

CALOGÊNESE IN VITRO DE DUAS CULTIVARES DE MORANGUEIRO (*Fragaria x ananassa*) A PARTIR DE DISCOS FOLIARES

FLORES, Rejane¹; GOMES, Patrícia R.¹; FARIA Janine T. C.¹; CENTELLAS, Alberto Q.¹; FORTES Gerson R. de L.²; PETERS, José A.³

¹ UFPel/FAEM Depto. de Fitotecnia - CAMPUS Universitário Cx. Postal 354 - CEP 96010-900 - Pelotas, RS

² EMBRAPA/CPACT, BR 392, Km 78, C.P. 403, 96001-970, Pelotas, RS

³ UFPel, Depto. de Botânica - CAMPUS Universitário - Cx. Postal 354 - CEP 96010-900 Pelotas, RS
(Recebido para publicação em 20/02/98)

RESUMO

Conduziram-se dois ensaios com o objetivo de desenvolver um protocolo para a calogênese de morangueiro cvs. Konvoy-Cascata e Chandler, a fim de serem utilizados em futuros programas de melhoramento. Discos foliares foram inoculados em sais e vitaminas MS, mio-inositol (100mg.l⁻¹), sacarose (30g.l⁻¹), ágar (6g.l⁻¹) e BAP (1µM). Testaram-se seis concentrações (0; 3; 6; 9; 12 e 15µM) de 2,4-D ou de picloram na indução da calogênese de ambas cultivares. No segundo ensaio, estudou-se o pré-condicionamento dos explantes em cinco períodos (0; 1; 2; 3 e 4 semanas) de escuro. Observou-se formação de calos em todos os tratamentos, exceto naqueles isentos de auxinas. As cultivares diferiram estatisticamente em ambos ensaios. Na cv. Konvoy-Cascata, o 2,4-D propiciou uma maior intensidade de calo e os períodos de escuro não diferiram estatisticamente para esta variável. Já na cv. Chandler, o 2,4-D e o picloram não mostraram diferenças significativas quanto a intensidade de calo, enquanto que, o pré-condicionamento dos explantes no escuro favoreceu significativamente o crescimento dos mesmos.

Palavras-chave: morangueiro, calogênese, cultura de tecidos, 2,4-D, picloram.

ABSTRACT

CALOGENESIS IN VITRO OF TWO CULTIVARS OF STRAWBERRY PLANTS (*Fragaria x ananassa*) FROM FOLIAL DISKS. Two experiments were performed aiming to develop some protocol to produce callogenesis on strawberry plants, Konvoy-Cascata and Chandler cultivars, in order to employ them on forthcoming improvement programs. Folial disks were inoculated into salts and vitamins MS, myo-inositol (100 mg.l⁻¹), sucrose (30 g.l⁻¹), agar (6 g.l⁻¹) and BAP (1µM). Six 2,4-D or picloran concentrations (0, 3, 6, 9, 12 and 15 µM) were tested to induce callogenesis on both

cultivars. In the second experiment, we studied explants pre-conditioning under five different dark periods (0, 1, 2, 3 and 4 weeks). Callogenesis were observed in all treatments, exception to those with no auxins. Cultivars differed statistically in both experiments. On Konvoy-Cascata, 2,4-D proved to provide larger callus intensity, and dark periods showed no statistical difference concerning this variable. For Chandler both 2,4-D and picloran didn't show significant difference for callus intensity. However, the explants pre-conditioning in the dark promoted their growth significantly.

Key words: strawberry plant, callus, tissue culture

INTRODUÇÃO

A propagação in vitro de morangueiros tornou-se uma prática eficaz para a produção em larga escala de plantas com sanidade controlada (BOXUS, 1977), preservação de cultivares indefinidamente e aumento na produção de estolões (MAAS, 1984).

Apesar da micropropagação usualmente obter clones, plantas com alterações genéticas podem ser produzidas, principalmente através do cultivo de calos e protoplastos (KARP, 1989).

O calo corresponde a uma massa de células desorganizadas e parcialmente indiferenciadas que variam quanto ao tipo, tamanho, conteúdo celular e espessura da parede. Traqueídeos, células parenquimáticas, câmbio e periderme podem se formar durante a calogênese (NARAYANASWAMY, 1977).

A variação somaclonal é um termo que descreve as variações observadas entre os tecidos cultivados in vitro (LARKIN & SCOWCROFT, 1981), sendo vista como fonte adicional de variabilidade, importante para plantas propagadas vegetativamente como o morangueiro. Os variantes somaclonais podem ser expostos a condições especiais que permitam a seleção dos variantes ou

mutantes espontâneos. Entre as muitas linhagens selecionadas, destacam-se aquelas que apresentam resistência à herbicidas, toxinas de fungos patogênicos, estresses ambientais, metais pesados e outros (HANDRO *et al.*, 1980). Portanto, a definição de uma metodologia de obtenção de somaclones de morangueiro pode ser uma ferramenta valiosa para o melhoramento tradicional de cultivares desta espécie.

Este trabalho teve como objetivo estudar o efeito de diferentes concentrações de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) ou picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico) e do pré-condicionamento dos explantes no escuro sobre a calogênese de morangueiro cvs. Konvoy-Cascata e Chandler.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos do Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (CPACT/EMBRAPA), Pelotas,RS.

Utilizaram-se como explantes discos foliares (0,6cm de diâmetro) de morangueiro cvs. konvoy-Cascata e Chandler, provenientes do cultivo *in vitro*.

O meio de cultura básico utilizado nos experimentos continha os sais e vitaminas de MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), acrescido de mio-inositol (100mg.l^{-1}), sacarose (30g.l^{-1}), agar (6g.l^{-1}) e BAP (6-benzilaminopurina) ($1\mu\text{M}$). O pH foi ajustado para 5,9.

Cada explante foi colocado individualmente em tubos de ensaio (25 x 150mm) com a face adaxial em contato com o meio de cultura.

As condições da sala de crescimento foram de temperatura à 25 (2°C, fotoperíodo de 16 horas de luz e (2000 lux de luminância).

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso com cinco repetições e seis explantes por tratamento. Os dados qualitativos foram analisados pelo teste de Duncan e os quantitativos pela regressão polinomial, com (0,01. Os dados expressos em percentagem foram transformados segundo arco seno

raiz quadrada de $(X/100)$, onde X significa o valor percentual obtido para cada variável. Para a variável intensidade de calo, os dados foram transformados segundo logaritmo de $(X/100)$, onde X significa o valor obtido.

Efeito do 2,4-D e picloram na calogênese

Testaram-se seis concentrações (0; 3; 6; 9; 12 e $15\mu\text{M}$) de 2,4-D ou de picloram na indução da calogênese. Após a inoculação, os explantes foram incubados no escuro por um período de três semanas. Posteriormente, foram conduzidos à sala de crescimento.

O ensaio foi avaliado aos 55 dias pelos parâmetros percentagem de calo formado e intensidade de calo. Para esta variável utilizou-se uma escala de 1 à 4, onde 1= ausência calo; 2 = pequena; 3 = média e 4 = grande formação de calo.

Efeito do escuro na calogênese

Testaram-se cinco períodos (0; 1; 2; 3 e 4 semanas) de escuro na calogênese de ambas cultivares. Ao meio de cultura básico foi adicionado $15\mu\text{M}$ de 2,4-D.

Após serem submetidos aos diferentes períodos de escuro, os tratamentos foram conduzidos à sala de crescimento.

As avaliações foram feitas após 50 dias de cultivo pela variável intensidade de calo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se a formação de calos em todos os tratamentos, exceto naqueles isentos das auxinas 2,4-D ou picloram. Estes dados concordam com GRATTAPAGLIA & MACHADO (1990) que relatam a indução da calogênese em meio com altas concentrações de auxinas, sendo 2,4-D um dos reguladores de crescimento mais eficazes na indução de calos (AMMIRATO, 1983).

Maior intensidade média de calo foi obtida com a cv. Chandler, a qual diferiu significativamente da cv. Konvoy-Cascata (Figura 1).

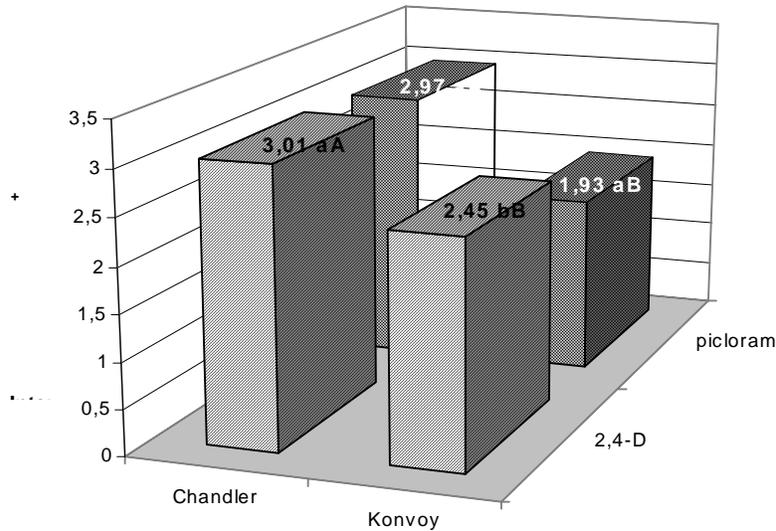


Figura 1- Intensidade média de calo formado em moranguero cv. Chandler e Konvoy-Cascata em função das concentrações de picloram e 2,4-D. EMBRAPA/CPACT, Pelotas, RS, 1998*

*Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem significativamente quanto aos reguladores e letra maiúscula quanto as cultivares, pelo teste de Duncan a 1% de probabilidade.

+Escala de 1-4, onde 1=ausência; 2=pequena; 3=média e 4=grande formação de calo.

Vários trabalhos têm demonstrado que certos grupos de plantas respondem mais facilmente em culturas *in vitro* que outros. Estas diferenças mostram que as condições ideais para o cultivo *in vitro* variam com o genótipo em estudo (AMMIRATO, 1986).

JONES *et al.* (1988) trabalhando com calogênese em oito cultivares de moranguero, também observou diferença entre os genótipos. Respostas diferentes entre genótipos têm sido relatadas em milho (GREEN & PHILLIPS, 1975), tabaco (HEBERLE-BORS, 1984),

alfafa (KAO & MICHAYLUK, 1980) e outras culturas

Na cv. Konvoy-Cascata, o 2,4-D mostrou-se estatisticamente superior ao picloram quanto a intensidade de calo (Figura 1), concordando com os dados verificados por GONZALEZ-BENITO & ALDERSON (1995) em *Alstroemeria*. Os melhores resultados foram registrados com 10,1(µM de 2,4-D, a partir desta concentração houve uma tendência a redução do crescimento dos calos (Figura 2).

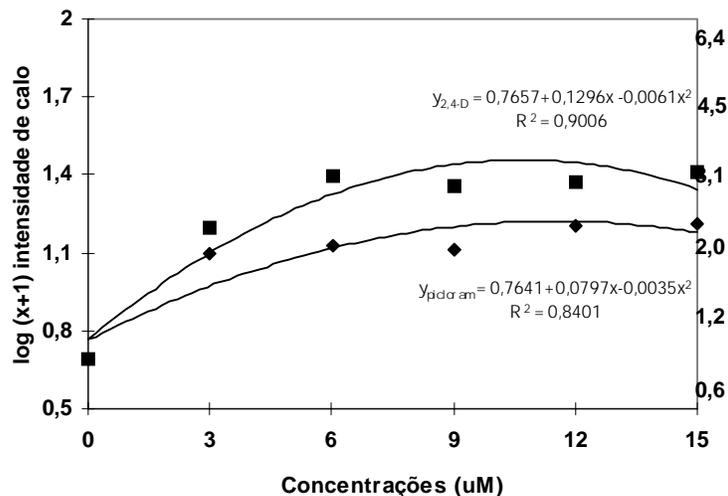


Figura 2 - Intensidade de calo formado em moranguero cv. Konvoy-cascata, em meio com diferentes concentrações de 2,4-D ou de picloram. EMBRAPA/CPACT, Pelotas, RS, 1998

O 2,4-D e o picloram mostraram o mesmo efeito no crescimento dos calos na cv. Chandler, não havendo diferença estatística entre os mesmos (Figura 1). Uma maior intensidade de calo foi obtida com 10,5(μM de 2,4-D ou de picloram , decrescendo em concentrações superiores (Figura 3) .

Estes dados concordam com JONES *et al.* (1988)

que observaram a formação de calos em várias cultivares de morangueiro dentro de quatro a oito semanas em meio com 2,4-D e BAP. NEHRA *et al.* (1990) estudando variação somaclonal em morangueiro, obteve calogênese em meios com 1-10(μM de 2,4-D e BAP, sendo que as melhores respostas para o crescimento dos calos foram registradas com 5(μM de BAP e 2,4-D.

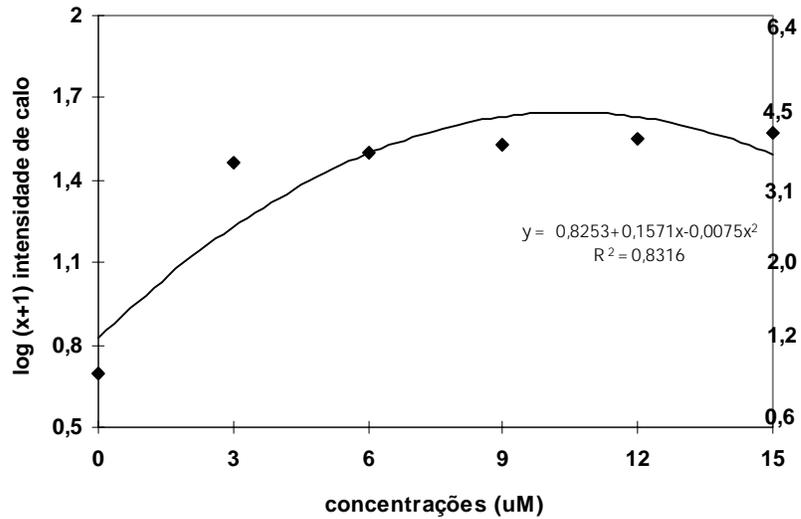


Figura 3 - Intensidade de calo formado em morangueiro cv.Chandler, em meio com 2,4-D ou picloram. EMBRAPA/CPACT, Pelotas, RS, 1998

BLANDO *et al.* (1993) relataram que cerca de 90% de explantes foliares de morangueiro cv. Pajaro formaram calos com 9(μM de 2,4-D e 4,6(μM de cinetina.

No entanto, para algumas espécies, o picloram também mostra-se bastante eficiente na indução de

calos (HAGEN *et al.*, 1990), fato este verificado na cv. Chandler.

As cultivares diferiram significativamente entre si quando se avaliou o efeito de diferentes períodos de escuro, onde os calos mais desenvolvidos foram observados na cv. Chandler (Figura 4).

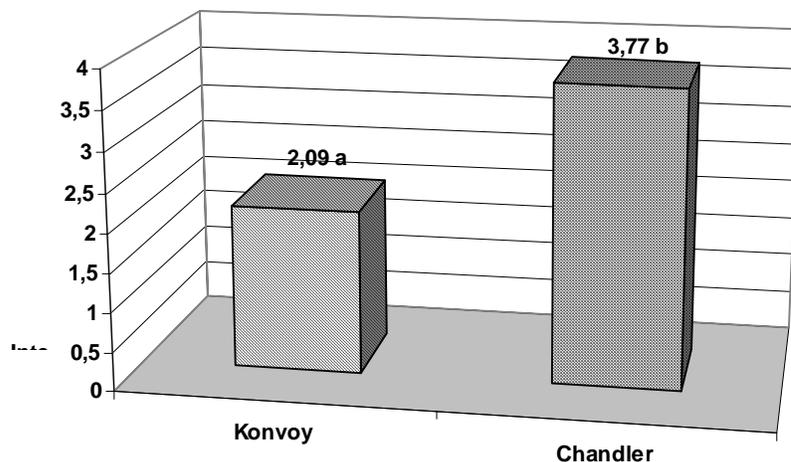


Figura 4 - Intensidade média de calo formado em morangueiro cv. Konvoy-Cascata e Chandler em função do pré-condicionamento dos explantes no escuro. EMBRAPA/CPACT, Pelotas, RS, 1998

Os diferentes períodos de escuro não diferiram estatisticamente quanto a intensidade de calo formado na cv. Konvoy-Cascata. Explantes submetidos ao escuro durante 4 semanas apresentaram um pequeno acréscimo na intensidade de calo (2,2), quando comparado com explantes levados diretamente sob à luz (2,0).

Apesar da maioria dos trabalhos relatar que a calogênese desenvolve-se melhor no escuro, FÁRIA

(1996) também não observou diferença significativa entre períodos de escuro na intensidade de calos de macieira cv. Marubakaido.

Na cv. Chandler, o escuro favoreceu significativamente o crescimento dos calos. Observou-se uma intensidade máxima de 4,0 quando os explantes foram submetidos a 3-4 semanas de escuro antes de serem transferidos para a luz (Figura 5).

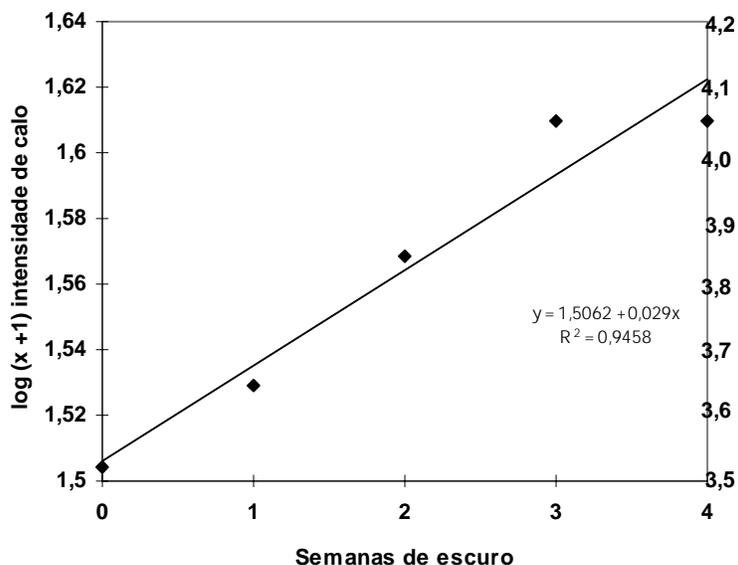


Figura 5 - Intensidade de calo formado de morangueiro cv. Chandler em função do pré-condicionamento dos explantes em diferentes tempos de escuro. EMBRAPA/CPACT, Pelotas, RS, 1998

Estes dados estão de acordo com BLANDO *et al.* (1993) que trabalhando com morangueiro cv. Pajaro, verificaram que o pré-condicionamento dos explantes no escuro por 20-40 dias, seguida pela exposição à luz, propiciou melhores resultados na calogênese.

Desta forma, estes resultados confirmam a importância do desenvolvimento de protocolos específicos para a indução de calo de acordo com o genótipo em estudo.

CONCLUSÕES

3-15 μ M de 2,4-D ou de picloram formam calos em 100% dos explantes formam calos nas cvs. Chandler e Konvoy-Cascata.

A cv. Chandler mostra-se mais responsiva que a cv. Konvoy-Cascata quanto a intensidade de calo formado.

2,4-D é superior ao picloram na calogênese da cv. Konvoy-Cascata.

Pré-condicionamento dos explantes, por três a quatro semanas no escuro, favorece o crescimento dos calos na cv. Chandler.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos funcionários do Laboratório de Cultura de Tecidos da EMBRAPA/CPACT pelo apoio, colaboração e agradável convívio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMMIRATO, P. V. Embryogenesis. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V. & YAMADA, Y. Handbook of plant cell culture-techniques for propagation and breeding. New York: Macmillan Publishing, 1983. p. 82-123.

AMMIRATO, P. V. Control and expression of morphogenesis in culture. In: WITHERS, L. A.; ALDERSON, P. G. Plant tissue culture and its agricultural applications. London: Butterwoths, 1986. Cap. 2. p. 23-45.

BLANDO, F.; NIGLIO, A.; FRATTARELLI, A. Cell suspension culture in strawberry: growth characterization and variability. *Acta Hort.*, v. 336, p. 257-262, 1993.

BOXUS, P.; QUOIRIN, M.; LAINE, J. M. Large scale propagation of strawberry plants from tissue culture. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y. P. S. Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ

culture. Berlin: Spring-Verlag, 1977. Cap. 7. p. 130-143.

FARIA, J. T. C. Calogênese e organogênese em porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido (*Malus prunifolia* Willd, Borkh). Pelotas-RS. 51 p. Tese (Mestrado em Agronomia) - Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, 1996.

GONZALEZ-BENITO, M. E.; ALDERSON, P. G. Callus induction in *Alstroemeria*. *Phyton*. Buenos Aires, v. 57, n. 1, p. 67-75, 1995.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1990. Cap. 2. p.99-169.

GREEN, C. E.; PHILLIPS, R. L. Plant regeneration from tissue cultures of maize. *Crop. Sci.*, v. 15, p. 417-421, 1975.

HAGEN, S. R.; TOURNEAU, D. L.; MUNETA, P.; BROWN, J. Initiation and culture of potato tuber callus tissue with picloram. *Plant Growth Regulation*, v. 9, p. 341-345, 1990.

HANDRO, W.; KERBAUY, G. B. Obtenção de plantas modificadas utilizando a cultura de tecidos e células vegetais. *Ciência e Cultura*, São Paulo, v. 33, n. 6, p. 790-797, 1980.

HEBERLE-BORS, E. Genotypic control of pollen plant formation in *Nicotiana tabacum* L. *Theoret. Appl. Genet.*, v. 68, p. 475-479, 1984.

JONES, O. P.; WALLER, B. J.; BEECH, M. G. The production of strawberry plant from callus culture. *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.*, v. 12, p. 235-241, 1988.

KAO, K. N.; MICHAYLUK, M. R. Plant regeneration from mesophyle protoplast of alfafa. *Z. Pflanzenphysiol*, v. 96, p. 135-141, 1980.

KARP, A. Can genetic instability be controlled in plant tissue culture? *IAPTC Newsletter*, v. 58, p. 2-11, 1984.

LARKIN, P. J.; SCOWCROFT, W. R. Somaclonal variation a novel of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.*, Canberra, v. 60, p. 197-214, 1981.

MAAS, J. L. Compendium of strawberry diseases. USA: American Phytopathological Society, 1984.

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

NARAYANASWAMY, S. Regeneration of plants from tissue cultures. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y. P. S. Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture. Berlin: Spring-Verlag, 1977. Cap. 10. p. 179-206.

NEHRA, N. S.; STUSHNOFF, C.; KARTHA, K. K. Regeneration of plant from immature leaf - derived callus of strawberry (*Fragaria ananassa*). *Plant Sci.*, v. 66, p. 119-126, 1990.