

**MAILSON MONTEIRO DO RÊGO**

**INDUÇÃO *IN VITRO* DE HAPLÓIDES E DE POLIPLÓIDES E DETECÇÃO MOLECULAR  
DE ALELOS DA AUTO-INCOMPATIBILIDADE EM MARACUJAZEIRO (*Passiflora edulis* f.  
*flavicarpa* Deg.).**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós - Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2001

A Deus Pai, por estar presente em minha vida

A Jerônimo, meu pai, *in memoriam*

A minha esposa, Elizanilda

A minha Filha, Rebeca

Dedico.

## AGRADECIMENTOS

Ao amor e misericórdia de Deus Pai, que conhecemos e nele cremos, sem o qual não seria possível concluirmos este trabalho.

A minha esposa Elizanilda e a minha filha Rebeca, pelo incentivo, dedicação, e acima de tudo, muito amor, carinho e compreensão para comigo.

À Universidade Federal de Viçosa, que com muito zelo nos acolheu e muito contribuiu para minha formação intelectual e pessoal.

À Universidade Federal de Roraima, que reconheceu a necessidade premente de qualificar seu corpo docente, permitindo-nos concluir nossos estudos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-PICDT), pela concessão da bolsa de estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Cláudio Horst Bruckner, pela orientação, apoio, confiança e amizade ao longo do curso.

Ao Prof. Dr. Fernando Luiz Finger, pelos conselhos, críticas, sugestões e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Células e Tecidos Vegetais do Departamento de Fruticultura da UFV, Prof. Dr. José Maria Moreira Dias, Márcio, Cenira, e Carla, pelo bom trato e amizade de irmãos que tive durante minha estada neste laboratório.

Ao Prof. Dr. Wagner Campos Otoni, pelo incentivo incessante, pelos sábios conselhos, por saber ser amigo e, acima de tudo, por acreditar que nós podemos fazer melhor.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Células e tecidos Vegetais do Bioagro, UFV, aqui representados por Elizonete, Vespaziano e Edgar, que de modo simples e descontraído, muito contribuíram na condução dos experimentos.

A meus irmãos, Marcos, Mário, Marcelo, Mauri, Márcia, Márcio e Marônio, que mesmo de longe, sempre torceram pelo meu sucesso.

À minha mãe, Terezinha de Jesus Monteiro, que com seu amor angelical, soube nos criar e nos educar.

À minha Tia, Adalva A. Monteiro, pela empreendedora que é, por que investiu em nós seu amor-de-mãe sem ter a certeza de que colheria bons frutos.

Aos meus grandes amigos adquiridos durante minha estadia em Viçosa, Prof. Alexandre, Prof. João Meira Neto, Prof. Serrão, Prof. Eldo, Prof. Cosme, Prof. Wagner, Profa. Aristéia, Profa. Renata, as minhas amigas Lú e Lú Martinelli, ao meu amigo Gilmar, a Ilza, a minha comadre Mércia, ao meus amigos Igor, Vanessa, Letícia e a angelical Júlia.

Às minhas amigas e técnicas Zilda e Rosane do Laboratório de Anatomia Vegetal, pela valiosa ajuda no trato com o material da minha Tese.

Enfim, a todos que, direta e indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## BIOGRAFIA

MAILSON MONTEIRO DO RÊGO, filho de Jerônimo Cavalcante do Rêgo e Terezinha de Jesus Monteiro do Rêgo, nasceu em Boqueirão, PB, em 28 de julho de 1966.

Em dezembro de 1990, graduou-se Biólogo pela Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campina Grande, PB.

Em 1991, exerceu atividades como docente de Biologia no Colégio Pio XI, em Campina Grande, PB.

Desde 05 de fevereiro de 1992, atua como docente na Escola Agrotécnica da Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, RR.

Em 27 de fevereiro de 1997, concluiu o Curso de Pós -Graduação em Genética e Melhoramento, em nível de Mestrado, pela Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, e em 05 de março de 1997, iniciou o Curso de Pós-graduação em Genética e Melhoramento em nível de Doutorado, na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

## ÍNDICE

	Página
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	8
CAPÍTULO I - Indução de ginogênese in vitro em maracujazeiro ( <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> Deg.) a partir de óvulos não-fertilizados.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
Material vegetal.....	16
Condições de cultivo.....	18
3. RESULTADOS.....	18
Indução da ginogênese.....	19
Efeito do genótipo.....	21
4. DISCUSSÃO.....	24
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27
CAPÍTULO II - Indução in vitro de tetraplóides de maracujazeiro ( <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> Deg.).....	31
1. INTRODUÇÃO.....	32
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
Desinfestação e germinação de sementes.....	36
Tipo de explante.....	37
Meio de indução de poliploidia.....	37
Análise do efeito fitotóxico.....	38
Meio de alongamento e enraizamento das brotações.....	38
Aclimação das plantas regeneradas.....	38
Cultivo em hidroponia.....	39
Determinação do nível de ploidia.....	39
Número de cloroplastos por célula-guarda dos estômatos.....	40
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
Avaliação do efeito fitotóxico dos agentes antimitóticos.....	40
Avaliação do nível de ploidia de plantas regeneradas.....	43
Número de cloroplastos das células-guardas do estômato.....	44
Fenótipo das plantas tetraplóides.....	45

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
CAPÍTULO III - Detecção molecular dos alelos da auto-incompatibilidade em maracujazeiro ( <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> Deg.) por meio de técnica de PCR.....	53
1. INTRODUÇÃO.....	54
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	58
Material vegetal.....	58
Extração do DNA genômico.....	58
Amplificação do DNA.....	58
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
RESUMO E CONCLUSÕES GERAIS.....	64

## RESUMO

RÊGO, Mailson Monteiro do, D. S., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2001. **Indução *in vitro* de haplóides e de poliplóides e detecção molecular de alelos da auto-incompatibilidade em maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.).** Orientador: Claudio Horst Bruckner. Conselheiros: Wagner Campos Otoni e Fernando Luiz Finger.

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a resposta ginogênica em 11 genótipos, adequar metodologia para indução *in vitro* de poliplóides e detectar alelos da auto-incompatibilidade em maracujazeiro azedo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener). Para avaliar os 11 genótipos, óvulos não-fertilizados foram inoculados em meio MS suplementado com as vitaminas do meio B5, 100 mg.L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 3% de sacarose, 5,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4 – D e 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e cultivado na ausência de luz a 27°C ± 1. Na indução dos poliplóides, utilizou-se explantes de segmentos de hipocótilo (1,0 cm de comprimento) de plantas germinadas *in vitro* e o meio MS suplementado com agentes antimitóticos, colchicina (0, 25, 250 e 1250 µM) e orizalina (0, 5, 15 e 30 µM). A determinação do nível ploidia das plantas regeneradas e aclimatadas foi feita por meio da contagem do número de cromossomos em células metafásicas de ponta de raiz. Na

detecção molecular dos alelos S da auto -incompatibilidade, reações de PCR foram conduzidas utilizando DNA genômico extraído de folhas jovens e oligonucleotídeos iniciadores específicos para os alelos-S das classes I e II. O genótipo II – 20 apresentou melhor resposta ginogênica, produzindo 21 embriões (7,07% dos óvulos inoculados). Na indução dos poliplóides, os meios mais adequados foram MS suplementado com colchicina a 25  $\mu$ M e MS suplementado orizalina a 15  $\mu$ M. A colchicina, em concentrações superiores (250 e 1250  $\mu$ M) foi fitotóxica aos explantes. Os indivíduos diplóides apresentaram  $2n = 2x = 18$  cromossomas, enquanto os tetraplóides,  $2n = 4x = 36$ . O número de cloroplastos por célula guarda foi eficiente indicador do nível de ploidia nesta espécie. Plantas diplóides possuem quatro cloroplastos por célula-guarda e as tetraplóides oito, em média. Utilizando-se os iniciadores específicos para os alelos -S, foi possível detectar e incluir a nível molecular, os alelos  $S_1$  e  $S_3$  do maracujazeiro, no subgrupo I das glicoproteínas do loco-S (SLG) das brassicas.

## ABSTRACT

RÊGO, Mailson Monteiro do, D. S., Universidade Federal de Viçosa, August 2001. **Induction in vitro of haploids and poliploids and molecular detection of self - incompatibility alleles in passion-fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.)**. Adviser: Claudio Horst Bruckner. Committee members: Wagner Campos Otoni and Fernando Luiz Finger.

The objectives of this work were to evaluate the gynogenic ability of 11 genotypes, to adapt *in vitro* methodology for poliploidy induction and detection of self -incompatibility alleles in yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener). For the evaluation of gynogenic ability, no-fertilized ovules were inoculated in a MS medium supplemented with vitamin B5, 100 mg.L<sup>-1</sup> mio-inositol, 3 g.L<sup>-1</sup> sucrose, 5,0 mg.L<sup>-1</sup> 2,4 - D and 1,0 mg.L<sup>-1</sup> BAP and cultivated in dark at 27°C ± 1. For poliploidy induction, explants from hypocotyl segments (1,0 cm length) of plants germinated *in vitro* were inoculated in BAD medium, supplemented with antimitotic agents: colchicine (0, 25, 250 and 1250 µM) and orizaline (0, 5, 15 and 30 µM). The ploidy level of regenerated and acclimatized plants was determined by counting the number of chromosomes at root tips metaphasic cells. For the molecular detection of self-incompatibility S-alleles, genomic DNA was extracted from young leaves

and submitted to PCR reaction with specific oligonucleotides primers for the classes I and II of the S-alleles. The genotype II - 20 presented the better gynogenic ability, producing 21 embryos (7,07% of the inoculated ovules). For the induction of poliploidy, the most appropriate media were BAD supplemented with 25  $\mu$ M colchicine and BAD supplemented with 15  $\mu$ M orizaline. Higher concentrations of colchicine (250 and 1250  $\mu$ M) were toxic to the explants. The diploid individuals presented  $2n = 2x = 18$  chromosomes, while the tetraploids had  $2n = 4x = 36$ . The number of chloroplasts in the guard-cells was an efficient indicator of the ploidy level in this species. The guard -cells had four chloroplasts in diploid plants and eight in tetraploid ones. The alleles S1 and S3 were detected at molecular level and included in the subgroup I of glicoproteins of S-locus (SLG) of the *Brassica*.

## INTRODUÇÃO GERAL

O maracujazeiro pertence a família *Passifloraceae*, a qual consiste de 12 gêneros. Destes, o gênero mais rico em espécies é o *Passiflora*, compreendendo aproximadamente 430 espécies, conhecidas pelo nome de maracujá, das quais aproximadamente 60 apresentam frutos comestíveis. A maioria delas é originária da América Tropical, com distribuição marcadamente nos trópicos e África (Vanderplank, 1996). De acordo com Oliveira et al., (1987), aproximadamente 200 espécies são nativas do Brasil, com conseqüente presença de ampla variabilidade genética, que pode ser explorada em programas de melhoramento.

Sua importância econômica decorre da ampla e diversificada utilização das passifloráceas pelo homem. Podem ser cultivadas como ornamentais e os frutos, além de serem consumidos *in natura* na forma de suco, são também usados na preparação comercial de sucos, refrescos, doces e sorvetes. O uso medicinal é também bastante difundido (Oliveira, 1987).

As duas formas de maracujá mais cultivadas no mundo são o maracujá-amarelo, *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deneger ( $2n = 18$ ), e o maracujá-roxo, *Passiflora edulis* f. *edulis* Sims (Carvalho-Okano e Vieira, 2001). Entretanto, a espécie de maior importância econômica nas Américas, Austrália e África é o maracujá-amarelo (Oliveira et al, 1987). O Brasil destaca-se como o maior produtor mundial, com área plantada de aproximadamente 33.000 hectares (IBGE, 1993) e, segundo Melletti et al., (1994), isto é consequência da contínua evolução técnica dos plantios, impulsionada pela agroindústria de sucos e pela demanda crescente do mercado de frutas *in natura*.

Os trabalhos de melhoramento ainda são escassos e poderão contribuir significativamente para o aumento da produtividade em função da grande variabilidade de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* e das espécies relacionadas (Bruckner, 1997).

Os objetivos do melhoramento na cultura são aumento da produtividade e do vigor da planta, resistência ou tolerância a pragas (lagartas, percevejos e moscas das frutas) e doenças (morte prematura das plantas atribuído a fungos, *Fusarium* e *Phytophthora*), adaptação ampla, frutos grandes, alto teor de suco, coloração amarelo-dourada dos frutos, alto teor de sólidos solúveis e de ácidos tituláveis e resistência a transporte e armazenamento (Oliveira e Ferreira, 1991).

Sendo uma planta alógama, vários são os métodos de melhoramento aplicáveis a cultura do maracujazeiro. O melhoramento de plantas alógamas dá -se pelo aumento da frequência de genes favoráveis ou pela exploração do vigor híbrido ou heterose. O aumento na frequência de genes favoráveis pode ser conseguida por meio da seleção em massa ou pela

seleção com teste de progênies. Já o vigor híbrido é explorado por meio de híbridos, variedades sintéticas ou compostos (Bruckner, 1997).

Nos programas convencionais de melhoramento, os híbridos são obtidos a partir de linhagens endogâmicas selecionadas, variedades de polinização aberta, clones ou outras populações divergentes (Allard, 1971). No maracujazeiro, linhagens endogâmicas são obtidas por meio de cruzamento entre plantas meio-irmãs, retro-cruzamentos ou autopolinização no estágio de botão (Bruckner et al, 1995; Rêgo et al, 2000). A realização de autofecundações proporciona maior endogamia (Falconer, 1972).

Variedades sintéticas e compostos também podem ser considerados como boas opções de melhoramento, porque a maior produtividade pode ser combinada com maior eficiência na polinização, e a semente pode ser multiplicada pelo produtor. Variedades sintéticas são produzidas a partir de cruzamentos, em todas as combinações, entre várias linhas endogâmicas, todas com boa capacidade de combinação. Quando as linhas são variedades ou populações de polinização livre, as populações resultantes tem sido denominadas de compostos (Hallauer e Miranda Filho, 1982).

Um dos gargalos destes métodos convencionais de melhoramento, é a produção das linhagens endogâmicas, nas plantas alógamas a homozigose só é alcançada após 7 a 9 gerações de autofecundação, permanecendo sempre uma pequena proporção de heterozigose residual (Jansen, 1992). No maracujazeiro, acentuada depressão endogâmica ocorre após o terceiro ciclo de autofecundação, a qual é caracterizada por flores de tamanho reduzido, perda da coloração da corola e esterilidade dos órgãos reprodutivos (Rêgo, dados não publicados).

Uma técnica alternativa de grande potencial para produzir de linhagens homozigotas em plantas frutíferas, é a haplodiploidização (Zhang e Lespinasse, 1992). Esta técnica consiste em induzir a embriogênese *in vitro* a partir do cultivo de anteras, micrósporos, ovário e óvulos não-fertilizados, resultando na regeneração de plantas haplóides (n). As plantas haplóides são extremamente úteis aos melhoristas, porque carregam apenas um alelo de cada gene, desta forma, qualquer mutação recessiva é facilmente detectável; os genes letais são eliminados do “pool” gênico; são produzidas em grande número rapidamente e permite produzir linhagens homozigotas a partir de plantas diplóides e poliplóides em tempo relativamente curto.

Plantas haplóides podem ser convertidas a duplo -haplóides (DH), pela simples duplicação do seu genoma, o que pode ocorrer espontaneamente ou por meio da aplicação de agentes químicos, colchicina e orizalina. Quando a planta doadora de antera, micrósporo, ovário ou óvulo é um híbrido F1 ou F2, a linhagem homozigota é conseguida em uma única geração, reduzindo o tempo necessário para produzir linhagens homozigotas e aumentando a eficiência de seleção (Jansen, 1992; Zhang e Lespinasse, 1992),.

Outra técnica alternativa de melhoramento de fruteiras, é a manipulação da poliploidia (Sanford, 1983). Esta técnica tem grande potencial no melhoramento de plantas frutíferas. Plantas poliplóides caracterizam-se por apresentarem três ou mais conjuntos de cromossomos no núcleo de suas células, enquanto os diplóides apresentam apenas dois (Shepherd, 1987).

Os efeitos morfofisiológicos da poliploidia variam em diferentes espécies. Um efeito comum da poliploidia é o aumento do tamanho das partes vegetativas das plantas, o que torna os poliplóides bem mais vigorosos em relação aos diplóides correspondentes (Allard, 1971).

Um caso particular de sucesso com poliplóides em fruteiras refere-se às bananeiras (Sanford, 1987). Os clones cultivados são principalmente triplóides e produzem frutos partenocárpicos e sem sementes. Seu emprego deve-se ao fato de que os triplóides são superiores aos diplóides devido ao maior vigor vegetativo e maior tamanho dos frutos, o que os torna mais produtivos e com a polpa menos densa e mais palatável em razão do maior volume celular.

O primeiro relato sobre a indução de poliplóides de maracujazeiro foi feito por Knight Jr. (1991). Este autor obteve nove plantas híbridas resultantes do cruzamento entre *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg. com *P. incarnata* L. Porém, todos os indivíduos F1 eram diplóides e macho-estéreis. Para restaurar a fertilidade masculina, ele duplicou o número cromossômico dos híbridos F1's com solução de colchicina a 0,2%, obtendo assim, várias linhas de alotetraplóides. Posteriormente, Otoni et al., (1995), obtiveram pela primeira vez, alopóliploides via hibridação somática entre essas mesmas espécies. Outras combinações alotetraplóides foram produzidas também por hibridação somática, dentre elas, *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg. + *P. amethystina* Mikan (Barbosa e Vieira, 1997; Vieira, 1997), *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg. + *P. alata* L., *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg. + *P. cincinnata* L. e *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg. + *P. giberti* L. (Vieira, 1997). Entretanto, nenhum relato foi encontrado sobre a indução *in vitro* de autotetraplóides no maracujazeiro amarelo.

A auto-incompatibilidade no maracujazeiro, é do tipo homomórfica e esporofítica (Bruckner et. al., 1995; Rêgo et al., 1999; 2000), e é definida como a incapacidade que plantas hermafroditas férteis apresentam em produzir sementes após serem autopolinizadas. Este

fenômeno caracteriza-se pela capacidade hereditária de a flor rejeitar seu próprio pólen ou pólen com o mesmo genótipo durante a fase pró-gâmica. (Nettancourt, 1997).

Em brassicas, dois genes (*slg* e *skr*) determinam a auto-incompatibilidade. O gene *slg*, identificado e clonado por Nasrallah et al., (1985), codifica uma glicoproteína solúvel e específica do loco-S (SLG). Esta proteína apresenta duas regiões altamente conservadas e duas outras altamente polimórficas, e se acumula nas paredes das células papilares do estigma (Kandasamy et al., 1989). O gene *srk*, codifica uma proteína quinase receptora de membrana, cujo domínio extracelular apresenta alto grau de similaridade de seqüência com a proteína SLG (Kumar e Trick, 1994). De acordo com Stein et al, (1991), o gene *srk* está envolvido no reconhecimento célula-à-célula da resposta auto-incompatível.

Os genes *slg* e *srk* estão fortemente ligados e segregam como um único gene, por esse motivo, Boys e Nasrallah (1993) denominaram de haplótipo o par de alelos *slg-srk* encontrados no loco-S de uma dada planta. Duas diferentes classes de haplótipos foram identificadas com base na reatividade da SLG com anticorpo monoclonal contra a SLG do genótipo S<sub>6</sub>. Os alelos da classe I reagem com o anticorpo, enquanto os alelos da classe II, não. Os alelos da classe I ocupam alta posição na hierarquia de dominância e estão associados com forte reação de auto-incompatibilidade. O mais interessante é que, baseado neste polimorfismo epítipo, alelos-S de *Brassica campestris* e de outros gêneros podem ser similarmente agrupados em subconjuntos de alelos S anticorpo positivo e negativo.

No maracujazeiro, os alelos-S tem sido arbitrariamente numerados (Bruckner et al, 1995; Rêgo et al., 1999; 2000). Além de trabalhoso, a identificação desses alelos -S pelo método de linhagens testadoras demanda muito tempo, porque é necessário grande número

de cruzamentos teste, e o fenótipo da auto-incompatibilidade é influenciado por fatores ambientais e condição fisiológica da planta (Nettancourt 1997).

Um método simples para detectar polimorfismo SLG foi desenvolvido (Brace et al., 1993; 1994). Este método envolve a amplificação do DNA que codifica a SLG por PCR com oligonucleotídeos iniciadores específicos e posterior análise eletroforética de seus produtos, após clivagem com endonucleases de restrição.

Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram:

- Avaliar onze genótipos de maracujazeiro amarelo quanto à resposta ginogênica por meio da cultura de óvulos não-fertilizados;
- Adequar metodologias de indução de poliploidia *in vitro* em maracujazeiro amarelo;
- Verificar a relação do caráter número de cloroplastos por célula-guarda com o nível de ploidia nesta espécie.
- Detectar e incluir a nível molecular, os alelos-S da auto-incompatibilidade do maracujazeiro amarelo, nos subgrupos I e II das SLG's, utilizando iniciadores alelo S-específicos de brassica;

### Referências Bibliográficas.

- ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo: Edgard Blücher, 1971. 381p.
- BARBOSA, L. V.; VIEIRA, M. L. C. Meiotic behavior of passion fruit somatic hybrids, *P. edulis* f. *flavicarpa* Degener + *P. amethystina* Mikan. **Euphytica** **98**: 121 – 127. 1997.
- BOYES, D. C.; NASRALLAH, J. B. Physical linkage of the *SLG* and *SRK* genes at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. **Molecular General Genetics** **236**: 221-228. 1993.
- BRACE, J.; OCKENDON D. J.; KING, G. J. Development of a method for the identification of S alleles in *Brassica oleracea* based on digestion of PCR -amplified DNA with restriction endonucleases. **Sexual Plant Reproduction** **6**: 133-138. 1993.
- BRACE, J.; KING, G. J.; OCKENDON, D. J. A molecular approach to the identification of S - alleles in *Brassica oleracea*. **Sex Plant Reproduction** **7**: 203-208. 1994.
- BRUCKNER, C. H.; CASALI, V. W. D.; MORAES, C. F.; REGAZI, A. J.; SILVA, E. A. M. Self - incompatibility in passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). **Acta Horticulturae** **370**: 45-57. 1995.
- BRUCKNER, C. H. Perspectivas do melhoramento do maracujazeiro. In: MANICA, I. 1<sup>a</sup>. ed. **Maracujá: Temas selecionados (1): melhoramento, morte prematura, polinização e taxonomia**. Cinco Continentes Editora Ltda. Porto Alegre, RS. 1997. p.25-46.

- CARVALHO-OKANO, R. M.; VIEIRA, M. F. Morfologia externa e taxionomia. In: BRUCKNER, C. H.; PICANÇO, M. C. **Maracujá: tecnologia de produção, pós -colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. p.33-49.
- FALCONER, D. S. **Introduction to quantitative genetics**. New York, Roland Press, 1972. 365p.
- HALAUER, A. R.; MIRANDA FILHO, J. B. **Quantitative genetics in maize breeding**. Ames, Iowa University Press, 1982. 468p.
- IBGE. **Produção agrícola municipal**. Rio de Janeiro, p. 53 (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Anuário Estatístico do Brasil).1993
- JANSEN, R. C. On the selection for specific genes in double haploids. **Heredity** **69**: 92-95. 1992.
- KANDASAMY, M. K., PAOLILLO, D. J., FARADAY, C. D., NASRALLAH, J. B., NASRALLAH, M. E. The S-locus specific glycoproteins of *Brassica* accumulate in the cell wall of developing stigma papillae. **Experimental Biology** **134**: 462-472. 1989.
- KNIGHT Jr.,R. J. Development of tetraploid hybrid passion fruit clones with potential for the North temperature zone. **HortScience** **26 (12)**: 1541 – 1543. 1991.
- KUMAR, V.; TRICK, M. Expression of the S-locus receptor kinase multigene family in *Brassica oleracea*. **Plant Journal** **6**: 807-813. 1994
- MELETTI, L. M., SOARES -SCOTT, M. D., BERNACCI, L. C. et al. **Caracterização Agronômica de germoplasma de maracujá (*Passiflora spp.*)** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 13, 1994, Salvador. **Anais...**Salvador: Soc. Bras. Frutic., 1994. V. 3, p. 821-822.
- NASRALLAH, J. B.; KAO, T. H.; GOLDBERG, M. L.; NASRALLAH, M. E. A cDNA clone encoding an S-locus-specific glycoprotein from *Brassica oleracea*. **Nature** **318**: 263-267. 1985.
- NETTANCOURT, De. Incompatibility in angiosperms. **Sexual plant reproduction** **10**: 185-199. 1997.

- OLIVEIRA, J. C. de. Melhoramento genético. In: RUGGIERO, C. (ed.) **Cultura do maracujazeiro**. Ribeirão Preto, L. Summa, 1987. p. 218-46
- OLIVEIRA, J. C.; FERREIRA, F. R. Melhoramento genético do maracujazeiro. In: SÃO JOSÉ, A. R.; FERREIRA, F. R.; VAZ, R. L. **A cultura do maracujá no Brasil**, FUNEP, 1991. p. 211-239.
- OLIVEIRA, J. C.; FERREIRA, F. R.; RUGGIERO, C.; NAKAMURA, K. Caracterização e avaliação de germoplasma de *Passiflora edulis*. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 9.**, Campinas, 1987. **Anais ...** Campinas, SBF, 1988. V.2, p, 591-596.
- OTONI, W. C.; BLACKHALL, N. W.; d'UTRA VAZ, F. B.; CASALI, V. W.D.; POWER, J. B.; DAVEY, M. R. Somatic hybridization of *Passiflora* species, *P.edulis* f. *flavicarpa* Degener and *P. incarnata* L. **Journal of Experimental Botany** **46 (288)**: 777 – 785. 1995
- RÊGO, M. M.; BRUCKNER, C. H.; FINGER, F. L.; SIQUEIRA, D.L.; FERNANDES, A., Self - incompatibility in passion fruit: evidence of two loci genetic control. **Theoretical and Applied Genetics** **98**: 564-568. 1999.
- RÊGO, M.M.; RÊGO, E. R.; BRUCKNER, C. H.; Da SILVA, E. A. M.; FINGER, F. L.; PEREIRA, K. J. C. Pollen tube behavior in yellow passion fruit following compatible and incompatible crosses. **Theoretical and Applied Genetics** **101**: 685-689. 2000.
- SANFORD, J.C. Ploidy manipulations. In: MOORE, J.N.; JANICK, J. (Eds.) **Methods in fruit breeding**. West Lafayette: Purdue University Press, 1983. p. 100-123.
- SHEPHERD, J. C. Banana breeding – past and present. **Acta Horticulturae** **196**: 37-43. 1987
- STEIN, J. C., HOWLETT, B., BOYES, D. C., NASRALLAH, J. B., NASRALLAH, M. E. Molecular cloning of a putative receptor protein kinase of *Brassica oleracea*. **Proceeding of the National Academic Science USA** **88**: 8816-8820. 1991
- VANDERPLANK, J. **Passion flowers and passion fruit**. Cambridge: MIT Press, Second edition, 1996. 224p.
- VIEIRA, M. L. C. Hibridação somática em plantas – a importância de espécies selvagens como fonte de genes. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento** **3**: 36 – 40. 1997.

ZANG, Y.X. & LESPINASSE, Y. Haploid. In: HAMMERSCHLAG, F. A., LITZ, R. E. (Eds.)  
**Biotechnology of perennial fruit crops.** CAB International, 57-75. 1992

## **CAPÍTULO I**

**Indução de ginogênese *in vitro* em maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) a partir de óvulos não-fertilizados**

## Indução de ginogênese *in vitro* em maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) a partir óvulos não-fertilizados

### Introdução

O termo ginogênese, na sua forma original, denota a situação na qual o gameta masculino é eliminado do citoplasma do gameta feminino e o embrião desenvolve-se a partir do saco embrionário (Wilson, 1925 *apud* Mol, 1999). Entretanto, não existe evidência direta sobre o comportamento do núcleo espermático durante a fertilização nestas plantas, e os cromossomos podem ser eliminados após a cariogamia em embriões ginogenéticos, como tem sido encontrado em alguns cruzamentos distantes em cevada e trigo (Subrahmanyam e Kasha, 1973). A polinização com linhagens indutoras de haplóides é freqüentemente usada para ginogênese *in situ* (Bonahec et al., 1995). Esta técnica vem sendo utilizada para produzir linhagens duplo-haplóides (DH) em milho (Bordes et al., 1997). Plantas ginogênicas também podem ser obtidas mediante polinização com pólen irradiado (Bonahec et al., 1994). A polinização *in vitro* ou *in vivo* pode resultar em haplóides de origem materna, porque o material genético masculino pode não ser expresso ou estar ausente na progênie. De Verna e Collins (1984) demonstraram que, em petunia, as condições *in vitro* eram melhores do que pólen irradiado, na indução de plantas ginogênicas. A partir de então, o termo ginogênese *in vitro*, está limitado a indução por meio de órgãos excisados e/ou condições de meio de cultura.

Na década de 70, haplóides de cevada foram obtidos por cultura *in vitro* de ovários não polinizados, e o termo ginogênese foi reintroduzido no campo da embriologia experimental referindo-se ao desenvolvimento de embriões e plantas a partir de saco embrionário não-fertilizado (San Noeum, 1979).

O maracujazeiro, planta auto-incompatível (Bruckner et al., 1995; Rêgo et al., 1999, 2000), possui gineceu tricarpelar, com ovário súpero, globoso, unilocular, placentação parietal, pluriovular (aproximadamente 300 óvulos); os estiletes são livres, em número de três; cada um com estigma capitado (Vanderplank, 1996). Antes da fertilização, o óvulo maduro consiste de um saco embrionário composto de três células antipodais, duas sinérgides, uma oosfera e uma célula central com dois núcleos, envolto por tecido esporofítico diplóide (Rêgo e Meira, no prelo).

Desde a descoberta da primeira planta haplóide em *Datura stramonium* em 1921, muitas tentativas têm sido feitas para induzir o desenvolvimento partenogênico de oosfera ou outras células do saco embrionário. Maheshwari e Rangaswamy (1965) concluíram que a cultura de óvulos poderia ser útil na indução artificial da partenogênese. San Noeum (1976) e Stibon (1981) mostraram a totipotência das células haplóides derivadas do gametófito feminino e determinaram algumas das condições pelas quais forçam as células haplóides a formar calos ou embriões.

Vários fatores afetam a cultura de óvulos e ovários não-fertilizados, dentre eles: (a) genótipo da planta doadora; (b) estágio do saco embrionário, (c) tratamento com frio; (d) meio de cultura, com ênfase para o meio basal, fitorreguladores, concentração de sacarose; (e) modo de inoculação; e (f) condições de cultivo (Yang e Zhou, 1982).

San Noeum (1976) classificou as estruturas que originam o embrião em oito grupos: a) oosfera; b) oosfera e antípodas; c) antípodas; d) oosfera e uma sinérgide; e) oosfera e duas sinérgides; f) uma ou duas sinérgides; g) sinérgides e antípodas; e h) sinérgides, oosfera e antípodas. Em muitos casos estudados, os embriões desenvolvem-se partenogeneticamente da oosfera, como em cevada (Huang et al., 1982), girassol (Yang et al., 1990), beterraba (Bossoutrot e Hosemans, 1985), tabaco (Wu e Chen, 1982) e milho (Borders et al., 1997).

O desenvolvimento apogâmico de uma sinérgide foi encontrado em arroz (Li e Yang, 1986; Zhou et al., 1986), de células antipodais em cevada (Huang et al., 1982) e de ambos os tipos de células em tabaco (Wu e Chen, 1982). O termo apogametia ocorre quando o embrião se desenvolve de qualquer célula do saco embrionário, exceto a oosfera (Czapik, 1997).

Nettancourt (1977) já havia aventado a possibilidade de produzir plantas haplóides a partir de híbridos por meio da cultura de óvulo *in vitro*. Tais linhagens, após duplicação do número de cromossomos, podem ser usadas para a produção rápida de novas variedades. A cultura de óvulos *in vitro* também pode ser usada para gerar haplóides em diferentes espécies, inclusive, auto-incompatíveis e, após duplicar o número cromossômico, pode-se criar linhas diplóides completamente homozigotas, as quais podem ser de grande interesse para produção de híbridos. Atualmente, obtem-se a indução de plantas haplóides por meio de óvulos não - fertilizados *in vitro* em várias culturas: *Allium cepa* (Campion et al, 1992), *Lolium multiflorum* (Kumlehn e Nitzsche, 1996), *Nicotiana tabacum* (Yang e Zhou, 1982) e *Curcubita pepo* (Metwally et al., 1998). À luz do exposto acima, esta tecnologia apresenta grande potencial como técnica auxiliar no melhoramento de fruteiras (Zhang e Lespinasse, 1992), reduzindo o tempo necessário para produzir linhagens homozigotas. Essa técnica tem sido aplicada com

sucesso em várias fruteiras, dentre elas: macieira, videira, citros e mamoeiro (Zhang e Lespinasse, 1992). Os objetivos deste trabalho foram desenvolver uma metodologia para indução de ginogênese a partir de óvulos não -fertilizados e avaliar onze genótipos de maracujazeiro quanto à resposta embriogênica por meio da cultura de óvulos não-fertilizados.

## **2. Material e Métodos**

Este experimento foi conduzido nos laboratórios de Cultura de Tecidos Vegetais do Bioagro/UFV e do Setor de Fruticultura do Departamento de Fitotecnia da UFV, no período de março de 1999 a junho de 2001.

### *Material Vegetal*

Foram utilizados 11 genótipos derivados de cruzamentos (tabela1). As plantas foram mantidas em condições de campo no pomar do Setor de Fruticultura da UFV, recebendo os tratamentos culturais tradicionais da cultura.

Botões florais medindo aproximadamente 40 mm de comprimento foram coletados no dia da antese e levados para o laboratório. Os ovários foram removidos dos botões florais livres de sépalas, pétalas, corona filamentosa e estiletes, como recomendado por Dumas e Chambonnet (1986). Os ovários foram desinfestados mediante imersão em álcool 70% por 1 minuto, posteriormente em solução de hipoclorito de sódio a 2% e Tween-20 a 0,1%, durante 10 minutos, e enxaguados cinco vezes com água deionizada e autoclavada.

Tabela 1. Plantas doadoras de óvulos não-fertilizados utilizados na indução de ginogênese e seus respectivos genitores

Plantas	Genitores
I – 11	PA <sup>1</sup> CI-6
I – 20	CY-6 x CI-6
I – 27	CT-8 x P1
I – 25	CT-8 x P-3
I – 28	CL-6 x Sul Brasil
I – 30	CL-6 x P-3
I – 37	PA <sup>1</sup> P-3
II – 8	CS-9 x Sul Brasil
II – 10	CI-6
II – 18	AUT <sup>2</sup> CY-6
II – 31	CL-6 x P2

<sup>1</sup> – Polinização aberta; <sup>2</sup>- Autofecundação.

Em condições assépticas, sob microscópio estereoscópico, procedeu -se o corte transversal na região mediana do ovário, sendo os óvulos excisados e cultivados em diferentes meios de indução. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com 11 tratamentos (genótipos) e oito repetições. Cada parcela consistiu de uma placa de Petri de poliestireno (90 cm de diâmetro), esterilizada com radiação gama contendo 30 mL de meio e cerca de 35 óvulos. Após a inoculação, as placas de Petri foram vedadas com filme de PVC e incubadas a 27°C, no escuro, por quatro semanas. Os resultados foram expressos em número de embriões obtidos e a respectiva percentagem em relação ao número de óvulos inoculados. Na análise da resposta à indução de ginogênese aplicou-se a análise de variância, com teste F, a 5% de probabilidade. A herdabilidade foi calculada da seguinte maneira:  $\hat{h}^2 = \hat{s}_g^2 / \hat{s}_p^2$ .  $\hat{s}_g^2$  representa a estimativa do componente de variância genética e  $\hat{s}_p^2$  a estimativa do componente de variância fenotípica. As médias das percentagens de embriões formados, que

diferiram de zero, de cada genótipos, foram posteriormente agrupadas usando-se o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Os dados foram analisados usando o programa Genes (Cruz, 1997).

### *Condições de cultivo*

O meio de indução de ginogênese, consistiu do meio basal MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com vitaminas do meio B5 (Gamborg et al., 1968), suplementados com 3,0% de sacarose, 100 mg.L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 5,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. Antes da autoclavagem à 121°C por 20 min., foram adicionados ao meio, 7g.L<sup>-1</sup> de ágar (Vetec) e o pH foi ajustado para 5,7 ± 0,1.

### **3. Resultados**

Dos 3.226 óvulos inoculados foram obtidos 69 embriões ginogênicos e 17 calos (Tabela 2). A embriogênese direta foi a regra neste trabalho, correspondendo a 2,23% dos óvulos inoculados.

No momento da inoculação, em aproximadamente 30% dos óvulos, os sacos embrionários encontravam-se maduros (Figura 1). Isto indica que a maturação dos óvulos é um processo não sincronizado, ou seja, em um mesmo ovário é possível encontrar sacos embrionários em diferentes estádios de maturação. Entretanto, à medida que se aproxima a antese, é possível encontrar maior percentual de óvulos com gametófito feminino completamente maduros (Rêgo e Meira, no prelo).

Tabela 2. Resposta ginogênica de óvulos não-fertilizados de 11 genótipos de maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) cultivado em meio MS suplementado com 5,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP

Genótipos	Número de óvulos cultivados	Embriões Ginogênicos	
		Número	%
I – 11	280	0,0	0,00
I – 20	219	11,0	5,02
I – 21	253	0,0	0,0
I – 25	324	8,0	2,47
I – 28	312	6,0	1,92
I – 30	304	5,0	1,64
I – 37	377	5,0	1,32
II – 8	245	4,0	1,63
II – 10	274	21,0	7,67
II – 18	349	0,0	0,0
II – 28	289	9,0	3,11

#### *Indução da ginogênese*

Em experimentos preliminares (dados não mostrados) ficou estabelecido que o meio mais adequado para indução da ginogênese era o meio basal MS suplementado com 3,0% de sacarose, 100 mg.L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 5,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP foi o mais eficiente em induzir embriogênese e calogênese a partir de óvulos não-fertilizados de maracujazeiro. Isto indica que a proporção adequada de auxina: citocinina, requerida para a indução de ginogênese, é da ordem de 5:1.

Durante os dez primeiros dias após a inoculação, os óvulos excisados e responsivos aumentaram sensivelmente de tamanho, chegando a triplicar seu tamanho original. Os óvulos mudaram da cor branca opalescente para marrom no decorrer da ginogênese (F igura 2B).

Após 20 dias de cultivo, observaram-se embriões emergindo principalmente da região chalazal do óvulo, e, em alguns casos, da região micropilar (Figura 2B).

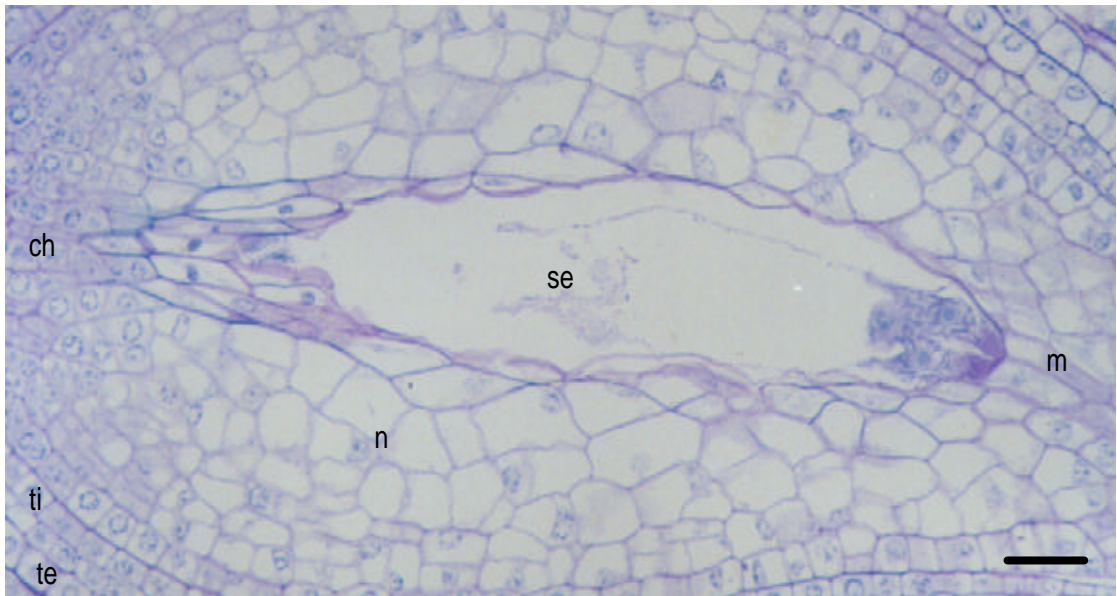


Figura 1. Fotomicrografia de óvulo maduro de maracujazeiro. Aspectos gerais ( **ch**, extremidade chalazal, **m**, extremidade micropilar, **te** e **ti**, tegumentos externos e internos, respectivamente, **n**, nucelo e **se**, saco embrionário com aparato feminino na região da micrópila e antípodas e núcleos polares fundidos na extremidade chalazal). Barra = 100 $\mu$ m.

A formação de calos foi observada em apenas um dos 11 genótipos analisados (1–20), os quais começam a formar-se a partir do décimo dia após a inoculação (Figura 3, Tabela 2). Observações neste trabalho indicam que a embriogênese e a formação de calos não ocorrem simultaneamente no mesmo óvulo.

### Efeito do genótipo

A resposta ginogênica é altamente dependente do genótipo, como indicado pela análise de variância e o teste de médias (Tabelas 3 e 4). Dos 11 genótipos utilizados neste experimento, três não produziram nenhum embrião (Tabela 2), portanto, apenas oito foram utilizados nas análises estatísticas. Os oito genótipos avaliados diferiram estatisticamente quanto à resposta ginogênica, quando submetidos as mesmas condições de cultivo. A herdabilidade do caráter resposta ginogênica foi alta, da ordem de 84,8% (Tabela 3). O coeficiente de variação relativamente baixo (34,5%), indica que o delineamento experimental foi adequado.

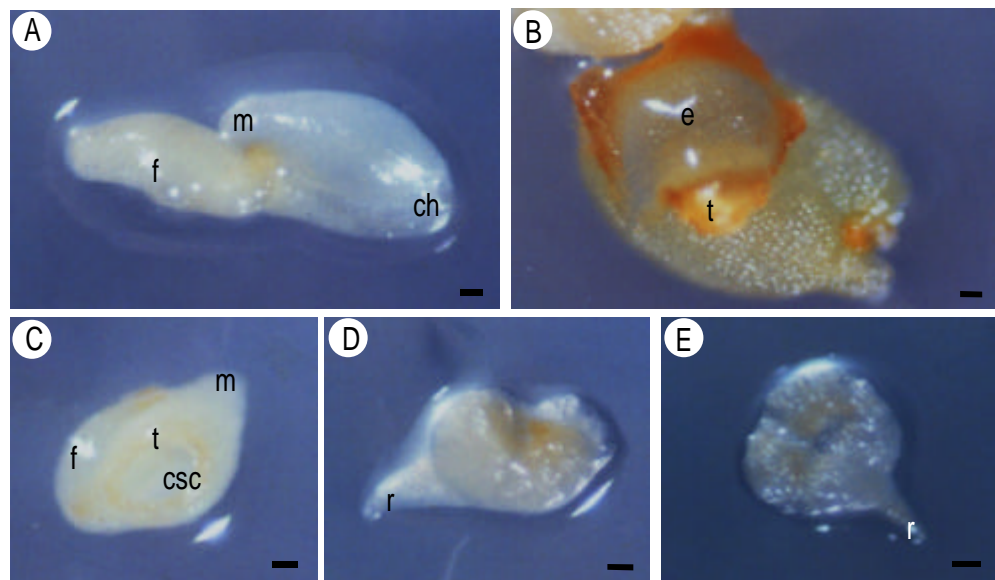


Figura 2. Indução de ginogênese *in vitro* em *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener. A. Óvulo não responsivo, 21 dias após a inoculação (m, extremidade micropilar; f, funículo; e ch, extremidade chalazal). B. Óvulo responsivo com 21 dias. Observe o embrião emergindo e rompendo os tegumentos do óvulo na extremidade chalazal (t, tegumentos; e e, embrião). C. Detalhe de um óvulo após a emergência do embrião mostrando a cavidade onde o embrião desenvolveu-se (csc, cavidade do saco embrionário). D e E. Embriões ginogênicos aos 21 dias (r, radícula). Barra = 100  $\mu$ m.

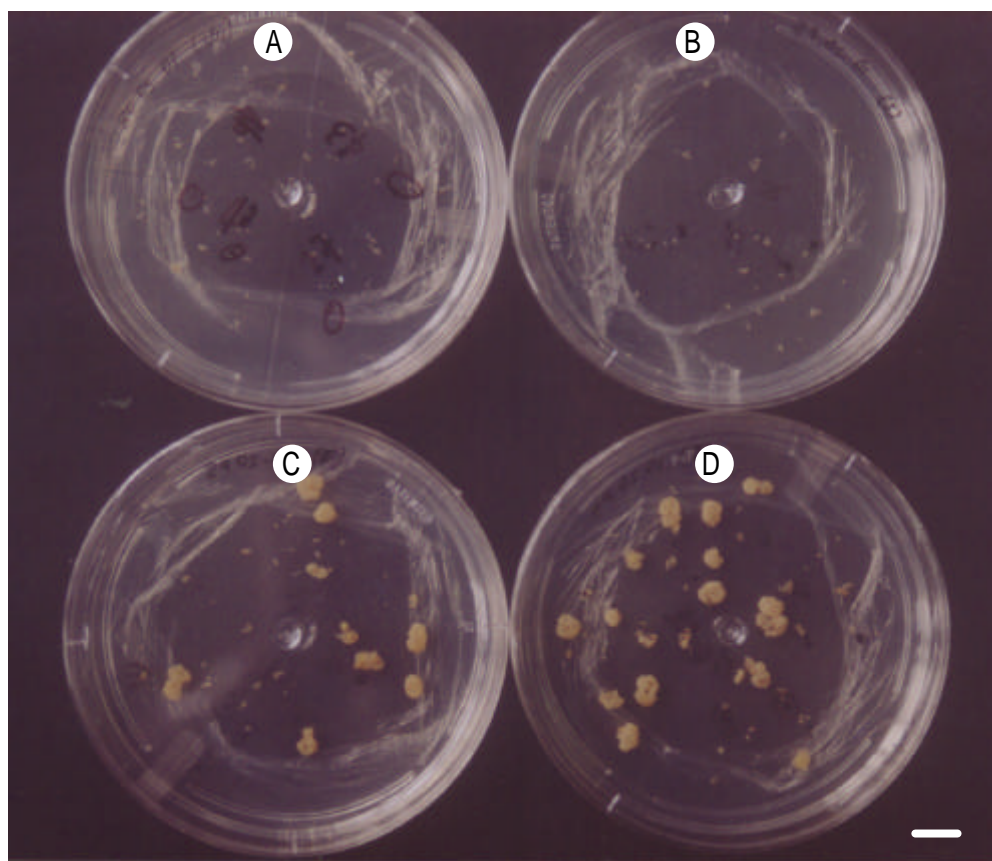


Figura 3. Placas de Petri evidenciando a resposta dependente do genótipo. **A** e **B**, placas inoculadas com óvulos dos genótipos não responsivos I-11 e II-18, respectivamente. **C** e **D**, calos friáveis originados de óvulos não-fertilizados do genótipo I-20. Barra = 1 cm.

A frequência de embriogênese variou de zero a 7,67%, dependendo do genótipo (Tabela 2). O genótipo I-20 foi responsivo tanto à embriogênese direta quanto à calogênese, originando respectivamente, 11 embriões e 17 calos friáveis (Figura 3). Dois tipos de calos foram formados *in vitro* a partir de óvulos de maracujazeiro. Observações visuais feitas sob microscópio estereoscópio, com aumento de 20x, indicam que o primeiro tipo de calo formou -

se a partir de tecido somático, especialmente da região do funículo do óvulo, e o segundo tipo originou-se de células do saco embrionário.

Tabela 3. Análise de variância de 11 genótipos de *P. edulis* f. *flavicarpa* Degener em relação à resposta ginogênica de óvulos não-fertilizados

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Probabilidade
TRATAMENTOS	7	16,29	2,32	51,56	0.0008
RESÍDUO	56	2,82	0,045		
TOTAL	63	19,11			
MÉDIA geral		1,72			
CV(%)		34,36			
h <sup>2</sup> (%)		84,85			

Tabela 4. Médias de percentagem de embriões ginigênicos formados de óvulos não - fertilizados em 8 genótipos de *P. edulis* f. *flavicarpa* Degener

Tratamento	Média	Grupo
II - 10	3.83	a
I - 20	2.51	b
II - 08	2.24	c
II - 28	1.55	d
I - 25	1.23	e
I - 28	0.96	f
I - 30	0.82	f
I - 37	0.66	g

Médias seguidas pela mesma letra pertencem a um mesmo grupo estabelecido pelo critério de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

#### 4. Discussão

Dentre os fatores que contribuíram para a indução de ginogênese no maracujazeiro, destaca-se a dependência do genótipo (Tabela 2). A diferença de resposta foi estatisticamente significativa a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. Este tipo de resposta têm sido encontrado em várias espécies de angiospermas. Wu e Chen (1982) relataram que em *Nicotiana tabacum*, a freqüência de formação de embrião foi de 75-80%, enquanto que, em *N. rustica*, em condições idênticas foi de apenas 8%. O caráter resposta à ginogênese apresentou alta herdabilidade ( $\hat{h} = 84,5\%$ ), indicando que os genes podem ser transferidos por meio de hibridação para linhagens-elite em programas de melhoramento. Herdabilidades altas para este caráter foram também relatadas em beterraba, cebola, tabaco e arroz (Zhou e Yang, 1981).

Outro fator importante em relação à resposta ginogênica em maracujazeiro é o estágio de desenvolvimento do saco embrionário. Nesta espécie, o desenvolvimento do saco embrionário não é sincronizado (Rego e Meira, no prelo). Possivelmente, isto explique, em grande parte, porque em genótipos onde a indução de ginogênese é alta (II-20), apenas alguns óvulos são responsivos. O fato é que alguns óvulos, ainda jovens, e que apresentavam-se ligeiramente esféricos, degeneraram após alguns dias de cultivo. Zhou e Yang (1981) mostraram que, em óvulos inoculados nos estádios uni e tetra-nucleados, a ginogênese não é iniciada até que o gametófito torne -se maduro. Tais observações foram ratificadas pelos trabalhos em arroz (Kuo, 1982), cevada (Huang et al., 1982), cebola (Bohanec et al., 1995) e beterraba (Bossoutrot e Hosemans, 1985), onde a embriogênese direta só foi observada quando o megagametófito estava totalmente maduro.

A indução de ginogênese em óvulos não-fertilizados de maracujazeiro requer cinco vezes mais auxinas em relação à citocininas, baixa concentração de sacarose (3%) no meio de cultivo e ausência de luz. Esses resultados são totalmente opostos àqueles obtidos por Kashin et al., (2000). Esses autores trabalharam com ginogênese a partir de ovários não-fertilizados de *Panicum miliaceum* L. Segundo Mukhambetzhonov (1997), essas condições *in vitro*, provavelmente, determinam o desvio do desenvolvimento geneticamente determinado das células diferenciadas do gametófito feminino, para a morfogênese *in vitro*, tornando-as competentes para desenvolver-se em esporófito. Auxinas e citocininas são conhecidas por limitar a proliferação de muitos tipos de células cultivadas *in vitro*. O sucesso na indução de ginogênese, com 2,4-D como auxina, tem sido relatada em vários casos (Yang e Zhou, 1982). Nesses casos, citocininas não foram adicionadas ao meio (Metwally et al., 1998), adicionadas em concentrações muito baixas (Kashin et al., 2000) ou em concentrações iguais às de 2,4-D (Campion et al., 1992).

O padrão ginogênico observado neste experimento indica que a embriogênese direta foi a regra (69 embriões), embora calos tenham sido formados (17 calos). Embriogênese direta tem sido observada em *Triticum aestivum* (Zhuo e Yang, 1981), *Beta vulgaris* (Bossoutrot e Hosemans, 1985) e *Morus indica* (Sita et al., 1991). Este padrão embriogênico é mais desejado, uma vez que as plantas geralmente são clorofiladas e apresentam, geralmente, o mesmo nível de ploidia. Ao contrário, na embriogênese indireta, as plantas geralmente são albinas e algumas vezes apresentam diferentes níveis de ploidia (Mukahambetzhonov, 1997). San Noeum e Ahmadi (1980) mostraram em cevada 'Bérénicé', que 100% das plantas originadas via ginogênese eram verdes, enquanto 99% das originadas de anteras eram

albinas. Similarmente, no cultivar de arroz Zao Geng n° 19, a porcentagem de plantas regeneradas e verdes via cultura de ovário foi 89,3%, porém via cultura de antera foi de apenas 36,4%. Esses mesmos autores também compararam duas linhagens dihaplóides (DH) ginogênicas com três linhagens DH androgênicas com a planta doadora do cultivar Bérénicé. A análise multivariada dos caracteres agrônômicos avaliados mostrou que as plantas DH ginogênicas estavam próximas da planta doadora, enquanto as DH androgênicas estavam significativamente distantes da planta doadora. A análise de progênies endogâmicas e de cruzamentos recíprocos confirmaram a variabilidade e mostraram importantes efeitos maternos e recíprocos, os quais conduziram à conclusão de novas interações núcleo - citoplasmáticas.

Além disso, embriões ginogênicos de maracujazeiro são formados mais rapidamente do que aqueles oriundos de anfimixia. Enquanto, neste trabalho, os primeiros formaram-se em 20 dias após a inoculação dos óvulos não-fertilizados, os últimos necessitavam, em média, 45 dias até a maturação, contados a partir da fertilização (Gilmartin, 1958).

Este trabalho relata a produção de embriões haplóides via ginogênese na cultura do maracujazeiro, aparentemente bastante promissora e de grande importância para o melhoramento genético da cultura. Conclui-se que é possível obter embriões ginogênicos a partir de óvulos não-fertilizados em *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener, e que o protocolo desenvolvido neste trabalho foi eficiente em produzir embriões ginogênicos.

## 5. Referências Bibliográficas

- BOHANEK, B.; JAKSE, M.; IHAN, A.; JAVORNIK, B. Studies of gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.): induction procedures and genetic analysis of regenerants. **Plant Science** **104**: 215-224. 1995.
- BORDERS, J.; DUMAS DE VALUZ, R.; LAPIERRE, A.; POLLACSEK, M. Haplodiploidization of maize (*Zea mays* L.) through induced gynogenesis assisted by glossy markers and its use in breeding. **Agronomie** **17**: 291-297. 1997.
- BOSSOUTROT, D.; HOSEMANS, D. Gynogenesis in *Beta vulgaris* L.: from *in vitro* culture of unpollinated ovules to the production of doubled haploid plants in soil. **Plant Cell Reports** **4**: 300-303. 1985.
- BRUCKNER, C. H.; CASALI, V. W. D.; MORAES, C. F.; REGAZI, A. J.; SILVA, E. A. M. Self - incompatibility in passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). **Acta Horticulturae** **370**: 45-57. 1995.
- CAMPION, B.; AZZIMONTI, M. T.; VICINI, E.; SCHIAVI, M.; FALAVIGNA, A. Advances in haploid plant induction in onion (*Allium cepa* L.) through *in vitro* gynogenesis. **Plant Science** **86**: 97-104. 1992.
- CRUZ, C. D. **Programa Genes. Aplicativo computacional em genética e estatística.** Viçosa. Editora UFV. 1997. 420p.
- CZAPIK, R. Some research problems of the endosperm in angiospermae. **Polish Botanical Studies** **2**: 109-120. 1997.
- DE VERNA, J. W.; COLLINS, G. B. Maternal haploids of *Petúnia axillaris* (Lam.) B.S.P. via culture of placenta attached ovules. **Theoretical and Applied Genetics** **69**: 187-192. 1984.
- DUMAS, V. R.; CHAMBONNET, D. Obtention of embryos and plants from *in vitro* culture of unfertilized ovules of *Cucurbita pepo*. **Genetic Manipulation in Plant Breeding** **1**: 295-297. 1986

- GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean roots cells. **Experimental Cell Research** **50**: 151-158. 1968.
- GILMARTIN, A. J. Post-fertilization seed and ovary development in *Passiflora edulis* Sims. **Tropical Agriculture** **35** (1): 41 – 58. 1958.
- HUANG, Q.T.; YANG, H. Y.; ZHOU, C. Embryological observations on ovary culture of unpollinated young flowers in *Hordeum vulgare* L. **Acta Botanica Sinica** **24**: 295-300. 1982.
- KASHIN, A. S.; BKYUDNEVA, E. A.; SILKIN, M. A. Megagamete activation and regulation of *in vitro* embryogenesis in unpollinated millet ovaries. **Russian Journal of Plant Physiology** **47**(2): 260-269. 2000.
- KUMLEHN, J. J.; NITZSCHE, W. Plant regeneration from ryegrass ovules cultivated on endosperm-derived feeder cells. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** **44**: 235-241.1996.
- KUO, C. S. The preliminary studies on culture of unfertilized ovary of rice *in vitro*. **Acta Botanica Sinica** **24**: 33-38. 1982.
- LI, G. M.; YANG, H. Y. Further embryological studies on the *in vitro* apogamy in *Oryza sativa* L. **Acta Botanica Sinica** **28**: 229-234. 1986.
- MAHESWARI, P.; RANGASWAMY, N. S. Embryology in relation to physiology and genetics. In: **Advances in Botanical Research** vol.2 (ed. Preston, R. D.), London: Acad. Press. pp. 219-321. 1965.
- METWALLY, E. I.; MOUSTAFA, S. A.; EL -SAWY, B. I.; HAROUN, S. A.; SHALABY, T. A. Production of haploid plants from *in vitro* culture of unpollinated ovules of *Cucurbita pepo*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** **52**: 117-121. 1998.
- MOL, R. Embryological aspects of *in vitro* gynogenesis in plant organ cultures. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica** **41**: 67-74. 1999.
- MUKHAMBETZHANOV, S. K. Culture of nonfertilized female gametophytes *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** **48**: 111-119. 1997.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum** **15**: 473– 497. 1962.

- NETTANCOURT, D. **Incompatibility in angiosperms**. Berlin. Springer-Verlag, 1977. 230p.
- RÊGO, M. M.; BRUCKNER, C. H.; FINGER, F. L.; SIQUEIRA, D. L.; FERNANDES, A. Self-incompatibility in passion fruit: evidence of two loci genetic control. **Theoretical and Applied Genetics** **98** (3-4): 564-568. 1999.
- RÊGO, M. M.; MEIRA, R. S. Megasporogênese e megagametogênese em *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener. (no prelo)
- RÊGO, M. M.; RÊGO, E. R.; BRUCKNER, C. H.; SILVA, E. A. M.; FINGER, F. L.; PEREIRA, K. J. C. Pollen tube behavior in yellow passion fruit following compatible and incompatible crosses. **Theoretical and Applied Genetics** **101** (5-6): 685-689. 2000.
- SAN NOEUM, L. H. Haploides d' *Hordeum vulgare* L. par culture *in vitro* d'ovaries non fécondes. **Ann. Amelior. Plant.** **26**: 751-754. 1976.
- SAN NOEUM, L. H. *In vitro* induction of gynogenesis in higher plants. **Broadening Genetics Base Crops** **1**: 327-329. 1979.
- SAN NOEUM, L. H.; AHMADI. Variability of doubled haploid from *in vitro* androgenesis and gynogenesis in *Hordeum vulgare* L. **Colloque NSP**, CNSR. Orsay. 1980
- STIBON, M. Production of haploid *Gerbera jasmesonii* plants by *in vitro* culture unfertilized ovules. **Agronomie** **1**: 807-812. 1981.
- SUBRAHMANYAM, N. C.; KASHA, K. J. Selective chromosomal elimination during haploid formation in barley following interspecific hybridization. **Chromosoma** **42**: 111-125. 1973.
- VANDERPLANK, J. **Passion flowers and passion fruit**. Cambridge: MIT Press, Second edition, 1996. 224p.
- YANG, H. Y.; ZHOU, C. *In vitro* induction of haploid plants from unpollinated ovaries and ovules. **Theoretical and Applied Genetics** **63**: 97-104. 1982.
- YANG, H. Y.; YAN, H.; ZHOU, C. *In vitro* production of haploids in *Helianthus*. In: Bajaj Y. P. S. (Ed.) **Biotechnology in agriculture and forestry**, v. 10, Legumes and Oilseed Crops I, 472-483. Berlin. Springer-Verlag, 1990

- WU, B. J.; CHEN, K. C. Cytological and embryological studies on haploid plant production from cultured unpollinated ovaries of *Nicotiana tabacum* L. **Acta Botanica Sinica**. **24**: 125-129. 1982.
- ZANG, Y.X.; LESPINASSE, Y. Haploid. In: HAMMERSCHLAG, F. A., LITZ, R. E. (Eds.) **Biotechnology of Perennial Fruit Crops**. CAB International, 57-75. 1992.
- ZHOU, C.; YANG, H. Y. Induction of haploid rice plantlets by ovary culture. **Plant Science Letters** **20**: 231-237. 1981.
- ZHOU, C.; YANG, H. Y.; TIAN, H. Q.; LIU, Z. L.; YAN, H. *In vitro* culture of unpollinated ovaries in *Oryza sativa* L. In: Hu, H.; Yang, H. Y. (Eds.) **Haploids of higher plants *in vitro***. Berlin. Springer-Verlag, 165-181. 1986.

## **CAPÍTULO II**

**Indução *in vitro* de tetraplóides de maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener)**

## **Indução *in vitro* de tetraplóides de maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener)**

### **Introdução**

O maracujazeiro amarelo (*P. edulis* f. *flavicarpa* Degener) é uma planta diplóide com  $2n = 18$  cromossomos (Snow e MacDougal, 1993). Suas flores são perfeitas e nascem das axilas em brotações novas, apresentando duas séries de filamentos da corona, tendo cinco sépalas, cinco pétalas e cinco estames. O ovário é unilocular multiovulado sobre o qual se encontra um estilete com estigma tripartido (Vanderplank, 1996).

A ploidia refere-se ao número conjuntos completos de cromossomos por célula. A notação comum para genoma é "x", logo 4x, refere-se a condição tetrapóide (STEBBINS, 1971). Plantas poliplóides caracterizam-se por apresentar três ou mais conjuntos de cromossomos no núcleo de suas células, enquanto os diplóides apresentam apenas dois. A poliploidia tem grande potencial no melhoramento de plantas frutíferas (Sanford, 1983). Estima-se que 95% das pteridófitas e, cerca de 80% das angiospermas sejam poliplóides (Masterson, 1994).

Os efeitos morfofisiológicos da poliploidia variam em diferentes espécies. Um efeito comum da poliploidia é o aumento do tamanho das partes vegetativas das plantas, o que torna os poliplóides bem mais vigorosos em relação aos diplóides correspondentes (Allard, 1971).

Um caso particular de sucesso com poliplóides em fruteiras refere-se às bananeiras (Shepherd, 1987). Os clones cultivados são principalmente triplóides e produzem frutos partenocárpicos e sem sementes. Seu emprego deve-se ao fato de que os triplóides são superiores aos diplóides devido ao maior vigor vegetativo e maior tamanho dos frutos, o que

os torna mais produtivos e com a polpa menos densa e mais palatável em razão do maior volume celular.

A poliploidia desempenhou e continua a desempenhar importante função na evolução das plantas superiores (Stebbins, 1971; Sanford, 1983). Um fator particularmente distintivo da evolução e especiação das fanerógamas é a aloploidia, a combinação de genomas nucleares de duas ou mais espécies ou gêneros ancestrais (Leitch e Bennett, 1997).

Os poliploides podem resultar da duplicação cromossômica somática, em decorrência da interrupção da divisão mitótica em células meristemáticas, levando geralmente à formação de quimeras (Sanford, 1983).

No melhoramento de plantas, a duplicação somática pode ser útil na produção de gametas  $2n$ , seja para produzir haplóides ou para cruzamentos programados. Tetraploides podem ser suficientemente vigorosos e produtivos, mas são raros nos centros de origem. Entretanto, para que a ploidia seja manipulada de forma eficiente e adequada, é necessário o conhecimento da biologia da poliploidia (Sanford, 1983).

A duplicação somática pode ser conseguida por uma série de condições naturais ou artificiais. A duplicação somática espontânea tem sido relatada em macieira e videira, resultando normalmente em quimeras. Em *Citrus*, poliploides somáticos espontâneos originam-se de embriões nucleares adventícios e raramente são quimeras (Sanford, 1983).

Embora a duplicação cromossômica somática possa ocorrer espontaneamente e existam vários tratamentos químicos e choques térmicos que podem ser aplicados, a colchicina é a substância tradicionalmente empregada para induzir a duplicação de cromossomos em plantas (Dolezel et al., 1994). A colchicina é um alcalóide extraído de *Colchicum autumnale*, que se liga aos dímeros de tubulina, impedindo sua polimerização e,

consequentemente, suprimindo a formação das fibras do fuso (Wilson et al., 1974). Este alcalóide age estritamente sobre células em divisão (Jensen, 1974), de forma que a poliploidização não atinge todas as células do material tratado, sendo comum o aparecimento de mixoplóides e quimeras (Wan et al., 1989). Por conseguinte, surgem problemas relativos à estabilidade de poliplóides, sendo freqüente a reversão parcial ou total à condição diplóide, após alguns ciclos de divisão (Mergen e Lester, 1971). Além disso, a colchicina é altamente fitotóxica às plantas, podendo causar esterilidade e albinismo (Wan et al., 1989; Chalak e Legave, 1996).

Herbicidas como amiprofos-metila, orizalina e triflurarina, apresentam maior afinidade às tubulinas de células vegetais do que a colchicina e seu uso é preferível por oferecer menor risco à saúde do homem, na manipulação do produto, e por ser mais econômico (Hansen e Andersen, 1996). As principais variáveis no tratamento com agentes antimitóticos são a concentração, o tempo de exposição à droga e a forma de aplicação (Jensen, 1974; Dore e Essad, 1996).

A indução *in vitro* da poliploidização tem sido obtida com maior eficiência mediante o uso de explantes, como meristemas apicais e axilares, segmentos de hipocótilo, nós cotiledonares, cotilédones, calos e micrósporos (Chalak e Legave, 1996; Salon e Earle, 1998; Hansen e Andersen; 1998).

Dentre os critérios iniciais empregados na avaliação de experimentos de indução *in vitro* de poliplóides, o número de cloroplastos nas células-guarda constitui um dos principais parâmetros a serem considerados, além da facilidade de contagem e constância em número, variando apenas com o nível de ploidia das plantas (Butterfass, 1995). Contudo, a contagem

do número cromossômico somático, constitui o método mais indicado para a determinação do nível de ploidia (Dore e Essad, 1996).

O maracujazeiro amarelo (*P. edulis* f. *flavicarpa* Deg.) é uma planta diplóide com  $2n=18$  cromossomos (Snow e MacDougal, 1993). A indução de alotetraplóides no maracujazeiro foi feita pela primeira vez por Knight Jr. (1991). Este autor fez cruzamentos entre plantas de *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg. com *P. incarnata* L., resultando em indivíduos F1, diplóides e macho-estéreis. Para restaurar a fertilidade masculina, duplicou-se o número cromossômico dos híbridos com solução de colchicina a 0,2%, obtendo-se várias linhas de alotetraplóides. Aloploplóides foram também obtidos por hibridação somática em *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg. + *P. incarnata* L. (Otoni et al., 1995), *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg. + *P. amethystina* Mikan (Barbosa e Vieira, 1997; Vieira, 1997), *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg. + *P. alata* L., *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg. + *P. cincinnata* L. e *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg. + *P. giberti* L. (Vieira, 1997). Contudo, nenhum relato foi encontrado sobre a indução *in vitro* de autotetraplóides no maracujazeiro amarelo.

À luz do exposto e da necessidade de realização de trabalhos básicos que auxiliem os programas de melhoramento genético da cultura, o presente trabalho objetivou estabelecer metodologias de indução de poloploidia *in vitro* em maracujazeiro amarelo e avaliar o uso do número de cloroplastos por células-guarda do estômato como indicador do nível de ploidia no maracujazeiro.

## 2. Material e Métodos

O material vegetal utilizado neste estudo foi obtido a partir de frutos maduros oriundos de supermercado, portanto, não se conhece os genótipo dos genitores.

#### *Desinfestação e Germinação de Sementes in vitro*

Plântulas axênicas de maracujazeiro foram obtidas a partir da remoção total dos tegumentos da semente, utilizando metodologia proposta por Rêgo et al.,(no prelo) e posterior desinfestação em álcool etílico, a 70% (v/v), durante um minuto e, subseqüentemente, em uma solução de hipoclorito de sódio a 2,5% (v/v), acrescida de Tween 20 a 0,1% (v/v), por 10 minutos. Transcorrido esse tempo, as sementes foram lavadas quatro a cinco vezes em água deionizada e autoclavada. Em seguida, as sementes foram colocadas para germinar em meio de cultivo constituído de metade da concentração dos sais básicos de MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com o complexo vitamínico do meio B5 ( Gamborg et al., 1968), 2% (p/v) de sacarose, 100 mg.L<sup>-1</sup> de mio-inositol e solidificado com agar (Sigma) a 0,7% (p/v). O pH do meio foi ajustado para 5,7 ± 0,1, antes da inclusão do agar. O meio foi vertido em tubos de ensaio de 25 x 150 mm, contendo aproxi madamente, 10 mL de meio por tubo e vedados com tampas de polipropileno. Após autoclavagem (120°C por 15 min) e solidificação do meio, transferiu-se uma semente por tubo. As culturas foram transferidas para sala de crescimento e colocadas no escuro, à temperatura de 27 ± 1 °C.

#### *Tipo de Explante*

Segmentos de hipocótilo medindo cerca de 1,0 cm de comprimento, provenientes deplântulas de maracujazeiro germinadas *in vitro*, com cerca de 15 dias de idade, foram utilizados como explantes neste experimento.

#### *Meio de indução de poliploidia*

Os meios de cultura usados para induzir poliploidia foram compostos pelos sais básicos do MS, suplementados com o complexo vitamínico do meio B5, 100 mg.L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 3% (p/v) de sacarose, 1 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, 0,7% (p/v) de ágar e diferentes concentrações de agentes despólimerizantes de microtúbulos – colchicina (µM): 0, 25, 250 e 1.250 e orizalina (µM): 0, 5, 15 e 30. O pH dos meios foi ajustado para 5,7 ± 0,1, antes da autoclavagem. As substâncias antimetabólicas foram adicionadas antes da autoclavagem não foram filtroesterilizadas.

Esses meios destinados à inoculação de segmentos de hipocótilo foram vertidos em placas de Petri de poliestireno (90 cm de diâmetro) esterilizadas com raios gama contendo cerca de 30 mL de meio.

Cada concentração do agente antimetabólico constituiu um tratamento. Cada tratamento constou de cinco repetições (cinco placas de Petri), e em cada placa foram inoculados 10 explantes. Após a inoculação dos explantes, as placas foram vedadas com filme PVC e as culturas foram transferidas para a sala de crescimento e mantidas sob irradiância em torno de 40 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, temperatura de 27 ± 1 °C e fotoperíodo de 16 horas. Transcorrido um período

de cultivo de 15 dias, os explantes foram transferidos para um meio de composição similar, porém não suplementados com os agentes antimetabólicos, no qual permaneceram até a regeneração de brotações.

#### *Análise do efeito fitotóxico*

Para avaliar a fitotoxicidade dos agentes antimetabólicos, utilizou-se como parâmetro fisiológico, a sobrevivência dos explantes tratados. Para tanto, contou-se o número de explantes verdes após 15 dias, os quais foram transferidos para placas de Petri contendo meio sem agentes antimetabólicos, como proposto por Chalak e Legave (1996).

#### *Meio de alongamento e enraizamento das brotações*

Brotações regeneradas a partir de segmentos de hipocótilo foram excisadas de seus respectivos explantes e transferidas para o meio de indução de alongamento e enraizamento proposto por DREW (1991). As culturas foram mantidas sob irradiância em torno de  $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , temperatura de  $27 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 16 horas.

#### *Aclimação das plantas regeneradas*

Plantas com raízes e medindo cerca de 10,0 cm de altura foram retiradas de frascos com capacidade de  $90 \text{ cm}^3$  e as raízes foram, cuidadosamente, lavadas em água corrente, para a remoção do excesso de meio de cultura. Em seguida, foram acondicionadas em copos

plásticos contendo água deionizada e autoclavada, envolvidos por um saco plástico (20 cm x 10 cm) para evitar a perda excessiva de água, e mantidos sob temperatura de 27°C. Pequenos orifícios foram feitos no saco plástico, a cada dois dias, e após o décimo dia as plantas foram transferidas para vasos plásticos de 0,5 L de capacidade contendo substrato orgânico Plantmax™. A seguir, as plantas foram levadas para casa de vegetação até atingirem 50 cm de altura.

#### *Cultivo em hidroponia.*

Plantas com 50 cm de altura foram acondicionadas em caixas de isopor de 10 L de capacidade forradas com saco plástico e revestidas com papel alumínio, mantido sob aeração constante e cultivadas em solução nutritiva formulada a partir do Kit de solução concentrada da Aquaplanta até a maturidade. Em cada caixa era acondicionada apenas uma planta.

#### *Determinação do nível de ploidia*

A determinação do nível de ploidia das plantas foi realizada por meio da contagem do número de cromossomos de células metafásicas utilizando-se meristemas de pontas de raiz. Com auxílio de microscópio estereoscópico, as regiões meristemáticas das raízes foram removidas, fixadas em solução de metanol/ácido acético (3:1) e armazenadas em congelador a - 20 °C até o momento do uso. Foram analisadas 10 células por planta.

### *Número de cloroplastos por célula-guarda dos estômatos*

Nessa avaliação, foram amostradas duas folhas totalmente expandidas de cada planta, das quais foram removidas, cuidadosamente e com o auxílio de uma pinça, porções da epiderme abaxial, procedendo à montagem das lâminas para exame microscópico. A contagem do número de cloroplastos foi feita utilizando-se objetiva de 40x. Para cada folha, foram feitas contagens em cinco campos distintos de 1 mm<sup>2</sup>, localizados ao acaso. Em cada área foram amostrados, ao acaso, três estômatos.

### **3. Resultados e Discussão**

#### *Avaliação do efeito fitotóxico dos agentes antimetabólicos*

Os tratamentos dos explantes com colchicina (25 µM) e orizalina (5, 15 e 30 µM) não induziram efeitos fisiológicos detectáveis visualmente, ou seja, não foram fitotóxicos aos explantes, os quais permaneceram semelhantes ao controle (Tabela 1). A taxa de sobrevivência dos explantes foi alta (88,8 - 100%), os quais proliferaram e regeneraram ramos (Figura 1). Porém, quando segmentos de hipocótilos de maracujazeiro, foram tratados com colchicina, nas concentrações de 250 e 1.250 µM, os sintomas de necrose apareceram no sétimo dia após a inoculação e todos os explantes necrosaram após o 15º dia de cultivo (Figura 1). Carvalho (2000) obteve resultados semelhantes, utilizando nós cotiledonares e segmentos de hipocótilo como explantes e as mesmas doses (250 e 1.250 µM) de colchicina

em urucum. Efeitos de fitotoxicidade por colchicina, sem nenhum ramo sobrevivente também foi relatado por Salon e Earle (1998) em *Tripsacum dactyloids* L. (Gramineae).

Tabela 1. Efeitos dos agentes antimitóticos sobre a sobrevivência, proliferação e regeneração de plantas *in vitro* a partir de explantes de segmentos do hipocótilo de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.)

Tratamentos	Número de explantes	Número de explantes Viáveis	Número de explantes Proliferando	Número de plantas regeneradas e aclimatadas
Controle <sup>1/</sup>	50	44	37	4
Colchicina				
25µM	50	47	35	5
250 µM	50	6	0	0
1.250 µM	50	0	0	0
Oryzalina				
5 µM	50	50	40	1
15 µM	50	49	38	3
30 µM	50	49	30	1

<sup>1/</sup>Meio de cultura não suplementado com agente antimitótico.

A colchicina, em concentração de 25 µM por um período de exposição de 15 dias, aparentemente foi menos fitotóxica aos segmentos de hipocótilo e mostrou -se eficiente na duplicação cromossômica somática. Dos explantes iniciais, 94% sobreviveram, 70% formaram ramos e 10% regeneraram plantas (Tabela 1).

Tratamentos com orizalina foram menos fitotóxicos do que a colchicina, mesmo na maior dose (30 µM). Ao invés do efeito fitotóxico, a orizalina em concentrações baixas (5 µM), melhorou a proliferação de ramos quando comparada ao controle. Entretanto, à medida em que a concentração aumentou, menor número de ramos foi regenerado (Tabela 1).

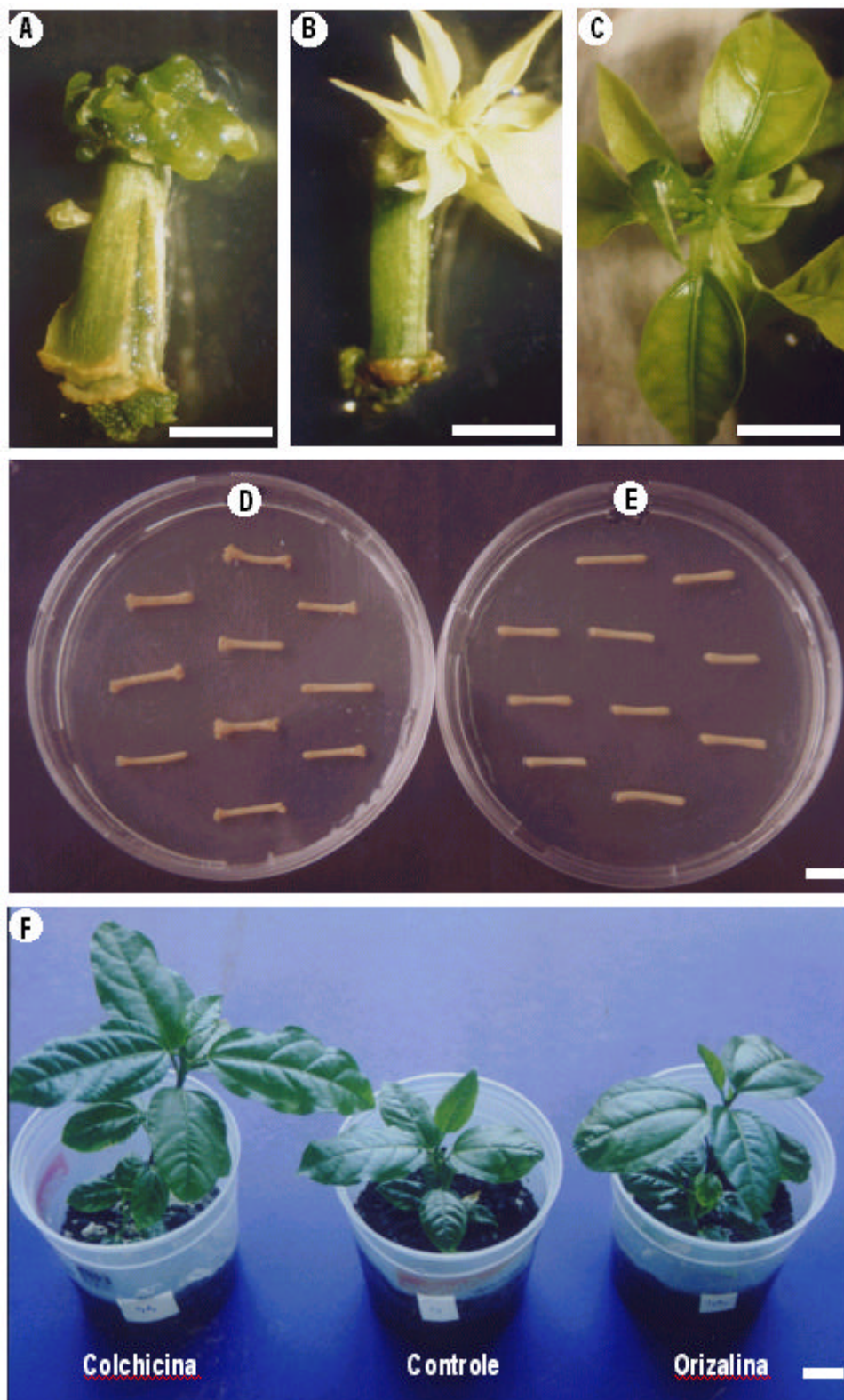


Figura 1. Indução *in vitro* de plantas tetraplóides e diplóides de maracujazeiro amarelo (*P. edulis* f. *flavicarpa* Deg.). A. Explante proliferando em meio MS suplementado com 25 µM de colchicina. B. Fenótipo de brotação Albina em meio MS suplementado com 25 µM de colchicina. C. Fenótipo de planta normal em meio MS. D e E. Efeito fitotóxico da colchicina a 250 e 1.250 µM, respectivamente. F. Plantas tetraplóides e controle regeneradas. Barra = 1 cm.

Chalak e Legave (1996) também verificaram que a orizalina (5  $\mu\text{M}$ ) é menos fitotóxica do que a colchicina e altamente efetiva na duplicação cromossômica de trihaplóides de Kiwi. Esses mesmos autores também observaram que, quando a concentração de orizalina aumentava, ocorria um decréscimo no número de ramos regenerados por explante tratado. Carvalho (2000), utilizando a mesma dose de orizalina (5  $\mu\text{M}$ ) e o mesmo período de exposição (15 dias), verificou que este herbicida também era fitotóxico para o urucum. Porém, quando foi diminuído o período de exposição para 15 horas, possibilitou a regeneração de maior número de plantas.

#### *Avaliação do nível de ploidia das plantas regeneradas*

Neste estudo o nível de ploidia das plantas regeneradas *in vitro* foi determinado com base na contagem do número de cromossomos de células metafásicas e número de cloroplastos por célula-guarda. Das 14 plantas regeneradas neste trabalho (Tabela 2), a observação do número de cromossomos evidenciou que 6 eram diplóides ( $2n = 2x = 18$ ) e 8 plantas eram tetraplóides ( $2n = 4x = 36$ ). Nenhum mixoplóide foi formado. Houve apenas um caso de duplicação espontânea e duas plantas albinas foram observadas das plantas tetraplóides induzidas com colchicina. A ocorrência de plantas albinas resultam de deleção no DNA plastidial e tem sido citada na literatura em *Nicotiana tabacum* (Devreux, 1970), *Datura* (Narayanaswamy e Chandy, 1971), trigo (Day e Ellis, 1985) e *Oryza sativa* (Sun et al., 1979). Apenas dois escapes foram observados, um no tratamento 25  $\mu\text{M}$  de colchicina e outro na concentração de 5  $\mu\text{M}$  de orizalina. Essas plantas não duplicaram o número de cromossomos somáticos quando submetidos aos agentes químicos. Possivelmente os escapes observados

neste trabalho surgiram a partir de células diplóides remanescentes, as quais se multiplicam a taxas superiores às poliplóides (Mergen e Lester, 1971)

Tabela 2. Nível de ploidia obtido com agentes antimitóticos aplicados nos explantes de hipocótilos de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.).

Tratamentos	Número de plantas analisadas	Número de plantas 2x	Número de plantas 4x	Número de plantas albinas
Controle <sup>1/</sup>	4	3	1	0
Colchicina				
25 µM	5	1	4	2
250 µM	0	0	0	0
1.250 µM	0	0	0	0
Oryzalina				
5 µM	1	1	0	0
15 µM	3	0	3	0
30 µM	1	0	1	0

<sup>1/</sup>Meio de cultura não suplementado com agente antimitótico.

#### *Número de cloroplastos das células-guardas do estômato*

O número de cloroplastos por célula-guarda foi eficiente em diferenciar plantas diplóides de tetraplóides. Todas as nove plantas tetraplóides apresentaram em média 8 cloroplastos por célula-guarda, enquanto as cinco diplóides apresentam em média 4 cloroplastos (Figura 2). Esses resultados mostram que esta metodologia é eficiente e rápida em comparação com as demais descritas neste trabalho. A utilidade deste caráter em acessar o nível de ploidia em plantas foi relatada em vários trabalhos (Bingham, 1968; Butterfass, 1995; Compton et al., 1996).

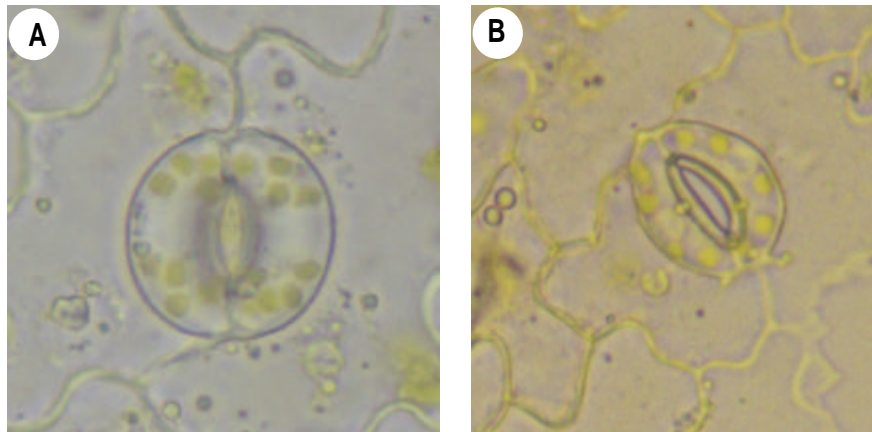


Figura 2. Fotomicrografias de estômatos de maracujazeiro amarelo (*P. edulis* f. *flavicarpa* Deg.). A. Célula-guarda de folhas de plantas tetraplóides com 08 cloroplastos. B. Célula-guarda de folhas de plantas diplóides com 04 cloroplastos, magnitude de 40x.

#### *Fenótipo das plantas tetraplóides*

Embora não tenha sido feita nenhuma caracterização em relação ao crescimento das plantas diplóides e tetraplóides, verificou-se por meio de análise visual que as plantas tetraplóides apresentaram crescimento mais rápido, maior vigor, internós e folhas maiores, quando comparadas ao controle diplóide (Figura 3). Os efeitos morfológicos e fisiológicos comuns da autopoliploidia são o aumento do tamanho das partes vegetativas das plantas, o que torna os autopoliploides bem mais vigorosos em relação aos diplóides correspondentes (Allard, 1971). Entretanto, as flores dos tetraplóides aparentemente não apresentaram diferenças no tamanho, exceto na expressão ectópica de ovários, óvulos e estigma no local de filamentos da coroa (Figura 4B). Cinco estruturas semelhantes a ovário parcialmente fechados (Figura 4C), oriundos da fusão parcial de dois ou mais filamentos, foram formados em cada flor. De cada estrutura, surgiram cerca de 20 óvulos ectópicos (Figura 4E). Expressão

ectópica de óvulos foi relatada em *Petunia hybrida* (Angenent, 1995; Colombo, 1995). Nesta espécie, dois genes - *floral binding protein7* (*FBP7*) e (*FBP11*), controlam a identidade do óvulo. Esses dois locos codificam fatores de transcrição da família MADS. Membros desta família também controlam a especificação de órgãos florais. Plantas transformadas com esses genes (*FBP7* e *FBP1*) cossuprimidos, exibiram carpelóides no lugar de óvulos, e a expressão ectópica de *FBP11* conduziu à formação de óvulos ectópicos em certas partes da flor. Esses resultados indicam que *FBP11*, e provavelmente *FBP7* também, são genes regulatórios requeridos para a identidade de óvulos em *Petunia* (Schneitz et al., 1998).

Diante do exposto acima, conclui-se que o protocolo utilizado foi eficiente na indução de tetraplóides de maracujazeiro *in vitro* e o número de cloroplastos nas células -guarda mostrou-se eficiente e rápido na determinação do nível de plóidia.

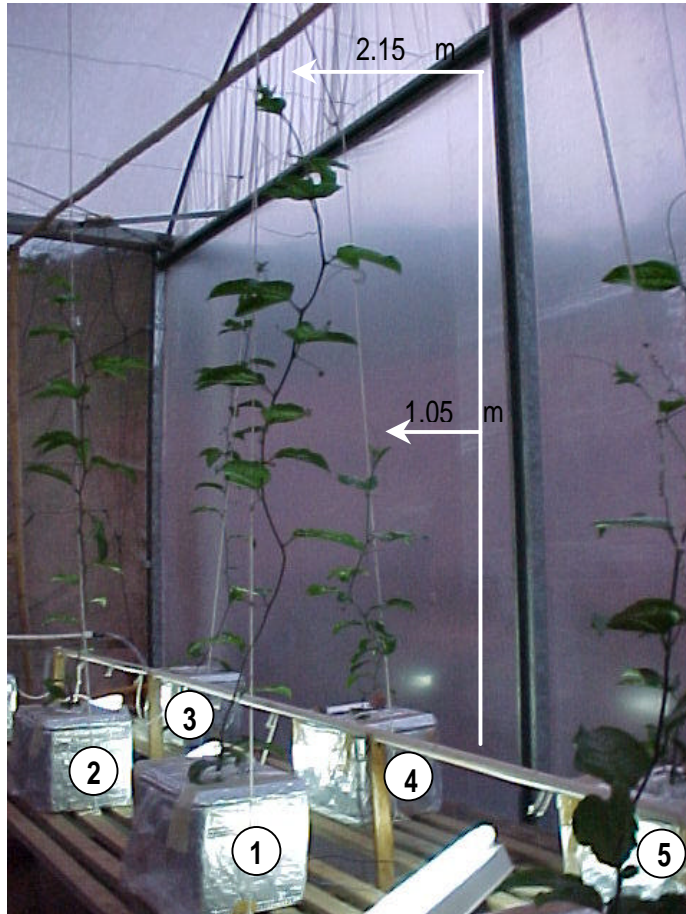


Figura 3. Maracujazeiro diplóide (4) e tetraplóides em sistema hidropônico (1, 2, 3 e 5). Diferença do crescimento entre planta diplóide (1,05m de altura) e tetraplóides (2,15m de altura) da mesma idade e submetidas as mesmas condições de hidroponia (setas).

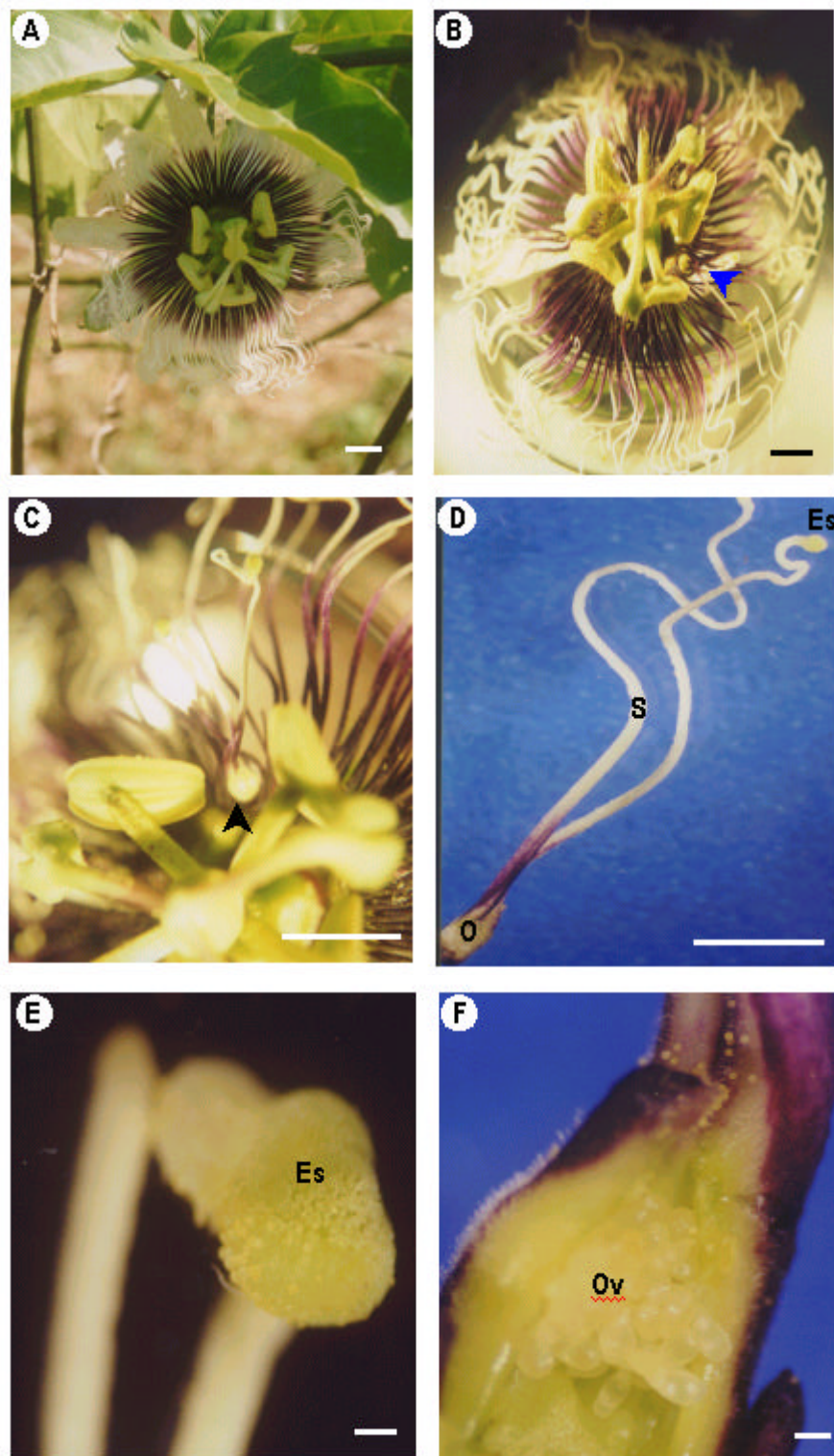


Figura 4. Flores de maracujazeiro amarelo (*P. edulis* f. *flavicarpa* Deg.). **A.** Flor de planta diplóide. **B.** Flor de planta tetraplóide. **C.** Detalhe da flor tetraplóide mostrando ovários ectópicos (seta). **D.** Gineceu ectópico mostrado na figura anterior. **A,B,C e D,** Barra = 1cm. **E.** Superfície estigmática ectópica do gineceu. **F.** Detalhe dos óvulos ecótípicos dentro do ovário ectópico. **E e F,** Barra = 100  $\mu$ m. **Es,** superfície estigmática; **S,** estilete; **O,** ovário; **Ov,** óvulos.

## Referências Bibliográficas

- ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo: Edgard Blücher, 1971. 381p.
- ANGENENT, G. C.; et al. A novel class of MADS box genes is involved in ovule development in *Petunia*. **Plant Cell** **7**: 1569 – 1582. 1995.
- BARBOSA, L. V. e VIEIRA, M. L. C. Meiotic behavior of passion fruit somatic hybrids, *P. edulis* f. *flavicarpa* Degener + *P. amethystina* Mikan. **Euphytica**. **98**: 121 – 127. 1997.
- BINGHAM, E. T. Stomatal chloroplasts in alfafa at four ploidy levels. **Crop Science** **8**: 509-510. 1968.
- BUTTERFASS, T. H. Reproduction and continuity of chloroplasts in spermatophytes. The **Botanical Review** **61** (1): 1 – 27. 1995.
- CARVALHO, J. F. R. P. **Análise cariótica e indução *in vitro* de poliploidia em urucum (*Bixa oreleana* L.)**. Tese Doutorado. Universidade Federal de Viçosa. 2000. 124p.
- CHALAK, L.; LEGAVE, J. M. Oryzalin combined with adventitious regeneration for an efficient chromosome doubling of trihaploid kiwifruit. **Plant Cell Reports** **16**: 97 – 100. 1996.
- COEN, E. S.; MEYEROWITZ, E. M. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. **Nature** **353**: 31-37. 1991.
- COLOMBO, L. et al. The *Petunia* MADS box gene *FBP11* determines ovule identity. **Plant Cell** **7**: 1859 – 1868. 1995.
- COMPTON, M. E.; GRAY, D. J.; ELMSTROM, G. W. Identification of tetraploid regenerants from cotyledons of diploid watermelon cultured *in vitro*. **Euphytica** **87**: 165-172. 1996.
- DEVREUX, M. New possibilities for the *in vitro* cultivation of plant cells. **Tech. Ver. Euro. Comm.** **9**: 105-110. 1970.
- DOLEZEL, J.; LUCRETI, S. SCHUBERT, I. Plant chromosome analysis and sorting by flow cytometry. **Critical Reviews in Plant Sciences** **13** (3): 275-309. 1994.

- DORE, C.; ESSAD, S. Polyploidization. In: JAHIER, J.; CHEVRE, A. M.; DELOURME, R.; REBER, F.; TANGUY, A. M. **Techniques of plant cytogenetics**. Lebanon: Science Publishers, 1996. p. 147-164.
- DREW, R. *In vitro* culture of adult and juvenile bud explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** **26**: 23-27. 1991.
- GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean roots cells. **Experimental Cell Research** **50**: 151-158. 1968
- HANSEN, N. J. P.; ANDERSEN, S. B. *In vitro* chromosome doubling with colchicine, oryzalin, trifuralin, and AMP in *Brassica napus* microspore culture. **Euphytica** **88 (2)**: 159-164. 1996.
- HANSEN, N. J. P.; ANDERSEN, S. B. *In vitro* chromosome doubling with colchicine during microspore culture in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Euphytica** **102**: 101-108. 1998.
- Imrie, B. C.; Kirkman, C. T.; Ross, D. R. Computer simulation of a sporophytic self-incompatible system. **Australian Journal Biological Science** **25**: 343-349. 1972
- JENSEN, C. J. Chromosome doubling techniques in haploids. In: KASHA, K. J. **Haploids in higher plants: advances and potentials**. Guelph: 1974. p. 153-192.
- KNIGHT Jr., R. J. Development of tetraploid hybrid passion fruit clones with potential for the North temperature zone. **HortScience** **26 (12)**: 1541 – 1543. 1991.
- LEITCH, I. J.; BENNETT, M. D. Polyploidy in angiosperms. **Trends in plant science** **2(12)**: 470-476. 1997.
- MANDEL, M. A. et al. Manipulation of flower structure in transgenic tobacco. **Cell** **71**: 133-143. 1992.
- MASTERSON, J. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. **Science** **264**: 421-424. 1994.
- MERGEN, F.; LESTER, D. T. Colchicine induced polyploidy in *Abies*. **Forest Science** **7 (4)**: 314-319. 1971.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum** **15**: 473– 497. 1962.

- NARAYANASWAMY, S.; CHANDY, L. P. *In vitro* induction of haploid, diploid and triploid androgenic embryoids and plantlets in *Datura metel* L. **Annals of Botany** **25**: 535-542. 1971.
- OTONI, W. C.; BLACKWALL, N. W.; d'ULTRA VAZ, F. B.; CASALI, V. W.D.; POWER, J. B.; DAVEY, M. R. Somatic hybridization of *Passiflora* species, *P.edulis* f. *flavicarpa* Degener. and *P. Incarnata* L. **Journal of Experimental Botany** **46** (288): 777 – 785. 1995.
- RÊGO, M. M.; RÊGO, E. R.; OLIVEIRA, M. A. R. Método rápido para quebrar a dormência de sementes do maracujazeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura** (submetido).
- SALON, P. R.; EARLE, E. D. Chromosome doubling and mode of reproduction of induced tetraploids of eastern gamagrass (*Tripsacum dactyloids* L.). **Plant Cell Reports** **17**: 881 – 885. 1998.
- SAMFORD, J.C. Ploidy manipulations. In: MOORE, J.N.; JANICK, J. (Eds) **Methods in fruit breeding**. West Lafayette: Purdue University Press, 1983. p. 100-123.
- SCHNEITZ, K.; BALSUBRAMANIAM, S.; SCHIEFTHALER, U. Organogenesis in plants: the molecular and genetic control of ovule development. **Trends in Plant Science** **3**(12): 468 – 472. 1998.
- SHEFERD, K. Banana breeding – past and present. **Acta Horticulturae** **196**: 37-43. 1987.
- SNOW, N.; MACDOUGAL, J. M. New chromosome reports in *Passiflora* (Passifloraceae). **Systematic Botany** **18**(2): 261-273. 1993
- STEBBINS, G. L. **Chromosomal evolution in higher plants**. Great Britain: J. W. Arrowsmith. 1971. 216p.
- SUN, C. S.; WU, S. C.; WANG, C. C.; CHU, C. C. The deficiency of soluble proteins and plastid ribosomal RNA in the albino pollen plantlets of rice. **Theoretical and Applied Genetics** **55**: 193 – 197. 1979.
- VANDERPLANK, J. **Passion flowers and passion fruit**. Cambridge: MIT Press, Second edition, 1996. 224p.
- VIEIRA, M. L. C. Hibridação somática em plantas – a importância de espécies selvagens como fonte de genes. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento** **3**: 36 – 40. 1997.

- YOUNG, A.; MILLER, C.; GREGORY, E.; LANGSTON, A. Sporophytic self-incompatibility in diploid and tetraploid races of *Rutidosia leptorrhynoides* (Asteraceae). **Australian Journal of Botany** **48**: 667-672. 2000.
- WAN, Y.; PETOLINO, J.F.; WIDHOLM, J. M. Efficient production of doubled haploid plants through colchicine treatment of anther-derived maize callus. **Theoretical and Applied Genetics** **7**: 889-892. 1989.
- WILSON, H. S.; BARBER, S. C.; WALTERS, T. Loss of duplicate gene expression in tetraploid *Chenopodium*. *Biochem. Systematic Ecology* **11**: 7 – 13. 1974.

### **CAPÍTULO III**

**Detecção molecular dos alelos da auto-incompatibilidade em maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) por meio da técnica de PCR.**

## **Detecção molecular dos alelos da auto-incompatibilidade em maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) por meio da técnica de PCR.**

### **Introdução**

A auto-incompatibilidade é definida como a incapacidade que plantas hermafroditas férteis apresentam em produzir sementes após serem autopolinizadas, conduzindo à alogamia, e baseia-se na capacidade hereditária da flor rejeitar seu próprio pólen ou pólen com o mesmo genótipo durante a fase pró-gâmica (Nettancourt, 1977, 1997).

Com base no controle do fenótipo da incompatibilidade do pólen, os sistemas de auto-incompatibilidade foram classificados em dois tipos básicos, o heteromórfico e o homomórfico (Clarke e Newbigin, 1993; Heslop-Harrison, 1975; Nettancourt, 1977). As espécies com auto-incompatibilidade heteromórfica produzem flores distintas, morfológicamente, que diferem basicamente no comprimento relativo do estilete em relação à antera. Essa diferença implica em barreira física para a autopolinização da flor, embora a polinização cruzada possa ocorrer. Tal incompatibilidade encontra-se distribuída em 24 famílias e 164 gêneros (Nettancourt, 1977).

Nas plantas com auto-incompatibilidade homomórfica, usualmente, não existe barreira física para a autopolinização, porém o tubo polínico incompatível cessa seu crescimento antes da fertilização do óvulo, por causa de um mecanismo que é controlado geneticamente, em muitos casos, por um único loco multialélico, o loco S. Essa auto-incompatibilidade é amplamente

distribuída. Nettancourt (1977) estima que mais da metade das espécies de angiospermas apresentam esse tipo de auto-incompatibilidade. A auto-incompatibilidade homomórfica está dividida em dois subgrupos: o gametofítico e o esporofítico (Nettancourt,1977,1997). Estes sistemas estão sob o controle genético do loco -S. Enquanto no sistema gametofítico o fenótipo da auto-incompatibilidade é determinado pelo genótipo S do pólen, no esporofítico, é determinado pelo genótipo S da planta mãe do pólen (Nettancourt, 1977, 1997). No sistema gametofítico predomina a inibição do tubo polínico no estilete, enquanto no sistema esporofítico ela ocorre no estigma (Rêgo et al., 2000).

Ho e Shii (1986), verificaram que o sítio de rejeição do crescimento do tubo polínico no maracujazeiro ocorria no estigma. Bruckner et al., (1995), estudando progênes em duas gerações, constataram que o sistema de incompatibilidade era do tipo esporofítico e com herança possivelmente monofatorial. Estes autores também demonstraram algumas relações de dominância entre os alelos S estudados ( $S_2 > S_1$  e  $S_2 > S_3$ ).

Rêgo et al., (1999; 2000) sugeriram, com base nos resultados de autopolinizações realizadas nos estágios de antese e de botão, cruzamentos recíprocos dentro de progênes (BA, BB, BD, BG e BJ) e sítios de inibição do crescimento do tubo polínico (estigma e estilete) que a auto-incompatibilidade do maracujazeiro estava sobre o controle de dois locos gênicos: o gene S do sistema esporofítico e um segundo, cuja expressão pode ser condicionada por combinações alélicas-específicas do primeiro.

Em *Brassica*, o loco-S compreende uma família gênica, a qual foi originalmente identificada seguindo a caracterização de genes que codificam proteínas da auto - incompatibilidade de *B. campestris* (Nasrallah et al., 1985; 1988). Os genes protótipos desta família, *slg* e *srk*, são altamente polimórficos. O gene *slg* foi descoberto e clonado por

Nasrallah et al., (1985), o qual codifica uma glicoproteína solúvel específica do loco -S (SLG), caracterizada por duas regiões altamente conservadas e duas outras altamente polimórficas, a qual se acumula na parede das células papilares do estigma (Kandasamy et al., 1989), e o gene *srk*, que codifica uma proteína cinase receptora de membrana, cujo domínio extracelular apresenta alto grau de similaridade de seqüência com a proteína SLG secretada (Goring e Rothstein, 1992; Kumar e Trick, 1994). De acordo com Stein et al. , (1991), o gene *srk* está envolvido no reconhecimento célula-à-célula da resposta auto-incompatível.

Os genes *srk* e *slg* são fortemente ligados. Cada par de alelos de *slg-srk* encontrados no loco-s de uma dada planta constitui um haplótipo (Nasrallah et al. , 1993). Duas diferentes classes de haplótipos foram identificadas com base na reatividade da SLG com anticorpo monoclonal MAbH8, um anticorpo contra a SLG do genótipo S<sub>6</sub>. Os alelos da classe I (S<sub>6</sub>, S<sub>13</sub>, S<sub>14</sub>, S<sub>22</sub>, S<sub>29</sub> e S<sub>63</sub>) reagem com MAbH8 enquanto os alelos da classe II (S<sub>2</sub>, S<sub>5</sub> e S<sub>15</sub>) não. Os alelos da classe I ocupam alta posição na hierarquia de dominância e estão associados com forte reação de auto-incompatibilidade. Por outro lado, os alelos da classe II exibem recessividade e interações competitivas no pólen (Kandasamy et al., 1989). O mais interessante é que, baseado neste polimorfismo epítipo, alelos-S de *Brassica campestris* e de gêneros relacionados podem ser similarmente agrupados em subconjuntos de alelos S MAbH8 positivo e negativo. Segundo Nasrallah et al., (1993), existem fortes evidências de que os alelos S divergem mais um do outro dentro da espécie do que entre espécies. Nas crucíferas a proteína S contém o domínio LWQSFDSPTDTLLP, constituído pelos seguintes aminoácidos, Leu-Trp-Gln-Ser-Phe-Asp-Ser-Pro-Thr-Asp-Thr-Leu-Leu-Pro, o qual é altamente conservado em membros da família S (Pruitt et al, 1993), assim como no milho (Walker e Zang, 1990) e na cenoura (Engelen et al, 1993).

No maracujazeiro, os alelos S tem sido arbitrariamente numerados (Bruckner et al., 1995; Rêgo et al., 1999; 2000). Desse modo, cada melhorista de planta tem sua própria série de linhagens-S testadoras, não havendo, portanto, padronização dos mesmos. Além disso, dois outros aspectos devem ser considerados: (1) a identificação desses alelos S pelo método de linhagens testadoras demanda muito tempo, porque são necessários grande número de cruzamento testes; (2) o fenótipo da auto-incompatibilidade é influenciado por fatores ambientais e a condição fisiológica da planta (Nettancourt, 1997); e (3) há necessidade de manter um banco de plantas identificadas.

Recentemente, um método simples para detectar polimorfismo SLG foi desenvolvido (Brace et al., 1993; 1994; Nishio e Sakamoto, 1993; Nishio et al., 1994). Este método envolve a amplificação do DNA SLG por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) com iniciadores específicos e análise eletroforética dos produtos do PCR após clivagem com endonucleases de restrição. A grande vantagem deste método em relação ao de linhagens testadoras é que o teste pode ser feito precocemente, i. é., o DNA é extraído de folhas novas de plantas jovens, o que é de grande interesse para os melhoristas de fruteiras (Nishio et al., 1996).

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi detectar a nível molecular os alelos-S da auto-incompatibilidade utilizando oligonucleotídeos iniciadores alelo-S específicos dos subgrupos I e II das SLGs de brassicas.

## 2. Material e Métodos

### *Material vegetal*

Foram usadas neste trabalho, duas plantas, designadas de DC-32 (alelo S<sub>3</sub>) e DC-40 (alelo S<sub>1</sub>). As quais, apresentam fenótipos distintos em relação aos alelos da auto - incompatibilidade. Os fenótipos foram identificados por meio de cruzamentos realizados por Faleiro (2000).

### *Extração do DNA genômico*

Amostras de DNA genômico foram extraídas de folhas jovens de acordo com metodologia descrita por Ferreira e Grattapaglia (1995). A concentração de DNA Foi determinada por comparação com padrões de quantidade conhecida e diluído para 3 ng.  $\mu\text{L}^{-1}$ .

### *Amplificação do DNA.*

O DNA foi amplificado por PCR usando iniciadores específicos para SLG. Os iniciadores usados foram PS5+PS15 e PS3+PS21, respectivamente, para as classe I e II das SLG (Nishio et al, 1996; Pomper et al, 1998), cujas sequências são: PS5, AGATGAAAGGAGTAAGAAA; PS15, ATCCGTGCTTTATTTAAGA; PS3, ATGAAAGGGGTACAGAACAT; PS21, CTAACCTAGATCAGCAGCAT. Cada reação continha

1,3 µL de tampão 10x, 1,04µL de dNTP(2,5 mM cada), 1 µL de cada iniciador (10 pmol. µL<sup>-1</sup>), 0,26 µL de *Taq* DNA polimerase, 2,5 µL de DNA genômico e 5,9 µL de H<sub>2</sub>O; totalizando 25 µL.

As condições de amplificação foram as mesmas utilizadas por Nishio et al., (1994), ou seja, 30 ciclos de 1 minuto a 93°C, 2 minutos a 45°C e 3 minutos a 72°C usando termociclador PTC 100 (MJ Research Inc.). Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 0,5 X e, após coloração com brometo de etídio, a imagem foi capturada no sistema Eagle Eye System Stratagene.

## Resultados e Discussão

Na Figura 1, observa-se uma banda amplificada de cerca de 1,3 Kb nas duas plantas analisadas neste estudo, DC-32 e DC-40, as quais apresentam respectivamente, os alelos da auto-incompatibilidade S<sub>3</sub> e S<sub>1</sub>. A banda foi amplificada usando o par de iniciadores (PS5 + PS15) específicos da classe I de brassicas (Nishio et al., 1996; Pomper et al., 1998), portanto, possivelmente os alelos S<sub>3</sub> e S<sub>1</sub> da auto-incompatibilidade do maracujazeiro podem ser incluídos também na classe I. Segundo Nishio et al., (1996), não existe sequência espécie - específica em alelos da *SLG*. Kusaba et al. (1997) e Sakamoto et al. (1998), utilizando análises filogenéticas construídas com seqüências de aminoácidos deduzidas de *Brassica oleracea* e *Raphanus sativus*, verificaram que os alelos *SLG* em *Raphanus* eram altamente similares aos de *Brassica* e sugeriram que a divergência dos alelos *SLG* nas duas espécies, ocorreu antes da diferenciação do gênero *Brassica* e *Raphanus*. Possivelmente, isto tenha ocorrido também

no maracujazeiro. Entretanto, mais investigações devem ser feitas para confirmar essa hipótese.

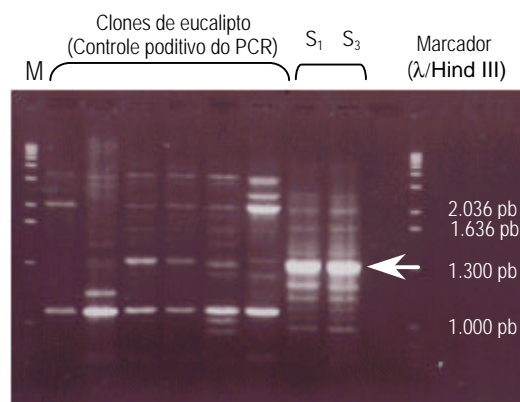


Figura 1. Produtos da amplificação a partir de DNA genômico dos alelos  $S_1$  e  $S_3$ , respectivamente, das plantas DC-40 e DC-32 de maracujazeiro amarelo (*P. edulis* f. *flavicarpa* Deg.), usando oligonucleotídeos iniciadores alelos-S específicos da classe I (PS5+PS15) para genes da auto -incompatibilidade. Fragmentos de DNA de aproximadamente 1.300pb (seta). A direita o controle positivo da reação com clones de eucalipto.

O outro par de oligonucleotídeos iniciadores específicos da classe II de brassica, PS3+PS21, não amplificou o DNA genômico das plantas utilizadas neste trabalho, possivelmente em decorrência da falta de homologia na região de anelamento entre os oligonucleotídeos iniciadores e a região do DNA genômico. Isto tem ocorrido em *Brassica* (Kusaba et al., 1997) e deve-se à baixa similaridade entre diferentes SLG das classe I e II, que está entre 64% e 69%.

Com base no exposto acima, concluímos que a técnica de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores específicos sintetizados a partir da região conservada das SLG's de brassica, foi eficiente na amplificação dos alelos  $S_1$  e  $S_3$  do maracujazeiro amarelo e permitiu incluí-los no subgrupo I das SLGs de *Brassica*.

## 5. Referências Bibliográficas

- BRACE, J.; OCKENDON D. J.; KING, G. J. Development of a method for the identification of S alleles in *Brassica oleracea* based on digestion of PCR -amplified DNA with restriction endonucleases. **Sexual Plant Reproduction 6**: 133-138. 1993
- BRACE, J.; KING, G. J.; OCKENDON, D. J. A molecular approach to the identification of S - alleles in *Brassica oleracea*. **Sexual Plant Reproduction 7**: 203-208. 1994.
- BRUCKNER, C. H.; CASALI, V. W. D.; MORAES, C. F.; REGAZI, A. J.; SILVA, E. A. M. Self - incompatibility in passion fruit ( *Passiflora edulis* Sims). **Acta Horticulturae 370**: 45-57. 1995.
- CLARKE, A. E., NEWBEGIN, E. D. Molecular aspects of self-incompatibility alleles from apple. **Annual Review Genetics 27**: 257-279. 1993.
- ENGELEN, F. A.; HARTOG, M. V.; THOMAS, T. L.; TAYLOR, B., et al. The carrot secreted glycoprotein gene *FP1* is expressed in the epidermis and has sequence homology to *Brassica* S-locus glycoproteins. **Plant Journal 4**: 855-862. 1993.
- FALEIRO, T. M. **Herança da auto-incompatibilidade no maracujazeiro** (*Passiflora edulis* Sims.). Viçosa, MG: UFV, 2000. 67p. Dissertação de Mestrado em Genética e Melhoramento.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2<sup>a</sup> ed. Brasília: EMBRAPA-CENERGEN, 1995. 220p.
- GORING, D. R.; ROTHSTEIN. The S-locus receptor kinase gene in a self -incompatibility *Brassica napus* line encodes a functional serin/threonine kinase. **Plant Cell 4**: 1273-1281. 1992
- HESLOP-HARRISON, J. Incompatibility and the pollen-stigma interaction. **Annual Review of Plant Physiology. 26**: 382-386. 1975
- HO, W. F.; SHII, C. T. Incompatibility system in passion fruit ( *Passiflora edulis* Sims). **Acta Horticulturae 194**: 31-38. 1986

- KANDASAMY, M. K.; PAOLILLO, D. J.; FARADAY, C. D.; NASRALLAH, J. B.; NASRALLAH, M. E. The S-locus specific glycoproteins of *Brassica* accumulate in the cell wall of developing stigma papillae. **Experimental Biology** **134**: 462-472. 1989.
- KUMAR, V.; TRICK, M. Expression of the S-locus receptor kinase multigene family in *Brassica oleracea*. **Plant Journal** **6**: 807-813. 1994
- KUSABA, M.; NISHIO, T.; SATTA, Y.; HINATA, K.; OCKENDON, D. J. Striking sequence similarity in inter- and intra-specific comparison of class I *SLG* alleles from *Brassica oleracea* and *Brassica campestris*: Implications for the evolution and recognition mechanism. **Proceedings National Academy Science USA** **94**: 7673-7678. 1997.
- NASRALLAH, J. B.; KAO, T. H.; GOLDBERG, M. L., NASRALLAH, M. E. A cDNA clone encoding an S-locus-specific glycoprotein from *Brassica oleracea*. **Nature** **318**: 263-267. 1985.
- NASRALLAH, J. B.; YU, S. M.; NASRALLAH, M. E. Self-incompatibility genes of *Brassica oleracea*: expression, isolation, and structure. **Proceedings National Academy Science USA** **85**: 5551-5555. 1988.
- NASRALLAH, J. B.; NASRALLAH, M. E. Pollen-stigma signaling in the sporophytic self-incompatibility response. **Plant Cell** **5**: 1325-1335. 1993.
- NETTANCOURT, D. **Incompatibility in angiosperms**. Berlin. Springer-Verlag, 1977. 230p.
- NETTANCOURT, D. Incompatibility in angiosperms. **Sexual plant reproduction** **10**: 185-199. 1997
- NISHIO, T.; SAKAMOTO, K. PCR-RFLP of S-locus for the identification of breeding lines in *Brassica*. **Japanese Journal Breedings (Suppl 1)**: 274. 1993
- NISHIO, T.; SAKAMOTO, K.; YAMAGUCHI, J. PCR-RFLP of S-locus for identification of breeding lines in cruciferous vegetables. **Plant Cell Report** **13**: 546-550. 1994.
- NISHIO, T.; KUSABA, M.; WATANABE, M.; HINATA, K. Registration S alleles in *Brassica campestris* L by the restriction fragment sizes of *SLGs*. **Theoretical and Applied Genetics** **92 (3/4)**: 388-394. 1996.

- POMPER, K. W.; AZARENKO, A. N.; BASSIL, N.; DAVIS, J. W.; MEHLENBACHER, S. A. Identification of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for self-incompatibility alleles in *Corylus avellana* L. **Theoretical and Applied Genetics** **97**: 479-487. 1998
- PRUITT, R. E., HULSKAMP, M., KOPEZAK, S. D. et al. **Molecular genetics of cell interactions in *Arabidopsis***. Development (Suppl.) 77-84. 1993
- RÊGO, M. M.; BRUCKNER, C. H.; FINGER, F. L.; SIQUEIRA, D.; FERNANDES, A. Self - incompatibility in passion fruit: evidence of two loci gen etic control. **Theoretical and Applied Genetics** **98**: 564-568. 1999.
- RÊGO, M.M.; RÊGO, E. R.; BRUCKNER, C. H.; Da SILVA, E. A. M.; FINGER, F. L.; PEREIRA, K. J. C. Pollen tube behavior in yellow passion fruit following compatible and incompatible crosses. **Theoretical and Applied Genetics** **101**: 685-689. 2000.
- STEIN, J. C.; HOWLETT, B.; BOYES, D. C.; NASRALLAH, J. B.; NASRALLAH, M. E. Molecular cloning of a putative receptor protein kinase of *Brassica oleracea*. **National Academy Science USA** **88**: 8816-8820. 1991
- WALKER, J. C.; ZHANG, R. Relationship of a putative receptor protein kinase from maize to the S-locus glycoproteins of *Brassica*. **Nature** **345**: 743-746. 1990.

## CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

- 1) O meio basal MS suplementado com 5,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, em regime de escuro foi o mais eficiente na resposta ginogênica;
- 2) O genótipo que apresentou melhor desempenho foi o II-20, regenerando 21 embriões;
- 3) O meio MS suplementado com colchicina a 25? M e orizalina a 15? M, incrementaram a indução *in vitro* de poliplóides de maracujazeiro;
- 4) O número de cloroplastos por célula-guarda é indicador eficiente do nível de ploidia em maracujazeiro. Plantas diplóides possuem em média quatro (04) cloroplastos por célula-guarda e as plantas tetraplóide possuem oito (08); e
- 5) Os oligonucleotídeos iniciadores específicos permitiram detectar e incluir a nível molecular os alelos S<sub>1</sub> e S<sub>3</sub> do maracujazeiro no subgrupo I das SLG's de brassicas.