	Fraca/forte
Aspereza da película	Lisa/reticulada
Cor da polpa	Amarela clara

Tabela 5. Formato do broto de clones velhos e novos de ápice caulinar, segmento nodal e derivado de calo das cultivares Asterix e Macaca de batata. Santa Maria, RS, 2006.

		Asterix	Macaca
		Clone Velho ¹	Ápice caulinar
	Segmento nodal	1,5413 a	1,4777 a
	Derivado de calo	1,4777 a	1,7002 a
Clone Novo	Ápice caulinar	1,3120 b	1,7320 a
	Segmento nodal	1,5413 a	1,4142 a
	Derivado de calo	1,5095 a	1,4045 b

¹Clone velho referente a 70 meses de subcultivo e clone novo referente a 12 meses de subcultivo.

²Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical, diferem entre si pelo teste Tukey em 5% de probabilidade. C.V. 10,51 %.

Tabela 6. Intensidade de primórdios radiculares de clones velhos e novos de ápice caulinar, segmento nodal e derivado de calo das cultivares Asterix e Macaca de batata. Santa Maria, RS, 2006.

		Asterix		Macaca
Clone Velho ¹	Ápice caulinar	4,4000	a ²	7,0000 a
	Segmento nodal	3,0000	b	6,8000 a
	Derivado de calo	3,0000	b	6,6000 a
Clone Novo	Ápice caulinar	3,3000	a	7,0000 a
	Segmento nodal	4,4000	a	5,8000 a
	Derivado de calo	4,4000	a	6,2000 a

¹Clone velho referente a 70 meses de subcultivo e clone novo referente a 12 meses de subcultivo.

²Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical, diferem entre si pelo teste Tukey em 5% de probabilidade. C.V. 8,73 %

Tabela 7. Comprimento da brotação lateral de clones velhos e novos de ápice caulinar, segmento nodal e derivado de calo das cultivares Asterix e Macaca de batata. Santa Maria, RS, 2006.

		Asterix		Macaca
Clone velho ¹	Ápice caulinar	4,4000	a ²	7,0000 a
	Segmento nodal	3,8000	a	6,8000 a
	Derivado de calo	3,0000	a	6,6000 a
Clone novo	Ápice caulinar	3,6000	a	7,0000 a
	Segmento nodal	4,4000	a	5,8000 a
	Derivado de calo	4,4000	b	6,2000 a

¹Clone velho referente a 70 meses de subcultivo e clone novo referente a 12 meses de subcultivo.

²Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical, diferem entre si pelo teste Tukey em 5% de probabilidade. C.V. 9,28%

Tabela 8. Pubescência da base do broto de clones velho e novo das cultivares Asterix e Macaca de batata. Santa Maria, RS, 2006.

	Asterix		Macaca	
Clone velho	4,67	a ¹	3,40	a
Clone novo	3,47	b	3,93	a

¹Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical, diferem entre si pelo teste Tukey em 5% de probabilidade. C.V.26,05%

Tabela 9. Coloração da base do broto de clones velhos e novos de ápice caulinar, segmento nodal e derivado de calo das cultivares Asterix e Macaca de batata. Santa Maria, RS, 2006.

	Asterix		Macaca	
Clone velho ¹	Ápice caulinar	1,5953 a ²	1,7003	a
	Segmento nodal	1,4778 a	1,4777	a
	Derivado de calo	1,4778 a	1,7773	a
Clone novo	Ápice caulinar	1,3121 b	1,7321	a
	Segmento nodal	1,5413 a	1,4142	a
	Derivado de calo	1,5096 a	1,4046	b

¹Clone velho referente a 70 meses de subcultivo e clone novo referente a 12 meses de subcultivo.

²Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical, diferem entre si pelo teste Tukey em 5% de probabilidade. C.V. 10,40 %

Tabela 10. Pigmentação da haste da planta de clones velhos e novos de ápice caulinar, segmento nodal e derivado de calo das cultivares Asterix e Macaca de batata. Santa Maria, RS, 2006.

	Asterix		Macaca	
Clone velho ¹	Ápice caulinar	3,0000 a ²	6,4000	a
	Segmento nodal	3,2000 a	4,8000	a
	Derivado de calo	3,0000 a	5,0000	a
Clone novo	Ápice caulinar	1,5000 b	1,5000	b
	Segmento nodal	2,6000 a	5,0000	a
	Derivado de calo	1,8000 b	5,4000	a

¹Clone velho referente a 70 meses de subcultivo e clone novo referente a 12 meses de subcultivo.

²Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical, diferem entre si pelo teste Tukey em 5% de probabilidade. C.V.12,41%

Tabela 11. Intensidade da pigmentação da parte interna da corola de clones velhos e novos de ápice caulinar, segmento nodal e derivado de calo das

cultivares Asterix e Macaca de batata. Santa Maria, RS, 2006.

		Asterix	Macaca
Clone velho ¹	Ápice caulinar	4,8000 a ²	5,0000 a
	Segmento nodal	4,3000 b	5,0000 a
	Derivado de calo	3,6000 a	5,0000 b
Clone novo	Ápice caulinar	5,0000 a	5,2000 a
	Segmento nodal	5,0000 a	5,0000 a
	Derivado de calo	3,0000 a	5,9000 a

¹Clone velho referente a 70 meses de subcultivo e clone novo referente a 12 meses de subcultivo.

²Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical, diferem entre si pelo teste Tukey em 5% de probabilidade. C.V. 7,33 %

Tabela 12. Pigmentação do pedúnculo floral em explantes de ápice caulinar, segmento nodal e derivado de calo das cultivares Asterix e Macaca de batata. Santa Maria, RS, 2006.

	Asterix		Macaca	
Ápice caulinar	2,00	a ¹	1,925	a
Segmento nodal	1,03	b	1,975	a
Derivado de calo	1,03	b	1,925	a

¹ Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical, diferem entre si pelo teste Tukey em 5% de probabilidade. C.V. 11,34%

Tabela 13. Tipo de planta em relação à folhagem dos explantes de ápice caulinar, segmento nodal e derivado de calo em clones velho e novo das cultivares Asterix e Macaca de batata. Santa Maria, RS, 2006.

		Asterix	Macaca
Ápice caulinar	Clone velho ¹	1,3106 ab ²	1,4142 a
	Clone novo	1,4142 a	1,4142 a
<hr/>			
Segmento nodal	Clone velho	1,2071 b	1,4142 a
	Clone novo	1,1035 b	1,4142 a
<hr/>			
Derivado de calo	Clone velho	1,3520 a	1,4142 a
	Clone novo	1,4142 a	1,4142 a

¹Clone velho referente a 70 meses de subcultivo e clone novo referente a 12 meses de subcultivo.

²Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical, diferem entre si pelo teste Tukey em 5% de probabilidade. C.V.7,84%

Tabela 14. Ondulação da borda dos folíolos de clones velhos e novos de ápice caulinar, segmento nodal e derivado de calo das cultivares Asterix e Macaca de batata. Santa Maria, RS, 2006.

		Asterix	Macaca
Clone velho ¹	Ápice caulinar	5,0000 a ²	3,0000 b
	Segmento nodal	5,0000 a	3,0000 a
	Derivado de calo	5,1000 a	3,0000 a
<hr/>			
Clone novo	Ápice caulinar	5,0000 a	5,0000 a
	Segmento nodal	4,5000 b	3,0000 a
	Derivado de calo	5,0000 a	2,9000 b

¹Clone velho referente a 70 meses de subcultivo e clone novo referente a 12 meses de subcultivo.

²Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical, diferem entre si pelo teste Tukey em 5% de probabilidade. C.V. 5,04 %

Tabela 15. Hábito de crescimento da planta de clones velhos e novos de ápice caulinar, segmento nodal e derivado de calo das cultivares Asterix e Macaca de batata. Santa Maria, RS, 2006.

		Asterix	Macaca
Clone velho ¹	Ápice caulinar	3,0000 a ²	3,3000 a
	Segmento nodal	3,2000 a	3,0000 a
	Derivado de calo	3,3000 b	3,0000 a
Clone novo	Ápice caulinar		
	Segmento nodal	3,0000 a	3,3000 a
	Derivado de calo	3,2000 a	3,0000 a
		4,9000 a	3,0000 a

¹Clone velho referente a 70 meses de subcultivo e clone novo referente a 12 meses de subcultivo.

²Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical, diferem entre si pelo teste Tukey em 5% de probabilidade. C.V.7,10%

Tabela 16. Coalescência dos folíolos de clones velho e novo das cultivares Asterix e Macaca de batata. Santa Maria, RS, 2006.

	Asterix	Macaca
Clone velho ¹	1,78 a ²	1,13 a
Clone novo	1,48 b	1,25 a

¹Clone velho referente a 70 meses de subcultivo e clone novo referente a 12 meses de subcultivo.

²Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical, diferem entre si pelo teste Tukey em 5% de probabilidade. C.V.26,58%

Tabela 17. Efeito principal do formato do tubérculo entre as cultivares Asterix e Macaca de batata. Santa Maria, RS, 2006.

Médias		
Asterix	3,4333	a ²
Macaca	1,4833	b
Clone velho ¹	2,4667	a
Clone novo	2,4500	a
Derivado de calo	2,6250	a
Segmento nodal	2,4500	a
Ápice caulinar	2,3000	a

¹Clone velho referente a 70 meses de subcultivo e clone novo referente a 12 meses de subcultivo.

²Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical, diferem entre si pelo teste Tukey em 5% de probabilidade C.V. 14,58%

Tabela 18. Efeito principal da aspereza da película do tubérculo entre as cultivares Asterix e Macaca de batata. Santa Maria, RS, 2006.

Médias		
Macaca	4,0333	a ²
Asterix	2,9000	b
Clone velho ¹	4,0667	a
Clone novo	2,8667	b
Segmento nodal	3,6500	a
Ápice caulinar	3,6000	a
Derivado de calo	3,1500	a

¹Clone velho referente a 70 meses de subcultivo e clone novo referente a 12 meses de subcultivo.

²Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical, diferem entre si pelo teste Tukey em 5% de probabilidade C.V. 14,58%

Tabela 19. Cor da película de tubérculos dos explantes de ápice caulinar, segmento nodal e derivado de calo em clones velho e novo das cultivares Asterix e Macaca de batata. Santa Maria, RS, 2006.

		Asterix	Macaca
Ápice caulinar	Clone velho ¹	1,3313 a ²	1,4142 a
	Clone novo	1,4142 a	1,4142 a
<hr/>			
Segmento nodal	Clone velho	1,0414 b	1,4142 a
	Clone novo	1,2071 b	1,4142 a
<hr/>			
Derivado de calo	Clone velho	1,3727 a	1,4142 a
	Clone novo	1,2899 ab	1,4142 a

¹Clone velho referente a 70 meses de subcultivo e clone novo referente a 12 meses de subcultivo.

²Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical, diferem entre si pelo teste Tukey em 5% de probabilidade C.V.7,84%

Tabela 20. Intensidade da coloração da base do broto de clones velhos e novos de ápice caulinar, segmento nodal e derivado de calo das cultivares Asterix e Macaca de batata. Santa Maria, RS, 2006.

		Asterix	Macaca
Clone velho ¹	Ápice caulinar	3,6000 a ²	3,0000 b
	Segmento nodal	3,0000 a	3,4000 a
	Derivado de calo	3,0000 a	5,0000 a
<hr/>			
Clone novo	Ápice caulinar	3,0000 a	4,2000 a
	Segmento nodal	3,0000 a	3,2000 a
	Derivado de calo	3,0000 a	3,2000 b

¹Clone velho referente a 70 meses de subcultivo e clone novo referente a 12 meses de subcultivo.

²Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical, diferem entre si pelo teste Tukey em 5% de probabilidade. C.V. 8,08 %

Tabela 21. Asas da planta de clones velho e novo das cultivares Asterix e Macaca de batata. Santa Maria, RS, 2006.

	Asterix		Macaca	
Clone velho ¹	2,07	a ²	2,88	a
Clone novo	22,2	a	2,60	b

¹Clone velho referente a 70 meses de subcultivo e clone novo referente a 12 meses de subcultivo.

²Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical, diferem entre si pelo teste Tukey em 5% de probabilidade. C.V. 14,42%

Tabela 22. Asas da planta de clones velho e novo das cultivares Asterix e Macaca de batata. Santa Maria, RS, 2006.

	Asterix		Macaca	
Ápice caulinar	2,18	a ¹	2,45	b
Segmento nodal	2,08	a	2,83	a
Derivado de calo	2,18	a	2,95	a

¹Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical, diferem entre si pelo teste Tukey em 5% de probabilidade. C.V. 14,42%

Tabela 23. Inserção das folhas de clones velhos e novos de ápice caulinar, segmento nodal e derivado de calo das cultivares Asterix e Macaca de batata. Santa Maria, RS, 2006.

	Asterix		Macaca	
Clone velho ¹	Ápice caulinar	2,0000 a ²	1,1500	b
	Segmento	2,0000 a	1,9500	a
	Derivado de calo	2,0000 a	2,0000	a
Clone novo	Ápice caulinar			
	Segmento	1,9000 a	1,9000	a
	Derivado de	2,0000 a	1,1500	b
		2,0000 a	2,0000	a

¹Clone velho referente a 70 meses de subcultivo e clone novo referente a 12 meses de subcultivo.

²Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical, diferem entre si pelo teste Tukey em 5% de probabilidade. C.V. 6,32%

Tabela 24. Fechamento das folhas de clones velhos e novos de ápice caulinar, segmento nodal e derivado de calo das cultivares Asterix e Macaca de batata. Santa Maria, RS, 2006.

		Asterix	Macaca
Clone velho ¹	Ápice caulinar	5,0000 a ²	5,2000 a
	Segmento nodal	5,0000 a	4,9000 a
	Derivado de calo	5,0000 a	5,0000 a
Clone novo	Ápice caulinar	5,0000 a	5,0000 a
	Segmento nodal	5,0000 a	5,1000 a
	Derivado de calo	5,0000 a	4,1000 b

¹Clone velho referente a 70 meses de subcultivo e clone novo referente a 12 meses de subcultivo.

²Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical, diferem entre si pelo teste Tukey em 5% de probabilidade.C.V. 4,17%

Tabela 25. Frequência de folíolos secundários de clones velhos e novos de ápice caulinar, segmento nodal e derivado de calo das cultivares Asterix e Macaca de batata. Santa Maria, RS, 2006.

		Asterix	Macaca
Clone velho ¹	Ápice caulinar	6,5000 a ²	5,5000 a
	Segmento nodal	7,0000 a	7,6000 a
	Derivado de calo	6,7000 a	9,0000 a
Clone novo	Ápice caulinar	6,6000 a	6,6000 b
	Segmento nodal	7,0000 a	7,2000 a
	Derivado de calo	6,4000 a	4,8000 b

¹Clone velho referente a 70 meses de subcultivo e clone novo referente a 12 meses de subcultivo.

²Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical, diferem entre si pelo teste Tukey em 5% de probabilidade. C.V. 5,83 %

Tabela 26. Cor da polpa de tubérculos de clones velhos e novos de ápice caulinar, segmento nodal e derivado de calo das cultivares Asterix e Macaca de batata. Santa Maria, RS, 2006.

		Asterix	Macaca
Clone velho ¹	Ápice caulinar	3,0000 a ²	3,0000 a
	Segmento nodal	3,0000 a	1,6000 b
	Derivado de calo	3,0000 a	3,0000 a
Clone novo	Ápice caulinar		
	Segmento nodal	3,0000 a	3,0000 a
	Derivado de	2,8000 a	2,8000 a
		3,0000 a	3,0000 a

¹Clone velho referente a 70 meses de subcultivo e clone novo referente a 12 meses de subcultivo.

²Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical, diferem entre si pelo teste Tukey em 5% de probabilidade. C.V.8,29%



Figura 1. **A)** Tratamento com Asterix apresentando haste principal sem pigmentação e asas retas. **B)** Tratamento com Asterix onde ocorreram flores com coloração violeta ametista claro. **C)** Tratamento com Macaca registrando ocorrência de haste principal pigmentada e asas onduladas. **D)** Tratamento com Macaca onde se identificou flor com alteração no número de lóbulos (pentâmero) e variação na intensidade da coloração.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A taxa de multiplicação *in vitro* depende da cultivar que está sendo micropropagada, isto é, está em função do genótipo.

Foi possível a identificação de variantes somaclonais nas cultivares Asterix e Macaca através dos marcadores morfológicos empregados.

O efeito do genótipo foi diferente para as cultivares Asterix e Macaca quanto à ocorrência de variantes somaclonais.

Os tempos de subcultivo de 70 meses e 12 meses proporcionou a ocorrência de variantes somaclonais, não sendo adequado para manutenção de características diagnósticas das cultivares Asterix e Macaca.

O explante derivado de calo apresentou a maior ocorrência de variantes somaclonais em ambas as cultivares.

A identificação de somaclones nas cultivares Asterix e Macaca de batata através de características morfológicas indica que se deve evitar tempo de subcultivo prolongado e utilizar, preferencialmente, explantes de ápice caulinar e segmento nodal. Embora, ocorra variação somaclonal no material micropropagado de batata, se forem adotadas medidas de redução do tempo de subcultivo e explantes de ápice caulinar e segmento nodal sem passar pelo estágio de calo, pode ser mantida a fidelidade genética do material micropropagado. Visto que a micropropagação apresenta vantagens como rapidez na produção de material micropropagado, redução de custos e espaço físico quando comparada ao método tradicional de propagação.

REFERÊNCIAS

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

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

AL-ZAHIM, M.A. FORD-LOYD, B.V.; NEWBURY, H.J. Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.18, n. 6, p. 473–477, 1999.

AUSTIN, S.; CASSELS, A.C. Variation between plants regenerated from individual calli produced from separated potato stem callus cells. **Plant Science Letters**, v.31, p.107-114, 1983.

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

BISOGNIN, D. A. **Recomendações Técnicas para o Cultivo da Batata no Rio Grande do Sul e Santa Catarina**, Santa Maria, 1996. 64p.

BORDALLO, P.N. SILVA, D.H.; MARIA, J.; CRUZ, C.D.; FONTES, E.P. Somaclonal variation on in vitro callus culture potato cultivars. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, p.300-304, 2004.

BRUNE, S.; MELO, P. E. . Caracterização dos brotos de tubérculos em clones de batata resistentes à pinta preta. In: XXXVIII Congresso Brasileiro de Olericultura, 1998, Petrolina. Horticultura Brasileira. Brasília: Sociedade de Olericultura do Brasil, 1998. v. 16. p. 38-38.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPH, 1998. v.1, p. 87-132.

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

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

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

EMBRAPA. Ambiente de software NTIA, versão 4.2.2: manual do usuário. Campinas: Centro Nacional de Pesquisa Tecnológica em Informática para a Agricultura, 1997. 258p.

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

FAO, 2005. Acessado em 12 de dezembro de 2006. Online. Disponível em: www.fao.org

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

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. IN: TORRES, A.; CALDAS, L. S.; BUSO, J.A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação**

genética de plantas. Brasília: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPQ, 1998. p. 183-260.

HAWKES, J.G. **History of the potato.** In: Harris, P.M. The potato crop: the scientific basis of improvement. Chapman and Hall, London, Cap. 1, p. 1-4, 1978.

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

IBGE, **Produção Agrícola Municipal 2005.** Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=740 . Acesso em: 03 set. 2006.

IBGE, 2006. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola.** Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa12200604.shtm> Acesso em: 04 jan. 2007.

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

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

KAWATA, M.; OHMIYA, A.; SHIMAMOTO, Y.; OONO, K.; TAKAIWA, F. Structural changes in the plastid DNA rice (*Oryza sativa* L.) during tissue culture. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.90, p. 364-371, 1995.

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

KAEPLER, S.M.; PHILLIPS, R.L. Tissue culture-induced DNA methylation variation in maize. **Proceedings of the National Academy Science**, v.90, p. 8773-8776, 1993. Online. Disponível na Internet <http://www.pnas.org/cgi/search>

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

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

MANTELL, S.H.; MATTHEWS, J.A., McKEE, R.A. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto: SBG, 1994. 344p.

MARASCHIN, M. et al. Somaclonal variation: a morphogenetic and biochemical analysis of *Mandevilla velutina* cultured cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 633-643, 2002.

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

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

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

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 25, 1974. p. 135-166. (versão eletrônica)

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

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

ORTIZ, R. & HUAMAN, Z. Inheritance of morphological and tuber characteristics. IN: BRADSHAW, J.E.; MACKAY, G.R. (Ed.) **Potato Genetics**. CAB International, Wallingford, UK, 1996, p. 263-283.

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

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

PHILLIPS, R.L; KAEPLER, S. M; OLHOFT, P. Genetic instability of plant tissue cultures: Breakdown of normal controls. **Proceedings of the National Academy Science** , v. 91, p. 5222-5226, 1994. Online. Disponível na Internet <http://www.pnas.org/cgi/search>

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

SANTOS, C.C.C.; RODRIGUES, P.H.V. Variação somaclonal em mudas micropropagadas de bananeira, cultivar *Pacovan*. **Bragantia**, Campinas, v.63, p.201-205, 2004.

SECHIN, J. Produção de batata-semente no estado do Rio Grande do Sul, Situação atual e perspectivas para o futuro. In: REUNIÃO TÉCNICA ANUAL DE PESQUISA E EXTENSÃO DA CULTURA DA BATATA DA REGIÃO SUL DO BRASIL, 5., 1998. Pelotas. **Anais...** EMBRAPA CPACT, 1998. p. 18-19. 74 p. (EMBRAPA-CPACT. Documentos, 46).

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

SKIRVIN, R.M., MCPHEETERS, K.D.; NORTON M . Sources of frequency of somaclonal variation. **Hortscience**, Alexandria, v.29, p.1232-1237. 1994.

SREE, R.K.; DIJKHUIS, P.; ROEST, S. Phenotypic variation and ploidy level of plants regenerated from callus potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Bintje). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 65, p. 329-338, 1983.

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

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

VALLS, F.J.M. Caracterização morfológica, reprodutiva e bioquímica de germoplasma vegetal. In: Encontro sobre recursos genéticos, 1.; 1988, Jaboticabal. **Anais...**Jaboticabal: UNESP, 1988. p. 106-128.

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

YANG, M. & LOH, C.S. Systemic endopolyploidy in *Spathoglottis plicata* (Orchidaceae) development. **BioMed Central Cell Biology**, v.33, n.5, p. 1-8, 2004. Online. Disponível na Internet <http://www.biomedcentral.com/bmedcellbio/>

WITHERS, L.A.; WILLIAMS, J.T. Conservação in vitro de recursos genéticos de plantas. IN:TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1998. v.1, p. 297-330.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Descrição qualitativa para os 12 tratamentos utilizando os descritores mínimos da batata. Santa Maria, RS, 2006.

1. Formato do Broto

T1 (Asterix, Velho, Segmento Nodal)	= 60% oval, 40% cônico
T2 (Asterix, Velho, Derivado de Calo)	=80% oval; 20% cônico
T3 (Asterix, Velho, Ápice Caulinar)	=10% esférico; 20%oval; 70% cônico
T4 (Asterix, Novo, Ápice caulinar)	= 40% esférico; 40% oval; 20% cônico
T5 (Asterix, Novo, Derivado de Calo)	= 70% oval, 30% cônico
T6 (Asterix, Novo, Segmento nodal)	= 60% oval, 40% cônico
T7 (Macaca, Velho, Derivado de Calo)	=10% oval; 90% cônico
T8 (Macaca, Velho, Ápice Caulinar)	=10% oval; 90% cônico
T9 (Macaca, Novo, Ápice Caulinar)	= 100% cônico
T10 (Macaca, Novo, Segmento Nodal)	= 100% cônico
T11 (Macaca, Novo, Derivado de Calo)	= 10% esférico, 80% oval,
T12 (Macaca, Velho, Segmento Nodal)	= 80% oval, 20% cônico

2. Coloração da base do broto

T1 (Asterix, Velho, Segmento Nodal)	= 80% verm-púrp., 20% azul-púrp
T2 (Asterix, Velho, Derivado de Calo)	= 80% verm-púrp., 20% azul-púrp
T3 (Asterix, Velho, Ápice Caulinar)	= 20% verm-púrp.,70% azul-púrp, 10%verde
T4 (Asterix, Novo, Ápice caulinar)	= 40% verm.-púrp.,20% azul-púrp, 40%verde
T5 (Asterix, Novo, Derivado de Calo)	= 70% verm-púrp., 30% azul-púrp
T6 (Asterix, Novo, Segmento nodal)	= 60% verm-púrp., 40% azul-púrp
T7 (Macaca, Velho, Derivado de Calo)	= 10% verm-púrp., 90% azul-púrp
T8 (Macaca, Velho, Ápice Caulinar)	= 10% verm-púrp., 90% azul-púrp
T9 (Macaca, Novo, Ápice Caulinar)	= 100% azul-púrp.
T10 (Macaca, Novo, Segmento Nodal)	= 100% verm.-púrp.
T11 (Macaca, Novo, Derivado de Calo)	= 80% verm-púrp., 10% azul-púrp., 10%verde
T12 (Macaca, Velho, Segmento Nodal)	= 80% verm-púrp., 20% azul-púrp

3. Intensidade da coloração da base do broto

T1 (Asterix, Velho, Segmento Nodal)	= 100% fraca
T2 (Asterix, Velho, Derivado de Calo)	= 100% fraca
T3 (Asterix, Velho, Ápice Caulinar)	= 80% fraca, 10% média, 10% forte
T4 (Asterix, Novo, Ápice caulinar)	= 100% fraca
T5 (Asterix, Novo, Derivado de Calo)	= 100% fraca
T6 (Asterix, Novo, Segmento nodal)	= 100% fraca
T7 (Macaca, Velho, Derivado de Calo)	= 100% média

T8 (Macaca, Velho, Ápice Caulinar)	= 100% fraca
T9 (Macaca, Novo, Ápice Caulinar)	= 40% fraca, 60% média
T10 (Macaca, Novo, Segmento Nodal)	= 90% fraca, 10% média
T11 (Macaca, Novo, Derivado de Calo)	= 90% fraca, 10% média
T12 (Macaca, Velho, Segmento Nodal)	= 80% fraca, 20% média

4. Pubescência da base do broto

T1 (Asterix, Velho, Segmento Nodal)	= 90% média, 10% intensa
T2 (Asterix, Velho, Derivado de Calo)	= 90% média, 10% intensa
T3 (Asterix, Velho, Ápice Caulinar)	= 80% pouca, 10% média, 10% intensa
T4 (Asterix, Novo, Ápice caulinar)	= 80% pouca, 20% média
T5 (Asterix, Novo, Derivado de Calo)	= 80% pouca, 20% média
T6 (Asterix, Novo, Segmento nodal)	= 80% pouca, 10% média, 10% intensa
T7 (Macaca, Velho, Derivado de Calo)	= 100% pouca
T8 (Macaca, Velho, Ápice Caulinar)	= 70% pouca, 20% média, 10% intensa
T9 (Macaca, Novo, Ápice Caulinar)	= 30% pouca, 70% intensa
T10 (Macaca, Novo, Segmento Nodal)	= 60% pouca, 30% média, 10% intensa
T11 (Macaca, Novo, Derivado de Calo)	= 80% pouca, 20% média
T12 (Macaca, Velho, Segmento Nodal)	= 80% pouca, 20% média

5. Aspecto do ápice do broto

T1 (Asterix, Velho, Segmento Nodal)	= 100% fechado
T2 (Asterix, Velho, Derivado de Calo)	= 100% fechado
T3 (Asterix, Velho, Ápice Caulinar)	= 100% fechado
T4 (Asterix, Novo, Ápice caulinar)	= 100% fechado
T5 (Asterix, Novo, Derivado de Calo)	= 100% fechado
T6 (Asterix, Novo, Segmento nodal)	= 90% fechado, 10% médio
T7 (Macaca, Velho, Derivado de Calo)	= 60% fechado, 20% médio, 20% aberto
T8 (Macaca, Velho, Ápice Caulinar)	= 70% fechado, 10% médio, 20% aberto
T9 (Macaca, Novo, Ápice Caulinar)	= 60% fechado, 20% médio, 20% aberto
T10 (Macaca, Novo, Segmento Nodal)	= 70% fechado, 10% médio, 20% aberto
T11 (Macaca, Novo, Derivado de Calo)	= 80% fechado, 20% aberto
T12 (Macaca, Velho, Segmento Nodal)	= 20% fechado, 20% médio, 60% aberto

6. Intensidade de primórdios radiculares do broto

T1 (Asterix, Velho, Segmento Nodal)	= 100% baixa
T2 (Asterix, Velho, Derivado de Calo)	= 100% baixa
T3 (Asterix, Velho, Ápice Caulinar)	= 40% baixa, 50% média, 10% alta
T4 (Asterix, Novo, Ápice caulinar)	= 70% baixa, 30% média
T5 (Asterix, Novo, Derivado de Calo)	= 40% baixa; 50% média; 10% alta
T6 (Asterix, Novo, Segmento nodal)	= 30% baixa; 70% média
T7 (Macaca, Velho, Derivado de Calo)	= 20% média; 80% alta
T8 (Macaca, Velho, Ápice Caulinar)	= 100% alta
T9 (Macaca, Novo, Ápice Caulinar)	= 100% alta
T10 (Macaca, Novo, Segmento Nodal)	= 60% média; 40% alta
T11 (Macaca, Novo, Derivado de Calo)	= 40% média; 60% alta

T12 (Macaca, Velho, Segmento Nodal) = 10% média; 90% alta

7. Comprimento da brotação lateral

T1 (Asterix, Velho, Segmento Nodal)	= 50% curto, 50% médio
T2 (Asterix, Velho, Derivado de Calo)	= 100% curto
T3 (Asterix, Velho, Ápice Caulinar)	= 40% curto; 50% médio; 10% longo
T4 (Asterix, Novo, Ápice caulinar)	= 70% curto; 30% médio
T5 (Asterix, Novo, Derivado de Calo)	= 40% curto; 50% médio; 10% longo
T6 (Asterix, Novo, Segmento nodal)	= 30% curto; 70% médio
T7 (Macaca, Velho, Derivado de Calo)	= 20% médio; 80% longo
T8 (Macaca, Velho, Ápice Caulinar)	= 100% longo
T9 (Macaca, Novo, Ápice Caulinar)	= 100% longo
T10 (Macaca, Novo, Segmento Nodal)	= 60% médio; 40% longo
T11 (Macaca, Novo, Derivado de Calo)	= 40% médio; 60% longo
T12 (Macaca, Velho, Segmento Nodal)	= 10% médio; 90% longo

8. Tipo de planta em relação à folhagem

T1 (Asterix, Velho, Segmento Nodal)	= 50% intermediária, 50% aberta
T2 (Asterix, Velho, Derivado de Calo)	= 85% média, 15% aberta
T3 (Asterix, Velho, Ápice Caulinar)	= 75% intermediária, 25% aberta
T4 (Asterix, Novo, Ápice caulinar)	= 100% intermediária
T5 (Asterix, Novo, Derivado de Calo)	= 100% intermediária
T6 (Asterix, Novo, Segmento nodal)	= 25% intermediária, 75% aberta
T7 (Macaca, Velho, Derivado de Calo)	= 100% intermediária
T8 (Macaca, Velho, Ápice Caulinar)	= 100% intermediária
T9 (Macaca, Novo, Ápice Caulinar)	= 100% intermediária
T10 (Macaca, Novo, Segmento Nodal)	= 100% intermediária
T11 (Macaca, Novo, Derivado de Calo)	= 100% intermediária
T12 (Macaca, Velho, Segmento Nodal)	= 100% intermediária

9. Hábito de crescimento da planta

T1 (Asterix, Velho, Segmento Nodal)	= 90% ereto, 10% semi-ereto
T2 (Asterix, Velho, Derivado de Calo)	= 90% ereto, 5% semi-ereto, 5% prostrado
T3 (Asterix, Velho, Ápice Caulinar)	= 100% ereto
T4 (Asterix, Novo, Ápice caulinar)	= 100% ereto
T5 (Asterix, Novo, Derivado de Calo)	= 5% ereto, 95% semi-ereto
T6 (Asterix, Novo, Segmento nodal)	= 90% ereto, 10% semi-ereto
T7 (Macaca, Velho, Derivado de Calo)	= 100% ereto
T8 (Macaca, Velho, Ápice Caulinar)	= 85% ereto; 15% semi-ereto
T9 (Macaca, Novo, Ápice Caulinar)	= 100% ereto
T10 (Macaca, Novo, Segmento Nodal)	= 75% ereto, 25% semi-ereto
T11 (Macaca, Novo, Derivado de Calo)	= 100% ereto
T12 (Macaca, Velho, Segmento Nodal)	= 100% ereto

10. Pigmentação da haste da planta

T1 (Asterix, Velho, Segmento Nodal)	= 90% débil; 10% intermediária
-------------------------------------	--------------------------------

T2 (Asterix, Velho, Derivado de Calo)	= 100% débil
T3 (Asterix, Velho, Ápice Caulinar)	= 100% débil
T4 (Asterix, Novo, Ápice caulinar)	= 75% ausente; 25% débil
T5 (Asterix, Novo, Derivado de Calo)	= 60% ausente; 40% débil
T6 (Asterix, Novo, Segmento nodal)	= 20% ausente; 80% débil
T7 (Macaca, Velho, Derivado de Calo)	= 100% intermediária
T8 (Macaca, Velho, Ápice Caulinar)	= 30% intermediária; 70% forte
T9 (Macaca, Novo, Ápice Caulinar)	= 75% ausente; 25% débil
T10 (Macaca, Novo, Segmento Nodal)	= 100% intermediária
T11 (Macaca, Novo, Derivado de Calo)	= 15% débil; 50% intermediária; 35% forte
T12 (Macaca, Velho, Segmento Nodal)	= 10% débil; 90% intermediária

11. Asas da planta

T1 (Asterix, Velho, Segmento Nodal)	= 100% retas
T2 (Asterix, Velho, Derivado de Calo)	= 90% retas, 10% onduladas
T3 (Asterix, Velho, Ápice Caulinar)	= 90% retas, 10% onduladas
T4 (Asterix, Novo, Ápice caulinar)	= 75% retas, 25% onduladas
T5 (Asterix, Novo, Derivado de Calo)	= 75% retas, 25% onduladas
T6 (Asterix, Novo, Segmento nodal)	= 85% retas, 15% onduladas
T7 (Macaca, Velho, Derivado de Calo)	= 100% onduladas
T8 (Macaca, Velho, Ápice Caulinar)	= 35% retas, 65% onduladas
T9 (Macaca, Novo, Ápice Caulinar)	= 75% retas, 25% onduladas
T10 (Macaca, Novo, Segmento Nodal)	= 35% retas, 65% onduladas
T11 (Macaca, Novo, Derivado de Calo)	= 10% retas; 90% onduladas
T12 (Macaca, Velho, Segmento Nodal)	= 100% onduladas

12. Inserção das folhas

T1 (Asterix, Velho, Segmento Nodal)	= 100% obtuso
T2 (Asterix, Velho, Derivado de Calo)	= 100% obtuso
T3 (Asterix, Velho, Ápice Caulinar)	= 100% obtuso
T4 (Asterix, Novo, Ápice caulinar)	= 90% obtuso, 10% agudo
T5 (Asterix, Novo, Derivado de Calo)	= 100% obtuso
T6 (Asterix, Novo, Segmento nodal)	= 100% obtuso
T7 (Macaca, Velho, Derivado de Calo)	= 100% obtuso
T8 (Macaca, Velho, Ápice Caulinar)	= 15% obtuso e 85% agudo
T9 (Macaca, Novo, Ápice Caulinar)	= 90% obtuso e 10% agudo
T10 (Macaca, Novo, Segmento Nodal)	= 15% obtuso e 85% agudo
T11 (Macaca, Novo, Derivado de Calo)	= 100% obtuso
T12 (Macaca, Velho, Segmento Nodal)	= 95% obtuso e 5% agudo

13. Fechamento das folhas

T1 (Asterix, Velho, Segmento Nodal)	= 100% médio
T2 (Asterix, Velho, Derivado de Calo)	= 100% médio
T3 (Asterix, Velho, Ápice Caulinar)	= 100% médio
T4 (Asterix, Novo, Ápice caulinar)	= 100% médio

T5 (Asterix, Novo, Derivado de Calo)	= 100% médio
T6 (Asterix, Novo, Segmento nodal)	= 100% médio
T7 (Macaca, Velho, Derivado de Calo)	= 100% médio
T8 (Macaca, Velho, Ápice Caulinar)	= 90% médio; 10% aberto
T9 (Macaca, Novo, Ápice Caulinar)	= 100% médio
T10 (Macaca, Novo, Segmento Nodal)	= 95% médio; 5% aberto
T11 (Macaca, Novo, Derivado de Calo)	= 45% fechado; 55% médio
T12 (Macaca, Velho, Segmento Nodal)	= 95% médio; 5% fechado

14. Pigmentação na nervura principal

T1 (Asterix, Velho, Segmento Nodal)	=100% ausente
T2 (Asterix, Velho, Derivado de Calo)	=100% ausente
T3 (Asterix, Velho, Ápice Caulinar)	=100% ausente
T4 (Asterix, Novo, Ápice caulinar)	=100% ausente
T5 (Asterix, Novo, Derivado de Calo)	=100% ausente
T6 (Asterix, Novo, Segmento nodal)	= 100% presente
T7 (Macaca, Velho, Derivado de Calo)	=100% presente
T8 (Macaca, Velho, Ápice Caulinar)	=100% presente
T9 (Macaca, Novo, Ápice Caulinar)	= 100% ausente
T10 (Macaca, Novo, Segmento Nodal)	=100% presente
T11 (Macaca, Novo, Derivado de Calo)	=100% presente
T12 (Macaca, Velho, Segmento Nodal)	=100% presente

15. Tamanho dos folíolos

T1 (Asterix, Velho, Segmento Nodal)	= 15% pequeno, 70% médio, 15% grande
T2 (Asterix, Velho, Derivado de Calo)	= 10% pequeno, 75% médio, 15% grande
T3 (Asterix, Velho, Ápice Caulinar)	= 10% pequeno, 80% médio, 10% grande
T4 (Asterix, Novo, Ápice caulinar)	= 15% pequeno, 70% médio, 15% grande
T5 (Asterix, Novo, Derivado de Calo)	= 20% pequeno, 70% médio, 10% grande
T6 (Asterix, Novo, Segmento nodal)	= 85% médio, 15% grande
T7 (Macaca, Velho, Derivado de Calo)	= 85% médio; 15% grande
T8 (Macaca, Velho, Ápice Caulinar)	= 10% pequeno; 85% médio; 5% grande
T9 (Macaca, Novo, Ápice Caulinar)	= 15% pequeno; 70% médio; 15% grande
T10 (Macaca, Novo, Segmento Nodal)	= 95% médio; 5% grande
T11 (Macaca, Novo, Derivado de Calo)	= 60% médio; 40% grande
T12 (Macaca, Velho, Segmento Nodal)	= 10% pequeno; 80% médio; 10% grande

16. Largura dos folíolos

T1 (Asterix, Velho, Segmento Nodal)	= 10% estreito; 85% médio; 5% largo
T2 (Asterix, Velho, Derivado de Calo)	= 10% estreito; 85% médio; 5% largo
T3 (Asterix, Velho, Ápice Caulinar)	=90% médio; 10% largo
T4 (Asterix, Novo, Ápice caulinar)	=10% estreito; 85% médio; 5% largo
T5 (Asterix, Novo, Derivado de Calo)	=25% estreito; 70% médio; 5% largo
T6 (Asterix, Novo, Segmento nodal)	=80% médio, 20% largo
T7 (Macaca, Velho, Derivado de Calo)	=60% médio, 40% largo

T8 (Macaca, Velho, Ápice Caulinar)	= 90% médio; 10% largo
T9 (Macaca, Novo, Ápice Caulinar)	= 10% estreito; 85% médio; 5% largo
T10 (Macaca, Novo, Segmento Nodal)	= 100% médio
T11 (Macaca, Novo, Derivado de Calo)	= 20% estreito, 70% médio, 10% largo
T12 (Macaca, Velho, Segmento Nodal)	=5% estreito, 90% médio, 5 % largo

17. Coalescência dos folíolos

T1 (Asterix, Velho, Segmento Nodal)	= 20% ausente/ rara; 80% freqüente
T2 (Asterix, Velho, Derivado de Calo)	= 25% ausente/rara; 75% freqüente
T3 (Asterix, Velho, Ápice Caulinar)	= 20% ausente/ rara; 80% freqüente
T4 (Asterix, Novo, Ápice caulinar)	= 25% ausente/rara; 75% freqüente
T5 (Asterix, Novo, Derivado de Calo)	=50% ausente/rara ; 50% freqüente
T6 (Asterix, Novo, Segmento nodal)	=80% ausente/rara, 20%freqüente
T7 (Macaca, Velho, Derivado de Calo)	=85% ausente/rara, 15% freqüente
T8 (Macaca, Velho, Ápice Caulinar)	=75% ausente/rara; 25% freqüente
T9 (Macaca, Novo, Ápice Caulinar)	= 20% ausente/rara; 80% freqüente
T10 (Macaca, Novo, Segmento Nodal)	= 100% ausente/rara
T11 (Macaca, Novo, Derivado de Calo)	= 100% ausente/rara
T12 (Macaca, Velho, Segmento Nodal)	= 100% ausente/rara

18. Ondulação da borda dos folíolos

T1 (Asterix, Velho, Segmento Nodal)	=100% média
T2 (Asterix, Velho, Derivado de Calo)	=100% média
T3 (Asterix, Velho, Ápice Caulinar)	=100% média
T4 (Asterix, Novo, Ápice caulinar)	=100% média
T5 (Asterix, Novo, Derivado de Calo)	=95% média; 5% forte
T6 (Asterix, Novo, Segmento nodal)	=75% média, 25% débil
T7 (Macaca, Velho, Derivado de Calo)	=80% média, 20% débil
T8 (Macaca, Velho, Ápice Caulinar)	=100% débil
T9 (Macaca, Novo, Ápice Caulinar)	= 100% média
T10 (Macaca, Novo, Segmento Nodal)	= 100% débil
T11 (Macaca, Novo, Derivado de Calo)	= 100% débil
T12 (Macaca, Velho, Segmento Nodal)	= 100% débil

19. Frequência de folíolos 2ª

T1 (Asterix, Velho, Segmento Nodal)	=100% alta
T2 (Asterix, Velho, Derivado de Calo)	=70% alta; 30% média
T3 (Asterix, Velho, Ápice Caulinar)	=75% alta; 25% média
T4 (Asterix, Novo, Ápice caulinar)	=80% alta; 20% média
T5 (Asterix, Novo, Derivado de Calo)	=85% alta; 15% média
T6 (Asterix, Novo, Segmento nodal)	=100% alta
T7 (Macaca, Velho, Derivado de Calo)	=100% muito-alta
T8 (Macaca, Velho, Ápice Caulinar)	=85% média; 5% alta; 10% muito-alta
T9 (Macaca, Novo, Ápice Caulinar)	= 20% média; 80% alta
T10 (Macaca, Novo, Segmento Nodal)	= 90% alta; 10% muito-alta

T11 (Macaca, Novo, Derivado de Calo)	=10% débil; 90% média
T12 (Macaca, Velho, Segmento Nodal)	=70% alta; 30% muito-alta

20. Frequência de flores

T1 (Asterix, Velho, Segmento Nodal)	= 100% presente
T2 (Asterix, Velho, Derivado de Calo)	= 100% presente
T3 (Asterix, Velho, Ápice Caulinar)	= 100% presente
T4 (Asterix, Novo, Ápice caulinar)	= 100% presente
T5 (Asterix, Novo, Derivado de Calo)	= 100% presente
T6 (Asterix, Novo, Segmento nodal)	= 100% presente
T7 (Macaca, Velho, Derivado de Calo)	= 100% presente
T8 (Macaca, Velho, Ápice Caulinar)	= 100% presente
T9 (Macaca, Novo, Ápice Caulinar)	= 100% presente
T10 (Macaca, Novo, Segmento Nodal)	= 100% presente
T11 (Macaca, Novo, Derivado de Calo)	= 100% presente
T12 (Macaca, Velho, Segmento Nodal)	= 100% presente

21. Comprimento do pedúnculo floral

T1 (Asterix, Velho, Segmento Nodal)	= 55% médio; 45% longo
T2 (Asterix, Velho, Derivado de Calo)	=45% médio; 55% longo
T3 (Asterix, Velho, Ápice Caulinar)	=45% médio; 55% longo
T4 (Asterix, Novo, Ápice caulinar)	=5% curto; 30% médio; 65% longo
T5 (Asterix, Novo, Derivado de Calo)	=60% médio; 40% longo
T6 (Asterix, Novo, Segmento nodal)	=5% curto; 30% médio; 65% longo
T7 (Macaca, Velho, Derivado de Calo)	=5% curto; 45% médio; 55% longo
T8 (Macaca, Velho, Ápice Caulinar)	=5% curto; 85% médio;10% longo
T9 (Macaca, Novo, Ápice Caulinar)	= 10% curto; 75% médio; 15% longo
T10 (Macaca, Novo, Segmento Nodal)	= 20% curto; 45% médio; 35% longo
T11 (Macaca, Novo, Derivado de Calo)	= 15% curto; 55% médio; 25% longo
T12 (Macaca, Velho, Segmento Nodal)	=5% curto; 50% médio; 45% longo

22. Pigmentação do pedúnculo floral

T1 (Asterix, Velho, Segmento Nodal)	=100% ausente
T2 (Asterix, Velho, Derivado de Calo)	=95% ausente; 5% presente
T3 (Asterix, Velho, Ápice Caulinar)	=100% ausente
T4 (Asterix, Novo, Ápice caulinar)	=100% ausente
T5 (Asterix, Novo, Derivado de Calo)	=100% ausente
T6 (Asterix, Novo, Segmento nodal)	=95% ausente, 5% presente
T7 (Macaca, Velho, Derivado de Calo)	=100% presente
T8 (Macaca, Velho, Ápice Caulinar)	=100% presente
T9 (Macaca, Novo, Ápice Caulinar)	= 15% ausente; 85% presente
T10 (Macaca, Novo, Segmento Nodal)	= 5% ausente; 95% presente
T11 (Macaca, Novo, Derivado de Calo)	= 15% ausente; 85% presente
T12 (Macaca, Velho, Segmento Nodal)	=100% presente

23. Coloração na parte interna da corola

T1 (Asterix, Velho, Segmento Nodal)	= 100% violeta ametista
-------------------------------------	-------------------------

T2 (Asterix, Velho, Derivado de Calo)	= 100% violeta ametista
T3 (Asterix, Velho, Ápice Caulinar)	= 100% violeta ametista
T4 (Asterix, Novo, Ápice caulinar)	= 100% violeta ametista
T5 (Asterix, Novo, Derivado de Calo)	= 100% violeta ametista
T6 (Asterix, Novo, Segmento nodal)	= 100% violeta ametista
T7 (Macaca, Velho, Derivado de Calo)	= 100% violeta ametista
T8 (Macaca, Velho, Ápice Caulinar)	= 100% violeta ametista
T9 (Macaca, Novo, Ápice Caulinar)	= 100% violeta ametista
T10 (Macaca, Novo, Segmento Nodal)	= 100% violeta ametista
T11 (Macaca, Novo, Derivado de Calo)	= 100% violeta ametista
T12 (Macaca, Velho, Segmento Nodal)	= 100% violeta ametista

24. Intensidade da pigmentação na parte interna da corola, em flores coloridas

T1 (Asterix, Velho, Segmento Nodal)	=35% fraca; 65% média
T2 (Asterix, Velho, Derivado de Calo)	=85% fraca; 15% forte
T3 (Asterix, Velho, Ápice Caulinar)	=10% fraca; 90% média
T4 (Asterix, Novo, Ápice caulinar)	=100% média
T5 (Asterix, Novo, Derivado de Calo)	=100% fraca
T6 (Asterix, Novo, Segmento nodal)	=100% média
T7 (Macaca, Velho, Derivado de Calo)	=100% média
T8 (Macaca, Velho, Ápice Caulinar)	=100% média
T9 (Macaca, Novo, Ápice Caulinar)	= 10% fraca; 70% média; 20% forte
T10 (Macaca, Novo, Segmento Nodal)	= 100% média
T11 (Macaca, Novo, Derivado de Calo)	= 55% média; 45% forte
T12 (Macaca, Velho, Segmento Nodal)	=100% médio

27. Ciclo Vegetativo

T1 (Asterix, Velho, Segmento Nodal)	= 100% precoce
T2 (Asterix, Velho, Derivado de Calo)	= 100% médio
T3 (Asterix, Velho, Ápice Caulinar)	= 100% médio
T4 (Asterix, Novo, Ápice caulinar)	= 100% médio
T5 (Asterix, Novo, Derivado de Calo)	= 100% médio
T6 (Asterix, Novo, Segmento nodal)	= 100% médio
T7 (Macaca, Velho, Derivado de Calo)	= 100% precoce
T8 (Macaca, Velho, Ápice Caulinar)	= 100% precoce
T9 (Macaca, Novo, Ápice Caulinar)	= 100% precoce
T10 (Macaca, Novo, Segmento Nodal)	= 100% precoce
T11 (Macaca, Novo, Derivado de Calo)	= 100% precoce
T12 (Macaca, Velho, Segmento Nodal)	= 100% precoce

28. Formato do Tubérculo

T1 (Asterix, Velho, Segmento Nodal)	= 80% longo e 20% oval-along
T2 (Asterix, Velho, Derivado de Calo)	= 70% longo, 20% oval-along e 10% oval
T3 (Asterix, Velho, Ápice Caulinar)	= 60% longo, 10% oval-along e 30% oval

T4 (Asterix, Novo, Ápice caulinar)	= 40% longo, 30% oval-along e 30% oval
T5 (Asterix, Novo, Derivado de Calo)	= 60% longo e 40% oval-along.
T6 (Asterix, Novo, Segmento nodal)	= 50% longo, 20% oval-along e 30% oval
T7 (Macaca, Velho, Derivado de Calo)	= 70% redondo, 30% oval = 60% redondo, 30% oval e 10% oval-along.
T8 (Macaca, Velho, Ápice Caulinar)	
T9 (Macaca, Novo, Ápice Caulinar)	= 70% redondo, 30% oval.
T10 (Macaca, Novo, Segmento Nodal)	= 50% redondo e 50% oval
T12 (Macaca, Velho, Segmento Nodal)	= 70% redondo e 30% oval

29. Profundidade dos olhos de tubérculos

T1 (Asterix, Velho, Segmento Nodal)	= 100% rasos
T2 (Asterix, Velho, Derivado de Calo)	= 100% rasos
T3 (Asterix, Velho, Ápice Caulinar)	= 100% rasos
T4 (Asterix, Novo, Ápice caulinar)	= 100% rasos
T5 (Asterix, Novo, Derivado de Calo)	= 100% rasos
T6 (Asterix, Novo, Segmento nodal)	= 100% rasos
T7 (Macaca, Velho, Derivado de Calo)	= 100% rasos
T8 (Macaca, Velho, Ápice Caulinar)	= 100% rasos
T9 (Macaca, Novo, Ápice Caulinar)	= 100% rasos
T10 (Macaca, Novo, Segmento Nodal)	= 100% rasos
T11 (Macaca, Novo, Derivado de Calo)	= 100% rasos
T12 (Macaca, Velho, Segmento Nodal)	= 100% rasos

30. Aspereza da película dos tubérculos

T1 (Asterix, Velho, Segmento Nodal)	= 40% lisa; 60% reticulada
T2 (Asterix, Velho, Derivado de Calo)	= 30% lisa; 70% reticulada
T3 (Asterix, Velho, Ápice Caulinar)	= 30% lisa; 70% reticulada
T4 (Asterix, Novo, Ápice caulinar)	= 40% lisa; 60% áspera
T5 (Asterix, Novo, Derivado de Calo)	= 60% lisa; 40% áspera
T6 (Asterix, Novo, Segmento nodal)	= 30% lisa; 70% áspera
T7 (Macaca, Velho, Derivado de Calo)	= 10% lisa; 90% reticulada
T8 (Macaca, Velho, Ápice Caulinar)	= 20% lisa; 80% reticulada
T9 (Macaca, Novo, Ápice Caulinar)	= 20% lisa; 80% reticulada
T10 (Macaca, Novo, Segmento Nodal)	= 20% lisa; 80% reticulada
T11 (Macaca, Novo, Derivado de Calo)	= 30% lisa; 70% áspera
T12 (Macaca, Velho, Segmento Nodal)	= 10% lisa; 90% reticulada

31. Cor da Película de Tubérculo

T1 (Asterix, Velho, Segmento Nodal)	= 90% amarela e 10% vermelha
T2 (Asterix, Velho, Derivado de Calo)	= 10% amarela e 90% vermelha
T3 (Asterix, Velho, Ápice Caulinar)	= 20% amarela e 80% vermelha
T4 (Asterix, Novo, Ápice caulinar)	= 100% vermelha
T5 (Asterix, Novo, Derivado de Calo)	= 30% amarela e 70% vermelha
T6 (Asterix, Novo, Segmento nodal)	= 50% amarela e 50% vermelha
T7 (Macaca, Velho, Derivado de Calo)	= 100% vermelha

T8 (Macaca, Velho, Ápice Caulinar)	= 100% vermelha
T9 (Macaca, Novo, Ápice Caulinar)	= 100% vermelha
T10 (Macaca, Novo, Segmento Nodal)	= 100% vermelha
T11 (Macaca, Novo, Derivado de Calo)	= 100% vermelha
T12 (Macaca, Velho, Segmento Nodal)	= 100% vermelha

32. Cor de polpa de tubérculo

T1 (Asterix, Velho, Segmento Nodal)	= 100% amarela clara
T2 (Asterix, Velho, Derivado de Calo)	= 100% amarela clara
T3 (Asterix, Velho, Ápice Caulinar)	= 100% amarela clara
T4 (Asterix, Novo, Ápice caulinar)	= 100% amarela clara
T5 (Asterix, Novo, Derivado de Calo)	= 100% amarela clara
T6 (Asterix, Novo, Segmento nodal)	= 10% branca e 90% amarela clara
T7 (Macaca, Velho, Derivado de Calo)	= 100% amarela clara
T8 (Macaca, Velho, Ápice Caulinar)	= 100% amarela clara
T9 (Macaca, Novo, Ápice Caulinar)	= 100% amarela clara
T10 (Macaca, Novo, Segmento Nodal)	= 10% branca e 90% amarela clara
T11 (Macaca, Novo, Derivado de Calo)	= 100% amarela clara
T12 (Macaca, Velho, Segmento Nodal)	= 70% branca e 30% amarela clara

33. Esverdeamento dos tubérculos

T1 (Asterix, Velho, Segmento Nodal)	= 90% ausente/muito fraco, 10% fraco
T2 (Asterix, Velho, Derivado de Calo)	= 100% ausente/muito fraco
T3 (Asterix, Velho, Ápice Caulinar)	= 100% ausente/muito fraco
T4 (Asterix, Novo, Ápice caulinar)	= 90% ausente/muito fraco, 10% fraco
T5 (Asterix, Novo, Derivado de Calo)	= 90% ausente/muito fraco, 10% fraco
T6 (Asterix, Novo, Segmento nodal)	= 100% ausente/muito fraco
T7 (Macaca, Velho, Derivado de Calo)	= 100% ausente/muito fraco
T8 (Macaca, Velho, Ápice Caulinar)	= 100% ausente/muito fraco
T9 (Macaca, Novo, Ápice Caulinar)	= 100% ausente/muito fraco
T10 (Macaca, Novo, Segmento Nodal)	= 100% ausente/muito fraco
T11 (Macaca, Novo, Derivado de Calo)	= 100% ausente/muito fraco
T12 (Macaca, Velho, Segmento Nodal)	= 100% ausente/muito fraco
