



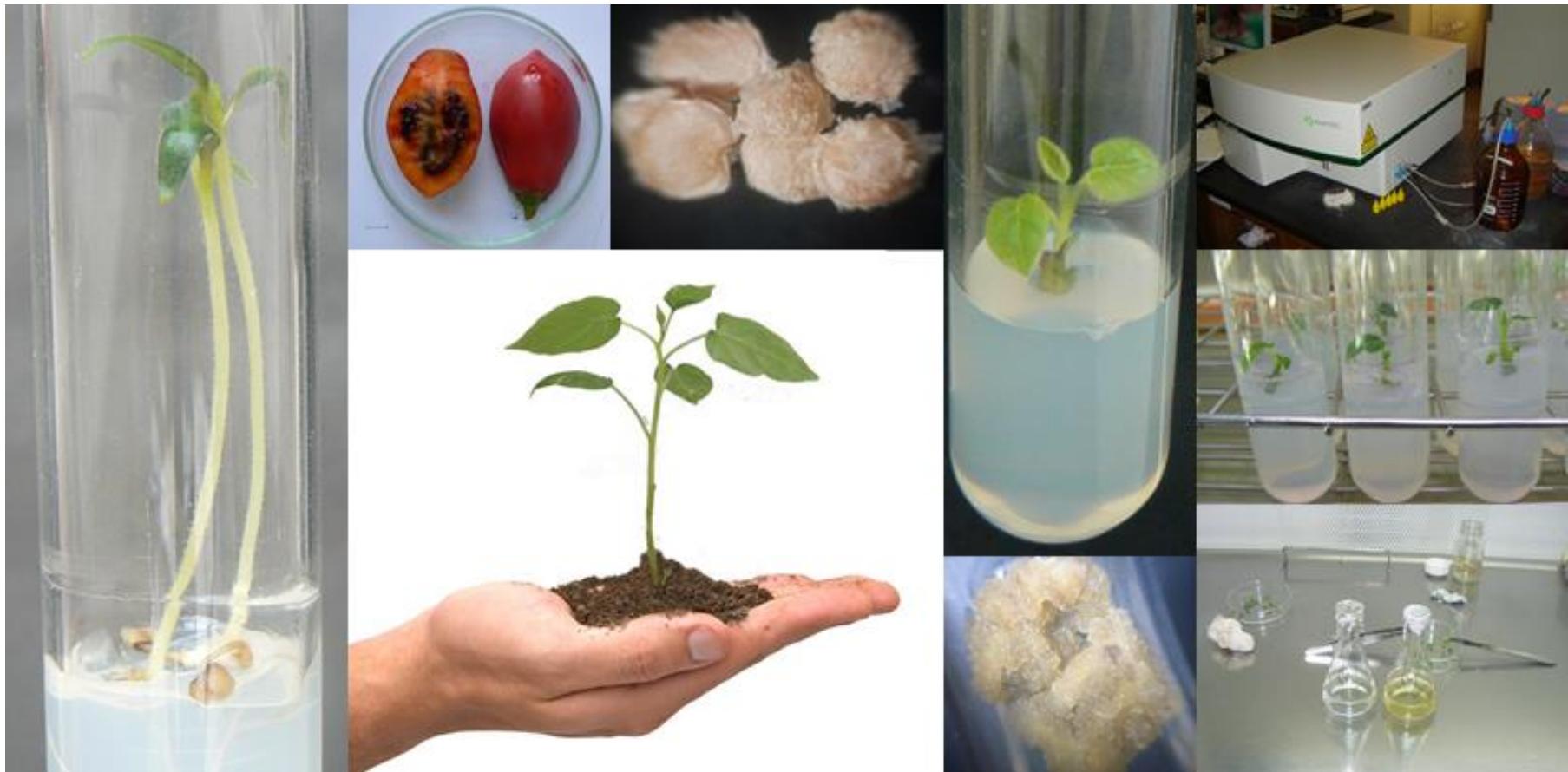
2013



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ensaio de poliploidização *in vitro* em vários explantes de tamarilho (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt)



Ensaio de poliploidização *in vitro* em vários explantes de tamarilho (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt)

David Tiago Nunes Reis

David Tiago Nunes Reis

2013



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

A utilização de dois habitats de zonas húmidas pelo Rouxinol-bravo *Cettia cetti* durante períodos de elevado dispêndio de energia

Dissertação apresentada à Universidade de
Coimbra para cumprimento dos requisitos
necessários à obtenção do grau de Mestre em
Ecologia, realizada sob a orientação científica do
Professor Doutor Jaime Ramos (Universidade de
Coimbra)

Pedro Luís Brito Lopes

2013

“There are no miracles in agricultural production”

Norman Borlaug, Prémio Nobel da Paz, 1970

Agradecimentos

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Jorge Canhoto e Prof. Dr. João Loureiro por toda a orientação, pelos conselhos e correcções científicas, e também pela amizade e pela disponibilidade que tiveram.

Ao Dr. Ghasem Karimzadeh pela sua preciosa ajuda na citometria de fluxo e no inglês, pelos artigos que me forneceu, pela paciência e por me dar a conhecer uma nova cultura.

Ao Prof. Dr. António Xavier Pereira Coutinho, pelo empréstimo do micrómetro e, acima de tudo, a simpatia e amizade ao longo destes anos.

À Dona Eulália Rosa, pela disponibilidade, preocupação, preparação do material e sem dúvida por ser a força motriz do laboratório.

Aos meus companheiros de laboratório, Nelson Farinha, Letice Gonçalves, Pedro Correia, Nélia Mano, Hélia Sales, Lara Currais, Sofia Vaz, Elsa Baltazar, e em especial, ao meu amigo Rui Pereira pelo bom ambiente e interajuda no laboratório.

Aos meus companheiros de casa, Cláudio Gaspar, José Pedro, Ricardo Leote, Diogo Ferro, Fernando Francisco, pelos jantares tertúlia das 21h30, onde se discutia desde ciência à política, economia e desporto, e que fizeram de mim uma pessoa mais culta.

Ao Jorge Rodrigues e ao Pedro Vinagre por toda a ajuda.

À Diana Sá da Bandeira pelo apoio, correcção e principalmente pela amizade.

A toda a minha família, especial a minha tia Bela pela motivação que me deu através dos doces e salgadinhos enviados todas as semanas e ao meu sobrinho Martim pelas alegrias, e quem sabe não será um dia um grande cientista.

Por último e mais importante, um enorme agradecimento aos meus Pais, que me deram o privilégio de estudar em Coimbra, que fizeram de mim uma pessoa melhor, e que me apoiaram incondicionalmente todos estes anos. Esta tese é-lhes dedicada.

Um Bem Haja a todos.

ÍNDICE

Resumo.....	V
Abstract	VII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Poliploidia.....	2
1.1.1 Definição e considerações gerais	2
1.1.2 Mecanismos de formação.....	3
1.1.3 Classificação e origem do genoma	4
1.1.4 Mudanças que promovem a evolução	6
1.2 Indução de poliploidia no melhoramento vegetal	7
1.2.1 Breve resenha histórica	7
1.2.2 Métodos e técnicas de indução de poliploidia <i>in vitro</i>	9
a) Agentes antimitóticos usados na duplicação cromossômica	9
b) Concentração, tempo de exposição e solventes.....	10
c) Tipos de explantes.....	11
d) Modos de aplicação.....	11
e) Confirmação de poliploidia.....	12
f) Pressupostos para a escolha da espécie	13
1.2.3 Principais aplicações da indução de poliploidia no melhoramento vegetal	14
a) Restauo da fertilidade em híbridos e contorno das barreiras da hibridização	14
b) Desenvolvimento de cultivares sem sementes	15
c) Mudanças na anatomia e morfologia.....	15
d) Produção de metabólitos secundários.....	16
e) Fontes de mutações	17
f) Uma ferramenta para a indução de apomixia?	17
1.3 Tamarilho (<i>Cyphomandra betacea</i> (Cav.) Sendt.).....	18
1.3.1 Descrição botânica e distribuição geográfica.....	18
1.3.2 Distribuição e importância económica e etnobotânica.....	19
1.3.3 Propagação e cultura <i>in vitro</i>	21
1.3.4 Poliploidização no tamarilho	22
1.4 Objectivos	23
2. MATERIAIS & MÉTODOS.....	24

2.1	Origem do material vegetal.....	25
2.2	Estabelecimento e propagação do material vegetal.....	25
2.2.1	Germinação <i>in vitro</i> de sementes e micropropagação	25
2.2.2	Isolamento e cultura de embriões zigóticos.....	26
2.3	Ensaio de indução de poliploidia.....	26
2.3.1	Tratamento com colchicina em ápices caulinares, segmentos nodais e embriões zigóticos. 26	
2.3.2	Exposição de segmentos foliares ao agente antimitótico e indução de embriogênese somática.....	27
2.4	Análise por citometria de fluxo.....	28
2.5	Propagação e enraizamento <i>in vitro</i>	29
2.6	Contagem dos cromossomas	29
2.7	Caracterização morfológica e estomática.....	30
2.8	Aclimação e transferência para o campo.....	30
2.9	Análise estatística.....	31
3.	RESULTADOS	32
3.1	Efeito da colchicina nos ápices caulinares, segmentos nodais e embriões zigóticos	33
3.1.1	Taxa de sobrevivência.....	33
3.1.2	Determinação do nível de ploidia por citometria de fluxo	36
3.2	Estabilidade do nível de ploidia em calos formados a partir de segmentos foliares, previamente tratados com colchicina	39
3.3	Análise morfológica e estomática de plantas diplóides, tetraplóides e mixoplóides.....	41
3.4	Contagem de cromossomas.....	44
3.5	Aclimação e transferência para o campo	45
4.	DISCUSSÃO	48
4.1	Efeito da colchicina nos ápices caulinares, segmentos nodais e embriões zigóticos	49
4.2	Estabilidade do nível de ploidia em calos formados a partir de segmentos foliares, previamente tratados com colchicina	53
4.3	Análise morfológica e estomática das plantas diplóides, tetraplóides e mixoplóides	54
5.	CONCLUSÕES & PERSPECTIVAS FUTURAS	57
6.	REFERÊNCIAS.....	59

Resumo

A poliploidização é um dos processos mais importantes na evolução das plantas. É também um processo amplamente explorado no melhoramento vegetal, uma vez que permite obter plantas com características mais interessantes do ponto de vista comercial, como flores ou frutos maiores, produzir variedades sem sementes, contornar as barreiras da hibridização, ou ainda, aumentar os níveis de metabólitos secundários. Existem várias formas de se obterem plantas poliplóides. Uma dessas formas é através da exposição de vários tipos de material vegetal a agentes antimitóticos.

O tamarilho (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt) é uma espécie diplóide ($2n = 2x = 24$ cromossomas), com um crescente interesse económico, uma vez que os seus frutos são pouco calóricos e representam uma excelente fonte de provitamina A e vitaminas B₆, C, E. Contêm ainda níveis elevados de proteínas, pectinas, fibras, ferro, cálcio e fósforo. Contudo e apesar de apresentar um grande potencial agrícola, o cultivo desta solanácea apresenta algumas limitações, tendo sido até agora pouco explorada.

Neste trabalho foi avaliada a capacidade de indução de tetraploidia em ápices caulinares de plântulas, segmentos nodais, e embriões zigóticos de tamarilho. Estes explantes foram expostos a diferentes concentrações de colchicina, em meio líquido ou em meio sólido e durante vários períodos de tempo. O nível de ploidia das plantas regeneradas a partir dos diferentes explantes foi confirmado por citometria de fluxo e pela contagem de cromossomas. As características morfológicas e estomáticas das plantas tetraplóides obtidas foram comparadas com as plantas diplóides. Este estudo avaliou ainda a estabilidade do nível de ploidia de calos formados a partir de segmentos foliares, previamente expostos à colchicina e mantidos durante 5 meses em meio de indução de embriogénese somática. Os resultados demonstraram que a indução de poliploidia foi mais eficaz em segmentos nodais, com uma frequência de tetraplóides de 17,1%, enquanto os ápices caulinares apenas produziram cerca de 8,2% de plantas tetraplóides. Em ambos os explantes os melhores resultados foram obtidos com concentrações de colchicina de 2500 e 3000 μM (meio líquido) durante 5 dias. Não foi possível obter plantas tetraplóides a partir da regeneração dos embriões zigóticos, contudo foi conseguida uma taxa elevada de plantas mixoplóides. A análise morfológica revelou que as plantas tetraplóides possuem um desenvolvimento mais lento, em comparação com as plantas diplóides. Estas plantas apresentaram uma altura mais baixa

e um sistema radicular menos desenvolvido. As plantas tetraplóides apresentaram ainda estomas maiores e um número de cloroplastos por células-guarda superior às plantas diplóides. Em contraste, as plantas diplóides possuíram uma densidade estomática maior. A análise do nível de ploidia dos calos formados a partir de segmentos foliares revelou que existem alterações no nível de ploidia. Contudo ficou provado que não foi a colchicina que teve efeito neste resultado, mas sim o tempo de cultura no meio de indução de embriogénese somática.

Em conclusão, este estudo forneceu novas perspectivas para a produção de plantas tetraplóides de tamarilho. As plantas obtidas serão avaliadas quanto à sua performance e poderão ser utilizadas em vários programas de melhoramento desta espécie.

Palavras-chave: citometria de fluxo; colchicina; conteúdo de ADN nuclear; cultura *in vitro* de plantas; melhoramento vegetal.

Abstract

Polyploidization is one of the most important phenomena in plant evolution. It is also a highly explored process in plant breeding, since it allows the production of plants with more interesting characteristics from a commercial point of view, such as bigger fruits or flowers, seedless varieties, to overcome hybridization barriers or even increasing levels of secondary metabolites. There are many ways to obtain polyploids plants. One of those ways is through the exposure of different tissues to antimetabolic agents.

Tamarillo (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt) is a diploid species ($2n = 2x = 24$ chromosomes), with a growing economic interest, since its fruits have small amounts of calories and are an excellent source of provitamin A, and vitamins B₆, C and E. It has also high levels of proteins, pectins, iron, calcium and phosphorus. Despite its great agricultural potential, the cultivation of this nighshade has some restrictions and, consequently, it has been little explored so far.

In this work, the capacity to induce tetraploidy in seedlings shoot-tips, nodal segments and zygotic embryos was evaluated. These explants were exposed to different colchicine concentrations, in liquid or solid mediums, during different incubation periods. Ploidy levels of the plants regenerated from the different explants were evaluated using flow cytometry and further confirmed using chromosome counts. The morphological and stomatal characteristics of the obtained tetraploid plants were compared with those from diploid plants. This study also evaluated the stability of the ploidy levels of the *callus* formed from leaves sections previously exposed to colchicine, and kept for 5 months in a somatic embryogenesis induction medium. The results showed that the ploidy induction was more efficient in nodal segments, with a frequency of obtained tetraploids of 17.1%, while shoot-tips only produced c.a. 8.2%. In both explants the best results were obtained with colchicine concentrations of 2500 and 3500 μM (liquid medium) during 5 days. Through the regeneration of zygotic embryos it was not possible to obtain tetraploid plants; however a high level of mixoploid plants was obtained. The morphological analysis revealed that tetraploid plants undergo a slower development when compared with diploid plants. In particular, these tetraploid plants have a lower height and a less developed radicular system. Those plants also have bigger stomata and a higher number of chloroplasts per guard cells. In contrast, diploid

plants have a greater stomatal density. The analysis of the ploidy levels of the *callus* formed from leaves sections showed changes in the ploidy levels. However this result was not due to colchicine itself, but to the period of incubation in the medium of somatic embryogenesis induction. This study provides new perspectives to the production of tamarillo tetraploid plants, with future plans focused in evaluating the performance and thus the commercial value of the resulting tetraploid plants, being of great value in several breeding programs.

Keywords: colchicine; flow cytometry; nuclear DNA content; plant breeding; plant tissue culture.

1.INTRODUÇÃO

1.1 Poliploidia

1.1.1 Definição e considerações gerais

A poliploidia define-se como a existência de três ou mais conjuntos completos de cromossomas no mesmo núcleo. Pode estar presente em células de um tecido, em partes de um organismo ou em organismos inteiros e representa uma importante característica na evolução de muitos eucariotas (Ramsey & Schemske, 1998; Comai, 2005; Otto, 2007; Song *et al.*, 2012). Em contraste com o processo de evolução gradual, onde as novas espécies evoluem a partir de populações isoladas, a especiação pode também surgir repentinamente. O mecanismo mais comum de especiação abrupta é através da poliploidia (Ranney, 2006). Por exemplo, quando um tetraplóide surge numa população, geralmente hibridiza com outros tetraplóides e diplóides. Esta hibridização cria muitas vezes barreiras reprodutivas que se tornam uma força motriz para a especiação.

A frequência de poliplóides em angiospérmicas é relativamente alta (1/100.000) (Ramsey & Schemske, 1998). De facto, estima-se que 70% das angiospérmicas sofreram um ou mais eventos de poliploidização ao longo do seu percurso evolutivo (Goldblatt, 1980; Masterson, 1994). Por outro lado, estudos mais recentes, através da análise genómica, indicam que 100% das angiospérmicas poderão ser paleopoliplóides (Bowers *et al.*, 2003; Otto, 2007). Nas gimnospérmicas, a presença de poliplóides é um acontecimento muito mais raro (Ahuja, 2001). Na verdade, a frequência de poliplóides encontrados nas gimnospérmicas é de apenas 5%, e 1.5% no grupo das coníferas (Ahuja, 2005). Estima-se também que 95% das pteridófitas tenham origem poliplóide (Soltis & Soltis, 1993).

A poliploidia pode ser também encontrada nos animais. De facto, conhecem-se algumas formas poliplóides em invertebrados, como os insectos ou moluscos, e em vertebrados como os répteis, anfíbios ou peixes. Nos mamíferos e nas aves, alterações nos níveis de ploidia são raras, e a ocorrer, aparecem durante os primeiros estágios do desenvolvimento, sendo geralmente fatais (Otto, 2007; Song *et al.*, 2012). Contudo, nas plantas a poliploidia é um processo muito mais dinâmico do que em outros organismos (Ramsey & Schemske, 2002). Durante os seus primeiros estágios de desenvolvimento, as plantas possuem algumas células poliplóides, que são necessárias ao normal desenvolvimento do embrião, como é o caso do endosperma, que fornece nutrientes e

proteínas necessárias, ou o suspensor, que serve de ponte para transferir esses nutrientes entre o embrião e o endosperma. As células do tapete das anteras, também podem ser poliplóides e têm entre outras funções a capacidade de nutrir os grãos de pólen (Hyon *et al.*, 2009).

Para se entender a poliploidia é necessário conhecer algumas noções básicas da citogenética. Um conjunto básico de cromossomas (no genoma) é designado por “ x ” e o número haplóide (n) é o número de cromossomas que ocorrem nos gametas. Por sua vez, as células somáticas possuem o dobro do número de cromossomas dos gametas, ou seja, $2n$. Os poliplóides são nomeados por um prefixo que indica o número de conjuntos básicos de cromossomas e do sufixo “ploidia”, que significa “quantidade de genoma”. Por exemplo, triplóide refere-se a uma célula com três cópias do genoma, enquanto um hexaplóide refere-se a uma célula com seis cópias do genoma. Espécies diplóides, como o tamarilho possuem $2n = 2x = 24$, ou seja, têm duas cópias de um genoma, com um total de 24 cromossomas ($2n$) nas suas células somáticas, e 12 cromossomas nos seus gametas, onde $n = x$. Espécies com níveis de ploidia superiores, como por exemplo os tetraplóides possuem 4 conjuntos básicos de cromossomas, onde as suas células somáticas possuem $2n = 4x$, e os seus gametas $n = 2x$.

1.1.2 Mecanismos de formação

A formação de organismos poliplóides na natureza pode ocorrer principalmente através de dois mecanismos (Comai, 2005). O primeiro é conhecido como poliploidização sexual, e envolve a não redução de gametas ($2n$) durante a meiose. É também o mecanismo de poliploidização mais comum em plantas (Harlan & De Wet, 1975; Ramsey & Schemske, 1998). A falha na redução, afecta a formação e função do fuso acromático e também a citocinese, podendo ocorrer basicamente em dois momentos do ciclo celular: a) pela restituição na primeira divisão (RPD), durante a meiose I e b) pela restituição na segunda divisão (RSD), em que a primeira divisão meiótica é seguida pela citocinese, estando a meiose II ausente. As consequências genéticas da RPD e da RSD são diferentes. A primeira conserva altos níveis de heterozigose nos gametas ($2n$) do híbrido formado, enquanto a segunda resulta numa redução significativa desses níveis (Comai, 2005; Acquah, 2007).

O segundo mecanismo que permite a formação de poliplóides ocorre devido a mutações em células somáticas, que provocam a interrupção da mitose e a consequente duplicação dos cromossomas dessas células. Este mecanismo é também denominado de poliploidização assexual. Muitos investigadores consideram-no um acontecimento mais raro de se encontrar na natureza do que a não redução de gâmetas (Ramsey & Schemske, 1998; Otto & Whitton, 2000). No entanto, células poliplóides aparecem frequentemente entre células diplóides dos tecidos da maioria das plantas (Doležel *et al.*, 2007) e, dependendo do estágio de desenvolvimento, poderão dar origem a plantas inteiras poliplóides (De Wet, 1971; Ranney, 2006). A possível formação natural de poliplóides como resultado de falhas mitóticas foi demonstrada em tecidos meristemáticos de várias plantas (Ramsey & Schemske, 1998) e em embriões jovens de milho (Randolph, 1932), por exemplo.

Como veremos mais à frente, este é um importante mecanismo para a obtenção de poliplóides artificiais.

1.1.3 Classificação e origem do genoma

A poliploidia divide-se em euploidia e aneuploidia. Os euplóides são organismos que possuem conjuntos múltiplos e inteiros de cromossomas, enquanto a aneuploidia caracteriza-se pela posse de conjuntos incompletos de cromossomas com a adição ou a deleção de um ou mais cromossomas específicos.

Os euplóides (Fig. 1) são denominados como autopoliplóides ou alopoliplóides, consoante a origem do genoma (Grant, 1971). Os autopoliplóides têm origem na duplicação do mesmo genoma, possuindo múltiplas cópias do seu conjunto básico (x) de cromossomas (Acquaah, 2007; Chen, 2010). Os alopoliplóides resultam da hibridização interespecífica ou intergenérica de dois ou mais genomas diferentes. Ambos são comuns em condições naturais; porém os alopoliplóides são tidos como mais frequentes (Ramsey & Schemske, 1998; Soltis *et al.*, 2004). Quando existe apenas a combinação de segmentos únicos de cromossomas, de diferentes genomas, o processo denomina-se de alopoliploidia segmentar (Comai, 2005; Ranney, 2006). Os cromossomas dos alopoliplóides segmentares são idênticos mas não homólogos e podem indicar possíveis homologias ancestrais entre espécies (Acquaah, 2007).

Os autopoliplóides não parece terem tido um grande impacto na evolução das espécies pois o aumento no número de cromossomas não significa necessariamente um aumento no desempenho dos organismos (Ramsey & Schemske, 1998; Otto & Whitton, 2000). Na realidade, a redução de fertilidade e do número de sementes devido a problemas no emparelhamento dos cromossomas, (Ramsey & Schemske, 1998) é uma característica muito comum nos autopoliplóides, limitando a propagação sexual das plantas que apenas se podem multiplicar por reprodução vegetativa (Ladizinsky, 1998). O efeito “giga”, caracterizado pelo aumento de tamanho de vários órgãos da planta como raízes, tubérculos, frutos ou sementes é o principal motivo para a utilização de autopoliplóides pelo homem. Como exemplo de autopoliplóides naturais com importância agrícola, podem-se destacar variedades tetraplóides de alfalfa, amendoim, batata, e café, ou ainda triplóides como a banana os quais não produzem sementes e, por isso, são também propagados unicamente de forma vegetativa (Acquaah, 2007).

A alopoliploidia teve uma importância mais acentuada na evolução das espécies, devido principalmente ao vigor híbrido ou heterose (Chen, 2010). A heterose define-se como um aumento de aptidão de indivíduos heterozigóticos quando comparados com homozigóticos da mesma população. Geralmente a heterose refere-se a níveis superiores de biomassa, estatura, taxa de crescimento e/ou fertilidade na descendência híbrida (Chen, 2010). Existem muitas culturas agrícolas que são alopoliplóides naturais, como por exemplo, morango, mostarda, cana-de-açúcar, colza, algodão, tabaco ou trigo (Acquaah, 2007). Outras foram já obtidas pela mão do homem, como é o caso do triticale (Mergoum & Macpherson, 2004). Contudo, os relatos existentes não demonstram equivocadamente uma relação directa entre a poliploidia e a domesticação das plantas (Hilu, 1993).

Os poliplóides, depois de sofrerem um evento de poliploidização, atravessam um processo de conversão gradual da poliploidia para a diploidia. Este fenómeno denomina-se diploidização (Fig. 1) e ocorre devido a alterações genéticas em *loci* duplicados (Comai, 2005). Esta estratégia permite eliminar várias incompatibilidades no seu genoma evitando o silenciamento de genes e mantendo a fertilidade e a estabilidade da espécie (Doyle *et al.*, 2008).

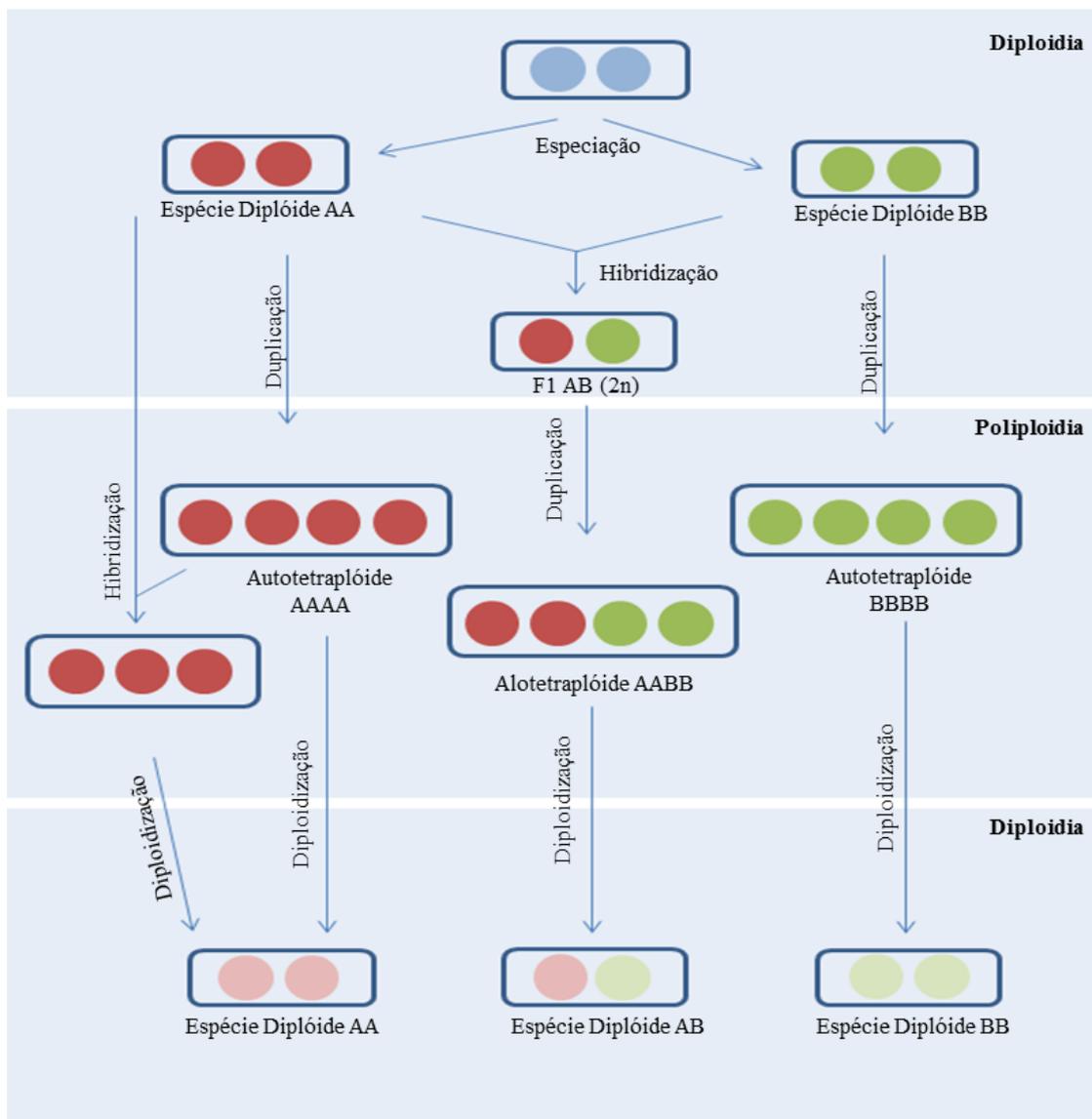


Figura 1 - Principais origens do genoma na formação de espécies via poliploidia. A figura mostra as principais vias que resultam na passagem repentina de diploidia para poliploidia e a consequente transição gradual de poliploidia para diploidia. Para cada forma, o genoma haplóide é representado por um círculo colorido. (Adaptado de Meru, 2013 e Comai, 2005).

1.1.4 Mudanças que promovem a evolução

Os poliplóides possuem três características óbvias que promovem a sua evolução. As duas primeiras resultam da duplicação genética e são a heterose e a ampla redundância genética. A fixação de diferentes genomas que ocorre na heterose permite aos alopoliplóides integrarem características de qualidade dos seus parentes, exibindo uma melhor adaptação, por exemplo, a certas condições ambientais (Chen, 2010). O emparelhamento forçado dos cromossomas homólogos dos híbridos alopoliplóides

impede a recombinação intergenómica, mantendo eficazmente o mesmo nível de heterose durante as gerações seguintes. Para além dos aloploplóides, a heterose também é conhecida em autopoliplóides, apesar dos seus mecanismos ainda serem pouco entendidos (Comai, 2005). A redundância genética permite aos poliplóides mascarar os seus alelos recessivos pela expressão de alelos selvagens. Este facto fornece uma protecção contra os efeitos prejudiciais das mutações e da genotoxicidade. A redundância genética permite ainda diversificar a função génica pela alteração de cópias redundantes de genes importantes (Comai, 2005; Chen, 2010).

A terceira característica é mais controversa e está relacionada com a reprodução das plantas. Em alguns casos, a poliploidia interrompe os sistemas de auto-incompatibilidade, permitindo a autofecundação em organismos poliplóides. Em certas plantas, a poliploidia pode ainda favorecer o aparecimento de reprodução assexuada (Comai, 2005).

Em suma, as mudanças no genoma, na expressão génica e nos sistemas de reprodução, possibilitam aos poliplóides inovar e melhorar as suas funções, permitindo atingir a especiação e o sucesso evolutivo.

1.2 Indução de poliploidia no melhoramento vegetal

1.2.1 Breve resenha histórica

Foi no início do século XX, e após a redescoberta dos trabalhos de Mendel, que se começaram a dar os primeiros passos na manipulação artificial dos níveis de ploidia em plantas. Em 1904, Nemec observou, pela primeira vez, a duplicação cromossómica artificial, expondo raízes de *Datura* a hidrato de cloral e a outros químicos. Contudo, muitas vezes tecidos tetraplóides apareciam sem ser necessário qualquer estímulo (Blakeslee & Avery, 1937). Em 1907, os franceses Élie e Émile Marchal, conseguiram induzir poliploidia em musgos, através da regeneração celular do esporófito diplóide, após o seu corte e exposição a baixas temperaturas (Burnham, 1962).

Em 1916, Winkler introduz o termo “poliploidia”, depois de obter plantas tetraplóides a partir de tecido caloso de solanáceas (Winkler, 1916; Burnham, 1962). Nas décadas seguintes, a utilização de calos para induzir a duplicação espontânea dos cromossomas, foi conseguida em várias espécies do género *Solanum* (Jorgensen, 1928),

e em espécies do género *Nicotiana* (Greenleaf, 1938). Nos anos 20, Belling e Blakeslee (1924) encontram ramos tetraplóides em *Datura*, depois da sua exposição a baixas temperaturas. Foi também nesta década que Karpechenko (1927), obtém o híbrido *Raphanobrassica*, resultado do cruzamento intergenérico de *Raphanus sativus* ($2n = 18$ cromossomas) com *Brassica oleracea* ($2n = 18$). Apesar de não ter sido o primeiro a realizar este cruzamento, Karpechenko foi o primeiro a mostrar a fertilidade dos seus descendentes, criando uma nova espécie em laboratório. Este resultado foi a consequência de algumas plantas terem sofrido poliploidização espontânea durante os ensaios experimentais, dando origem a indivíduos tetraplóides férteis ($4n = 36$). A primeira aplicação de indução de poliploidia em espécies agrícolas, foi reportada no início da década de 30. Randolph (1932), conseguiu obter plantas tetraplóides de milho, através da exposição dos seus embriões a altas temperaturas (durante as primeiras fases de desenvolvimento).

Até 1937, muitos foram os métodos utilizados para induzir poliplóides em plantas mas sempre com reduzidas taxas de sucesso (Eigsti & Dustin, 1955). Contudo, nesse ano, surgem duas publicações importantes: Blakeslee e Avery (1937) mostraram que através do uso da colchicina, um alcalóide extraído de plantas de *Colchicum autumnale*, era possível obter plantas com o dobro dos cromossomas; e passado pouco tempo, Nebel (1937), reportou que este alcalóide interfere com a anáfase.

A descoberta da actividade antimitótica da colchicina foi um grande contributo para estudo da genética teórica. Por outro lado, marcou também o início de uma nova era no melhoramento vegetal, tornando-se uma poderosa e eficaz ferramenta para produção de poliplóides experimentais (Eigsti & Dustin, 1955). O seu uso intensificou-se, e os resultados obtidos foram espectaculares. Nos anos seguintes, o número de publicações relativas à indução de poliploidia aumentou drasticamente. O norte-americano Blakeslee continuou as suas pesquisas e, em 1939, conseguiu produzir poliplóides pertencentes a 48 espécies diferentes, usando a colchicina (Blakeslee, 1939).

Um pouco por todo o mundo, vários investigadores seguiram os seus passos. Na década de 40, a maioria das espécies agrícolas cultivadas na Suécia detinham variedades autopoliplóides experimentais (Eigsti & Dustin, 1955) e na Rússia, Japão e Inglaterra mais de 80 alopoliplóides diferentes de milho foram criados (Burnham, 1962). Outras culturas agrícolas, como o algodão, batata, arroz, beterraba, ou o tabaco possuíam já nessa altura, variedades artificiais com o dobro dos cromossomas (Hancock, 1997).

No início da década de 50, o departamento de agricultura dos Estados Unidos (USDA) apresentou variedades poliplóides das espécies frutícolas mais cultivadas, como maçãs, pêssegos, uvas, e morangos (Hancock, 1997). Foi também nesta altura que o japonês Kihara desenvolveu pela primeira vez melancias sem sementes (Kihara, 1951). A comunidade científica estava empolgada e, na edição de Outubro de 1953 do boletim do USDA podia-se ler “O homem, ao produzir poliplóides, pode avançar milhões de anos, sem que seja necessário esperar por um acidente da natureza para quebrar as barreiras de algumas fases do melhoramento” (Hancock, 1997).

Com os avanços na cultura de tecidos vegetais, a primeira poliploidização *in vitro* foi reportada por Murashige e Nakano (1966). Estes autores observaram a duplicação espontânea de cromossomas em culturas celulares de *Nicotiana*, conseguindo obter a partir dessas culturas, plantas tetraplóides. Sabe-se hoje, que a ocorrência de mixoploidia, poliploidia e aneuploidia, em massas embriogénicas estabelecidas *in vitro* e em plantas regeneradas é um fenómeno relativamente comum, e muitas vezes utilizado para criar variabilidade genética (Jelenic *et al.*, 2001; Ren *et al.*, 2012; Currais *et al.*, 2013).

O tratamento químico pela colchicina continua a ser o método preferido. Contudo nos anos 90, a classe das dinitroanilinas foi aclamada como uma alternativa à colchicina na indução de poliploidia (Ramulu *et al.*, 1991; Van Tuyl *et al.*, 1992). Foi também nesta década que a duplicação cromossómica *in vitro* se estabeleceu como uma ferramenta auxiliar na cultura de tecidos vegetais (Dhooghe *et al.*, 2011).

1.2.2 Métodos e técnicas de indução de poliploidia *in vitro*

a) Agentes antimitóticos usados na duplicação cromossómica

Uma das maneiras de se produzirem plantas com o dobro dos cromossomas é através de interferências com o seu ciclo mitótico. O ciclo celular pode ser interrompido por uma grande variedade de compostos químicos. Mas só aqueles que o afectam entre o fim da fase S e antes do início da citocinese permitem a indução da duplicação cromossómica (Dhooghe *et al.*, 2011).

Por outro lado, os agentes antimitóticos mais eficazes são os que actuam ao nível da metáfase, como por exemplo a colchicina, a classe das dinitroanilinas (onde se inclui a orizalina, trifluralina, ou dinitramina), o acenafteno, a vinblastina, entre outros. Estes

agentes ligam-se aos dímeros de α - e β -tubulina, bloqueando assim a polimerização dos microtúbulos e impedindo a migração dos cromossomas para os polos durante a anáfase (Petersen *et al.*, 2003; Caperta *et al.*, 2006). Em contraste com os inibidores da metáfase, existem ainda aqueles que bloqueiam o complexo promotor da anáfase. Entre eles podem encontrar-se o lactacistina, o MG132 e a epoxomicina. Contudo são pouco utilizados na indução de poliploidia, uma vez que não são totalmente eficazes e são geralmente dispendiosos (Dhooghe *et al.*, 2011).

O agente antimitótico mais comum é a colchicina. Este alcalóide está também muitas vezes associado ao combate de certas doenças inflamatórias em humanos (Eigsti e Dustin, 1955), como seja a conhecida gota. O seu uso na indução de poliploidia deve-se principalmente às elevadas taxas de sucesso que se têm obtido com a sua utilização, e também por não perder a sua actividade após autoclavagem (Zhang, *et al.*, 2007). Não obstante, este agente apresenta uma toxicidade muito elevada. Em algumas espécies, pode provocar um crescimento anormal, perdas de cromossomas, rearranjos, mutações ou infertilidade (Luckett, 1989; Dhooghe *et al.*, 2011). A ligação da colchicina à tubulina das plantas é baixa, o que leva muitas vezes a que seja utilizada em concentrações elevadas (na ordem dos milimolares; Caperta *et al.*, 2006). Devido a estes factos, têm sido testados outros compostos como herbicidas, especialmente os derivados das de dinitroanilinas. Estima-se que 25% de todos os herbicidas comercializados têm como principal mecanismo de acção interferir com a mitose (Dhooghe *et al.*, 2011). Para além de menos tóxicos, possuem também uma afinidade maior pelos dímeros da tubulina das plantas, o que permite uma actuação mais eficaz a concentrações mais baixas (na ordem dos micromolares; Petersen *et al.*, 2003).

b) Concentração, tempo de exposição e solventes

A concentração do agente antimitótico e o seu tempo de exposição são dois parâmetros essenciais na indução da poliploidia, e estão directamente interligados. Geralmente, tempos de exposição e concentrações baixas são insuficientes ou provocam mixoploidia (diferentes níveis de ploidia em diferentes células ou órgãos do mesmo organismo), enquanto concentrações e tempos maiores costumam ser letais. Cada espécie necessita de ser testada para se encontrar o tratamento ideal.

Por outro lado o tipo de solvente usado para dissolver o agente antimutagênico também é importante, visto participar directamente na eficácia ou toxicidade do tratamento. Existem vários estudos que utilizam diferentes tipos de solventes como por exemplo hidróxido de sódio, etanol a 70% ou a 96% ou acetona a 100%. Os agentes antimutagênicos podem ainda ser dissolvidos em água ou directamente no meio de cultura líquido. Contudo o solvente mais usado é o dimetilsulfóxido (DMSO). Este composto aumenta a permeabilidade das células e permite o aumento da absorção dos agentes antimutagênicos (Stanys *et al.*, 2006; Dhooghe *et al.*, 2011). No entanto, concentrações altas podem também ser tóxicas. Quando o agente antimutagênico é aplicado directamente nos tecidos das plantas, são muitas vezes adicionados agentes surfactantes para aumentar a superfície de contacto (Dhooghe *et al.*, 2011).

c) Tipos de explantes

Mais uma vez a eficiência de poliploidização depende do explante utilizado (Petersen *et al.*, 2003). Podem ser usados diferentes tipos de explantes, como ápices, embriões zigóticos ou somáticos, sementes, plântulas, segmentos nodais ou rebentos caulinares. Para se encontrar o tipo de explante adequado à indução de poliploidia, é necessário testar vários tipos de explantes por espécie. Contudo, dentro de um tipo de explante podem existir diferentes taxas de sucesso dependendo da permeabilidade do tecido e da capacidade de transporte do agente antimutagênico para os meristemas (Allum *et al.*, 2007). Além disso, a eficiência do tratamento está também dependente do genótipo e da idade do explante (Chauvin *et al.*, 2005; De Mello e Silva *et al.*, 2000; Stanys *et al.*, 2006).

d) Modos de aplicação

Tanto *in vivo* como *in vitro* os meristemas, rebentos caulinares, sementes ou plântulas podem ser mergulhados ou aspergidos com uma solução que contenha o agente antimutagênico. No entanto, a indução de poliploidia *in vivo*, é muitas vezes caracterizada pelo aparecimento de mixoploidia. A aplicação em sistemas *in vitro*, permite obter um maior controlo e eficiência nos tratamentos, e pode ser dividida em dois momentos – indução de poliploidia e transferência para meio de cultura normal.

Inicialmente, os explantes são expostos ao agente antimitótico que é adicionado ao meio de cultura (líquido com agitação, ou sólido) estabelecido nos protocolos de cada espécie e incubados durante um determinado período de tempo. Os explantes podem ainda ser submetidos a período de pré-incubação, caracterizado pela ausência do agente antimitótico, para sincronizar as divisões mitóticas e assim melhorar o efeito posterior da adição do agente (Chauvin *et al.*, 2005). No final do período de indução, os explantes são lavados para remover contaminações superficiais e transferidos para os meios de cultura normal, sem a presença do agente antimitótico.

e) Confirmação de poliploidia

Uma vez que a indução de duplicação cromossômica não é totalmente eficaz, e a ocorrência de mixoploidia é frequente, é necessário confirmar o nível de ploidia das plantas expostas ao agente antimitótico. Existem vários métodos que podem ser usados para determinar o nível de ploidia, como a observação dos caracteres morfológicos e anatômicos, a contagem dos cromossomas, ou ainda por determinação do tamanho de genoma por citometria de fluxo. Contudo, a combinação de diferentes métodos é muitas vezes empregue (Rubuluza *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008; Majdi *et al.*, 2010).

A contagem dos cromossomas é um método eficiente, pois determina o número efectivo de cromossomas existente na planta (Doležel *et al.*, 2007). Contudo é uma técnica muito trabalhosa que necessita da presença de células em divisão (geralmente células metafásicas do ápice de raízes jovens), de tratamentos enzimáticos muitas vezes específicos para cada planta e de protocolos de coloração. Está ainda dependente do número e tamanho dos cromossomas característico de cada espécie. Quando os cromossomas estão presentes em grande número ou são de um tamanho reduzido, existem frequentemente dificuldades na sua contagem (Dhooghe *et al.*, 2011).

Em contraste com a contagem dos cromossomas, as observações morfológicas e anatômicas são simples de realizar, porém apresentam um grau elevado de imprecisão. Os caracteres morfológicos visíveis a olho nu podem servir como critério primário de selecção de poliplóides, mas a sua confirmação por outros métodos é sempre necessária, pois a ocorrência de mixoploidia é impossível de detectar. O tamanho e a densidade dos estomas e o número de cloroplastos por estoma são dos parâmetros anatômicos mais utilizados para detectar poliploidia. Em geral, plantas diplóides apresentam estomas de tamanho mais reduzido do que as poliplóides correspondentes; enquanto, o número de

cloroplastos por estoma presente costuma ser maior nos poliplóides. Contudo, as condições ambientais e a idade da planta podem condicionar os resultados (Roy *et al.*, 2001). O tamanho do pólen também varia com o nível de ploidia, todavia é raramente utilizado como critério de confirmação na poliploidização *in vitro* (Dhooghe *et al.*, 2011).

Actualmente, a citometria de fluxo é a técnica mais comum para avaliar o nível de ploidia das plantas (Doležel *et al.*, 2007). Resumidamente, através de um citómetro de fluxo é possível analisar o conteúdo de ADN presente em núcleos vegetais (previamente isolados e corados), quantificando o número de células que se encontram nas diversas fases do ciclo celular (G_1 , S e G_2). A amostra a analisar é geralmente preparada em conjunto com uma planta padrão, de nível de ploidia e conteúdo nuclear conhecido (Loureiro, 2007; Doležel *et al.*, 2007).

Em comparação com os métodos atrás referidos, a análise por citometria de fluxo possui várias vantagens. A preparação das amostras e a sua análise é simples e rápida, o que permite analisar uma grande quantidade de amostras num curto período de tempo. Podem ser usados vários tipos de material vegetal, (raízes, folhas, sementes, frutos, pétalas, entre outros) e em quantidades muito pequenas, não sendo necessário que as células se encontrem em divisão (Loureiro, 2007). Além disso, como não necessita de raízes ou plantas aclimatizadas, possibilita uma detecção precoce de poliploidia, permitindo assim a poupança de tempo e espaço (Väinölä, 2000; Loureiro, 2007; Doležel *et al.*, 2007).

A citometria de fluxo permite ainda detectar mixoploidia devido ao facto de conseguir analisar uma enorme quantidade de células individuais, em diferentes camadas e em diferentes tipos de tecidos (Loureiro, 2007; Doležel *et al.*, 2007).

f) Pressupostos para a escolha da espécie

Ao longo das últimas décadas a indução de poliploidia foi aplicada em muitas espécies. Isto permitiu reunir informação sobre as características mais adequadas das espécies a utilizar. Em Acquaah (2007) e Dewey (1980) estão compiladas essas características. Resumidamente, as variedades poliplóides possuem um número óptimo de cromossomas que lhes permite obter o melhor desempenho. Uma vez que duplicação cromossómica implica um aumento drástico e instantâneo do genoma da planta, a

selecção de parentes com um baixo número de cromossomas ajudará a reduzir o risco de complicações meióticas e permitirá ainda aumentar as hipóteses de obter poliplóides férteis.

A produção de poliplóides através de espécies alogâmicas (polinização cruzada) promove a recombinação genética, permitindo aumentar as hipóteses de obter um genótipo equilibrado. Devido às elevadas taxas de infertilidade que caracterizam os poliplóides, a indução de poliploidia deve ser aplicada no melhoramento de espécies com capacidade de se reproduzir de forma vegetativa, que sejam perenes no seu habitat, e cujo produto económico não é a semente (ex. flores, vegetais, frutos).

1.2.3 Principais aplicações da indução poliploidia no melhoramento vegetal

a) Restauo da fertilidade em híbridos e contorno das barreiras da hibridização

Muitos dos híbridos interespecíficos ou intergenéricos são estéreis. Isto deve-se principalmente à ocorrência de falhas no emparelhamento dos cromossomas durante a meiose, decorrentes de incompatibilidades genéticas, como o número de cromossomas dos seus progenitores (Ranney, 2006). Através da duplicação cromossómica é possível restaurar a fertilidade de híbridos, pois cada cromossoma ganha um cromossoma homólogo permitindo um emparelhamento correcto durante a meiose. Esta metodologia tem sido aplicada com êxito no restauo de fertilidade de vários híbridos economicamente importantes, como é o caso de *Rhododendron* 'Fragrans Affinity' × *Chitalpa tashkentensis* (Contreras *et al.*, 2006; Olsen *et al.*, 2006). Por outro lado a aplicação desta metodologia nem sempre é obtida com sucesso, como acontece em híbridos interespecíficos de *Alstroemeria* (Lu & Bridgen, 1997).

Muitos cruzamentos são difíceis de obter devido principalmente a diferenças no nível de ploidia entre os respectivos parentes. Um dos métodos para contornar esta situação é através da duplicação cromossómica de um dos parentes. Por exemplo, a duplicação cromossómica de *Buddleja globosa* ($2n = 2x = 38$) permite a hibridização interespecífica com *Buddleja davidii* ($2n = 4x = 76$) (Van Laere *et al.*, 2011).

b) Desenvolvimento de cultivares sem sementes

As variedades sem sementes, e em especial das espécies frutícolas, possuem uma aceitação comercial maior, principalmente por um motivo que é óbvio: maior facilidade na ingestão dos seus frutos. Existem vários métodos para a obtenção de plantas sem sementes, como por exemplo a regeneração de plantas através do endosperma. Contudo, o método convencional, através de cruzamentos entre níveis diferentes de ploidia, é o mais rápido e mais económico (Ranney, 2006). As plantas triplóides ($3n$) são caracterizadas pela não produção de sementes (esteréis), e podem ser obtidas artificialmente através de duas etapas básicas. A primeira é a obtenção de plantas tetraplóides, através da indução de poliploidia e sua identificação. A segunda é a hibridização das plantas obtidas (tetraplóides) com plantas diplóides para obtenção de sementes triplóides (Acquaah, 2007). Porém uma das características dessas sementes é a sua baixa taxa de germinação (Yang & Sung, 1994). Como exemplo de espécies frutíferas sem sementes, obtidas por este método pode-se destacar a melancia, (Kihara, 1951), a uva (Ji *et al.*, 2013) ou vários citrinos (Raza *et al.*, 2003; Aleza *et al.*, 2012). Por outro lado, a obtenção de indivíduos triplóides de espécies invasoras, pode ser útil no controlo das suas populações (Ranney, 2006).

c) Mudanças na anatomia e morfologia

A poliploidia está directamente ligada a mudanças na anatomia e morfologia das plantas. O aumento no conteúdo nuclear de um organismo tende a aumentar o volume das suas células (Comai, 2005), porém, os autopoliplóides mantêm o mesmo número de células dos diplóides correspondentes (Song *et al.*, 2012). As plantas autopoliplóides desenvolvem órgãos maiores, como por exemplo flores, frutos, raízes ou sementes. As folhas são geralmente mais largas, com uma espessura superior, e caracterizadas por um aumento na sua massa por unidade de área. (Acquaah, 2007; Song *et al.*, 2012). Possuem também um aumento no tamanho dos estomas e no número de cloroplastos por células guarda (Dhawan & Lavania, 1996; Acquaah, 2007). Este fenómeno é designado de “efeito giga” e tem uma extrema importância em algumas plantas cultivadas. É economicamente importante em espécies ornamentais, principalmente pela possibilidade de se obterem novas formas, tamanhos e cores de flores (Väinölä, 2000; Sakhanokho *et al.*, 2009; Acquaah, 2007), mas também porque a taxa de crescimento

mais lenta (atribuída a baixos níveis de auxinas) permite ao poliplóides florir mais tarde e por um período mais longo, quando comparados com os diplóides correspondentes (Levin, 1983). O “efeito giga” é também explorado em variedades de espécies frutícolas, devido à possibilidade de alguns indivíduos apresentarem um aumento no tamanho dos frutos e na proporção da polpa, acompanhado por uma diminuição no número de sementes (Stanys *et al.*, 2006). Muitas variedades frutícolas são também caracterizadas por um atraso no tempo de maturação (Kadota & Niimi, 2002).

Contudo, os poliplóides estão também associados a desequilíbrios anatómicos como o enrolamento anormal das folhas, o aparecimento de ramos frágeis e quebradiços ou ainda a existência de frutos aquosos (Ranney, 2006). Também, organismos com altos níveis de ploidia possuem um crescimento mais lento e muitas vezes anormal (Ranney, 2006).

d) Produção de metabólitos secundários

O aumento nos níveis de ploidia afecta muitas propriedades fisiológicas das plantas, como por exemplo, a actividade enzimática, a diversidade de enzimas ou alterações nos níveis de flavonóides, terpenos ou alcalóides entre outros compostos, em vários órgãos da planta (sementes, raízes, frutos, entre outros). Esta situação leva muitas vezes a mudanças qualitativas e quantitativas e a variações na biossíntese de metabólitos secundários (Dhawan & Lavania, 1996). Em certos casos, o metabolismo primário sofre também alterações (Levin, 1983).

Este efeito faz com que a poliploidia possa ter influência na adaptabilidade e na resistência ao stresse biótico e abiótico das plantas (Levin, 1983; Dhawan & Lavania, 1996). Em particular, o aumento de produção de metabólitos secundários como alcalóides ou terpenos pode servir de defesa química contra pestes e patogénos. Em alguns casos, alguns poliplóides podem ainda demonstrar uma maior eficiência na absorção de nutrientes e também uma maior resistência à seca e tolerância ao frio (Ranney, 2006; Levin, 1983; Dhawan & Lavania, 1996).

A obtenção de variedades poliplóides é muitas vezes aplicada em plantas medicinais, sendo extremamente útil na indústria. Por exemplo, a produção de hormonas sexuais e de corticóides aumentou significativamente depois da indução de tetraplóides em *Dioscorea zingiberensis* (Heping *et al.*, 2008). Por outro lado, através da duplicação cromossómica foi possível aumentar a produção de piretrina, um

composto natural com acção inseticida em plantas de *Chrysanthemum cinerariifolium* (Liu & Gao, 2007). Ou ainda, através da indução de tetraploidia em *Artemisia annua*, é possível aumentar cerca de seis vezes a produção de artemisinina, um fármaco utilizado contra a malária (De Jesus-Gonzalez & Weathers, 2003).

e) Fontes de mutações

Como referido anteriormente, uma das vantagens evolutivas dos poliplóides naturais é apresentarem uma ampla redundância genética. Esta é também uma característica que pode ser explorada no melhoramento vegetal através da indução de mutagénesis em poliplóides artificiais. A duplicação do seu genoma tolera modificações em alelos deletérios e aumenta a frequência de mutações (Gaul, 1958). Este método foi usado em programas de melhoramento de vários cultivares da orquídea *Achimenes sp.*, onde a indução de autotetraploidia seguida da aplicação de tratamentos por raios X permitiu aumentar 20 a 40 vezes a frequência de mutações, em comparação com os cultivares diplóides correspondentes (Broertjes, 1976).

f) Uma ferramenta para a indução de apomixia?

Muitas das plantas apomíticas encontradas na natureza são poliplóides; contudo, a maior parte das plantas poliplóides não são apomíticas (Otto & Whitton, 2000). Alguns autores sugerem que a estreita relação entre a poliploidia e a apomixia pode ser devido a diferentes efeitos genéticos, como o efeito da dosagem do gene. Assim, quanto mais alto for o nível de ploidia da planta, mais cópias do(s) gene(s) responsável(is) pela apomixia existirão e maior será a probabilidade da mesma ser apomítica (Thompson & Lumaret, 1992). Levin (1983) propôs que a obtenção de plantas apomíticas obrigatórias (ou seja, que só se reproduzem desta forma) pode ser conseguida através de indução de altos níveis de ploidia. Existem vários exemplos na literatura da produção de plantas apomíticas através da duplicação prévia dos cromossomas (Nygren, 1948; Quarin *et al.*, 2001). Porém o papel da poliploidia na apomixia ainda não está totalmente claro. Hoje sabe-se que a poliploidia é um factor importante, mas não essencial, uma vez que apesar da poliploidia já ter sido induzida num grande número de plantas, muito poucas dessas plantas apresentaram capacidade apomítica (Bicknell & Koltunow, 2004).

1.3 Tamarilho (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.)

1.3.1 Descrição botânica e distribuição geográfica

Cyphomandra betacea (Cav.) Sendt. também denominado de *Solanum betaceum* (Cav.) (Bohs, 2007), é um arbusto subtropical, semi-lenhoso e de crescimento rápido, pertencente à família das solanáceas. O seu nome comum varia bastante consoante os países, sendo conhecido por “tomate de palo” (Honduras), “tomate de árvore” (Brasil), “lima tomate” (Bolívia), entre outros (Morton, 1987). A sua designação de tamarilho nasceu na Nova Zelândia em 1967 (Bohs, 1989) devido ao aumento da sua procura e necessidade de o diferenciar do tomate comum (*Solanum lycopersicum*).

A sua altura média varia entre 3 e 5,5 m de comprimento (Morton, 1987), e o seu diâmetro na base entre 5 e 10 cm (Fig. 2A) (Bohs, 1989). As folhas são alternadas, em forma de coração na base, ovadas e pontiagudas no ápice (Fig. 2B). Atingem entre 10-35 cm de comprimento, e entre 4-12 cm de largura. São finas, pubescentes nas duas faces, e têm um cheiro almiscarado persistente. (Morton, 1987). As flores encontram-se próximas das extremidades dos ramos, suportadas em pequenos cachos soltos. Estas têm entre 1,25 e 2 cm de largura, e apresentam 5 lóbulos pontiagudos cor-de-rosa claros (Fig. 2C). Possuem também 5 estames amarelos, e um cálice verde arroxeado (Morton, 1987). A floração começa no final da primavera e acaba no início do outono (Meadows, 2002). Os frutos maduros são elípticos e carnudos, atingindo 4-10 cm de comprimento e 3-5 cm de largura (Bohs, 1989) e pendendo a partir de hastes compridas e seguros por um cálice cónico (Fig. 2D). Podem encontrar-se sós ou em grupos de 3 a 12 (Morton 1987). O epicarpo é liso (Bohs, 1989) e rijo e a sua cor varia entre o roxo escuro, vermelho, cor-de-laranja, amarelo, ou cor-de-laranja e amarelo, consoante o cultivar (Fig. 2E). Podem também ter estrias longitudinais tenuemente mais escuras. A cor da endocarpo varia entre cor-de-laranja e vermelho até amarelo ou amarelo-creme de acordo com os cultivares (Morton, 1987). O fruto possui muitas sementes (Bohs, 1989) e a polpa que as envolve nos dois compartimentos longitudinais é suave e succulenta (Morton, 1987). Esta polpa pode ter uma cor preta nos frutos roxo-escuro e vermelhos, ou amarela, nos frutos amarelos ou cor-de-laranja (Bohs, 1989). A frutificação inicia-se 2 anos após o cultivo, atingindo o máximo de produção em 5 anos. A partir deste momento, a produção de frutos diminui bruscamente, sendo o tempo de vida médio de uma plantação comercial de cerca de 8 anos (Meadows, 2002; Mertz *et al.*, 2010).

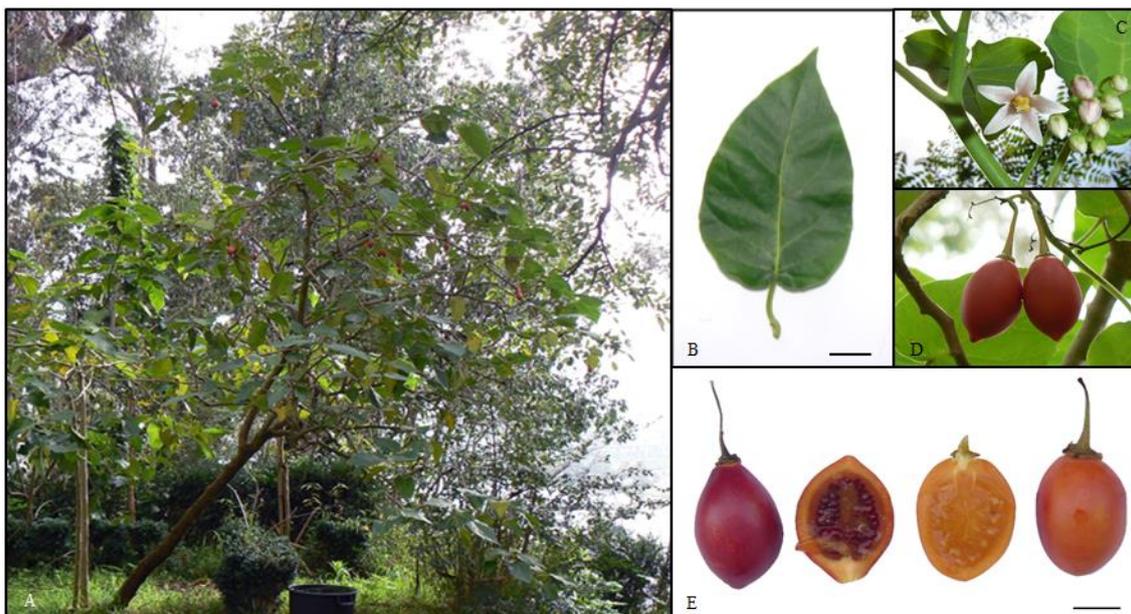


Figura 2 - Tamarilho (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.): A - árvore adulta localizada no Jardim Botânico da Universidade de Coimbra; B - folha jovem; C - Flores em vários estágios de desenvolvimento; D - Frutos ; E - Corte transversal dos frutos de duas variedades diferentes; Barras = 2 cm.

Em geral, o tamarilho cresce entre os 300 e os 3000 m de altitude (Morton, 1987), e mais perto do nível do mar quando o clima é mais frio. Dá-se melhor com temperaturas acima dos 10°C, mas é sensível a temperaturas constantemente elevadas. Consegue sobreviver à geada, se esta não for demasiado prolongada e frequente. Não resiste à seca, nem sobrevive em solos inundados ou com água estagnada (National Research Council, 1989). Como as suas raízes são curtas e superficiais, também não é muito resistente ao vento, pelo que tem de se encontrar em locais minimamente abrigados (Morton, 1987). Cresce melhor em solos bem drenados, leves e férteis (National Research Council, 1989).

1.3.2 Distribuição e importância económica e etnobotânica

Até há relativamente pouco tempo, não se sabia com exactidão a origem do tamarilho, mas acreditava-se provir dos Andes. Através de diferentes abordagens incluindo estudos morfológicos, biossistemáticos, moleculares e trabalho de campo, foram encontrados parentes selvagens próximos, no sul da Bolívia e noroeste Argentino (Bohs, 2007). Sendo originário da Bolívia e Argentina, o tamarilho é vulgarmente cultivado em planaltos em grande parte da América Latina (Peru, Andes, Chile,

Equador, Bolívia, Argentina, Brasil, Colômbia, Venezuela, Costa Rica, Guatemala, Jamaica, Porto Rico e Haiti). Encontra-se também na África de Leste e Sudeste Asiático, e até 1903 foi muito popular no Sri Lanka e nas Índias Orientais Holandesas. Foi também cultivado em jardins em Queensland e nos planaltos da parte Australiana da Nova Guiné (Morton, 1987). Acredita-se que tenha sido introduzido nos Açores e na Madeira ainda durante o século XIX (Guimarães *et al.*, 1996; Canhoto *et al.*, 2005). Em 1891 foi introduzido na Nova Zelândia, e o seu cultivo para comércio em pequena escala começou por volta de 1920 (Morton, 1987). Actualmente este país é o principal produtor e exportador dos seus frutos.

O sabor do tamarilho é semelhante ao do tomate comum, mas os seus frutos são mais doces e ácidos e os frutos menos suculentos. Devido à sua aparência com o tomate, os frutos podem ser comidos de forma semelhante: crus, cortados em saladas, cozinhados ou guisados com carne (Bohs, 1989). Podem também ser usados em sobremesas, em sumos, compotas ou iogurtes. No entanto, apesar de comestíveis, a epiderme e as sementes tendem a ser removidas devido ao seu sabor desagradável (National Academy Press, 1989).

Em termos nutricionais o tamarilho é uma excelente fonte de provitamina A (caroteno – 150 mg por 100g), vitamina B₆, vitamina C (25 mg por 100 g), vitamina E, ferro, cálcio e fósforo. Contém também níveis elevados de proteínas (1,5-2 g por 100 g), pectina e fibras, que podem prevenir obstipações, reduzir os níveis de colesterol no sangue e controlar a glicémia em diabéticos. Possui também taxas baixas de calorias, uma vez que possui poucos hidratos de carbono (Centre for Underutilised Crops, 2009; McCane & Widdowson, 1992). Todas as variedades de tamarilho têm uma composição semelhante em fenóis, no entanto, as variedades amarelas não possuem antocianinas (Centre for Underutilised Crops, 2009). Os frutos são também usados no tratamento de doenças respiratórias e anemia em algumas tribos na Índia (Hazarika *et al.*, 2012), e possuem polifenóis que provaram ser potentes antioxidantes ao inibir a oxidação de LDL *in vitro*, e a produção de agentes reativos de oxigénio em células PC12 (Kou *et al.*, 2009), podendo reduzir o risco de alguns cancros e problemas cardiovasculares.

1.3.3 Propagação e cultura *in vitro*

O tamarilho pode ser propagado através das formas convencionais: via seminal, por estacaria ou ainda por enxertia (Gatita & Almeida, 2003; Correia & Canhoto, 2012; Muñoz, 2013). Apesar da germinação das sementes ser de fácil obtenção, este método não permite obter plantas geneticamente uniformes, sendo inútil na propagação de génotipos seleccionados (Correia & Canhoto, 2012). A propagação via estacaria ou enxertia garante a manutenção do génotipo, contudo, estes métodos estão muitas vezes associados a problemas fitossanitários (Correia & Canhoto, 2012) e implicam a utilização de estacas com 1 a 2 anos, com um diâmetro mínimo de 1,5 cm e com 3-4 gemas (Muñoz, 2013). Se o objectivo for propagar um grande número de plantas, estes métodos tornam-se morosos e muitas vezes difíceis de aplicar. Por outro lado, a cultura *in vitro* permite contornar este facto, uma vez que é possível obter um grande número de plantas num curto espaço de tempo.

A micropropagação no tamarilho pode ser efectuada através da proliferação dos meristemas axilares (Barghchi, 1986; Cohen & Elliot, 1979; Obando *et al.*, 1992), por organogénese ou ainda através da indução de embriogénese somática. A utilização da organogénese foi aplicada em vários tipos de explantes do tamarilho, como segmentos foliares (Obando *et al.*, 1992), cotilédones e hipocótilos de plântulas (Guimarães, 1996; Gatita & Almeida, 2003), raízes, embriões zigóticos ou ainda protoplastos (Guimarães, 1996).

Quanto à indução de embriogénese somática esta também foi conseguida em vários tipos de explantes, como embriões zigóticos, cotilédones, hipocótilos, raízes ou segmentos de folhas jovens (Guimarães, 1996; Canhoto, 2005; Correia *et al.*, 2012). Porém, e até esta altura, ainda não foi possível induzir embriogénese somática a partir de explantes provenientes de árvores adultas. Para contornar este facto, Correia *et al.*, (2012), desenvolveu um protocolo, que consiste em duas fases. Na primeira ocorre o estabelecimento *in vitro* de plantas através da proliferação de meristemas axilares provenientes de material adulto. A segunda fase consiste na indução de embriogénese em segmentos foliares dessas plantas estabelecidas *in vitro*. Desta forma é possível regenerar plantas a partir de embriões somáticos de um génotipo de uma árvore adulta de tamarilho.

1.3.4 Poliploidização no tamarilho

O tamarilho é uma espécie diplóide que possui 24 cromossomas (Vignoli, 1945). Contudo, na natureza é possível encontrar indivíduos triplóides, tetraplóides ou ainda aneuplóides (Standring *et al.*, 1990; Pringle & Murray, 1992a). Os poliplóides de tamarilho são reconhecidos pela redução nas dimensões dos frutos e pela diminuição no número e tamanho das suas sementes. Geralmente, o efeito “giga” também se manifesta, com o aparecimento de folhas mais espessas e flores maiores (Pringle & Murray, 1992a). O volume do pólen, o tamanho dos estomas e ainda o número de cloroplastos por célula guarda também aumenta nos níveis de ploidia superiores de tamarilho (Standring *et al.*, 1990; Pringle & Murray, 1992a). Porém, a viabilidade do seu pólen decresce, quando comparados a indivíduos diplóides (Pringle & Murray, 1992a). A primeira indução de poliploidia nesta espécie foi relatada em 1992 (Pringle & Murray, 1992b). Estes autores conseguiram produzir plantas de tamarilho com o dobro dos cromossomas através da aplicação de colchicina, durante a germinação das sementes. Contudo as taxas de sucesso foram relativamente baixas, obtendo um número bastante elevado de plantas mixoplóides. Os mesmos autores utilizaram as plantas tetraplóides obtidas, em cruzamentos com indivíduos de níveis de ploidia diferentes. Deste modo conseguiram obter plantas triplóides, e também aneuplóides, principalmente com 25 e 26 cromossomas (Pringle & Murray, 1992b).

Em 2010, um estudo efectuado no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Departamento de Ciências da Vida da FCTUC, demonstrou a produção de plantas tetraplóides de tamarilho, através da exposição de segmentos nodais (com pelo menos um meristema axilar), a diferentes concentrações de colchicina e orizalina, em meio de cultura líquido e sólido. Contudo, os melhores resultados (taxa de indução de 33,3%) foram obtidos expondo os explantes a 2500 μM de colchicina, em meio líquido e durante 2 dias e 4 dias (Antunes, 2010).

Mais recentemente, noutra estudo efectuado no mesmo laboratório, Currais *et al.*, (2013), revelou que a manutenção *in vitro* de culturas embriogénicas de tamarilho por vários períodos de tempo (1, 2, 7, 10 anos) pode também causar alterações cromossómicas. Esta autora detectou a presença de aneuploidia, triploidia, tetraploidia, e ainda mixoploidia, em massas embriogénicas e em algumas das plantas regeneradas.

Esta metodologia pode também servir como uma ferramenta alternativa para a obtenção de poliplóides a serem usados em programas de melhoramento.

1.4 Objectivos

Nas últimas décadas o Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Departamento de Ciências da Vida da FCTUC tem utilizado o tamarilho (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt) como um organismo modelo para explicar vários fenómenos de morfogénese *in vitro*, como a organogénese e a embriogénese somática, e cujos protocolos e respectivas conclusões podem ser transpostos para outras espécies idênticas.

Por outro lado, e uma vez que o tamarilho é uma espécie NUC (“Neglected and Underutilized Crop”; www.underutilized-species.org), isto é, uma espécie com grande potencial agrícola (devido principalmente ao valor económico dos seus frutos), mas que por diversas razões ainda não foi devidamente explorada, o mesmo laboratório tem vindo a desenvolver e a otimizar novos protocolos, que poderão vir a ser utilizados como ferramentas no melhoramento do tamarilho e na sua propagação *in vitro*. Uma dessas ferramentas é a indução de poliploidia.

Considerando todos estes factos, este trabalho tem como principais objectivos: 1) avaliar a capacidade de indução de poliploidia *in vitro*, através do agente antimitótico colchicina, em vários tipos de explantes de tamarilho (ápices de plântulas, segmentos nodais e embriões zigóticos); 2) investigar as diferenças morfológicas e estomáticas existentes entre as plantas diplóides e tetraplóides; e, por último, 3) verificar a estabilidade do nível de ploidia de calos, originados a partir de segmentos foliares previamente expostos à colchicina.

2.MATERIAIS & MÉTODOS

2.1 Origem do material vegetal

Neste trabalho foram utilizadas sementes de tamarilho (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.) de dois genótipos distintos: TV – tamarilho vermelho e TL – tamarilho laranja. As sementes foram obtidas a partir de frutos colhidos durante os meses de Novembro e Dezembro de 2012 em duas árvores localizadas no Jardim Botânico da Universidade de Coimbra (JBUC).

2.2 Estabelecimento e propagação do material vegetal

2.2.1 Germinação *in vitro* de sementes e micropropagação

As sementes depois de extraídas dos frutos foram lavadas em água corrente e colocadas em agitação, num balão de 100 ml com água destilada e 2-3 gotas de Tween 20, durante 10 minutos. De seguida procedeu-se à sua esterilização tendo, as sementes sido lavadas em etanol a 70% (v/v) durante 30 segundos, transferidas para uma solução de hipoclorito de cálcio (Sigma) a 7 % (w/v) durante 15 minutos e, por fim, lavadas três vezes em água destilada e esterilizada. As sementes foram depois deixadas em embebição durante 24h à temperatura ambiente. No dia seguinte, as sementes voltaram a ser esterilizadas num solução de hipoclorito de sódio 5% (w/v) e mais uma vez lavadas 3 vezes, na câmara de fluxo laminar, utilizando água destilada e esterilizada.

De seguida, as sementes de cada um dos genótipos (TV e TA) foram colocadas em tubos de ensaio (15 x 2,2cm, duas sementes por tubo), contendo cerca de 15 ml de meio MS (Murashige & Skoog, 1962) e 3 % (w/v) de sacarose, com pH ajustado a 5.7 e solidificado com 0,6% w/v de agar (Panreac, Spain). O meio foi previamente autoclavado a 121°C durante 20 minutos, antes de receber as sementes. As culturas foram mantidas num fitoclima, a uma temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e sob um fotoperíodo de 16h luz (usando lâmpadas fluorescentes com intensidade de $15\text{-}20 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) durante 5 semanas. No final deste período, os ápices das plântulas foram isolados (1 cm) e, no caso do genótipo TL, utilizados para ensaios de indução de poliploidia; no caso dos ápices do genótipo TV, estes foram subcultivados no mesmo meio (MS) durante 5 semanas. No final deste período, as plantas resultantes foram divididas pelos seus segmentos nodais (1 cm), com pelo menos um meristema axilar, e utilizados nos ensaios

de poliploidização.

2.2.2 Isolamento e cultura de embriões zigóticos

O isolamento de embriões foi efectuado em sementes do genótipo TV. As sementes, depois de esterilizadas, foram mantidas durante 48h em água destilada e esterilizada para amolecer os tecidos. A excisão dos embriões foi feita na câmara de fluxo laminar utilizando uma lupa binocular. As sementes foram colocadas em caixas de Petri esterilizadas e com o auxílio de uma pinça e de um bisturi removeu-se cuidadosamente o tegumento, de modo a evitar lesões nos embriões. De seguida os embriões foram isolados da semente e utilizados nos ensaios de indução de poliploidia.

2.3 Ensaios de indução de poliploidia

2.3.1 Tratamento com colchicina em ápices caulinares, segmentos nodais e embriões zigóticos

Nos ensaios de indução de poliploidia usaram-se diferentes explantes: ápices caulinares de plântulas (genótipo TL), segmentos nodais (genótipo TV) e embriões zigóticos do genótipo TV. Como agente antimitótico utilizou-se uma solução stock de colchicina (Sigma), previamente dissolvida em DMSO 1% (v/v) (Panreac). A colchicina foi adicionada em diferentes concentrações aos meios de cultura específicos de cada explante.

As concentrações e a duração dos tratamentos dos diferentes explantes encontram-se pormenorizados na tabela 1. Em todos os ensaios foi usado um meio sem colchicina como controlo. Para os ensaios com os ápices e segmentos nodais, foi utilizado uma estratégia em bloco, com iguais tempos de exposição, duração e meio de exposição. No caso dos embriões zigóticos, os ensaios de indução de poliploidia ocorreram apenas em meio líquido.

Nos ensaios em sólido os explantes foram transferidos para tubos de ensaio e mantidos a uma temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1$. Nos ensaios em meio líquido, os explantes foram transferidos para Erlenmeyers de 50 ml com cerca de 20 ml de meio (específico do explante e suplementado com as diferentes concentrações de colchicina), e mantidas

na incubadora ($25^{\circ}\text{C} \pm 1$) e com agitação orbital (80 rpm) durante o tempo definido. Em todos os ensaios, os explantes foram mantidos ao escuro para minimizar a sua oxidação.

No final do tempo de indução, todos os explantes foram lavados 3 vezes em meio de cultura líquido sem a adição de sacarose (para remover a contaminação superficial) e transferidos para meio de cultura sólido. Os segmentos nodais foram estabelecidos em meio MS com $0,8 \mu\text{M}$ de benzilamino-purina (BAP) e os ápices e os embriões zigóticos estabelecidos apenas em meio MS. Estas culturas foram mantidas na estufa, a uma temperatura de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16h luz. Após 30 dias, a taxa de sobrevivência foi registada e os explantes transferidos para meio fresco. Nos meses seguintes procedeu-se à determinação do nível de ploidia das plantas obtidas.

2.3.2 Exposição de segmentos foliares ao agente antimitótico e indução de embriogénese somática

Nos ensaios de indução de poliploidia foram ainda utilizados segmentos foliares. Estes explantes foram previamente tratados com colchicina em meio líquido e transferidos para meio (sólido) de indução de embriogénese somática (ES). Para estes ensaios foi utilizada a metodologia descrita em Canhoto *et al.*, (2005), ligeiramente modificada. Resumidamente, folhas jovens resultantes da subcultura dos ápices caulinares (genótipo TV) com 5 semanas em meio MS, foram seccionadas em quatro partes e ligeiramente danificadas. De seguida foram transferidas para Erlenmeyers de 50 ml com cerca de 20 ml de meio (líquido) de indução de ES, composto por meio MS, 9% (w/v) de sacarose, $0,20 \mu\text{M}$ de Picloram e suplementado com as diferentes concentrações de colchicina (Tabela 1). O pH foi ajustado a 5,7. No final do período de exposição dos explantes à colchicina, estes foram lavados 3 vezes em meio de indução de ES, sem sacarose, e transferidos para meio de cultura sólido (meio de indução de ES, solidificado com 0,25% w/v de phytigeltm, Sigma). As culturas foram mantidas no escuro a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante, aproximadamente 5 meses. No final deste período, os calos formados foram analisados por citometria de fluxo.

Tabela 1- Concentração de colchicina e duração dos tratamentos dos diferentes explantes.

Tipo de explante (*)	Meio de indução	[Colc.] μM	Duração (dias)		
Ápices caulinares (10) Segmentos nodais (15)	Líquido (MS + 0,8 μM BAP)	1750	2 3		
		2000	2 3		
		2250	2 3		
		2500	2 4 5		
		3000	1 2 5		
		Sólido (MS + 0,8 μM BAP)	500 1000 1500	7	
		Embriões zigóticos (8)	Líquido (MS)	250	3 4
				500	3 4
				1000	3 4
				Segmentos foliares (10)	Líquido (MS + 9% sacarose + 0,20 μM Picloram)
2000					
2500					
3000					

*número de explantes utilizados em cada tratamento; [Colc.] – concentração de colchicina.

2.4 Análise por citometria de fluxo

A análise das plantas e dos calos sujeitos ao agente antimitótico foi efectuada nos 2 e 5 meses seguintes após os ensaios de indução de poliploidia. As suspensões nucleares foram preparadas de acordo com Galbraith *et al.*, (1983). Em resumo, aproximadamente 20 mg de folhas jovens ou cerca de 20 mg de tecido caloso e 20 mg de folhas jovens da planta padrão (*Pisium sativum* cv. Ctirad, $2C = 9.09$ pg de ADN; Doležel *et al.*, 1992), foram transferidos em conjunto, para uma caixa de Petri, com 1 ml do tampão de isolamento nuclear WPB (0,2 M Tris-HCl, 4 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2 mM EDTA

$\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 86 mM NaCl, 10 mM metabissulfito de sódio, 1 % (m/v) PVP-10, 1 % (v/v) Triton X-100, pH 7.5; Loureiro *et al.*, 2007). A extração dos núcleos foi efectuada através de um *chopping* do material vegetal, com o auxílio de uma lâmina de barbear. De seguida, as suspensões nucleares foram filtradas numa rede de nylon de 30 μm e os núcleos corados com 50 $\mu\text{g/ml}$ de iodeto de propídio (PI). Foi também adicionado 50 $\mu\text{g/ml}$ de RNase (Sigma) para prevenir a ligação do PI ao ARN. As amostras foram analisadas nos 5 minutos seguintes num citómetro de fluxo (CyFlow'Space, Partec). A fluorescência relativa de cerca de 1.600 núcleos por amostra (média) foi analisada usando o software Flomax (versão 2.4d Partec). O nível de ploidia de cada amostra foi calculado através do índice de ADN relativo (ID: razão entre a fluorescência média do pico G_0/G_1 da amostra e a fluorescência média do pico de *Pisum sativum*) e comparado com plantas do grupo controlo. A existência de mixoploidia, foi considerada quando pelo menos, 25% dos núcleos totais analisados (de plantas previamente confirmadas como diplóides), se encontravam na fase G_2 .

2.5 Propagação e enraizamento *in vitro*

As plantas tetraplóides e mixoplóides confirmadas por análise de citometria de fluxo e plantas do grupo controlo foram multiplicadas pela cultura dos seus segmentos nodais, com pelo menos um meristema axilar e estabelecidos em meio MS suplementado com 0,8 μM de BAP. Após 4 semanas, 10 plantas de cada um dos níveis de ploidia ($2x$, $4x$, $2x+4x$), foram transferidas para meio de enraizamento. Este era composto por meio MS, suplementado com 3% w/v sacarose e solidificado com 0,6% w/v de ágar e pH 5,7. As plantas foram mantidas no fitoclima com temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo 16h/luz (lâmpadas fluorescentes com intensidade de $15\text{-}20 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). O número e tamanho das raízes induzidas foram registados ao fim 30 dias e os dados sujeitos a tratamento estatístico.

2.6 Contagem dos cromossomas

O número de cromossomas foi determinado 15 dias após a transferência das plantas para meio de enraizamento. Foram analisadas 2 plantas diplóides, 4 plantas tetraplóides e 6 plantas mixoplóides. Os ápices vegetativos das raízes (1,5 cm) foram tratados com colchicina durante 2h, a 25°C , no escuro, seguindo-se a sua fixação em etanol/ácido

acético 3:1 (v/v) durante 4h, à temperatura ambiente e a aplicação da técnica de Feulgen (Darlington & La Cour, 1976). Deste modo, as raízes foram hidrolisadas em HCl 1N a 60°C durante 6 minutos, transferidas para água destilada à temperatura ambiente durante 5 minutos e coradas com o reagente de Schiff durante 2 a 3h, no escuro. Por fim, efectuou-se o esmagamento do material vegetal em 45% de ácido acético. Os cromossomas foram observados ao microscópio óptico (Nikon Eclipse E400) e as imagens registadas com uma câmara digital (Nikon Sight DS-U1) usando o software Nikon Act-2U (v1.6).

2.7 Caracterização morfológica e estomática

A caracterização morfológica e estomática foi efectuada em plantas com 5 semanas em meio de enraizamento. Foram analisadas 10 plantas de cada nível de ploidia ($2x$, $4x$ e $2x + 4x$). Os parâmetros morfológicos analisados foram os seguintes: altura das plantas, comprimento e largura da folha maior, diâmetro da base do caule, nº de raízes e comprimento da raiz maior e menor. A análise estomática foi efectuada em duas folhas jovens e totalmente formadas. A epiderme abaxial foi removida e colocada numa lâmina com uma gota de água destilada. De seguida, as preparações foram observadas ao microscópio óptico. Todas as medições foram efectuadas usando um micrómetro ocular. Para determinar o tamanho e o número de cloroplastos por células-guarda, foram seleccionados 20 estomas ao acaso, e as medições foram realizadas na objectiva de imersão (ampliação de 1000x). Por sua vez, a densidade estomática (nº de estomas/mm²) foi calculada em duas zonas distintas de cada folha analisada, utilizando uma ampliação de 100x.

2.8 Aclimação e transferência para o campo

Para aclimação foram seleccionadas ao acaso 2 plantas diplóides e 2 plantas tetraplóides com 5 semanas em meio de enraizamento. As plantas foram retiradas dos tubos de ensaio e as suas raízes lavadas cuidadosamente em água destilada, para remover totalmente os vestígios do meio de enraizamento e prevenir contaminações. Foram depois transferidas para copos de plástico (30 ml) contendo uma mistura de areia, argila e turfa, 1:1:1, e colocadas numa sala de crescimento com temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16h/luz (lâmpadas fluorescentes com intensidade de 25-20 μmol

$\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Durante a primeira semana e para assegurar uma humidade elevada as plantas estiveram cobertas com plástico transparente e foram aspergidas periodicamente com água destilada. A rega foi efectuada de 3 em 3 dias. Ao final de 30 dias as plantas foram transplantadas para vasos de 1L contendo substrato comercial (Compo Sana Universaltm) e transferidas para o exterior.

2.9 Análise estatística

Os caracteres morfológicos e estomáticos foram analisados estatisticamente utilizando uma ANOVA (Statistica 10.0). As diferenças significativas entre as médias foram identificadas através de um teste de comparações múltiplas, teste de Tukey ($P < 0,05$).

3.RESULTADOS

3.1 Efeito da colchicina nos ápices caulinares, segmentos nodais e embriões zigóticos

3.1.1 Taxa de sobrevivência

A taxa de sobrevivência dos ápices caulinares e dos segmentos nodais encontra-se expressa na Figura 3, enquanto a dos embriões zigóticos se encontra na Figura 4. No geral, em todos os explantes, esta taxa diminuiu com o aumento da concentração de colchicina e da duração do tratamento. Comparando as taxas de sobrevivência entre os ápices caulinares e os segmentos nodais, verifica-se que os segmentos nodais são mais sensíveis à acção do agente antimitótico, quer em meio líquido, quer em meio sólido, do que os ápices caulinares. Em meio líquido, as concentrações mais baixas de colchicina (1750, 2000 e 2250 μM) e uma duração reduzida do tratamento (2 dias), não tiveram qualquer efeito sobre os ápices caulinares, apresentando estes uma taxa de sobrevivência de 100%. No caso dos segmentos nodais, e para as mesmas concentrações e duração, a acção tóxica da colchicina é evidente. As taxas de sobrevivência destes explantes foram relativamente mais baixas, variando entre os 60% e os 73,3%. Nos tratamentos com concentrações mais elevadas e de maior duração (2500 e 3000 μM de colchicina, durante 5 dias) os ápices caulinares apresentaram uma sobrevivência de 60% para ambas as concentrações, enquanto os segmentos nodais apresentaram valores de sobrevivência mais baixos (33,3% e 20%, respectivamente).

Em meio sólido foram obtidos resultados similares, ou seja, tanto na concentração mais baixa (500 μM) como na mais alta (1500 μM) os ápices caulinares apresentaram uma taxa de sobrevivência mais elevada (80% e 70%) em comparação com os segmentos nodais (40% e 26,7%).

Em relação aos embriões zigóticos, a taxa de sobrevivência (Fig. 4) nos tratamentos com colchicina foi bastante variável, tendo-se obtido taxas de 50% nas concentrações de 250 μM e 500 μM durante 3 dias, 37,5% para uma exposição de 500 μM durante 4 dias, e entre os 25% e 12,5%, no tratamento com 1000 μM durante 3 e 4 dias, respectivamente. O tratamento controlo (Fig. 5) também apresentou uma certa taxa de mortalidade.

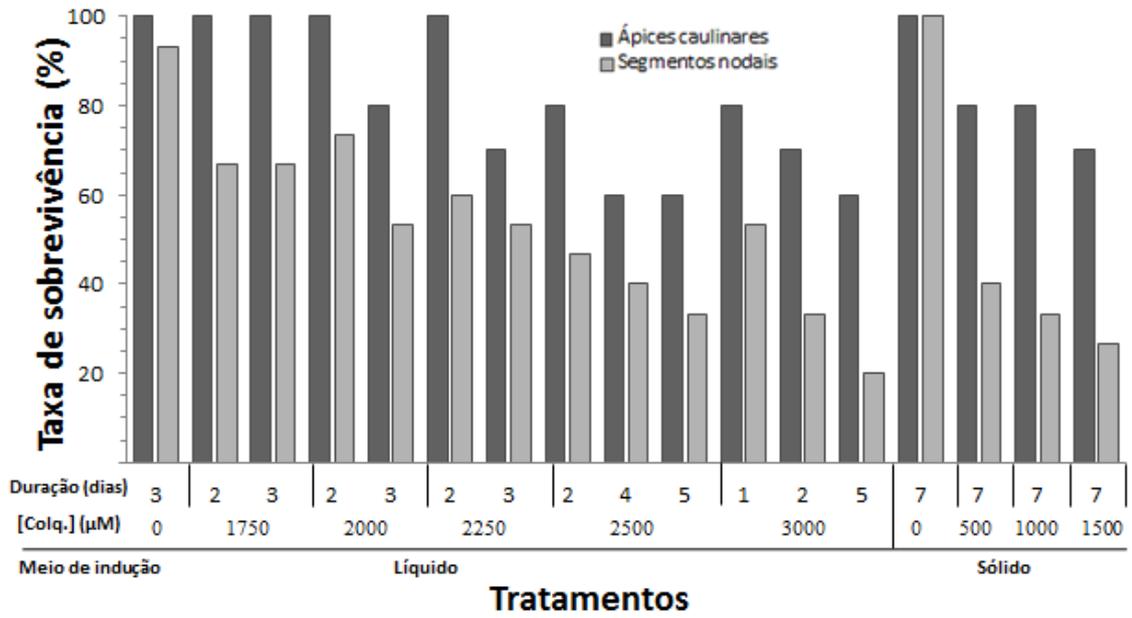


Figura 3 - Taxa de sobrevivência 30 dias após a exposição dos explantes (ápices caulinares e segmentos nodais) aos tratamentos com colchicina.

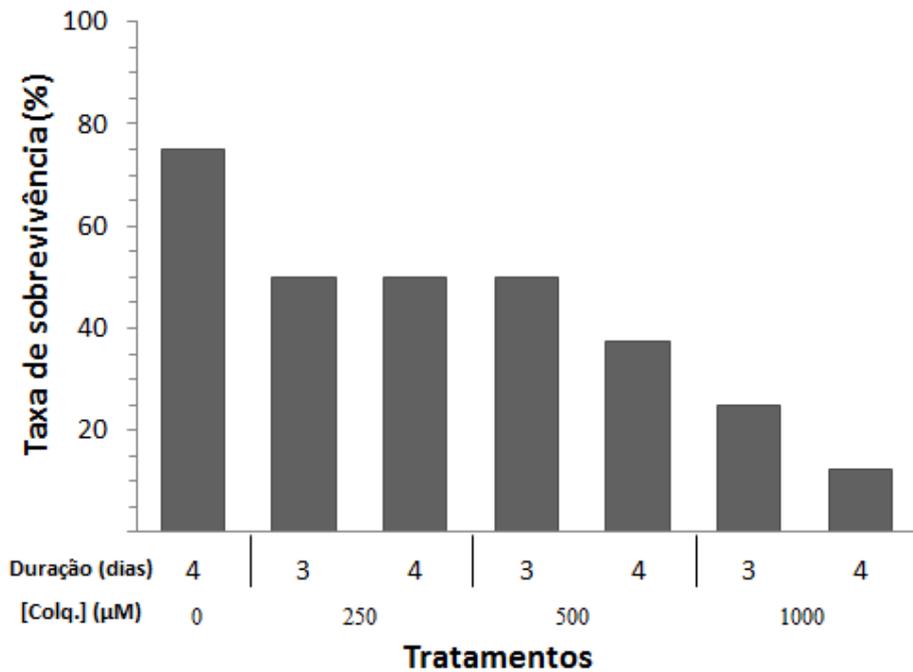


Figura 4 - Taxa de sobrevivência 30 dias após a exposição dos embriões zigóticos aos tratamentos com colchicina.

RESULTADOS

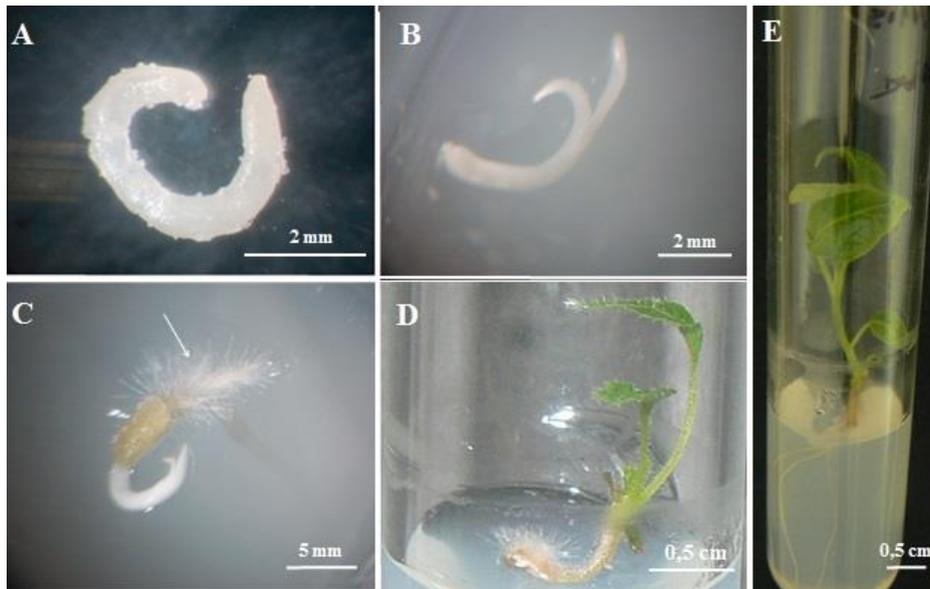


Figura 5 – Maturação de embriões zigóticos (grupo controle): A - momento do isolamento; B a E – crescimento em meio sólido após os tratamentos de indução de poliploidia; B – momento da transferência; C - 10 dias após a transferência (a seta indica o desenvolvimento de pêlos radiculares); D e E - 17 dias e 30 dias aproximadamente após a transferência.

Apesar de não estar explícito nos dados, alguns ápices caulinares submetidos ao tratamento com colchicina em meio sólido, e alguns embriões zigóticos tratados em meio líquido, revelaram anomalias durante o seu crescimento (Fig. 6). Contudo, foram contabilizados como sobreviventes, e o nível de ploidia de alguns deles foi mesmo analisado por citometria de fluxo.

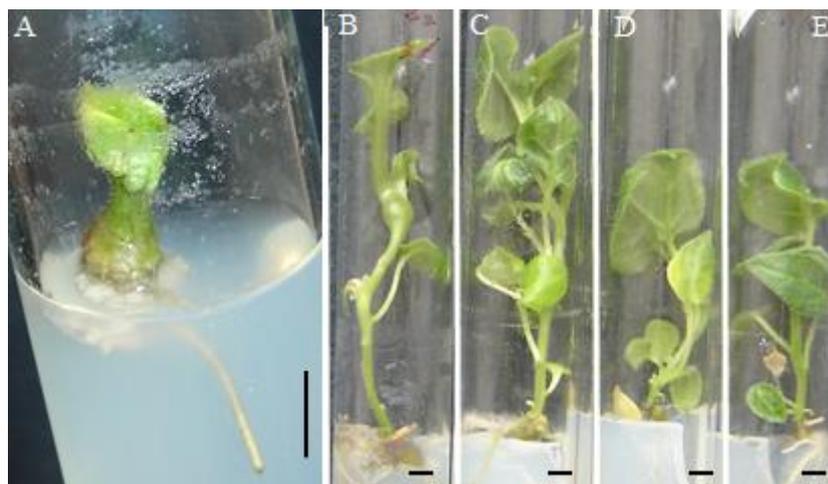


Figura 6 - Efeito da colchicina no desenvolvimento dos diferentes explantes: A - ápice caulinar anômalo depois de cultivado em meio sólido de indução de poliploidia; B e C - plantas regeneradas a partir embriões zigóticos: B – planta aberrante, C – planta com desenvolvimento normal; D e E – plantas regeneradas a partir de segmentos nodais e ápices caulinares, respectivamente (desenvolvimento normal). Barras= 0.5 cm.

3.1.2 Determinação do nível de ploidia por citometria de fluxo

Através da citometria de fluxo foram analisadas no total 119 plantas. Destas, 61 foram regeneradas a partir de segmentos nodais, 48 a partir de ápices caulinares e 10 formadas a partir de embriões zigóticos. Nem todos os tratamentos foram analisados. As Tabelas 2 e 3 mostram a eficiência das diferentes concentrações de colchicina na indução de poliploidia dos três tipos de explantes.

Tabela 2 - Efeitos dos diferentes tratamentos com colchicina na indução de poliploidia de ápices caulinares e de segmentos nodais de tamarilho.

Colchicina (µM)	Duração (dias)	Ápices caulinares %			Segmentos nodais %		
		2x	4x	2x + 4x	2x	4x	2x + 4x
Líquido							
0	3	100 (10)	0	0	100 (15)	0	0
1750	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
2000	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
2250	2	-	-	-	88,9 (8)	0	11,1 (1)
	3	-	-	-	75 (6)	12,5 (1)	12,5 (1)
2500	2	-	-	-	71,4 (5)	14,3 (1)	14,3 (1)
	4	83,3 (5)	0	16,7 (1)	50 (3)	16,7 (1)	33,3 (2)
3000	5	50 (3)	16,7 (1)	33,3 (2)	40 (2)	40 (2)	20 (1)
	1	100 (8)	0	0	87,5 (7)	12,5 (1)	0
3000	2	71,4 (5)	14,3 (1)	14,3 (1)	20 (1)	40 (2)	40 (2)
	5	50 (3)	16,7 (1)	33,3 (2)	0	50 (2)	50 (2)
Sólido							
0	7	100 (10)	0	0	100 (15)	0	0
500	7	-	-	-	-	-	-
1000	7	87,5 (7)	0	12,5 (1)	40 (2)	20 (1)	40 (2)
1500	7	57,1 (4)	13,3 (1)	28,6 (2)	50 (2)	0	50 (2)

2x, 4x e 2x + 4x significam, diplóides, tetraplóides e mixoplóides, respectivamente; os valores entre parêntesis representam o número das plantas obtidas; (-) significa que estes tratamentos não foram analisados por citometria de fluxo.

Em relação aos ápices caulinares e aos segmentos nodais, foi possível obter plantas tetraplóides nos dois tipos de meio de indução (líquido e sólido) e em quase todos os tratamentos analisados. Contudo, em ambos os casos obteve-se um número bastante

RESULTADOS

elevado de plantas mixoplóides. Comparando os diferentes tratamentos verifica-se, uma vez mais que, os ápices caulinares são menos susceptíveis a acção da colchicina. No total, independentemente da concentração de colchicina e do tempo de exposição, a taxa de plantas tetraplóides obtidas a partir da regeneração dos ápices foi de apenas 8,2 % (4 plantas) contra os 17,7% (11 plantas) obtida a partir de segmentos nodais. A presença de mixoplóides também foi maior em plantas regeneradas a partir de segmentos nodais (21,1% versus 12,5% dos ápices caulinares).

No caso dos segmentos nodais, os melhores resultados foram obtidos nos tratamentos com concentrações e tempo de exposição mais prolongados (com excepção para os tratamentos em meio sólido). Assim, as melhores taxas de indução de tetraploidia nestes explantes, foram de cerca de 50% no tratamento com 3000 μm durante 5 dias e de 40% nos tratamentos com 2500 μm durante 5 dias e com 3000 μm durante 2 dias. No que diz respeito aos ápices caulinares, as taxas de sucesso de poliploidização foram relativamente baixas, sendo que a taxa de indução de tetraplóides foi similar entre tratamentos tendo variado entre os 13,3% e os 16,7%.

Em relação aos embriões zigóticos não foi encontrado a presença de tetraploidia em nenhuma das plantas analisadas. Porém, foram detectados mixoplóides em cerca de 50% das 10 plantas analisadas, sendo que nos tratamentos com 1000 μM de colchicina, todas as plantas revelaram ser mixoplóides.

Tabela 3 - Efeitos dos diferentes tratamentos de colchicina na indução de poliploidia de embriões zigóticos de tamarilho.

Colchicina (μM)	Duração (dias)	Nível de ploidia das plantas %		
		2x	4x	2x + 4x
0	4	-	-	-
250	3	-	-	-
	4	-	-	-
500	3	75 (3)	0	25 (1)
	4	66,7 (2)	0	33,3 (1)
1000	3	0	0	100 (2)
	4	0	0	100 (2)

2x, 4x e 2x + 4x significam, diplóides, tetraplóides e mixoplóides, respectivamente; os valores entre parêntesis representam o número das plantas obtidas; (-) significa que estes tratamentos não foram analisados por citometria de fluxo.

Na Figura 7 encontram-se exemplos dos histogramas obtidos na análise por

citometria de fluxo. As plantas diplóides estão representadas no histograma A, enquanto as tetraplóides e mixoplóides são representadas nos histogramas B e C, respectivamente. Em todos os histogramas, o pico 1, localizado na posição 100 (em unidades arbitrárias, expressas em número de canais), corresponde à fase G₀/G₁ do ciclo celular da planta utilizada como padrão de referência (*Pisum sativum* cv. Ctirad, 2C = 9,09 pg ADN). O pico correspondente à fase G₀/G₁ das plantas diplóides de tamarilho encontra-se aproximadamente na posição 275 (Fig. 7A, pico 2), enquanto o pico da fase G₀/G₁ das plantas tetraplóides localiza-se sensivelmente no dobro da posição das plantas diplóides, ou seja, nos 550 canais (Fig. 7B, pico 2). Por sua vez, as plantas mixoplóides apresentam um pico na posição 275, e outro na posição 550 (Fig. 7C), correspondentes a núcleos diplóides na fase G₀/G₁ e a pelo menos 25% de núcleos tetraplóides na mesma fase do ciclo celular.

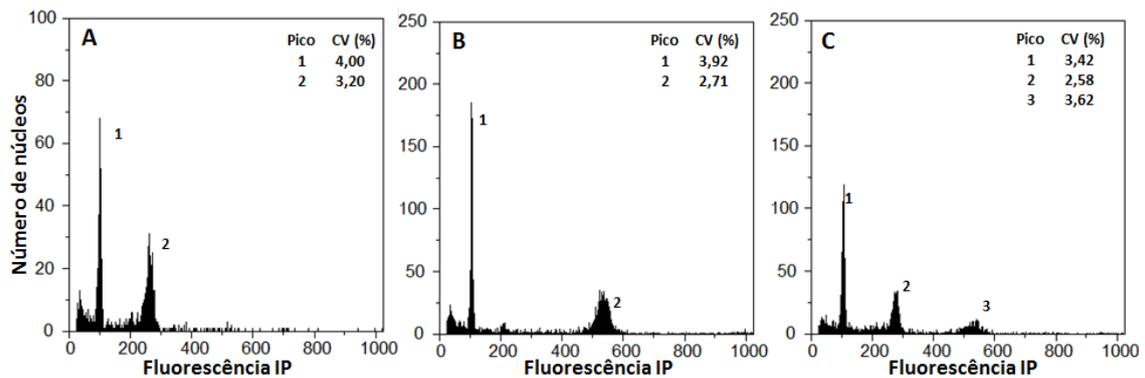


Figura 7 - Histogramas de fluorescência obtidos após análise simultânea de núcleos isolados de *Pisum sativum* cv. Ctirad (pico 1; 2C = 9,09 pg ADN, como padrão de referência interno) e *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (pico 2 e 3): A - planta diplóide, B - planta tetraplóide e C - planta mixoplóide. CV = coeficiente de variação.

Apesar de não se encontrar assinalado nos histogramas, o pico de dimensões reduzidas que aparece cerca da posição 200, representa a fase G₂ da planta padrão. Por outro lado, em alguns histogramas obtidos, foi ainda possível visualizar um número reduzido de núcleos na posição 550, correspondentes também a fase G₂ do ciclo celular de plantas diplóides de tamarilho.

No total de todas as plantas analisadas, o índice de ADN médio foi de $2,60 \pm 0,55$ para as plantas diplóides e de $5,02 \pm 0,17$ para as plantas tetraplóides. De referir ainda que os coeficientes de variação (CVs) obtidos para as plantas tetraplóides variaram entre os 2,7% e os 4,1%, com exceção de uma amostra que apresentou um valor de 8,4%. As plantas diplóides apresentaram em média, valores de CV na ordem dos 3,6%.

3.2 Estabilidade do nível de ploidia em calos formados a partir de segmentos foliares, previamente tratados com colchicina

Os segmentos foliares depois de tratados com as várias concentrações de colchicina foram transferidos para meio de indução ES (Fig. 8A), onde permaneceram cerca de 5 meses. Em todos os tratamentos, o início da dediferenciação dos explantes ocorreu por volta das 10 semanas de cultura (Fig. 8B). Após 5 meses foi possível observar a ocorrência de tecido caloso, de aparência amarelada e com uma organização friável (Fig. 8C), em todos os explantes. No final deste período, o tecido caloso formado foi repicado e analisado por citometria de fluxo. Para esta análise foram escolhidos aleatoriamente 3 amostras por tratamento, com exceção do tratamento com 3000 μ M de colchicina, onde foram utilizadas 4 amostras (tabela 4).

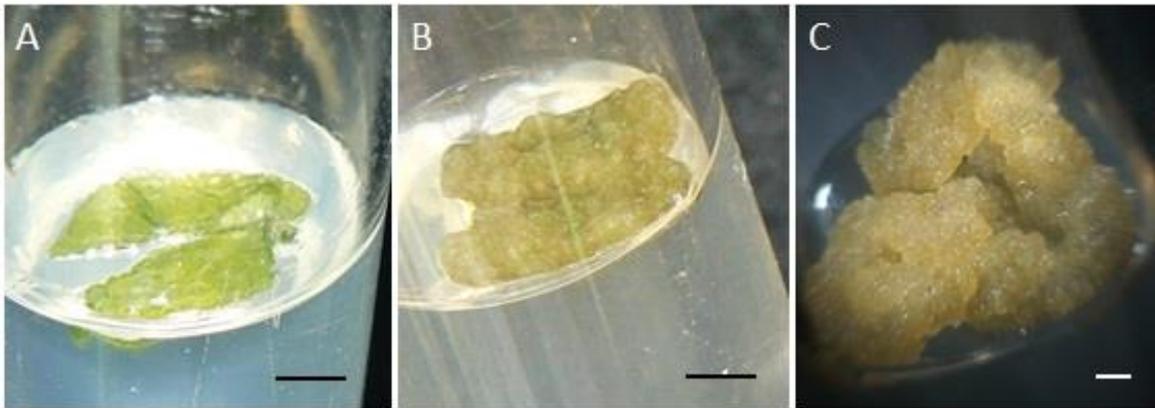


Figura 8 - Indução de embriogênese somática em segmentos foliares de tamarilho previamente tratados com colchicina. A – Aspecto dos explantes no momento da transferência para meio sem colchicina; B - Dediferenciação depois de 10 semanas no meio de indução de ES; C - Aspecto dos calos na altura da análise por citometria de fluxo (5 meses de cultura). Barras = 0.5 cm.

Tabela 4 - Análise do nível de ploidia de tecido caloso de tamarilho formado a partir de segmentos foliares tratados com colchicina e mantidos durante 5 meses em meio de indução de ES.

nº da amostra	Nível de ploidia	Núcleos fase G ₂ (%)	ID	CV (%)
C 0 (controle)				
1	2x+4x	55%	2,69	2,79
2	2x+4x	51%	2,5	1,61
3	2x+4x	31%	2,6	2,92
C 1750				
1	2x+4x	44%	2,03	2,35
2	2x+4x	48%	2,56	2,76
3	2x+4x	48%	2,62	3,17
C 2000				
1	2x+4x	41%	2,25	2,23
2	2x+4x	32%	2,64	2,62
3	2x+4x	73%	2,53	2,5
C 2500				
1	2x+4x	38%	2,59	2,96
2	2x+4x	51%	2,8	2,6
3	2x+4x	47%	2,63	2,39
C 3000				
1	2x+4x	34%	2,6	4,31
2	2x+4x	41%	2,84	3,82
3	2x+4x	46%	2,62	4,24
4	2x+4x	48%	2,47	2,32

C refere-se à concentração de colchicina a que os explantes foliares foram expostos antes de formarem o tecido caloso; ID representa o índice de ADN; CV – coeficiente de variação do pico G₀/G₁ da amostra.

A análise por citometria de fluxo revelou a presença de mixoploidia em todos tratamentos, inclusive no controle. Este facto confirma que a exposição dos segmentos foliares à colchicina foi irrelevante na alteração do nível de ploidia dos calos formados.

O número de núcleos presente na fase G₂ foi muito idêntico em todas as amostras (Tabela 4), apresentando no total uma média de 46%. A amostra 3 do tratamento controle foi a que registou um menor número de núcleos nesta fase do ciclo celular (31%), mas em contrapartida, a amostra 1 do mesmo tratamento foi a que registou o segundo maior valor (51%) de todas as amostras. O mesmo sucedeu no tratamento com 2000 µM de colchicina, em que a amostra 3 foi a que possuiu um maior número de núcleos na fase G₂ (73%); contudo a amostra 2 apresenta o segundo valor mais baixo (32%).

Uma vez que os resultados obtidos por citometria de fluxo foram muito parecidos entre vários tratamentos, a Figura 9 ilustra apenas os histogramas do tratamento

RESULTADOS

controle (A) e do tratamento com 3000 μM (B). Em ambos os histogramas podem-se notar três picos. O pico 1 corresponde à planta padrão enquanto o pico 2 e 3 pertencem a plantas de tamarilho. Estas plantas para além de possuírem núcleos na posição 225 (pico 2), possuem também uma quantidade de núcleos superior a 25% na posição 550 (pico 3), significando que são mixoplóides.

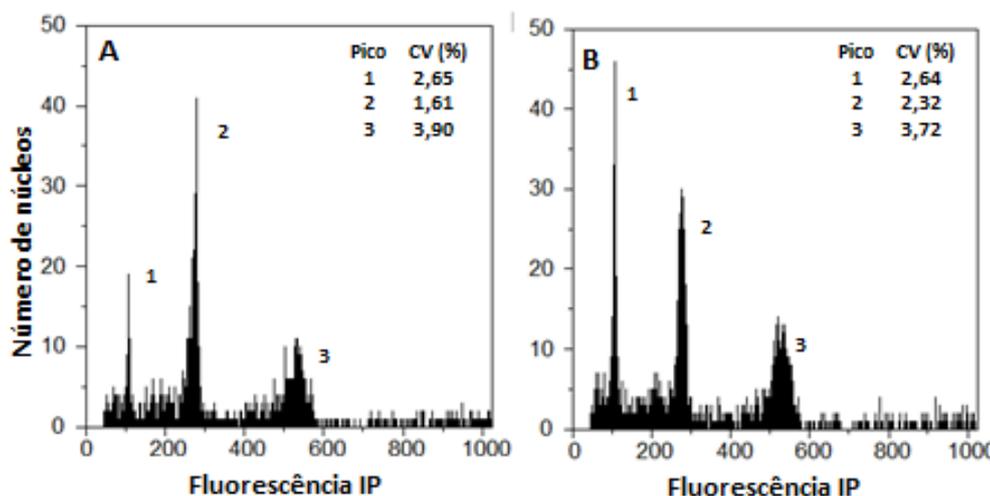


Figura 9 - Histogramas de fluorescência obtidos após análise simultânea de núcleos isolados de *Pisum sativum* cv. Ctirad (pico 1; $2C = 9,09$ pg ADN, como padrão de referência interno) e *Cyphomandra betacea*. A – tecido caloso do tratamento controle; B – tecido caloso do tratamento com 3000 μM . O pico 2 corresponde aos núcleos na fase G_0/G_1 e o pico 3 aos núcleos presentes na fase G_2 . Ambos os tecidos apresentam mixoploidia.

3.3 Análise morfológica e estomática de plantas diplóides, tetraplóides e mixoplóides

As análises morfológicas (Tabela 5) e estomáticas (Tabela 6) foram efectuadas apenas em plantas do genótipo TV, e após 5 semanas em meio de enraizamento. Em relação às características morfológicas, as plantas tetraplóides e mixoplóides apresentaram um desenvolvimento significativamente diferente das plantas diplóides. Essas diferenças reflectiam-se especialmente na altura, e no número e comprimento das raízes.

Em média, as plantas diplóides revelaram ser relativamente mais altas ($6,32 \pm 0,28$ cm) do que as plantas tetraplóides ($5,31 \pm 0,37$ cm) (Fig. 10) e mixoplóides ($5,25 \pm 0,49$ cm). No que se refere ao sistema radicular, as plantas diplóides possuem um número maior de raízes ($10,8 \pm 0,92$) e um comprimento da raiz principal superior ($5,6 \pm 0,95$ cm), comparativamente com as plantas tetraplóides (em média, $8,7 \pm 1,16$ raízes e $4,62$

$\pm 0,5$ cm para a raiz principal) e as plantas mixoplóides (em média, $9,2 \pm 1,4$ raízes e $4,52 \pm 0,61$ cm para a raiz principal). Para estas três características (altura, nº raízes e comprimento da raiz maior) não foram encontradas diferenças significativas entre as plantas tetraplóides e mixoplóides.

Nas restantes características morfológicas analisadas (i.e., comprimento e largura da folha maior, e diâmetro do caule) todas as plantas dos diferentes níveis de ploidia apresentarem valores semelhantes. A média do comprimento da folha maior rondou valores de cerca de $2,29 \pm 0,16$ cm enquanto a largura foi aproximadamente de $1,7 \pm 0,12$ cm em todas as plantas. Quanto à média do diâmetro do caule, variou entre os $2,6 \pm 0,05$ mm nas plantas diplóides e os $2,7 \pm 0,08$ mm nas plantas tetraplóides e mixoplóides.

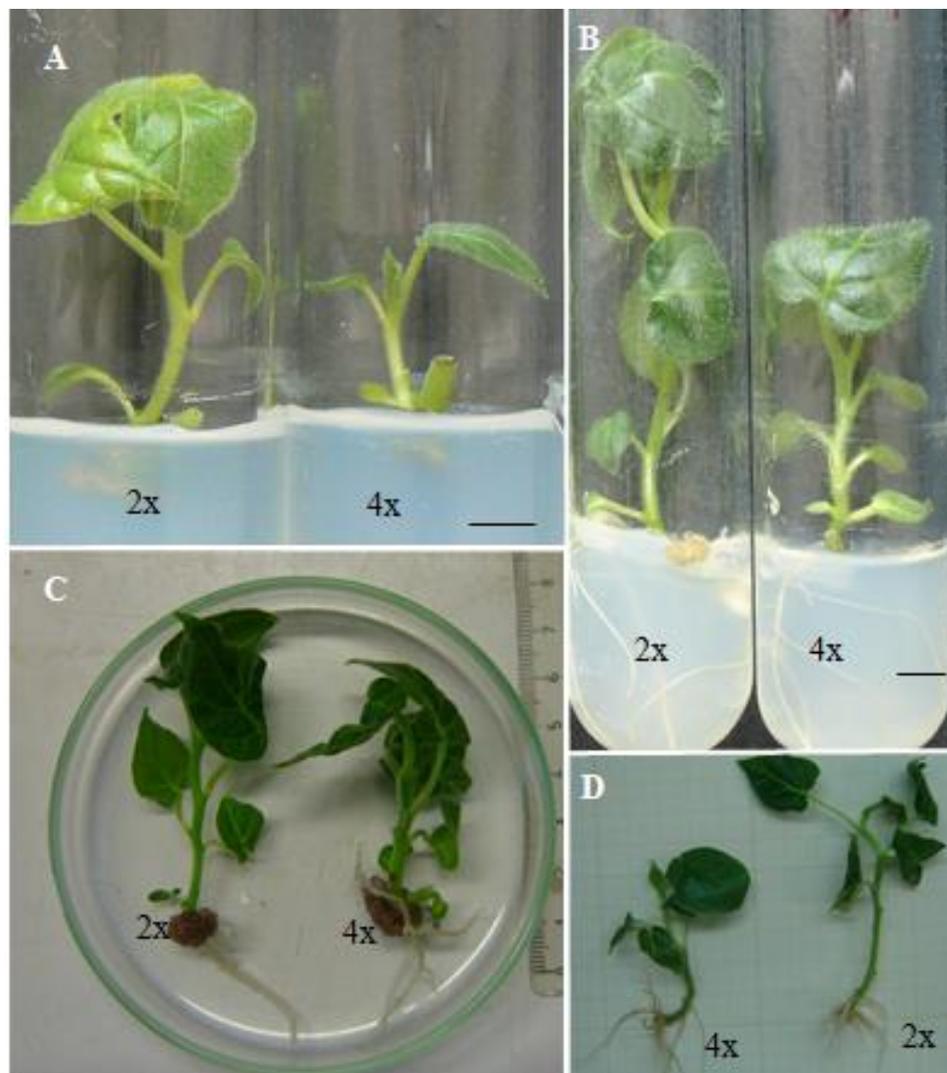


Figura 10 - Diferenças morfológicas entre as plantas diplóides (2x) e plantas tetraplóides (4x) de tamarilho (genótipo TV); A- Plantas propagadas através dos segmentos nodais (4semanas); B - Plantas em meio de enraizamento (3 semanas); C e D - Plantas com 5 semanas em meio de enraizamento. Barras= 0.5cm.

RESULTADOS

Tabela 5 - Análise morfológica em diferentes níveis de ploidia do tamarilho.

Nível ploidia	Altura (cm)	Comprimento da folha maior (cm)	Largura da folha maior (cm)	Índice foliar (comprimento/largura)	Ø base do caule (mm)	Nº raízes	Comprimento da raiz maior
2x	6,32±0,28 ^a	2,3±0,18 ^a	1,69±0,14 ^a	1,36±0,08 ^a	2,6±0,05 ^a	10,8±0,92 ^a	5,6±0,95 ^a
4x	5,31±0,37 ^b	2,29±0,16 ^a	1,67±0,12 ^a	1,38±0,12 ^a	2,7±0,08 ^a	8,7±1,16 ^b	4,62±0,5 ^b
2x + 4x	5,25±0,49 ^b	2,27±0,14 ^a	1,73±0,09 ^a	1,32±0,11 ^a	2,7±0,05 ^a	9,2±1,4 ^b	4,52±0,61 ^b

Cada valor representa a média e o desvio padrão dos três tratamentos. Cada tratamento consistiu em dez réplicas. Em cada coluna os valores com letra diferente possuem diferenças significativas, segundo o teste de Tukey (P <0,05).

Em relação aos estomas, a média do comprimento e largura é significativamente diferente nos três níveis de ploidia. Estes dois parâmetros são maiores nas plantas tetraplóides ($34,49 \pm 5,09$ e $28,97 \pm 3,15$ μm , respectivamente) (Fig. 11A), e mais pequenos nas plantas diplóides ($27,18 \pm 4,15$ e $23,66 \pm 3,52$ μm , respectivamente) (Fig. 11C). Por outro lado, as plantas mixoplóides, apresentaram valores intermédios ($31,46 \pm 5,85$ e $26,38 \pm 4,2$ μm , respectivamente). Quanto ao índice estomático (comprimento/largura), não existiram diferenças significativas entre as diferentes ploidia.

Tabela 6 - Análise estomática em diferentes níveis de ploidia do tamarilho.

Nível Ploidia	Comprimento dos estomas (μm)	Largura dos estomas (μm)	Índice estomático (comprimento/largura)	Frequência estomática ($\text{n}^\circ/\text{mm}^2$)	Nº de cloroplastos/células guarda
2x	27,18 ± 4,15 ^a	23,66 ± 3,52 ^a	1,15 ± 0,12 ^a	51,42 ± 3,88 ^a	22,87 ± 2,99 ^a
4x	34,49 ± 5,05 ^b	28,97 ± 3,15 ^b	1,19 ± 0,15 ^a	38,67 ± 5,81 ^b	30,12 ± 2,97 ^b
2x + 4x	31,46 ± 5,85 ^c	26,38 ± 4,2 ^c	1,19 ± 0,14 ^a	41,26 ± 6,65 ^b	27,82 ± 3,79 ^c

Cada valor representa a média e o desvio padrão dos três tratamentos. Cada tratamento consistiu em dez réplicas. Em cada coluna os valores com letra diferente possuem diferenças significativas, segundo o teste de Tukey (P <0,05).

No que diz respeito à frequência estomática, esta é significativamente superior nas plantas diplóides (51,42 por mm^2), em comparação com as plantas tetraplóides, que apresentaram a frequência estomática mais baixa (38,67 por mm^2), e com as plantas mixoplóides (41,26 por mm^2) não são significativamente diferentes.

Em relação ao número de cloroplastos por células-guarda, os três níveis de ploidia apresentaram diferenças significativas entre si. As plantas tetraplóides foram as que

apresentaram uma média maior (30,12, Fig. 11D), seguidas dos mixoplóides (27,82), e por fim, das plantas diplóides, que possuíram os valores mais baixos (22,87; Fig. 11B).

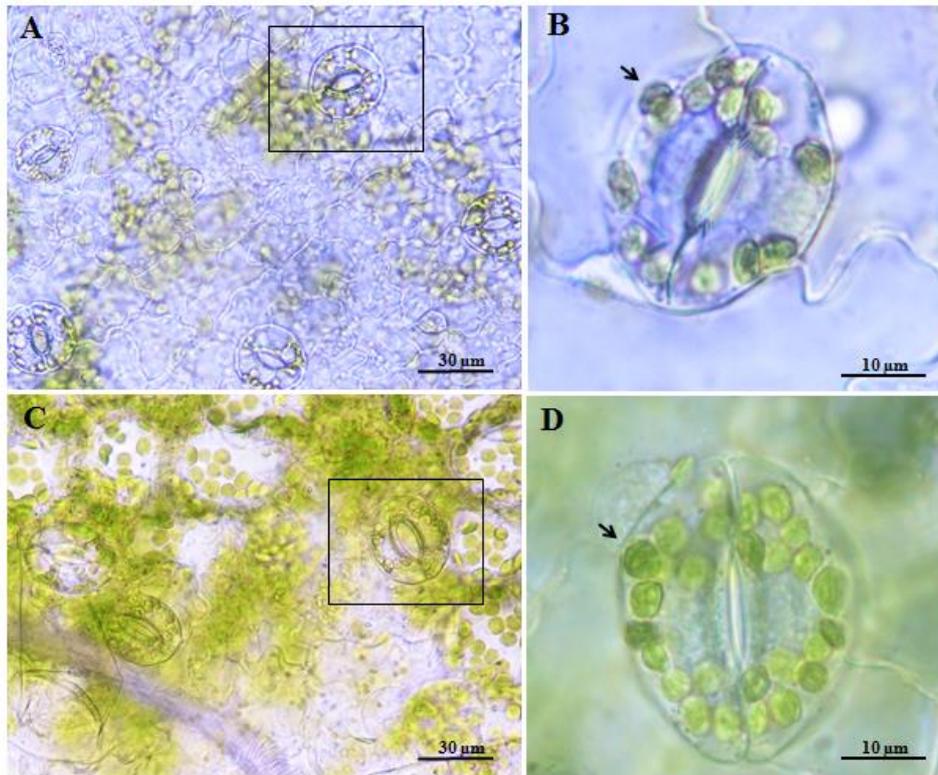


Figura 11 – Estomas e cloroplastos por células guarda de plantas diplóides e tetraplóides de tamarillo (A e B – planta diplóide; C e D – Planta tetraplóide. As setas indicam os cloroplastos.

3.4 Contagem de cromossomas

O nível de ploidia das plantas multiplicadas e previamente analisadas por citometria de fluxo, foi confirmado através da contagem dos cromossomas em células metafásicas dos ápices de raízes jovens e após 15 dias em meio de enraizamento. A análise do cariótipo permitiu confirmar os resultados obtidos por citometria de fluxo. As duas plantas identificadas como diplóides (controlo) e as quatro plantas identificadas como tetraplóides, apresentavam o número esperado de cromossomas para estes níveis de ploidia, i.e., 24 (Fig. 12A) e 48 cromossomas (Fig. 12B), respectivamente. Porém, a análise efectuada em 6 plantas mixoplóides (Fig. 12C e D), revelou que 5 apenas possuíam células com 48 cromossomas, enquanto numa planta, apesar da maior parte das células apresentar 48 cromossomas, existiam pontualmente algumas células com 24 cromossomas.

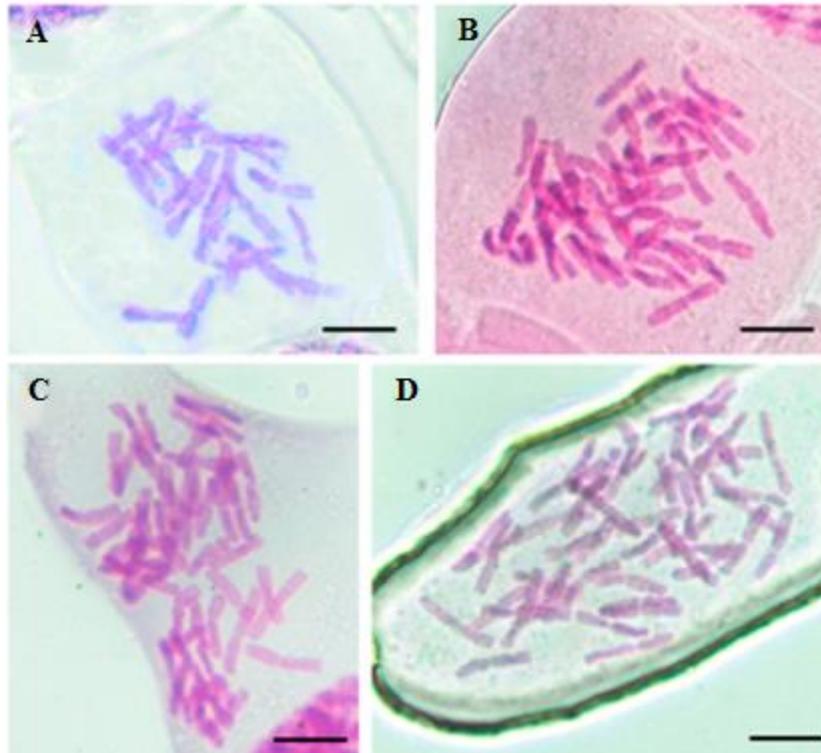


Figura 12 - Células metafásicas de raízes de tamarilho. A - Planta diplóide (24 cromossomas); B - Planta tetraplóide (48 cromossomas); C e D - Plantas mixoplóides (48 cromossomas). Barras = 10 μ m.

3.5 Aclimação e transferência para o campo

Após as 5 semanas no meio de enraizamento, duas plantas diplóides e duas plantas tetraplóides foram transferidas para condições *ex vitro*. Inicialmente as plantas foram aclimatizadas (fitoclima) e passado 30 dias foram transferidas para o exterior. Todas as plantas reagiram bastante bem, tanto à aclimatização como à transferência para o exterior, apresentando um desenvolvimento normal. Contudo e como seria de esperar, as plantas tetraplóides apresentaram um desenvolvimento mais lento do que as plantas diplóides (Fig. 13). Aos 30 e aos 60 dias, era notória a diferença de altura entre as plantas diplóides e as tetraplóides (Fig. 13B e C). Comparando os dois níveis de ploidia, as plantas tetraplóides apresentaram em média 7,6 cm de altura aos 30 dias e 17,7 cm aos 60 dias, enquanto a média da altura das plantas diplóides aos 30 dias foi de 10,05 cm e aos 60 dias de 26,65 cm (Tabela 7). No que toca ao número de nós, todas as plantas apresentaram igual número, com 4 nós aos 30 dias e 9 nós aos 60 dias. Em relação ao comprimento e largura da folha, as plantas tetraplóides apresentaram sempre valores mais inferiores às plantas diplóides. Aos 30 dias não existia diferenças no diâmetro do caule, contudo na análise efectuada aos 60 dias, ambas as plantas

tetraplóides apresentaram um diâmetro superior (9 mm) em relação as diplóides (8 mm) (Tabela 7). De realçar ainda, que os diplóides parecem ser mais rápidos a colonizar o substrato, apresentando um sistema radicular mais forte e mais desenvolvido do que as plantas tetraplóides (Fig. 13B). O efeito "giga" até ao momento não se manifestou.

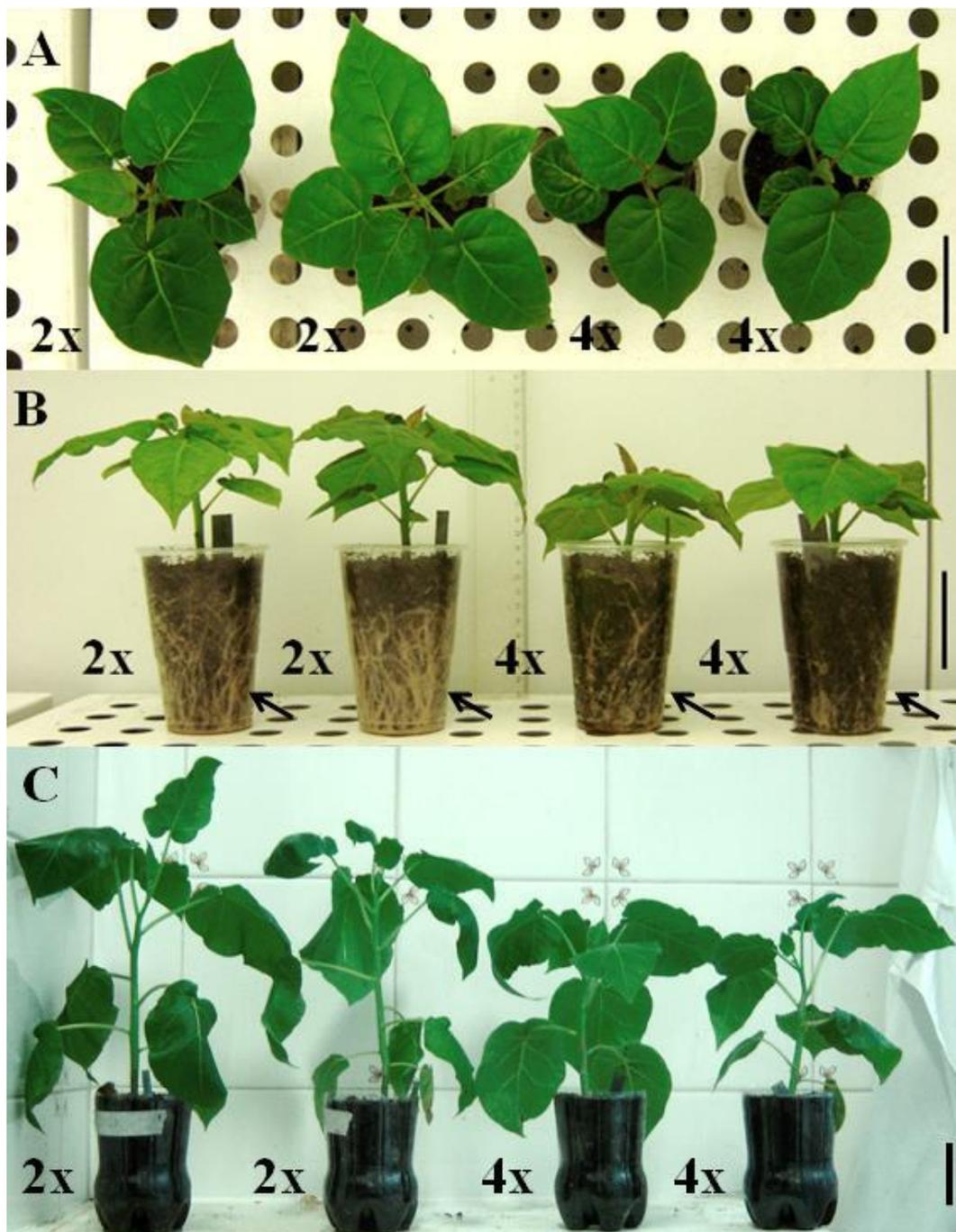


Figura 13 - Plantas diplóides (2x) e tetraplóides (4x) de tamarillo após a transferência para condições *ex vitro*. A – vista de topo (20 dias); B e C – variação na altura: B- 30 dias; C – 60 dias. As setas indicam o desenvolvimento radicular; Barras = 5cm.

RESULTADOS

Tabela 7 - Características morfológicas das plantas diplóides e tetraplóides de tamarilho, 30 e 60 dias após a transferência para condições *ex vitro*.

Nível de ploidia	Altura (cm)	Nº de nós	Comprimento da folha	Largura da folha	Comprimento/Largura da folha	Ø base do caule (mm)
30 dias (Aclimação)						
Planta diplóide 1	10,2	4	10,5	8	1,31	4
Planta diplóide 2	9,9	4	10	6,5	1,53	4
Planta tetraplóide 1	7,3	4	9,5	7	1,43	4
Planta tetraplóide 2	7,9	4	9	6	1,53	4
60 dias (Campo)						
Planta diplóide 1	26,2	9	20	13,5	1,48	8
Planta diplóide 2	27,1	9	18	13	1,38	8
Planta tetraplóide 1	18,1	9	16	11	1,45	9
Planta tetraplóide 2	17,3	9	16	11,5	1,45	9

4. DISCUSSÃO

4.1 Efeito da colchicina nos ápices caulinares, segmentos nodais e embriões zigóticos

A indução de poliploidia é uma ferramenta essencial no melhoramento vegetal. Através dela é possível obter plantas sem sementes, frutos e flores significativamente maiores, maior resistência a pragas, tolerância a stresse físico, e ainda superar as barreiras de hibridização (Sanford, 1983; Predieri, 2001). As técnicas de cultura *in vitro* permitiram expandir a sua aplicação aumentando a eficiência de indução, ao mesmo tempo que possibilitam uma melhor gestão de recursos, que facilitam o uso de métodos de selecção e, permitem ainda, uma rápida propagação dos indivíduos poliplóides formados (Predieri, 2001). Contudo, estes efeitos podem variar de acordo com a espécie, o grau de heterozigosidade e ainda o nível de ploidia (Zhang *et al.*, 2008). Por outro lado, a indução de poliploidia não é linear, apresentando algumas limitações. Existem vários factores que podem influenciar a eficiência da duplicação cromossómica *in vitro*. Estes factores incluem o tipo de agente antimitótico e a sua concentração, a duração do tratamento, o solvente utilizado, o modo de aplicação, o tipo de explantes usados, e ainda, o método de identificação das presumíveis plantas poliplóides.

No tamarilho, a obtenção de poliplóides artificiais, foi conseguida através da exposição das suas sementes à colchicina (Pringle & Murray, 1992b) e também através da exposição de segmentos nodais à colchicina e orizalina (Antunes, 2010). A escolha da colchicina e das suas concentrações para este trabalho foi baseada nos ensaios de Antunes (2010), em que o autor já tinha obtido taxas de indução razoáveis.

A colchicina é um composto clássico na indução de poliploidia. A sua utilização tem permitido a obtenção de poliplóides com sucesso em inúmeras espécies vegetais, algumas pertencentes à família das solanáceas (Stair & Showalter, 1942; Medina *et al.*, 1972; Tepakum & Veilleux, 1998; Praça *et al.*, 2009; Greplova *et al.*, 2009).

Este composto actua ao nível da anáfase do ciclo celular, interferindo com a formação do fuso acromático (Thao *et al.*, 2003). Contudo, e dependendo da concentração e da duração do tratamento, este processo afecta igualmente os explantes tratados, provocando muitas vezes a morte do material vegetal, um atraso no seu crescimento ou ainda um desenvolvimento anormal das plantas (Shao *et al.*, 2003). Neste estudo, o atraso no crescimento foi observado em todos os explantes submetidos à

colchicina, quando comparado com os explantes dos tratamentos controlo. Apesar dos dados não mostrarem, este atraso foi principalmente evidente nos embriões zigóticos e nos segmentos nodais (em meio líquido e em meio sólido), não sendo tão perceptível nos ápices caulinares.

As concentrações mais elevadas de colchicina e os períodos de incubação maiores levaram à senescência e ao aparecimento de necroses em todos os tipos de explantes. No caso dos segmentos nodais, estes resultados são idênticos aos obtidos em Antunes (2010). Porém, em comparação com este estudo, quer em meio sólido como em meio líquido, a taxa de sobrevivência obtida no presente trabalho foi aparentemente menor. Isto pode ter ocorrido devido ao facto de se tratarem de genótipos distintos ou ainda devido a diferenças na idade e no estado de desenvolvimento dos explantes. No caso dos embriões zigóticos, a redução no número de sobreviventes, para além da acção da colchicina, pode estar relacionado com lesões nos embriões que ocorreram durante o seu isolamento. Esta situação é corroborada pela diminuição do número de sobreviventes no tratamento sem colchicina (controlo). Pode ser também um dos motivos pelos quais se encontraram plantas com desenvolvimento anormal neste tipo de explantes.

Os resultados obtidos neste trabalho revelaram ainda que os ápices caulinares em comparação com os segmentos nodais são menos susceptíveis aos efeitos tóxicos da colchicina. Isto pode ser observado quer na taxa de sobrevivência, quer no sucesso da indução de poliploidia. No caso dos ápices caulinares, os tratamentos em meio sólido provocaram um número elevado de plantas anómalas. Esta situação não se verificou nos tratamentos em meio sólido dos segmentos nodais (contudo estes explantes apresentaram uma taxa de sobrevivência cerca de 2 vezes inferior à dos ápices caulinares). Estes resultados podem sugerir que a presença de meristemas totalmente formados (como é o caso dos ápices caulinares), confere uma maior resistência à acção do agente antimitótico. Esse efeito pode resultar do facto do meristema estar envolvido por uma série de primórdios foliares, podendo condicionar o contacto das células com o agente antimitótico.

O sucesso na indução de poliploidia foi diferente nos vários tipos de explantes. Das 48 plantas regeneradas a partir de ápices caulinares, apenas 8,2% apresentavam tetraploidia. Os melhores resultados (cerca de 16,7% de tetraplóides obtidos) foram

alcançados nos tratamentos em meio líquido, com a exposição mais longa e a concentrações maiores de colchicina (2500 μM e 3000 μM durante 5 dias). No entanto, os resultados obtidos parecem indicar que é necessário utilizar concentrações de colchicina mais elevadas para obter um maior número de plantas tetraplóides, uma vez que o número de plantas diplóides foi bastante elevado, e o número de plantas mixoplóides superior às plantas tetraplóides obtidas em todos os tratamentos. Resultados idênticos foram conseguidos por Praça *et al.*, (2009), em que através da regeneração de ápices caulinares de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) expostos a concentrações mais baixas de colchicina (5000 e 6500 μM durante 4 e 5 dias) provocou um baixo número de tetraplóides e um número elevado de diplóides e mixoplóides. Em contrapartida, segundo os mesmos autores, o tratamento ideal nesta espécie foi de 8000 μM durante 4 dias, tendo-se conseguido taxas de sucesso na obtenção de tetraplóides de cerca de 66,7% (Praça *et al.*, 2009). Em outras espécies de solanáceas, a aplicação de orizalina (28,8 μM durante 1 dia) em ápices caulinares, produziu cerca de 6% de plantas tetraplóides em híbridos de *S. tuberosum* \times *S. spegazzinii*, e 29% em híbridos de *S. tuberosum* \times *S. sparsipilum* (Chauvin *et al.*, 2003).

A percentagem de plantas tetraplóides obtidas através da regeneração de segmentos nodais foi maior. Num total de 61 plantas analisadas, 17,1% eram tetraplóides. Os melhores resultados (40 e 50%) foram obtidos, mais uma vez, nos tratamentos em meio líquido e nos quais a exposição foi mais prolongada e com uma concentração maior de colchicina (2500 μM durante 5 dias e 3000 μM durante 2 e 5 dias). Comparando estes resultados com os obtidos por Antunes (2010), verifica-se que as concentrações e a duração necessária para induzir tetraplóides foram ligeiramente diferentes. Em Antunes (2010) os tratamentos ideais (com taxas de sucesso de 33,3%) foram de 2500 μM durante 2 ou 4 dias, em meio líquido; neste estudo, estas concentrações apenas produziram 14,3 e 16,7% de plantas tetraplóides. Contudo, se comparamos os tratamentos em meio sólido entre ambos os estudos, verifica-se que existem semelhanças no tratamento com 1000 μM durante 7 dias. Neste trabalho conseguiu-se uma taxa de sucesso de 20% enquanto em Antunes (2010) essa taxa foi de cerca de 26%. Segundo a literatura, a obtenção de tetraplóides através da aplicação de colchicina em segmentos nodais de várias espécies de solanáceas (*S. berthaultii*, *S. bulbacastanum*, *S. pinnatisectum* e *S. verrucosum*) pode ser alcançada com bastante sucesso utilizando concentrações de 3500 e 5000 μM durante 1 dia (Greplova *et al.*, 2009). Porém,

segundo os mesmos autores, a orizalina é mais eficiente na obtenção de poliplóides nestas espécies do que a colchicina. No tamarilho este facto não foi verificado (Antunes, 2010).

No caso das plantas regeneradas a partir dos embriões zigóticos não foram encontradas plantas com o dobro dos cromossomas. Contudo, de todas as plantas analisadas por citometria de fluxo, 50% apresentaram mixoploidia. Em todos os tratamentos foi possível identificar plantas com mais do que um nível de ploidia nas suas células. Aliás, nos tratamentos com a concentração mais alta (1000 μ M durante 3 e 4 dias) a percentagem de plantas mixoplóides foi de 100%. Estes resultados parecem indicar que é possível induzir tetraploidia utilizando embriões zigóticos como explantes, sendo apenas necessário otimizar as condições de indução.

A percentagem total de plantas mixoplóides regeneradas a partir de ápices caulinares foi de 18,75% enquanto nos segmentos nodais foi de 22,95%. O aparecimento deste tipo de plantas é recorrente nos ensaios de poliploidização. Apesar da sua frequência diminuir quando aplicada em sistemas *in vitro* (comparativamente com a aplicação *in vivo*), a mixoploidia continua a ser um problema comum na indução de poliploidia (Rose *et al.*, 2000). Este tipo de plantas possuem um valor reduzido na agricultura, quando comparadas com as plantas tetraplóides porque, uma vez que possuem diferentes níveis de ploidia nas suas células, existem também diferenças no tempo necessário para que completem o seu ciclo celular. Esta situação pode originar complicações ao nível morfológico e fisiológico das plantas (Mergen e Lester, 1971). Por outro lado, a estabilidade do ADN nuclear das plantas mixoplóides acaba por sofrer distúrbios depois de sucessivas divisões celulares (Carvalho *et al.*, 2005). Como as células diplóides possuem uma taxa de proliferação maior do que as células com outros níveis de ploidia, as plantas mixoplóides tendem a reverter parcial ou totalmente para diplóides (Mergen & Lester, 1971). No entanto, isto não se verificou aquando da reanálise das plantas mixoplóides pela contagem dos seus cromossomas. Das 6 plantas mixoplóides utilizadas na contagem apenas uma possuía os dois níveis de ploidia (24 e 48 cromossomas) nas suas células metafásicas, enquanto as restantes apresentavam células com 48 cromossomas.

Estes resultados são contraditórios aos encontrados em Antunes (2010), em que todas as plantas mixoplóides apresentaram unicamente 24 cromossomas; e aos

encontrados por Alves (2012), em que todas as plantas mixoplóides (que se encontravam estabelecidas *in vitro* há mais de 1 ano) possuíam células metafásicas com os dois níveis de ploidia. Uma possível explicação é que estas plantas, depois de analisadas por citometria de fluxo, foram multiplicadas através dos seus segmentos nodais que poderiam apenas conter células tetraplóides nos seus meristemas axilares. Outra possibilidade pode ter a ver com o desenvolvimento das raízes a partir de sectores tetraplóides. Contudo, uma nova análise por citometria de fluxo é aconselhável.

Como seria de esperar, as plantas diplóides (grupo controlo), apresentaram todas 24 cromossomas e as tetraplóides, 48 cromossomas, o que confirma a eficiência da citometria de fluxo na análise do nível de ploidia das plantas.

4.2 Estabilidade do nível de ploidia em calos formados a partir de segmentos foliares, previamente tratados com colchicina

O estabelecimento de culturas de calos é apropriado para a produção em massa de plantas num espaço limitado. No entanto, uma restrição destas culturas é a instabilidade genética das plantas regeneradas a partir desses calos. Muitas vezes, essas plantas apresentam variação somaclonal (Fras *et al.*, 2007). Estas variações podem ser atribuídas a mudanças citogenéticas como a euploidia ou a aneuploidia (Nontaswatsri & Fukai, 2005). Por outro lado, as técnicas de cultura *in vitro* são consideradas como um dos factores responsáveis na reestruturação genómica das plantas (Madlung & Comai 2004). Durante a cultura *in vitro*, a preparação dos explantes, a exposição a reguladores de crescimento ou a desdiferenciação e a rediferenciação das células dos explantes podem levar a mudanças no conteúdo de ADN, na sua estrutura e ainda no número de cromossomas (Fras *et al.*, 2007).

No nosso estudo, os segmentos foliares depois de expostos aos tratamentos com colchicina foram mantidos durante 5 meses em meio de indução de ES. No final deste período, os calos formados foram analisados por citometria de fluxo. Esta análise revelou a presença de mixoploidia em todos os tratamentos, inclusive no controlo (sem colchicina), o que confirma que o agente antimitótico não teve efeito na alteração do nível de ploidia. A justificação mais plausível para tal situação, pode dever-se ao tempo demasiado longo em que os explantes se encontraram no meio de cultura. De relembrar

que este meio tem na sua composição a auxina Picloram, sendo que segundo a literatura, os reguladores de crescimento como as auxinas ou as citocininas podem induzir endorreducação (duplicação cromossômica sem que ocorra divisão celular) em calos estabelecidos *in vitro* (Liscum & Hangarter, 1991; Mishiba *et al.*, 2001; Gaj, 2004). Uma outra razão, contudo menos plausível, poderá ser a pré existência de endorreducação nas células dos segmentos foliares (Fras *et al.*, 2007).

Um estudo recente, mostra que culturas embriogénicas de tamarilho estabelecidas há pelo menos um ano *in vitro*, e plantas regeneradas a partir dessas culturas, sofrem distúrbios no número de cromossomas e mudanças no seu ADN (Currais *et al.*, 2013). Um outro estudo similar, e com tempo de cultura idêntico ao utilizado neste estudo (4 meses), mostra que culturas de *Coffea arabica* possuem também mudanças no conteúdo de ADN nuclear (Clarindo *et al.*, 2012).

4.3 Análise morfológica e estomática das plantas diplóides, tetraplóides e mixoplóides

Foram observadas diferenças morfológicas entre as plantas diplóides e as plantas tetraplóides e mixoplóides, analisadas após 5 semanas de cultura em meio de enraizamento. Os resultados revelaram que as plantas diplóides apresentam uma taxa de crescimento maior do que as plantas tetraplóides e mixoplóides, nomeadamente na altura e no número e comprimento da raiz maior. Segundo a literatura isto pode ser explicado pela reduzida taxa de divisão celular (Shao *et al.*, 2003; Stebbins, 1984). Estes resultados vão de encontro aos obtidos em Alves (2012). Contudo este autor analisou dois genótipos distintos de plantas tetraplóides, em que um dos genótipos apresentava sensivelmente um tamanho maior que as plantas controlo (diplóides). O facto de não existirem diferenças entre as plantas tetraplóides e as mixoplóides para estes caracteres, pode sugerir uma possível evolução destas últimas para o estado de tetraploidia.

Porém, estes dados não são totalmente fidedignos uma vez que, apesar de todas as plantas terem o mesmo tempo de desenvolvimento em cultura, existem outros factores para além da ploidia que podem interferir com o desenvolvimento das plantas, como por exemplo a exposição à luz (Alves, 2012) ou o estado fisiológico das plantas. No entanto uma análise no campo, seria mais apropriada e deverá ser efectuada no futuro. Mesmo

assim, e apesar de não ter sido realizado tratamento estatístico, a análise preliminar efectuada 30 e 60 dias após a transferência das quatro plantas para condições *ex vitro*, demonstra que existem diferenças evidentes na altura das plantas diplóides e das tetraplóides.

Em muitas plantas, o tamanho dos estomas é considerado um indicador indirecto do nível de ploidia (Beck *et al.*, 2003). Uma consequência directa da poliploidização é o aumento de volume celular (Dhooghe *et al.*, 2011). Este aumento pode ser verificado nas plantas utilizadas, uma vez que os diplóides de tamarilho apresentaram um comprimento e largura dos estomas menor quando comparado com as tetraplóides correspondentes. Contudo, as plantas mixoplóides apresentaram tamanhos intermédios em comparação com os diplóides e dos tetraplóides, o que poderá indicar a existência de tecidos com os dois níveis de ploidia. O aumento do volume celular pode ser verificado também na frequência estomática, uma vez que esta é maior nas plantas diplóides e menor nas plantas tetraplóides e mixoplóides. O facto de não existirem diferenças no índice estomático nos três níveis de ploidia poderá indicar que o aumento de volume dos estomas é proporcional em todos estes níveis.

Outro indicador do nível de ploidia é o número de cloroplastos por células-guarda. As plantas diplóides apresentaram um número mais reduzido de cloroplastos por células-guarda do que as tetraplóides correspondentes. Estudos idênticos, realizados nesta espécie, obtiveram resultados semelhantes (Alves, 2012; Standring *et al.*, 1990; Pringle & Murray, 1992a). Mais uma vez as diferenças encontradas entre os mixoplóides e as restantes plantas de nível de ploidia diferentes podem estar relacionadas com a posse de tecidos com os dois níveis de ploidia.

Este trabalho contribui assim para o alargamento da variabilidade genética no tamarilho, que poderá contornar as limitações que a exploração agrícola desta espécie apresenta. Em suma, ficou provado que a indução de poliploidia nesta espécie é relativamente fácil de obter, tanto em segmentos nodais, como em ápices caulinares de plântulas. Contudo, em ensaios futuros são necessárias várias optimizações, nomeadamente, aumentar o número de explantes por tratamento (para se conseguir um número maior de plantas sobreviventes e possíveis tetraplóides), analisar estatisticamente as características anatómicas e estomáticas em plantas estabelecidas no

DISCUSSÃO

campo e testar outras concentrações e duração dos tratamentos. Será também fundamental dar continuidade a este trabalho, particularmente na regeneração de plantas a partir dos calos mixoplóides obtidos e posterior análise do nível de ploidia por citometria de fluxo.

5. CONCLUSÕES & PERSPECTIVAS FUTURAS

O sucesso na obtenção de plantas tetraplóides de tamarilho abre novas portas para o melhoramento desta espécie. Este trabalho demonstrou que é possível obter este tipo de plantas utilizando ápices caulinares ou segmentos nodais cultivados *in vitro*. Tanto em ápices caulinares como em segmentos nodais, os melhores resultados na duplicação cromossômica foram alcançados aplicando concentrações de colchicina de 2500 ou 3000 μM (meio líquido) durante 5 dias. No caso dos segmentos nodais também se obtiveram bons resultados com concentrações de 3000 μM (meio líquido) ao fim de 2 dias. Uma vez que os ápices caulinares pertencem ao genótipo TL (tamarilho laranja), conseguiu-se obter pela primeira vez plantas com o dobro dos cromossomas pertencentes a este cultivar. Apesar de não ter sido possível obter plantas tetraplóides através da regeneração de embriões zigóticos expostos à colchicina, foram obtidas plantas mixoplóides. No futuro, para obter plantas tetraplóides a partir deste tipo de explantes é ainda necessário otimizar as concentrações e a duração dos tratamentos a aplicar.

De realçar que é aparentemente possível distinguir as plantas tetraplóides das diplóides, através de certas características anatómicas (altura e sistema radicular) e estomáticas (tamanho e densidade dos estomas e número de cloroplastos). No entanto, torna-se impossível detectar as plantas mixoplóides. O uso da citometria de fluxo revela-se então essencial neste processo para uma verdadeira certificação do nível de ploidia.

Em ensaios futuros será necessário avaliar a estabilidade das plantas tetraplóides bem como comparar a sua performance com a das plantas diplóides. Será também necessário avaliar a sua fertilidade e as características do fruto como o tamanho, número de sementes, composição química, sabor, entre outras. A hibridização intraespecífica ou intergenérica dos novos tetraplóides com outras espécies relacionadas poderá permitir a obtenção de novas características, com importância comercial relevante. Existe ainda a possibilidade de realizar cruzamentos entre diferentes níveis de ploidia, nomeadamente entre plantas tetraplóides e diplóides para a obtenção de plantas triplóides, caracterizadas pela ausência de sementes nos seus frutos. Este trabalho revelou ainda que o estabelecimento de segmentos foliares em meio de indução de ES, durante pelo menos 5 meses, leva a formação de calos com alterações no nível de ploidia. A regeneração de plantas a partir desses calos poderá ser uma via alternativa para a obtenção de plantas poliplóides nesta espécie.

6. REFERÊNCIAS

- Acquaah G (2007) Principles of plant genetics and breeding. Polyploidy in Plant Breeding. Wiley-Blackwell, Malden. 13: 214 -130.
- Ahuja MR (2001) Recent advances in molecular genetics of forest trees. *Euphytica* 121: 173–195.
- Ahuja MR (2005) Polyploidy in gymnosperms: Revisited. *Silvae Genetica* 54:59–69.
- Aleza P, Juarez J, Cuenca J, Ollitrault P & Navarro L** (2012) Extensive citrus triploid hybrid production by $2x \times 4x$ sexual hybridizations and parent-effect on the length of the juvenile phase. *Plant Cell Reports* 31: 1723-1735.
- Allum JF, Bringloe DH & Roberts AV (2007) Chromosome doubling in a *Rosa rugosa* Thunb. hybrid by exposure of *in vitro* nodes to oryzalin: the effects of node length, oryzalin concentration and exposure time. *Plant Cell Reports* 26: 1977–1984.
- Alves A (2012) Ensaio de embriogênese somática e transformação genética no tamarilho (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.). Tese de Mestrado. Universidade de Coimbra.
- Antunes P (2010) Indução de plantas tetraplóides através de tratamento com agentes c-mitóticos no tamarilho (*Cyphomandra betacea*) e no medronheiro (*Arbutus unedo*). Tese de Mestrado. Universidade de Coimbra.
- Barghchi M (1986) *In vitro* rejuvenation of *Cyphomandra betacea* (tamarillo). Plant Physiology Division Biennial Report, Department of Scientific and Industrial Research (DSIR), New Zealand, 52.
- Belling J & Blakeslee AF (1924) The distribution of chromossomes in tetraploid Daturas. *American Naturalist* 58: 60-70.
- Bicknell RA & Koltunw AM (2004) Understanding apomixis: recent advances and remaining conundrums. *Plant Cell* 16: 228–245.
- Blakeslee A (1939) The present and potential service of chemistry to plant breeding. *The American Journal of Botany* 26: 163–172.
- Blakeslee F & Avery AG (1937) Methods inducing doubling of chromosomes in plants. *Journal of Heredity* 28: 393–411.
- Bohs L (1989) Ethnobotany of the genus *Cyphomandra* (Solanaceae). *Economic Botany* 43: 143-63.

REFERÊNCIAS

- Bohs L (2007) Phylogeny of the *Cyphomandra* clade of the genus *Solanum* (Solanaceae) based on ITS sequence data. *Taxon* 56: 1012-1026.
- Bowers JE, Chapman BA, Rong JK, *et al.*, (2003) Unravelling angiosperm genome evolution by phylogenetic analysis of chromosomal duplication events. *Nature* 422: 433–438.
- Broertjens C (1976) Mutation breeding of autotetraploid *Achimenes* cultivars. *Euphytica* 25: 297-304.
- Burnham CR (1962) Applications of polyploidy. In: *Discussions in Cytogenetics*, 6th edn. Burgess Publishing Co., Minneapolis. 251-270. <http://www.maizegdb.org/ancillary/Burnham/> acedido em Junho de 2013.
- Canhoto JM, Lopes ML & Cruz GS (2005) Protocol for somatic embryogenesis: tamarillo (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.). In: SM Jain, PK Gupta (Eds.) *Protocol for Somatic Emryogenesis in Woody plants*, Dordrecht, Springer. 379-389.
- Caperta A, Delgado M, Ressurreição F, Meister A, Jones R, Viegas W & Houben A (2006) Colchicine-induced polyploidization depends on tubulin polymerization in c-metaphase cells. *Protoplasma* 227: 147-153.
- Carvalho JR, Carvalho CR & Otoni, WC (2005) *In vitro* induction of polyploidy in annatto (*Bixa orellana*). *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 80: 69–75.
- Centre for Underutilised Crops (CUC). 2009. Tree tomato (*Cyphomandra betacea*). PAVUC Fact Sheet N°6. http://www.exoticseedsshop.com/tamarillo/Factsheet_6_Treetomato_final_3006.pdf Acedido a Junho de 2013.
- Chauvin J, Souchet C, Dantec J & Ellissèche F (2003) Chromosome doubling of 2x *Solanum* species by oryzalin: method development and comparison with spontaneous chromosome doubling *in vitro*. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 73: 65-73.
- Chauvin JE, Label A & Kermarrec MP (2005) *In vitro* chromosomedoubling in tulip (*Tulipa gesneriana* L.). *The Journal of Horticultural Science & Biotechnology*. 80: 693–698.
- Chen Z (2010) Molecular mechanisms of polyploidy and hybrid vigor. *Trends in Plant Science* 15: 57-71.
- Clarindo WR, Carvalho CR & Mendonça MC (2012) Ploidy instability in long-term *in vitro* cultures of *Coffea arabica* L. monitored by flow cytometry. *Plant Growth Regulation* 68: 533–53.

- Cohen D & Elliot D (1979) Micropropagation methods for blueberries and tamarillos. Combined Proceedings, International Plant Propagators Society 29: 177-179.
- Comai L (2005) The advantages and disadvantages of being polyploid. Nature Reviews Genetics 6: 836-846.
- Contreras RN, Ranney TG & Tallury SP (2007) Reproductive behavior of diploid and allotetraploid *Rhododendron* L. 'Fragrant Affinity'. HortScience 42: 31-34.
- Correia SI & Canhoto JM (2012) Biotechnology of tamarillo (*Cyphomandra betacea*): from *in vitro* cloning to genetic transformation. Scientia Horticulturae 148: 161–168.
- Correia SI, Lopes ML & Canhoto JM (2012) Somatic embryogenesis induction system for cloning an adult *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (tamarillo). Trees 25: 109-1020.
- Currais L, Loureiro J, Santos C, & Canhoto JM (2013) Ploidy stability in embryogenic cultures and regenerated plantlets of tamarillo. Plant Cell Tissue & Organ Culture 104: 359-373.
- Darlington CD & La Cour LF (1976) The Handling of Chromosomes, sixth ed. London: George Allen & Unwin Ltd. 125-126.
- De Jesus-Gonzalez L & Weathers PJ (2003) Tetraploid *Artemisia annua* hairy roots produce more artemisinin than diploids. Plant Cell Reports 21: 809–813.
- De Mello e Silva M, Callegari J & Zanettini B (2000) Induction and identification of polyploids in *Cattleya intermedia* Lindl. (Orchidaceae) by *in vitro* techniques. Ciência Rural 30: 105–111.
- Dewey DR (1980) Some applications and misapplications of induced polyploidy to plant breeding. Basic Life Sciences 13: 445-470.
- Dhawan O & Lavania U (1996) Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy: a review. Euphytica 87: 81-89.
- Dhooghe E, Van Laere K, Eeckhaut T, Leus L & Van Huylenbroeck J (2011) Mitotic chromosome doubling of plant tissues *in vitro*. Plant Cell Tissue & Organ Culture 104: 359–373.
- Doležel J, Greilhuber J & Suda J (2007) Flow cytometry with plant cells. Wiley, Weinheim 454.
- Doležel J, Sgorbati S & Lucretti S (1992) Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. Physiologia Plantarum 85: 625–631.

REFERÊNCIAS

- Doyle JJ, Flagel LE, Paterson AH, *et al.*, (2008) Evolutionary genetics of genome merger and doubling in plants. *Annual Review Genetics* 42: 443–461.
- Eigsti OJ & Dustin AP (1955) *Colchicine in agriculture, medicine, biology, chemistry*. Iowa University Press, Ames. http://archive.org/stream/colchicineinagri00eigs/colchicineinagri00eigs_djvu.txt acedido em Maio de 2013.
- Fras A, Juchimiuk J, Siwinska D & Maluszynska J (2007) Cytological events in explants of *Arabidopsis thaliana* during early callogenesis. *Plant Cell Reports* 26: 1933-1939.
- Gaj MD (2004) Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regulation* 43: 27–47.
- Galbraith D, Harkins K, Maddox J, Ayres N, Sharma D & Firoozabady E (1983) Rapid flow cytometric analysis of the cell-cycle in intact plant-tissues. *Science* 220: 1049-1051.
- Gatita I & Almeida J (2003) Micropropagación del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendtn.), Solanaceae silvestre usada en la alimentación humana. *Revista Forestal Venezolana* 47: 9-13.
- Gaul H (1958) Present aspects of induced mutations in plant breeding. *Euphytica* 7: 275-289.
- Goldblatt P (1980) Polyploidy in angiosperms: monocotyledons. *Basic Life Sciences* 13: 219-239.
- Grant V (1971) *Plant speciation*. New York: Columbia University Press 435.
- Greenleaf WH (1938) Induction of polyploidy in *Nicotiana* by hetero-auxin treatment. *Journal Heredity* 29: 451-464.
- Greplova M, Polzerova H & Domkarova J (2009) Intra- and interspecific crosses of *Solanum* materials after mitotic polyploidization *in vitro*. *Plant Breeding* 128: 651–657.
- Guimarães M, Tomé M & Cruz G (1996) *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (Tamarillo). Em: Bajaj, Y. (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Trees IV*. Springer-Verlag, Berlin, 120-137.
- Hancock J (1997) The colchicine story. *HortScience* 32: 1011–1012.
- Harlan J & De Wet (1975) On Ö Winge and a prayer: the origins of polyploidy. *The Botanical Review* 41: 311-390.

- Hazarika TK, Lalramchuana & Nautiyal BP (2012) Studies on wild edible fruits of Mizoram, India used as ethno-medicine. *Genetic Resources & Crop Evolution* 59: 1767–1776.
- Heping H, Shanlin G, Lanlan C & Xiaoke J (2008) *In vitro* induction and identification of autotetraploids of *Dioscorea zingiberensis*. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 44: 448-455
- Hilu KW (1993) Polyploidy and the evolution of domesticated plants. *American Journal of Botany* 80: 1494–1499.
- Hyon O, Jean, D & Robert, J (2009) Endoreplication: polyploidy with purpose. *Genes & Development* 23: 2461-2477.
- Jelenic S, Berljak J, Papes D & Jelaska S (2001) Mixoploidy and chimeric structures in somaclones of potato (*Solanum tuberosum* L.) cv. Bintje. *Food Technology and Biotechnology* 39: 13–17.
- Ji W, Li ZQ, Zhou Q, Yao WK, & Wang YJ (2013) Breeding new seedless grape by means of *in vitro* embryo rescue. *Genetics & Molecular Research* 12: 859-69.
- Jorgensen CA (1928) The experimental formation of heteroploid plants in the genus *Solanum*. *Journal of Genetics* 19: 133-211.
- Kadota M, Niimi Y, (2002) *In vitro* induction of tetraploid plants from a diploid Japanese pear cultivar (*Pyrus pyrifolia* N. cv. Hosui). *Plant Cell Reports* 21: 282-286.
- Karpechenko, GD (1927) Polyploid hybrid of *Raphanus sativus* L. × *Brassica oleracea* L. *Bull. Appl. Bot. Genetics & Plant Breeding* 17: 398- 410.
- Kihara H (1951) Triploid Watermelons. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* 58: 217-230.
- Kou M, Yen J, Hong J & Wang C (2009) *Cyphomandra betacea* Sendt. Phenolics protect LDL from oxidation and PC12 cells from oxidative stress. *Food Science Technology* 42: 458–463.
- Ladizinsky G (1998) *Plant evolution under domestication*. Dordrecht: Kluwer Academic Press 262.
- Levin D (1983) Polyploidy and novelty in flowering plants. *American Naturalist* 122: 1-25.
- Liscum E& Hangarter RP (1991) Manipulation of ploidy level in cultured haploid petunia tissue by phytohormone treatments. *Journal of Plant Physiology* 138: 33–38.

REFERÊNCIAS

- Liu Z & Gao S (2007) Micropropagation and induction of autotetraploid plants of *Chrysanthemum cinerariifolium* (Trev.) Vis. *In vitro* Cellular & Developmental Biology - Plant 43: 404-408.
- Loureiro J, (2007) Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal. Tese de Doutorado, Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Aveiro, 248.
- Loureiro J, Rodriguez E, Doležel J & Santos C (2007) Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry – examination with 37 species. *Annals of Botany* 100: 875–888.
- Lu C & Bridgen MP (1997) Chromosome doubling and fertility study of *Alstroemeria aurea* × *A. caryophyllaea*. *Euphytica* 94: 75 - 81.
- Luckett D (1989) Colchicine mutagenesis is associated with substantial heritable variation in cotton. *Euphytica* 42: 177–182.
- Madlung A & Comai L (2004) The effect of stress on genome regulation and structure. *Annals of Botany* 94: 481–495.
- Majdi M, Karimzadeh G, Malboobi MA, Omidbaigi R & Mirzaghaderi G (2010) Induction of Tetraploidy to Feverfew (*Tanacetum parthenium* Schulz. Bip): Morphological, Physiological, Cytological and Phytochemical Changes. *HortScience*, 45: 16-21.
- Masterson J (1994) Stomatal size in fossil plants: Evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science* 264: 421–423.
- McCane J & Widdowson DA (1992) In: Fruit and nut (Suppl. To the composition of foods.) 5th Ed. London, Holland, Unwin & Buss. 74 -77.
- Meadows LR (2002) Growing tamarillo relatives. In: The New Zealand Home Garden. http://www.naturalhub.com/grow_fruit_type_tamarillo_relative_new_zealand. Acedido em Junho de 2013.
- Medina DM, Longo CR, Lopes C, Neusa D, Azzini LE & Usberti FA (1972) Poliploidização em berinjela (*Solanum melongena* L.): I - Tratamento de sementes pela colchicina. *Bragantia* 31: 275-287.
- Mergen F& Lester DT (1971) Colchicine induced polyploidy in *Abies*. *Forest Science* 7: 314-319.
- Mergoum M & Macpherson H (2004) *Triticale* Improvement and production. Food & Agriculture Organization.

- Mertz C, Brat P, Caris-Veyrat C & Günata Z (2010) Characterization and thermal lability of carotenoids and vitamin C of tamarillo fruit (*Solanum betaceum* Cav.). *Food Chemistry* 119: 653-659.
- Meru G (2013) Poliploidy. Department of Horticulture, University of Georgia. http://plantbreeding.coe.uga.edu/index.php?title=5._Polyploidy acedido em Maio de 2013.
- Mishiba K, Okamoto T & Mii M (2001) Increasing ploidy level in cell suspension cultures of *Doritaenopsis* by exogenous application of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. *Physiologia Plantarum* 112: 142–148.
- Morton, JF (1987) Tree tomato. In: Julia, F., Morton (Eds.), *Fruits of Warm Climates*, Miami., Miami, FL, 437–440.
- Muñoz & Victor A (2013) Tamarillo (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.). Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile. <http://www.provar.uchile.cl/doc/TAMARILLO%202011.pdf> acedido em Junho 2013.
- Murashige T & Nakano R (1966) Tissue culture as a potential tool in obtaining polyploid plants. *Journal of Heredity* 57: 114–118.
- Murashige T & Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- National Research Council (1989) “Tamarillo- Tree Tomato” in *Lost crops of the incas: little-known plants of the Andes with promise for worldwide cultivation*. Washington: Academy Press. 306 - 316.
- Nebel BR (1937) Mechanism of polyploidy through colchicine. *Nature* 140: 1101.
- Nontaswatsri C & Fukai S (2005) Regenerative *callus* of *Dianthus* ‘Telstar Scarlet’ showing mixoploidy produce diploid plants. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 83: 351-355.
- Nygren A** (1948) *Further studies in spontaneous and synthetic Calamagrostis purpurea*. *Hereditas* 34: 113–134.
- Obando M, Goreux A & Jordan M (1992) Regeneration *in vitro* de *Cyphomandra betacea* (tamarillo), una especie frutal andina. *Ciência e Investigacion Agraria* 19: 125-130.

REFERÊNCIAS

- Olsen T, Ranney T & Vilorio Z (2006) Reproductive behavior of induced allotetraploid \times *Chilotalpa* and *in vitro* embryo culture of polyploidy progeny. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 131: 716-724.
- Otto S (2007) The Evolutionary Consequences of Polyploidy. *Cell* 131: 452-462.
- Otto S & Whitton J, (2000) Polyploid incidence and evolution. *Annual Review of Genetics* 34: 401-437.
- Petersen K, Hagberg P & Kristiansen K (2003) Colchicine and oryzalin mediated chromosome doubling in different genotypes of *Miscanthus sinensis*. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 73: 137-146.
- Praça MM, Carvalho CR & Clarindo WR (2009) *A practical and reliable procedure for in vitro induction of tetraploid tomato*. *Scientia Horticulturae* 122: 501-505.
- Predieri S (2001) Mutation induction and tissue culture in improving fruits. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 64: 185-210.
- Pringle GJ & Murray BG (1992a) Polyploidy and aneuploidy in the tamarillo, *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (Solanaceae). I. Spontaneous polyploidy and features of the euploids. *Plant Breeding* 108: 132-138.
- Pringle GJ & Murray BG (1992b) Polyploidy and aneuploidy in the tamarillo, *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (Solanaceae). II. Induction of tetraploidy, interploidy crosses and aneuploidy. *Plant Breeding* 108: 139-148.
- Quarin L, Espinoza F, Martinez J, Pessino SC, & Bovo, OA** (2001) *A rise of ploidy level induces the expression of apomixis in Paspalum notatum*. *Sexual Plant Reproduction* 13: 243-249.
- Ramsey J & Schemske DW (1998) Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology, Evolution & Systematics* 29: 467-501.
- Ramsey J & Schemske DW (2002) Neopolyploidy in flowering plants. *Annual Review of Ecology, Evolution & Systematics* 33: 589-639.
- Ramulu K, Verhoeven H & Dijkhuis P (1991) Mitotic blocking, micronucleation, and chromosome doubling by oryzalin, amiprofosmethyl, and colchicine in potato. *Protoplasma* 160: 65-71.
- Randolph LF (1932) Some effects of high temperatures on polyploidy and other variation in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 18: 222-229.

- Ranney TG (2006) Polyploidy: from evolution to new plant development. Combined Proceedings, International Plant Propagators Society 56: 137–142.
- Raza H, Mumtaz-Khan M & Ali-Khan A (2003) Review Seedlessness in *Citrus*. International Journal of Agriculture & Biology 5: 388-391.
- Ren Y, Bang H, Gould J, Rathore KS, Patil BS, & Crosby KM (2012) Shoot regeneration and ploidy variation in tissue culture of honeydew melon (*Cucumis melo* L. inodorus). *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 49: 223–229.
- Rose B, Kubba J, Tobutt R (2000) Induction of tetraploidy in *Buddleia globosa*. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 63: 121–125.
- Roy A, Leggett G & Koutoulis A (2001) *In vitro* tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in hop (*Humulus lupulus* L.). *Plant Cell Reports* 20: 489-495.
- Rubuluza T., Nikolova R., Smith M. & Hannweg K. (2007) *In vitro* induction of tetraploids in *Colophospermum mopane* by cochicine. *South African Journal of Botany* 73: 259-261.
- Sakhanokho F, Rajasekaran K, Kelley Y & Faridi I (2009) *Induced Polyploidy in Diploid. Ornamental Ginger (Hedychium muluense RM Smith) using Coichicine and Oryzalin*. *HortScience* 44: 1809-1814.
- Sanford, JC (1983) Ploidy manipulations, In: J.N. Moore and J. Janick (eds.). *Methods in fruit breeding*. Purdue University Press, West Lafayette, Ind. 100-123.
- Shao JZ, Chen CL, Deng XX (2003) *In vitro* induction of tetraploid in pomegranate (*Punica granatum*). *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 75: 241–246.
- Soltis D & Soltis S (1993) Molecular data and the dynamic nature of polyploidy. *Critical Review in Plant Sciences* 12: 243–273.
- Soltis D, Soltis S & Tate A (2004) Advances in the study of polyploidy since plant speciation. *New Phytologist* 161: 173–191.
- Song C, Liu S, Xiao J, Zhou Y, Qin Q, Zhang C & Liu Y (2012) Polyploid organisms. *Science China Life Science* 55: 301-311.
- Stair EC & Showalter RK (1942) Tetraploidy in tomatoes induced by the use of colchicine. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 40: 383–386.

REFERÊNCIAS

- Standring LS, Pringle GJ & Murray BG (1990) The control of chloroplast number in *Solanum muricatum* Ait. and *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. and its value as an indicator of polyploidy. *Euphytica* 47: 71–77.
- Stanys V, Weckman A, Staniene G & Duchovskis (2006) *In vitro* induction of polyploidy in Japanese quince (*Chaenomeles japonica*). *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 84: 263-268.
- Stebbins GL (1984) Polyploidy and the distributed of arctic-alpine flora: a new evidence and new approaches. *Botanica Helvetica* 94: 1–13.
- Teparkum S, Veilleux R (1998). Indifference of potato anther culture to colchicine and genetic similarity among anther-derived monoploid regenerants determined by RAPD analysis. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 53: 49-58.
- Thao P, Ureshino K, Miyajima I, Ozaki Y, Okubo H (2003) Induction of tetraploids in ornamental *Alocasia* through colchicine and oryzalin treatments. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 72: 19–25.
- Thompson JD & Lumaret R (1992) The evolutionary dynamics of polyploid plants: origins, establishment and persistence. *Trends in Ecology & Evolution* 7: 302-307.
- Väinölä A (2000) Polyploidization and early screening of *Rhododendron* hybrids. *Euphytica* 112: 239-244.
- Van Laere K, Van Huylenbroeck J & Van Bockstaele E (2011) Introgression of yellow flower colour in *Buddleja davidii* by means of polyploidisation and interspecific hybridization. *Horticultural Science* 38: 96-103.
- Van Tuyl J, Meijer H & Van Dien M (1992) The use of oryzalin as an alternative for colchicine *in vitro* chromosome doubling of *Lilium* and *Nerine*. *Acta Horticulturae (ISHS)* 325: 625-630.
- Vignoli L (1945) Sterilità e Moltiplicazione vegetativa in “*Jabarosa, Artemisia Hemerocallus*”. *Nuovo Giornale Botanico Italiano, Nuova Serie* 52: 1– 10.
- Winkler H (1916) Über die experimentelle Erzeugung von Pflanzen mit abweichenden Chromosomenzahlen. *Zeitschrift für Botanik* 8: 417–531.
- Yang ML & Sung FJ (1994) The effect of suboptimal temperature on germination of triploid watermelon seeds of different weights. *Seed Science & Technology* 22: 485-493.

Zhang J, Zhang M & Deng X (2007) Obtaining autotetraploids *in vitro* at a high frequency in *Citrus sinensis*. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 89: 211-216.

Zhang ZH, Dai HY, Xiao M & Liu X (2008) *In vitro* induction of tetraploids in *Phlox subulata* L. *Euphytica* 159: 59–65.

