**DISSERTAÇÃO**

# HIBRIDAÇÃO SOMÁTICA EM *Passiflora* spp.

**GIOVANA VESECHI DA CONCEIÇÃO MATOS**

**Campinas, SP**

**2006**

**INSTITUTO AGRONÔMICO**
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA TROPICAL E SUBTROPICAL**

# HIBRIDAÇÃO SOMÁTICA EM *Passiflora* spp.

**GIOVANA VESECHI DA CONCEIÇÃO MATOS**

**Orientadora: Ilene Ribeiro da Silva Passos**

Dissertação submetida como requisito
parcial para obtenção do grau de
**Mestre** em
Agricultura Tropical e Subtropical
Área de Concentração em Melhoramento
Genético Vegetal

Campinas, SP
Fevereiro 2006

Ficha elaborada pelo Núcleo de Informação e Documentação do Instituto Agronômico

M433h Matos, Giovana Vesechi da Conceição
Hibridação somática em *Passiflora spp*. / Giovana Vesechi da Conceição Matos. Campinas, 2006
52 fls.; il.

Orientadora: Dra. IIene Ribeiro da Silva Passos
Dissertação ( Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agronômico

1. Maracujá 2 Protoplastos 3. RAPD 4. AFLP
I. Matos, Giovana Vesechi da Conceição II. Passos IIene Ribeiro da Silva III. Instituto Agronômico.
V. Título

CDD 634.425

Aos meus pais,

Magali de Fátima Vesechi Matos e

José Antonio da Conceição Matos,

pelo amor e a paciência, que são infinitos.

**DEDICO**

**AGRADECIMENTOS**

- À pesquisadora, amiga e orientadora Dra. Ilene Ribeiro da Silva Passos, pela confiança e ensinamentos importantes no curso e na minha vida profissional;
- Ao Prof. Dr. Pedro Canisio Binsfeld, da Universidade de Bonn, Alemanha, pelo auxílio e atenção dedicados durante toda a realização deste trabalho;
- Ao Prof. Dr. Marcelo Carnier Dornelas, do Departamento de Fisiologia Vegetal da UNICAMP, por ter auxiliado nas dificuldades encontradas no decorrer deste trabalho;
- Aos pesquisadores Dra. Laura Maria Molina Meletti, Dra. Marta Dias Soares-Scott Dr. Carlos Augusto Colombo, Dra. Haiko Sawasaki, Dra. Vera Maria Quecini, Dra. Regina Helena Geribello Priolli , Dr. Francisco Antonio Passos, Dra. Neiva Izabel Pierozzi, que não mediram esforços para a realização e conclusão deste trabalho;
- Às alunas de iniciação científica Paula Feliciano de Lima e Milene Möller, pelo auxílio nas análises moleculares e pela amizade;
- À técnica de laboratório Rauly Maximo Rabello Moretti, pelo auxílio na execução dos experimentos e pela amizade;
- Ao Prof. Dr. Augusto Tulmann Neto, do CENA/USP, por disponibilizar o equipamento fotográfico do microscópio de luz invertida para as fotos de cultura de protoplastos;
- À pesquisadora Dra. Sigrid Luiza Jung Mendaçolli, do IAC, por disponibilizar o equipamento fotográfico do microscópio esteroscópico bilocular, para as fotos de organogênese e embriogênese somática;
- Aos amigos de laboratório: Guilherme Neira Felcar, Guilherme Gomes Baptista, Maria Aparecida Ribeiro Vieira, Leonardo Held, Milena Binatti Ferreira, Natalie Leóz Schocken, pelo convívio e amizade;
- Aos amigos da Pós-Graduação, que foram indispensáveis nos momentos mais difíceis;
- Aos meus pais Magali e Guta, por acreditarem na minha capacidade e por me incentivarem a concluir este trabalho, e a todos da minha família, principalmente meus irmãos Murilo e Leandro, que sempre me apoiaram;

- E a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização e finalização deste trabalho.

**SUMÁRIO**

RESUMO..... vi
ABSTRACT..... vii
1 INTRODUÇÃO..... 01
2 REVISÃO DE LITERATURA..... 02
2.1 Hibridação Somática..... 02
2.2 A Hibridação Somática como Técnica Atual no Melhoramento de Plantas..... 05
2.3 Fusão de Protoplastos e o Melhoramento Genético do Maracujazeiro (*Passiflora* spp.)..... 06
3 MATERIAL E MÉTODOS..... 07
3.1 Rendimento no Isolamento de Protoplastos de *Passiflora edulis*..... 09
3.2 Eficiência de Plaqueamento para *Passiflora* spp..... 10
3.2.1 *P. edulis*..... 10
3.2.2 *P. nitida*..... 10
3.3 Verificação do Efeito da Idade de Cotilédones e do Efeito da Luz, Durante a Germinação de Sementes, no Comportamento de Protoplastos Isolados de *P. edulis*..... 11
3.4 Fusão de Protoplastos entre Espécies de *Passiflora* spp..... 12
3.4.1 Fusão entre *P. edulis* e *P. cincinnata* utilizando solução de fusão com diferentes valores de pH..... 12
3.4.2 Fusão entre *P. edulis* e *P. cincinnata* com regeneração de plantas provenientes de calos formados dos produtos de fusão..... 13
3.4.3 Fusão entre as espécies *Passiflora edulis* e *Passiflora nitida*..... 14
3.5 Efeito do Hormônio Ácido Indolbutírico (AIB) no Enraizamento de Plantas Regeneradas do Experimento de Fusão entre *P. edulis* e *P. cincinnata*..... 15
3.6 Caracterização dos Híbridos..... 15
3.6.1 Análise citogenética através da contagem de cromossomos..... 15
3.6.2 Análise molecular..... 16
3.6.2.1 Marcadores RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso)..... 16
3.6.2.2 Marcadores AFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados)..... 17
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 18
4.1 Rendimento no Isolamento de Protoplastos de *Passiflora* edulis..... 19
4.2 Eficiência de Plaqueamento para *Passiflora* spp..... 21
4.2.1 *P. edulis*..... 21
4.2.2 *P. nitida*..... 25
4.3 Verificação do Efeito da Idade de Cotilédones e do Efeito da Luz, Durante a Germinação de Sementes, no Comportamento de Protoplastos Isolados de *P. edulis*..... 27
4.4 Fusão de Protoplastos entre Espécies de *Passiflora* spp..... 29
4.4.1 Fusão entre *P. edulis* e *P. cincinnata* utilizando solução de fusão com diferentes valores de pH..... 29
4.4.2 Fusão entre *P. edulis* e *P. cincinnata* com regeneração de plantas provenientes de calos formados dos produtos de fusão..... 29
4.4.3 Fusão entre as espécies *Passiflora edulis* e *Passiflora nitida*..... 35

4.5 Efeito do Hormônio Ácido Indolbutírico (AIB) nas Plantas Regeneradas do Experimento de Fusão entre *P. edulis* e *P. cincinnata*..... 36
4.6 Caracterização dos Híbridos..... 37
4.6.1 Análise citogenética através da contagem de cromossomos..... 37
4.6.2 Análise molecular..... 39
4.6.2.1 Marcadores RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso)..... 40
4.6.2.2 Marcadores AFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados)..... 41
5 CONCLUSÕES..... 43
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 44

MATOS, Giovana Vesechi da Conceição. **Hibridação somática em *Passiflora* spp.** 2006. 52f. Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético Vegetal) – Pós-Graduação – IAC.

## RESUMO

O Brasil possui uma condição privilegiada quanto aos recursos genéticos de *Passiflora*, uma vez que o maior centro de dispersão geográfica dessa frutífera localiza-se no Centro-Norte do país. É de interesse estudar as espécies desse gênero, comestíveis ou não, visando ampliar o seu cultivo comercial e identificar fontes de resistência às doenças que ocorrem em *Passiflora edulis* Sims, principal espécie de interesse econômico. No maracujá, devido à baixa fertilidade dos híbridos interespecíficos, a hibridação somática, via fusão de protoplastos, representa uma alternativa de transferência de genes do germoplasma selvagem para a espécie cultivada. Assim, o presente projeto propõe o estudo da produção e caracterização citogenética e molecular de híbridos somáticos, em relação aos parentais, visando a sua utilização no programa de melhoramento genético do maracujá do Instituto Agronômico de Campinas. Vários testes preliminares foram efetuados visando otimizar o isolamento e cultivo de protoplastos antes de se iniciar os experimentos de fusão. Estudaram-se as condições de germinação de sementes (luz ou escuro) para a retirada de explantes de cotilédones e idade do cotilédone na época da coleta em função da quantidade de protoplastos isolados e eficiência de plaqueamento. Também vários testes de fusão de protoplastos foram efetuados. Todos os meios de cultura, tanto para o cultivo de protoplastos, quanto para a regeneração de plantas foram modificados em relação aos publicados. O meio para regeneração de plantas MD sofreu três modificações. Cinco procedimentos diferentes foram utilizados para os microcalos provenientes de fusão de protoplastos obtidos após 28 dias de cultura, no que diz respeito aos meios de cultura que passaram e o tempo de permanência em cada meio. Observou-se diferença entre esses tratamentos. No experimento de fusão de protoplastos entre as espécies *P. edulis* + *P. cincinnata* foram obtidos 2265 calos quando os microcalos sofreram o procedimento 1. A menor quantidade de calos foi obtida no procedimento 2: 101. As maiores taxas de regeneração foram obtidas nos procedimentos 3 (5,86%) e 4 (5,02%), que diferiram dos anteriores por um maior tempo de permanência em meio MD. As análises citogenéticas encontraram 10 plantas tetraplóides, em 15 analisadas. As análise moleculares confirmaram a obtenção de dez híbridos somáticos. Deste trabalho pode-se concluir que: a) para se obter um número maior de protoplastos isolados deve-se utilizar cotilédones jovens (6 dias) provenientes de sementes germinadas sob luz ou no escuro. b) para se obter uma maior eficiência de plaqueamento deve-se utilizar cotilédones por volta de 21 dias após a germinação, sendo esta realizada no escuro. c) obtiveram-se híbridos somáticos utilizando-se protocolos de fusão química, onde os protoplastos foram cultivados em meio K8P, K8, e MD, modificados a partir de protocolos originais publicados. d) foi possível a identificação de híbridos somáticos através das técnicas moleculares RAPD e AFLP.

**Palavras-Chave:** Maracujá, protoplastos, RAPD, AFLP

MATOS, Giovana Vesechi da Conceição**. Somatic hibridization in *Passiflora* spp.** 2006. 52f. Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético Vegetal) – Pós-Graduação – IAC.

## ABSTRACT

Brazil is favored on *Passiflora* genetic resources since its main dispersion center is set in the Middle North zone of this country. It is of great interest the study of the species of this genre, eatable or non-eatable, aiming to amplify its commercial cropping and identify resistance sources to *Passiflora edulis Sims* illnesses, as this is the main species of economical interest. In passion fruit breeding, due to interspecies hybrids low fruitfulness, somatic hybridization through protoplast fusion is an alternative way of gene transfer from wild germoplasm to the cultivated species. Thus, this project proposed to study the production, cytogenetic and molecular characterization of somatic hybrids, with regard to parental, aiming to utilize them on the passion fruit genetic breeding program of the Instituto Agronômico de Campinas. Many preliminary tests were accomplished to optimize protoplasts isolation and breeding before fusion experiments started. It was done studies of seed germination conditions (dawn or dusk) for cotyledons explants withdrawal and cotyledon age by the time of harvest according to isolated protoplasts quantity and plating efficiency. There were also done many protoplasts fusion tests. All culture medium, not only for protoplasts growing but also for plant regeneration, was modified according to the literature. MD plants regeneration medium has suffered three modifications. Five different procedures were used to microcallus proceeding from protoplast fusion obtained after 28 days of growing, according to the culture mediums and permanence time in each medium. Some differences were detected among these treatments. In *P. edulis* + *P. cincinnata* protoplast fusion experiment, 2265 callus were obtained when microcallus were submitted to procedure one. The lowest callus amount was obtained in procedure two: 101. The highest regeneration rates were obtained in the 3rd (5,86%) and 4th (5,02%) procedures, which differed from the previous ones for a higher permanence time in MD medium. Cytogenetic analysis had found 10 tetraploid plants among 15 studied. Molecular analysis confirmed the attainment ten somatic hybrids. According to this study, the following conclusions were taken: a) to obtain a higher amount of isolated protoplasts there must be used young (6 days old) cotyledons proceeding from germinated seeds under dawn or dusk, b) to obtain a higher plating efficiency there must be used cotyledons 21 days-after-germination old, being the germination done in dusk, c) it was obtained somatic hybrids by the use of chemical fusion protocols, in which the protoplasts were cultivated in K8P, K8 and MD mediums, modified from original published protocols. d) it was possible to identify somatic hybrids through molecular techniques such as RAPD and AFLP.

**Key Words**: Passion fruit, protoplasts, RAPD, AFLP.

# 1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma condição privilegiada quanto aos recursos genéticos de Passiflora, uma vez que o maior centro de dispersão geográfica dessa frutífera localiza-se no Centro-Norte do país (SOUSA & MELETTI, 1997). É de interesse estudar as espécies desse gênero, comestíveis ou não, visando ampliar o seu cultivo comercial e identificar fontes de resistência às doenças que ocorrem em *Passiflora edulis* Sims, principal espécie de interesse econômico.

O maracujazeiro é planta de cultivo relativamente recente. A espécie *Passiflora edulis* Sims é referida como maracujá amarelo ou roxo e engloba grande variabilidade genética.

Em recente entrevista dada à revista A Granja, o presidente da AFRUVEC, Ângelo Domingos Rossi, declarou o seguinte: "O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de maracujá. Entretanto, é uma cultura que carece muito de pesquisas que venham dar suporte para uma produção sustentada e manter o Brasil nessa liderança mundial. É sobejamente conhecida a característica itinerante do maracujazeiro, e se deve a dois gargalos, ou seja, problemas de comercialização e evolução das pragas que atacam a cultura, tornando inviável economicamente a sua produção. Desta forma, ações continuadas de pesquisa voltadas para o melhoramento genético, plantas mais tolerantes a bactérias, doenças fúngicas, fusariose e notadamente ao vírus PWV que vem dizimando os cultivos em escala comercial em diversas regiões do Brasil, não poderão sofrer solução de continuidade sob o risco de nos tornarmos produtores marginais no cenário internacional".

O Instituto Agronômico (IAC) vem trabalhando em pesquisas com a cultura do maracujá desde o início da década de 80. O programa de melhoramento genético dessa frutífera encontra-se muito bem estruturado, tendo originado três cultivares do grupo amarelo (MELETTI & MAIA, 1999) e um cultivar do grupo roxo de *Passiflora edulis* Sims (MELLETI et al., 2005). Essas pesquisas estão sendo conduzidas por uma equipe multidisciplinar, a qual abrange pesquisadores da área de melhoramento genético, citogenética e botânica (BERNACCI & VITTA, 1999; MELETTI, 1998; MELETTI et al., 1999; SOARES-SCOTT, 1998; SOARES-SCOTT et al., 1999 a, b, c). Outrossim, PASSOS (1999) descreveu o cariótipo e estudou pela primeira vez, protocolos de cultura de tecidos

para *Passiflora nitida* Kunth. Essa espécie apresenta resistência a morte prematura, uma das principais moléstias que atacam atualmente o maracujá cultivado (MENEZES, 1990; MENEZES et al., 1994) cujo agente causal ainda não foi identificado. A morte prematura, morte repentina ou murcha pode ser controlada com tentativas do uso de porta enxertos resistentes. Mas em escala comercial se mostra antieconômico, devido a pequena disponibilidade das sementes das espécies de porta-enxerto (MELETTI, 2005). PASSOS et al. (2002a; 2002b, 2004a e b) e MATOS et al. (2003) estudaram o estabelecimento *in vitro* por meio de sementes, organogênese, e a cultura de células em suspensão para cinco espécies de maracujá: *Passiflora edulis* Sims., *P. nitida* Kunth., *P. alata* Curtis., *P. cincinnata* Mast. e *P. setacea* DC.

Em 2001 também foram iniciados estudos para otimização de protocolos de isolamento, cultura e regeneração de protoplastos para as mesmas cinco espécies de maracujá, visando utilizar essas metodologias para a fusão de protoplastos, buscando em última análise obter cultivares de maracujá resistentes às principais moléstias que atacam a cultura (PASSOS et al., 2004b). No maracujá, devido à baixa fertilidade dos híbridos interespecíficos, a hibridação somática, via fusão de protoplastos, representa uma alternativa de transferência de genes do germoplasma selvagem para a espécie cultivada (VIEIRA, 1997).

Assim, o presente projeto propõe o estudo da produção e caracterização citogenética e molecular de híbridos somáticos, em relação aos parentais, visando a sua utilização no programa de melhoramento genético do maracujá do Instituto Agronômico (IAC).

# 2 REVISÃO DE LITERATURA

## 2.1 Hibridação Somática

A hibridação somática por meio da fusão de protoplastos é uma alternativa para a reprodução sexual a fim de combinar (por meio de tratamentos químicos ou por eletrofusão) dois genomas completos, incluindo as organelas citoplasmáticas (BAJAJ, 1994; BINSFELD, 1999). Segundo LIU et al. (2005) a fusão de células somáticas tem potencial de aplicação no

melhoramento genético em casos de alta incompatibilidade sexual ou barreiras de reprodução entre as espécies não relacionadas, inclusive pela recombinação de novas combinações dos genomas nuclear e/ou citoplasmático. Dessa maneira, a hibridação somática abriu inúmeras possibilidades para manipulações do genoma tais como: 1) superação de incompatibilidades sexuais (LIU et al., 2005; DAVEY et al., 2005); 2) produção de anfidiplóides (JOURDAN & SALAZAR, 1993); 3) transferência de parte do genoma de uma espécie para outra (LIU et al., 2005); 4) transferência do DNA citoplasmático para a produção de plantas macho-estéreis (LIU et al., 2005; DAVEY et al., 2005); 5) produção de plantas resistentes a estresses ambientais ou pragas e doenças (AUSTIN et al., 1985; ENDO et al., 1991; GLIMELIUS et al., 1991; BUI et al., 1992; WOLTERS et al., 1994; WAARA & GLIMELIUS, 1995; HENN et al., 1998; BINSFELD, 1999; LIU et al., 2005).

A hibridação somática comparada à transformação genética é empírica e não específica, o evento pode não ser precisamente controlado e a etapa de seleção é necessária (BINSFELD, 1999). Entretanto, em muitas espécies de plantas pode-se superar incompatibilidades sexuais pela fusão de protoplastos, permitindo assim a transferência e incorporação de caracteres poligênicos (LYNCH et al., 1995, WAARA & GLIMELIUS, 1995; BINSFELD, 1999; LIU et al., 2005). Alguns caracteres introduzidos pelas técnicas de DNA recombinante, por exemplo, resistência a vírus ou a insetos (MEYER et al., 1987), são codificados por um único gene. Entretanto, na maioria das culturas de importância econômica, caracteres tais como: resistências a doenças, tolerância a estresse e produção estão sobre controle de poligenes. Estes podem ser transferidos pela fusão de protoplastos (BINSFELD, 1999). Além do mais, alguns dos caracteres de herança citoplasmática como macho esterilidade e resistência à atrazina foram incorporados por meio da fusão de protoplastos. Em muitas espécies foi demonstrado que a produção de híbridos somáticos e cíbridos enriqueceram o pool de germoplasma existente (WOLTERS et al., 1994; WAARA & GLIMELIUS, 1995; LIU et al., 1995; RUTGERS et al., 1997; HENN et al., 1998; BINSFELD, 1999).

De acordo com BINSFELD (1999) para uma eficiente produção de híbridos somáticos, quatro estágios estão envolvidos: 1) isolamento e cultura de protoplastos com eficiente regeneração de plantas em pelo menos um dos parentais de fusão. 2) indução de fusão de protoplastos, preferencialmente em alta freqüência, sem perda de viabilidade. 3)

desenvolvimento de uma estratégia de seleção para regeneração de híbridos somáticos e 4) a confirmação de obtenção do híbrido ou cíbrido.

A indução da fusão pode ser alcançada utilizando-se tratamentos químicos ou físicos comuns. Em ambos os casos a fusão é um processo de dois estágios. Primeiro os protoplastos têm que ser aproximados para contato próximo entre membranas, onde o grau de adesão da membrana plasmática depende dos protoplastos parentais (BINSFELD, 1999). O contato firme pode ocorrer apenas em determinadas regiões entre os protoplastos aderidos. Subseqüentemente, as membranas plasmáticas são estimuladas a interagir, por exemplo, pela modificação de cargas elétricas, resultando na fusão de protoplastos (GLEBA & SYTNIK, 1984; VON KELLER et al., 1995, BINSFELD, 1999).

A membrana plasmática de protoplastos isolados de plantas possuem uma carga elétrica líquida negativa de aproximadamente 10-35 mV (NAGATA et al., 1979) e como conseqüência os protoplastos se repelem uns aos outros. Para induzir o contato íntimo com a membrana, requerido para a fusão, as cargas da superfície dos protoplastos precisam ser neutralizadas pela exposição, por exemplo, a policátions tais como polietilenoglicol (PEG), ou pelo uso de soluções com alto pH, no caso da fusão química (KAO & MICHAYLUK, 1974; GLEBA & SYTNIK, 1984; HENN, 1997; BINSFELD, 1999). DORNELAS (1995) utilizando solução de PEG com o pH 5,8 obteve células híbridas a partir da fusão de protoplastos de *Passiflora edulis* var. flavicarpa, *P. alata*, *P amethystina*, *P. cincinnata*, *P. coccinea* e *P. giberti*. ARAUJO (2004) visando a obtenção de hibridação interespecifica em *Nicotiana spp.* utilizou solução de PEG com pH 7,0.

A fusão gera produtos com dois ou mais núcleos (heterocárions) com citoplasmas misturados derivados dos respectivos protoplastos parentais. A formação da parede celular e a fusão nuclear ocorrem cedo na cultura resultando em células híbridas. A fusão nuclear ocorre tanto na interfase, pela formação de pontes nucleares ou na primeira mitose (GLEBA & SYTNIK, 1984; BAJAJ, 1994; VON KELLER et al., 1995; BINSFELD, 1999). A princípio, é esperado que o número cromossômico dos híbridos somáticos resultantes seja a soma do número de cromossomos dos dois protoplastos fundidos e que as organelas de ambos protoplastos estejam presentes (GLEBA & SYTNIK, 1984; BINSFELD, 1999). LIU et al. (2005), porém, relatam que eliminações espontâneas de cromossomos de cada ou de ambos parentais fundidos são muito freqüentes.

LIU et al. (2005) citam mais de 90 espécies já utilizadas em hibridação somática intergenérica. E esta não está completa.

Para a espécie *Passiflora* a regeneração de plantas a partir de protoplastos foi obtida para *P. edulis* f. flavicarpa (D'UTRA VAZ et al., 1993), *P. edulis* (+) *P. alata*, *P. edulis* (+) *P. amethystina*, *P. edulis* (+) *P. cincinnata* e *P. edulis* (+) *P. giberti*. (DORNELAS, 1995) e *Passiflora edulis* (+) *P. incarnata* (OTONI, 1995). Em LIU et al. (2005) são citadas algumas frutíferas utilizadas em hibridação somática assimétrica, tais como, *Vittis* (+) *Bupleurum* (Song et al., 1999), *Citrus* (+) *Poncirus* (VARDI et al., 1987; LIU & DENG, 2000). E também são citadas algumas espécies utilizadas em hibridação somática simétrica, como, *Citrus* (+) *Fortunella* (DENG et al., 1992; GROSSER et al., 1996; OLLITRAULT et al., 1996; LIU & DENG, 2000; COSTA et al., 2003; TAKAMI et al., 2004), *Citrus* (+) *Poncirus* (OHGAWARA et al., 1985; GROSSER et al., 1988b; OHGAWARA et al., 1991; GROSSER et al., 1996; OLLITRAULT et al., 1996; GUO & DENG., 2002), *Citrus* (+) *Citropsis* (GROSSER et al., 1990; LING& IWAMASA, 1994; GROSSER et al., 1996), *Citrus* (+) *Severina* (GROSSER et al., 1988a, 1996; GROSSER et al., 2000; MOTOMURA et al., 1995, 1997) *Fortunella* (+) *Poncirus* (MIRANDA et al., 1997) e *Pyrus* (+) *Prunus* (OCHATT et al., 1989).

## 2. 2 A Hibridação Somática como Técnica Atual no Melhoramento de Plantas

Segundo LIU et al. (2005) a transferência gênica das espécies relacionadas ou distantes é dificultada pela incompatibilidade sexual pré ou pós-zigótica. A hibridação somática via fusão de protoplastos é uma alternativa possível para transferência de gene das espécies relacionadas ou não. A hibridação e transformação genética são alternativas promissoras e suplementares da hibridação sexual para transferência de genes em plantas superiores. A transformação genética, manipulação de genes em nível molecular, é precisa e alvo-orientado com tecnologia sofisticada. Contudo, a falta de gene alvo, dificulta a transferência poligênica, impedindo seu uso como produto geneticamente melhorado, onde a hibridação somática pode iniciar seu papel na transferência de características poligênicas, como resistência a estresse abiótico e biótico.

A fusão de protoplastos pode ser usada para criar proveitosos materiais híbridos para programas de melhoramento genético, embora a incompatibilidade em diferentes níveis esteja presente nos híbridos somáticos derivados de combinações de fusão envolvendo espécie filogeneticamente distantes, que conduz ao inesperado desenvolvimento do híbrido. No entanto, a aneuploidia em híbridos somáticos oriundos de fusão simétrica ou assimétrica tem efeitos inibitórios nas aplicações dos híbridos devido a perda de vigor, aberrações no desenvolvimento e a morfologia anormal (LINO et al., 2003). De qualquer modo, desprezando estes pontos negativos, alguns dos híbridos somáticos intergenéricos têm mostrado desenvolvimento favorável e possivelmente terão potencial para melhorar os cultivares já existentes (XIA et al., 2001; GROSSER & CHANDLER, 2003).

DAYER et al. (2005) apresentam resultados positivos em que a fusão de protoplastos, simétrica ou assimétrica, colaborou no melhoramento genético de diversas culturas economicamente importantes como batata, plantas ornamentais, citrus, brassicas e cereais. Os autores enfatizam que os protoplastos fornecem também sistemas para investigar a maioria dos aspectos da genética e da fisiologia celular das plantas, incluindo estudos da genômica, proteômica e metabolômica.

Apesar de inúmeros procedimentos realizados nesta área, problemas ainda persistem. Isto inclui a recalcitrância de alguns protoplastos em expressar a sua totipotência, os protoplastos de folhas de cereais são um exemplo clássico (DAVEY et al., 2005). Felizmente o maracujá tem relevado totipotência celular a partir de calos provenientes de protoplastos, o que possibilita o uso da técnica para obtenção de híbridos somáticos (PASSOS & BERNACCI, 2005).

O interesse em tecnologia de protoplastos tem tido um foco particular na geração de novos híbridos somáticos e plantas cíbridas que não podem ser produzidos via hibridação convencional (DAVEY et al., 2005).

### 2.3 Fusão de Protoplastos e o Melhoramento Genético do Maracujazeiro

O maracujá cultivado (*P. edulis*), de maior importância econômica é afetado por várias moléstias causadas por fungos, bactérias, vírus e micoplasma. Algumas delas, sob condições favoráveis, podem ser realmente limitantes à produção. Por isso, em muitas regiões, a cultura

tornou-se nômade, migrando periodicamente na medida em que não há controle conhecido para algumas delas ou quando se torna antieconômico (MELETTI & MAIA, 1999).

Na III Reunião Técnica de Pesquisa sobre maracujazeiro realizada na Universidade Federal de Viçosa, MG, em 2002 foi levantado o grave problema dos danos econômicos que a bactéria *Xanthomonas campestris* pv. passiflorae tem causado à cultura do maracujazeiro, sendo urgente a busca de fontes de resistência, para cruzamentos com a espécie cultivada.

Por outro lado, a ocorrência de fenômenos de auto-incompatibilidade, protandria e variações na morfologia floral dificultam a prática do melhoramento genético (OLIVEIRA & FERREIRA, 1991). A hibridação interespecífica tem sido a melhor alternativa em busca de resistência a doenças. Híbridos interespecíficos foram obtidos por OLIVEIRA (1987). No entanto, esses híbridos mostram graus variados de fertilidade, justificando a aplicação da técnica de hibridação somática (DORNELAS et al., 1995; VIEIRA, 1997).

Dentro deste contexto, os recursos de técnicas como fusão de protoplastos visando a obtenção de híbridos somáticos interespecíficos, podem vir a ser de grande utilidade para o melhoramento genético de *Passiflora* (DORNELAS, 1995).

OTONI (1995) obteve, de forma inédita, cinco híbridos somáticos a partir da eletrofusão de protoplastos isolados de mesófilo de *P. edulis* f. *flavicarpa* e *P. incarnata.* Esses híbridos somáticos foram utilizados em experimentos na primeira geração de retrocruzamento com *P. edulis* e *P. incarnata*.

Já, DORNELAS (1995), obteve híbridos a partir da fusão química de protoplastos de *P. edulis* var. *flavicarpa*, *P. alata*, *P. amethystina*, *P. cincinnata*, *P. coccinea* e *P. gibertii*. Para a fusão química o autor utilizou soluções de PEG (polietilenoglicol), onde as melhores concentrações foram as de 20 e 30% para a formação de heterodímeros entre protoplastos de *Passiflora*. Estes híbridos foram posteriormente estudados citológicamente, mas, aparentemente não foram inseridos em programas de melhoramento genético do maracujá (BARBOSA & VIEIRA, 1997; SOARES-SCOTT et al., 2003).

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os tecidos vegetais utilizados para o isolamento de protoplastos foram retirados das espécies *P. edulis* var. *flavicarpa* Deg., *P. nitida* Kunth. e *P. cincinnata* Mast. Estas espécies

fazem parte do banco de germoplasma *in vitro* do Instituto Agronômico (IAC). Os materiais vegetais doadores de protoplastos foram cotilédones obtidos de sementes germinadas *in vitro* e folhas jovens de plantas mantidas *in vitro*. Para a espécie *Passiflora nitida* Kunth foram obtidas também células em suspensão como doadoras de protoplastos, por meio da indução de calogênese de discos foliares, oriundos de plantas estabelecidas *in vitro* por meio de sementes germinadas e mantidas *in vitro*.

No isolamento de protoplastos as folhas ou os cotilédones das espécies *P. cincinnata* Mast., *P. edulis* var *flavicarpa* Deg. e *P. nitida* Kunth foram pesados em placas de petri (5,0 cm de diâmetro). O tecido foi segmentado com auxilio de pinças e bisturis sob rigorosa condição asséptica. Adicionou-se junto ao tecido vegetal a solução salina CPW13 (FREARSON et al., 1973) para a pré-plasmólise do mesmo. Após quinze minutos, a solução salina de lavagem CPW13 foi trocada pela solução enzimática contendo Cellulase R-10 e Macerozyme R-10 de acordo com DORNELAS (1995). A placa, contendo a solução enzimática e o tecido, foi mantida no escuro, em agitador orbital rotativo a 40 rpm de agitação, durante 16hs.

Na lavagem de protoplastos a solução enzimática e o resto de tecidos não digeridos foram filtrados primeiramente em uma malha de nylon de 90μm e posteriormente na malha de 56μm, sob rigorosa condição asséptica. Esta filtragem foi realizada adicionando-se CPW13. Os protoplastos em solução foram centrifugados por sete minutos a 1500rpm (centrífuga FANEN, modelo baby II, passo três). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em CPW13. A centrifugação foi repetida e o *pellet* ressuspenso em 1ml de meio K8P (KAO, 1977), modificado (Anexo 2). Uma alíquota foi retirada para contagem de protoplastos em hemocitômetro, com auxílio de pipeta Pasteur esterilizada. A contagem foi realizada em microscópio de luz invertida Olympus em objetiva 20x.

No cultivo de protoplastos, após a contagem, os protoplastos foram plaqueados utilizando-se a densidade de 1 x $10^5$ de protoplastos por mililitro de meio de cultura. Os protoplastos foram cultivados em gotas de agarose (0,6%) (DORNELAS, 1995; OTONI, 1995) mergulhadas em 3ml de meio K8P modificado (Anexo 2), sob rigorosas condições assépticas. Efetuou-se a troca de meio a cada três ou quatro dias, em proporções de: 3:1; 2:1; 1:1; 1:2; 0:1 de K8P: K8 (KAO, 1977), ambos modificados (Anexo 2), visando a

redução da osmolaridade do meio. As placas de cultivo foram mantidas no escuro por 21 dias, a 25-28º C.

### 3.1 Rendimento no Isolamento de Protoplastos de *Passiflora edulis*

Foram efetuados oito isolamentos de protoplastos com a espécie *P. edulis*. Em sete isolamentos utilizaram-se cotilédones como explante e em apenas um deles utilizou-se hipocótilo. A quantidade de enzima utilizada variou de experimento para experimento, bem como a quantidade de material vegetal e tempo de permanência do explante no escuro antes do isolamento (Tabela 1).

**Tabela 1** - Tipo de explante, idade do explante, volume de solução enzimática (ml), massa de tecidos (mg) e permanência do explantes no escuro antes do isolamento utilizados em cada isolamento de protoplastos de *Passiflora edulis.*

| Isolamento (nº) | Tecido Vegetal | Idade do material vegetal (dias) | Volume de solução enzimática (ml) | Massa do material vegetal (mg) | Permanência no escuro (horas) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Cotilédones | 10 | 1,75 | 030 | 24 |
| 2 | Cotilédones | 15 | 2,80 | 134 | 13 |
| 3 | Hipocótilos | 13 | 1,80 | 842 | Germinação no escuro |
| 4 | Cotilédones | 14 | 2,00 | 174 | 7 |
| 5 | Cotilédones | 20 | 1,50 | 83,6 | 96 |
| 6 | Cotilédones | 30 | 2,00 | 149 | Germinação no escuro |
| 7 | Cotilédones | 25 | 2,00 | 423,5 | 26 |
| 8 | Cotilédones | 15 | 2,50 | 137 | 30 |

### 3.2 Eficiência de Plaqueamento para *Passiflora* spp.

#### 3.2.1 *P. edulis*

Foram efetuados cinco isolamentos de protoplastos para a verificação da eficiência de plaqueamento. Nos quatro (testes 1, 2, 3 e 4) utilizaram-se cotilédones como explante. A quantidade de enzima utilizada variou em cada experimento, bem como a quantidade de material vegetal e tempo de permanência do explante no escuro antes do isolamento (Tabela 2).

**Tabela 2** - Tipo de explante, idade do explante, volume de solução enzimática (ml), massa de tecidos (mg) e permanência do explantes no escuro antes do isolamento utilizados em cada isolamento de protoplastos de *Passiflora edulis* para a verificação da eficiência de plaqueamento.

| Teste | Tecido Vegetal | Idade do material vegetal (dias) | Volume de solução enzimática (ml) | Massa do material vegetal (mg) | Permanência no escuro (horas) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Cotilédones | - | 1, 5 | 27,7 | - |
| 2 | Cotilédones | 13 | 2,0 | 120,0 | 108 |
| 3 | Cotilédones | 08 | 1,5 | 63,9 | Germinação no escuro |
| 4 | Cotilédones | 14 | 1,5 | 125,6 | Germinação no escuro |

#### 3.2.2 *P. nitida*

No teste n° 1 pesaram-se 20mg de folhas de plantas germinadas e mantidas *in vitro* sem a nervura central, que permaneceram 2 horas no escuro antes do isolamento. Utilizou-se 1,5ml da solução enzimática.

No teste n° 2 coletaram-se cerca de 500mg de células em suspensão, obtidas de calogênese em discos foliares da espécie *P. nitida*, com o auxílio de uma peneira de nylon (56μm). Procedeu-se a pré-plasmólise das células adicionando-se CPW13 por quinze minutos, centrifugou-se a 1500rpm (centrífuga FANEN, modelo baby II, passo três) por sete

minutos para a retirada do sobrenadante, adicionou-se 3ml da solução enzimática para digestão da parede celular de células em suspensão (0,8% de Macerozyme R10 e 4% de Cellulase R10). Com auxílio da pipeta Pasteur passou-se a solução de enzimas mais as células para a placa de petri, estas foram levadas para o agitador, onde permaneceram por 16 horas a 40rpm.

A mistura enzimática e o resto das células com as paredes celulares não digeridas foram filtrados primeiramente em uma malha de nylon de 90µm e posteriormente na malha de 56µm. Os protoplastos em solução foram lavados por meio de centrifugação por sete minutos a 1500rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* suspenso em CPW13. A centrifugação foi repetida e o *pellet* suspenso em 1ml de meio K8P modificado (Anexo 2). Uma alíquota foi retirada para contagem de protoplastos em hemocitômetro, realizado sob microscópio de luz invertida Olympus (objetiva de 20x).

Após a contagem os protoplastos foram plaqueados utilizando-se a densidade de 1 x $10^5$ de protoplastos por mililitro de meio de cultura. Os protoplastos foram cultivados em gotas de agarose (0,6%) (DORNELAS, 1995; OTONI, 1995) mergulhadas em 3ml de meio K8P modificado (Anexo 2). Efetuando-se a troca de meio a cada três e quatro dias, em proporções de: 3:1; 2:1; 1:1; 1:2; 0:1 de K8P:K8, ambos modificados (Anexo 2), visando a redução da osmolaridade do meio.

### 3.3 Verificação do Efeito da Idade de Cotilédones e do Efeito da Luz, Durante a Germinação de Sementes, no Comportamento de Protoplastos Isolados de *Passiflora edulis*

Utilizaram-se neste experimento cotilédones, com idade determinada, germinados na presença ou na ausência de luz. Em todos os tratamentos o isolamento se fez com 1,5ml de solução enzimática.

No tratamento 1 pesaram-se 140,8mg de cotilédones que possuíam seis dias de idade e foram germinados na ausência de luz. No tratamento 2 pesaram-se 137mg de cotilédones que possuíam seis dias de idade e foram germinados na presença de luz. No tratamento 3 pesaram-se 63mg de cotilédones que possuíam 21 dias de idade e foram germinados na ausência de luz.

No tratamento 4 pesaram-se 297mg de cotilédones, com 21 dias de idade e germinados na presença de luz.

### 3.4 Fusão de Protoplastos entre Espécies de *Passiflora* spp

Os procedimentos de fusão foram baseados no protocolo de DORNELAS (1995) sendo efetuados logo após a contagem dos protoplastos. Estes foram suspensos a uma população de 2 x $10^5$ protoplastos por mililitro em CPW13. Um mililitro da suspensão de ambas as espécies foram misturadas em um tubo de centrífuga. O *pellet* foi obtido pela centrifugação da mistura a 1500rpm (centrífuga FANEN, modelo baby II, passo três), por sete minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* suspenso em 1ml da solução de fusão com PEG (polietilenoglicol), deixou-se repousar por 10min.

Foram adicionados a cada cinco minutos, os seguintes volumes de CPW13 (em ml): 0,25; 0,5; 1,0; 1,0; 1,5. O volume do tubo de centrífuga foi completado com CPW13, seguido de centrifugação a 1500rpm por sete minutos. O sobrenadante foi descartado e a centrifugação repetida. O sobrenadante foi substituído por meio K8P modificado (Anexo 2) contendo agarose (0,6%). Fez-se o cultivo em gotas de agarose como descrito no item 3.

Experimentos preliminares foram efetuados visando estudar diferentes valores de pH para a solução de fusão e diferentes meios de cultura para o desenvolvimento de calos e regeneração de plantas.

#### 3.4.1 Fusão entre *P. edulis* e *P. cincinnata* utilizando solução de fusão com diferentes valores de pH

Foram utilizadas folhas jovens e vigorosas de plantas germinadas e mantidas *in vitro*, sem a nervura central, das espécies *P. edulis* e *P. cincinnata*, como doadoras de material vegetal para obtenção de protoplastos. Cada espécie foi isolada em duas placas de petri (5cm de diâmetro) com cerca de 180mg material vegetal em cada placa para espécie *P. cincinnata* e cerca de 300mg de material vegetal para cada placa da espécie *P. edulis*. Adicionando-se 3ml da solução enzimática para cada placa da espécie *P. cincinnata* e 2ml para cada placa da espécie *P. edulis*.

Os procedimentos de lavagem, de fusão e de cultivo foram realizados segundo protocolo de DORNELAS (1995). As soluções de fusão contendo PEG foram as seguintes:

A) Solução de fusão com PEG 30% (P. M. 4000), autoclavada com valor do pH 5,8.

B) Solução de fusão com PEG 30% (P. M. 4000), autoclavada com valor do pH 7,0.

Durante a fusão foi realizada a contagem dos eventos e dos dímeros observando-se em microscópio de luz invertida Olympus (objetiva de 20x).

### 3.4.2 Fusão entre *Passiflora edulis* e *Passiflora cincinnata* com regeneração de plantas provenientes de calos formados dos produtos de fusão

Foram utilizadas folhas jovens e vigorosas, provenientes de plantas germinadas e mantidas *in vitro* como explantes doadores de protoplastos. O isolamento e a fusão dos protoplastos seguiram o protocolo de DORNELAS (1995), a solução de fusão continha PEG a 30% (P. M. 4000). Após 21 dias de cultivo dos protoplastos em meio de cultura K8 e K8P, ambos modificado (Anexo 2), as micro-colônias formadas foram transferidas para meio MD (MOURAD-AGHA & DEXHEIMER, 1979) modificado (Anexo 7). Nas transferências seguintes dos calos para meio fresco, aplicaram-se diferentes tratamentos (Tabela 3), utilizando-se os seguintes meios de cultura:

a) MD modificado (Anexo 6)

b) MD modificado (Anexo 7) adicionado o dobro da concentração hormonal (MD 2x).

c) MURASHIGE & SKOOG, 1962 (MS); e

d) MS/R, que constou do meio MS acrescido de 2mg.$L^{-1}$ de 6-BA e 2,5mg.$L^{-1}$ Nitrato de Prata.

Após os 28 dias em meio MS/R todos os tratamentos foram transferidos para meio MS, e a cada 28 dias foram transferidos para meio MS fresco. À medida que as plantas regeneradas cresceram elas foram separadas do calo e colocadas individualmente em frascos que continham meio MS com água de coco (10%), sendo transferidas a cada 28 dias para meio MS fresco, acrescido de água de coco (10%). Após três meses do procedimento de fusão foram realizadas avaliações para se obter número e porcentagem de plantas regeneradas e calos verdes.

**Tabela 3 -** Seqüência de meios de culturas para os quais os calos foram transferidos visando a regeneração de plantas; período (dias) de permanência em cada meio, dentro de cada procedimento.

| Procedimento | MD 2x | MD | MS/R | MS/R |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 16 dias | 0 dias | 35 dias | 28 dias |
| 2 | 16 dias | 16 dias | 28 dias | 28 dias |
| 3 | 16 dias | 23 dias | 28 dias | 28 dias |
| 4 | 16 dias | 28 dias | 28 dias | 28 dias |
| 5 | 09 dias | 35 dias | 28 dias | 28 dias |

As plantas regeneradas neste experimento passaram por uma avaliação prévia onde se priorizou as que pela morfologia lembravam híbridos. Estas, então foram submetidas a análise citogenética, para contagem de cromossomos e à análise molecular com os marcadores RAPD e AFLP.

### 3.4.3 Fusão entre as espécies *Passiflora edulis* e *Passiflora nitida*

Neste experimento os explantes doadores de material vegetal foram folhas germinadas e mantidas *in vitro* para as espécies *P. edulis* e *P. nitida.* Para esta espécie foi adicionado 2ml de solução enzimática e para outra espécie 2,5ml da solução enzimática.

A solução de fusão utilizada continha PEG 30% (P.M.4000), pH 5,8. Após a fusão foi realizado o cultivo dos produtos de fusão em meio de cultura K8P modificado (Anexo 2). Foram realizadas avaliações dos produtos de fusão vivos, mortos e em divisão aos 4 e 14 dias de cultivo.

Visando o controle da contaminação utilizaram-se placas de petri com a medida de 4,5cm de raio ao invés da placa com 2,5cm, para o cultivo dos protoplastos. Para tanto, foram efetuados cálculos para a adição de meio de cultura para o cultivo dos protoplastos, que fossem proporcionais aos utilizados quando se utilizavam placas de tamanho menor. A

quantidade de meio de cultura inicial, K8P modificado (Anexo 2), foi colocada em dois volumes diferentes em cada placa, sendo 9,0ml e 9,6ml para cobrir as gotas do plaqueamento e 3,0ml e 3,2ml, respectivamente, para a troca do meio de cultura para a redução da osmolaridade. As placas 1 e 2 tiveram volume inicial de meio de cultura 9ml e as placas 3, 4 e 5 tiveram o volume inicial de 9,6ml.

### 3.5 Efeito do Hormônio Ácido Indolbutírico (AIB) no Enraizamento de Plantas Regeneradas da Fusão entre *P. edulis* e *P. cincinnata*

Visando a obtenção de raízes para a contagem do número de cromossomos das 181 plantas regeneradas, após cinco meses, oriundas de calos provenientes do experimento de fusão entre *P. edulis* e *P. cincinnata*, transferiu-se 81 plantas para meio de cultura MS contendo a auxina IBA (1,0 $mg.L^{-1}$) e 100 plantas para meio MS sem adição de hormônios. Após 28 dias sob luz todas as plantas foram transferidas para os seus respectivos meios frescos. Após 56 dias de cultivo nesses meios foram realizadas avaliações do número e porcentagem de indivíduos que emitiram ou não raízes.

### 3.6 Caracterização dos Híbridos

#### 3.6.1 Análise citogenética através da contagem de cromossomos

Para obtenção de metáfases mitóticas foram coletados ápices meristemáticos de raízes. Estas foram pré-tratadas com uma solução de 8-hidroxiquinolína (0,002M) durante aproximadamente 5 horas. Em seguida, foram fixadas em etanol:ácido acético (3:1) a -20 °C. As raízes foram colocadas em mistura enzimática, contendo 1:1 de Pectinase e Cellulase (2%), diluídas em tampão citrato, por 1 hora a 37 °C. Após a digestão as raízes foram lavadas e fixadas em etanol:ácido acético (3:1).

Para a preparação das lâminas, as raízes foram esmagadas entre lâmina e lamínula e aquecidas na chama de lamparina. As lâminas foram congeladas em nitrogênio líquido por segundos e as lamínulas foram em seguida removidas com auxílio de uma lâmina Gilete, secadas por 24 horas. As lâminas foram coradas com solução de Giemsa à 2% por 10 minutos e secas por 48 horas. A fixação da lamínula foi feita com Permount.

### 3.6.2 Análise molecular

Extraiu-se DNA de amostras de folhas mantidas *in vitro* dos parentais *P. edulis* e *P. cincinnata* e dos híbridos putativos.

A extração de DNA foi baseada no protocolo utilizado pelo Laboratory Protocols - CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory, com algumas modificações visando resolver os problemas específicos da espécie em estudo. Inicialmente, procedeu-se a maceração mecânica do material vegetal em nitrogênio líquido, imediatamente após sua coleta, sendo então armazenado em ultra-freezer (-80ºC). A extração foi realizada a partir do tecido vegetal ressuspendido em tampão de extração CTAB (CTAB 2%, NaCl 1,42M, EDTA 20mM, Tris-HCl (pH 8,0) 100mM, PVP 2%, β mercaptoetanol 0,2% e $H_2O$ qsp) e submetido a uma temperatura de 65ºC por 60 minutos. Em seguida, procedeu-se duas etapas de extração em clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e, a seguir centrifugou-se, recuperando-se a fase aquosa da solução. O DNA foi precipitado com a adição de álcool isopropílico. Após duas lavagens do precipitado com etanol 70% e 95% e completa secagem do *pellet,* o DNA finalmente foi suspenso em 100µl de TE. A fim de se obter um precipitado mais puro, a solução foi incubada a $37^0$C por duas horas na presença de RNAse (10mg/ml).

A quantificação de todos indivíduos híbridos putativos foi efetuada através da análise comparativa de amostras de DNA-padrão (DNA lambda íntegro, marca Invitrogen) diluído em diferentes concentrações, após eletroforese em géis de agarose 0,8% corados com brometo de etídio. A qualidade e estimativa de concentração do DNA genômico extraído foram efetuadas em gel de agarose 1 %.

#### 3.6.2.1 Marcadores RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso)

As reações de amplificação foram realizadas para cada um dos genótipos dos parentais, para a mistura física, que constou de uma mistura de igual quantidade do DNA de cada um dos pais e para os híbridos putativos. A reação foi realizada em um volume total de 15µl contendo 25ng de DNA genômico, 10µM de cada iniciador 3' e 5' da Operon, 100µM de cada dNTP e 1x a solução tampão de PCR contendo 50mM de KCl, 10mM de Tris-HCl,

pH 8,9, 1,5mM de $MgCl_2$ e 0,5 unidade da enzima Taq DNA-polimerase. O ciclo total de amplificação foi realizado em um termociclador PTC200 marca MJ Research programado para iniciar com 5 minutos a 95ºC seguido por 44 ciclos com 1 minuto de desnaturação a 94 ºC, 1 minuto de pareamento a 35º C, 1 minuto e meio de extensão a 72º C e 5 minutos a 72ºC para extensão final.

Os produtos de amplificação foram separados inicialmente em gel de agarose 1,4% e corados com brometo de etídio. Seguido da visualização das bandas sob luz ultravioleta.

#### 3.6.2.2 Marcadores AFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados)

As reações de AFLP foram realizadas de acordo com o protocolo de Vos et al. (1995) com algumas modificações. Aproximadamente 250ng de DNA extraído conforme protocolo CTAB anteriormente descrito, foram duplamente digeridos com 2,5 unidades das enzimas *Eco*RI e *Mse*I por 2 horas a 37ºC.

Adaptadores específicos que possuem terminais complementares da clivagem pelas enzimas de restrição foram sintetizados (Invitrogen*)* e ligados com auxílio da enzima T4 DNA Ligase (1 unidade). A pré-amplificação foi realizada em volume final de 15µl contendo 2µl do DNA digerido, ligado e diluído (1:6), 1x tampão de PCR, 2mM de $MgCl_2$, 50ng/µl de cada *primer EcoRI*+0 e *Mse*+0 (*primers* não seletivos), 200µM de dNTP e 1U da enzima *Taq* DNA *Polymerase*. Em seguida, *primers Eco*RI e *Mse*I, também sintetizados pela Invitrogen e que contêm três nucleotídeos seletivos foram utilizados para a última etapa de amplificação. A reação de amplificação foi realizada em volume final de 15µl contendo 1,5µl do produto da pré-amplificação diluído (1:10), 1x o tampão de PCR, 2mM de $MgCl_2$, 50ng/µl de cada *primer* seletivo *Eco*RI e *Mse*I, 200µM de dNTP e 1U da enzima *Taq* DNA *Polymerase*. O ciclo total de amplificação foi realizado em um termociclador PTC200 marca MJ *Research* programado para repetir 13 vezes o ciclo de 30 segundos a 94ºC, 30 segundos a 65ºC e 1 minuto a 72ºC, diminuindo a temperatura de pareamento (0.7ºC) por ciclo, seguido de 23 ciclos de 30 segundos a 94ºC, 30 segundos a 56ºC e 1 minuto a 72ºC. Os produtos de amplificação foram separados sob condições desnaturantes em gel de poliacrilamida a 6%, 8M de uréia e tampão TBE 1x por cerca de 3 horas a 70

Watts de potência. Os fragmentos obtidos foram detectados com nitrato de prata segundo protocolo CRESTE et al. (2001).

Os dados resultantes da eletroforese em gel para cada combinação de *primers Eco*RI e *Mse*I foram analisados, sendo considerados polimorfismo, bandas presentes nos híbridos desde que presentes em pelo menos um dos pais.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em experimentos preliminares verificou-se que os protoplastos em cultura apresentavam *budding,* ou seja, formação de bolhas ao redor dos mesmos ou alongamento da membrana celular. Nossa hipótese foi de que pudesse ser um excesso de exposição dos protoplastos ao 2,4-D, que se reconhece ser uma auxina forte e até certo ponto tóxica. Tanto o meio K8P, para protoplastos, quanto o meio K8, para células, ambos descritos por KAO (1977) supõem a utilização de 2,4-D. Assim, como teste, resolveu-se retirar a referida auxina do segundo meio de cultura, K8. Com a retirada desta auxina verificou-se, a redução na formação de *budding.* Por este motivo, nos experimentos com isolamento de protoplastos em que não se realizaram fusões, utilizou-se o meio K8 modificado (Anexo 2) sem 2,4-D. Já para os experimentos onde se realizou a fusão de protoplastos, o 2,4-D precisou ser reintegrado ao meio cultura, pois o agente fusionante (PEG) causa a morte de grande parte dos protoplastos diminuindo, conseqüentemente, a densidade de cultura.

Na literatura verifica-se com freqüência a indicação da redução da pressão osmótica do meio, mediante a substituição deste a cada cinco (OTONI et al., 1995 e 1996) ou 7 dias (DORNELAS & VIEIRA, 1993). Em nossos experimentos, com o meio K8 modificado (Anexo 2) contendo ou não 2,4-D, verificamos que a troca deveria ser efetuada no mínimo a cada 3 ou no máximo 4 dias, pois caso contrário tanto os protoplastos quanto as células que já haviam entrado em divisão morreriam. Este procedimento proporcionou uma eficiência de plaqueamento alta em experimentos preliminares, quais sejam: de 45,8% para *P. edulis*, 36, 8 % para *P. alata*, e 24,5 % para *P. nitida* (PASSOS & BERNACCI, 2005).

### 4.1 Rendimento no Isolamento de Protoplastos de *Passiflora edulis*

A tabela 4 apresenta os resultados de rendimento obtido para os testes preliminares. A contaminação verificada nas placas atrapalhou o andamento do experimento sendo que em nenhum dos sete isolamentos realizados foi possível obter plantas regeneradas.

Em dois isolamentos (nº 1 e nº 2) as placas foram descartadas, pois estavam contaminadas. Isto ocorreu por causa da alta temperatura verificada no nível das placas incubadas o que provocava a evaporação do meio de cultura e condensação na tampa da placa, escorrendo pelas laterais para fora, propiciando assim o desenvolvimento de fungos e bactérias. Foram efetuados outros experimentos para contornar a contaminação, utilizando-se placas de diâmetro maior para evitar que o meio de cultura vertesse. Mesmo assim o índice de contaminação continuou sendo alto. A análise feita por especialista em microorganismos concluiu que as contaminações presentes no meio de cultura que embebia as gotas de agarose, e até mesmo nas gotas de agarose, eram provenientes de bactérias do ar. Somente após a troca do filtro de ar da câmara de fluxo laminar asséptico o problema foi resolvido, conseguindo-se anular a taxa de contaminação.

Em outros quatro isolamentos (nº 3, nº 5, nº 6 e nº 7) para P. *edulis*, os microcalos formados em 21 dias de cultivo em meio K8 modificado e K8P modificado (Anexo 2) foram transferidos para meio MD modificado (Anexo 3). Após 28 dias de cultivo no escuro observou-se que os calos haviam oxidado, provavelmente devido ao excesso de sacarose, tendo que descartá-los. Posteriormente testaram-se, em outros experimentos, novas modificações para o meio de cultura MD (Anexo 6 e 7), inclusive após os experimentos de fusão.

Os protoplastos obtidos no isolamento nº 4 (Tabela 4) foram utilizados em testes preliminares de fusão.

OTONI et al. (1996) demonstraram que o rendimento e a viabilidade dos protoplastos diminuíram com o aumento de idade da planta matriz, para a espécie *P. suberosa*. Plantas com 30 dias apresentaram um rendimento, ou seja, número de protoplastos isolados por grama de matéria fresca, de $12,3 \times 10^6 \pm 0,34 \times 10^6$, para plantas com 60 dias obteve-se $8,1 \times 10^6 \pm 0,15 \times 10^6$ e para plantas com 90 dias $3,7 \times 10^6 \pm 0,84 \times 10^6$. Esses autores discutem que a eficiência da mistura enzimática no isolamento de *P.*

*suberosa* pode ser atribuída à transição de fases, em particular pelo aumento na complexidade da estrutura da parede celular, pela ocorrência de maior espessamento das paredes celulares em decorrência da deposição secundária de substâncias, diminuindo a eficiência de atuação da mistura enzimática utilizada. DORNELAS (1995) obteve 16,8 x $10^6$ por grama de material vegetal para *P. edulis*, quando utilizou folhas mantidas *in vitro*.

**Tabela 4** - Número de protoplastos isolados por g de tecido vegetal (rendimento), para os isolamentos de 1 a 8 de *Passiflora edulis*.

| Isolamento | Rendimento (nº de protoplastos isolados/g de tecido vegetal) |
|---|---|
| 1 | 12,3 x $10^6$ |
| 2 | 13,7 x $10^6$ |
| 3 | 0,06 x $10^6$ |
| 4 | 3,40 x $10^6$ |
| 5 | 14,3 x $10^6$ |
| 6 | 1,20 x $10^6$ |
| 7 | 0,20 x $10^6$ |
| 8 | 7,3 x $10^6$ |

DORNELAS & VIEIRA (1993) relatam que os protoplastos oriundos de tecido foliar são ligeiramente menores que os isolados a partir de tecido cotiledonar, no entanto as freqüências de divisão celular e a eficiência de plaqueamento são bastante semelhantes e são igualmente influenciadas pela densidade dos protoplastos e pelo sistema de cultura. Os autores concluem que a densidade de 1 x $10^5$ protoplastos por ml de meio e o cultivo em "droplets", sistemas esses utilizados nestes experimentos, mostraram-se mais adequados para o cultivo de protoplastos isolados de tecido cotiledonar.

## 4.2 Eficiência de Plaqueamento para *Passiflora* spp.

O fator eficiência de plaqueamento (PE) vem a ser a porcentagem de protoplastos ou de células derivadas de protoplastos que originam colônias no meio nutriente (FUNGARO & VIEIRA, 1989). Pode se determinar a eficiência de plaqueamento inicial (EIP) pela contagem, aos sete dias de cultivo, do número de protoplastos que mostraram, pelo menos, uma primeira divisão mitótica, em relação aos protoplastos totais do campo de observação. E também, a eficiência de plaqueamento final (EFP) pode ser determinada pelo número de contagem de calos recuperados, ao final de 28 a 30 dias de cultivo, em relação a população de protoplastos originalmente plaqueada (OTONI, 1995) ou 14 dias como DORNELAS (1995).

O meio de crescimento para calo utilizado, nos experimentos para verificar a eficiência de plaqueamento, foi o MD modificado (Anexo 5), o qual não foi eficiente para o desenvolvimento das microcolônias em calos organogênicos. Nestes experimentos avaliaram-se as eficiências de plaqueamento, que são mostradas nas tabelas que seguem abaixo, em cada experimento a descrição do cultivo e do rendimento de isolamento.

OTONI et al. (1996) observaram uma eficiência de plaqueamento de 45,6% e 32,5% para plantas da espécie *P. incarnnata* com 30 a 60 dias de idade, respectivamente. Já, DORNELAS & VIEIRA (1993) observaram uma eficiência de plaqueamento de 25,5% para *P. edulis*, de 16,3% para *P. amethystina* e 18,2% para *P. cincinnata.*

### 4.2.1 *P. edulis*

No teste nº 1, onde se utilizaram 27,7mg de cotilédones e 1,5ml de solução enzimática, obteve-se rendimento 11,3 x $10^6$ de protoplastos por g de material vegetal. Após 21 dias de cultivo observou-se a presença de microcolônias. Estas foram transferidas para meio MD modificado (Anexo 6). Após 28 dias de cultivo no escuro, não se observou desenvolvimento das microcolônias. Porém, a eficiência de plaqueamento observada neste teste foi de 54,5%.

Na tabela 5 pode se observar que, embora a taxa de células mortas tenha sido 32,7%, a taxa de células acima da primeira divisão foi de 29,7%. A porcentagem de células vivas é dada

pela somatória de células vivas sem divisão, células em primeira divisão e células acima da primeira divisão, onde neste experimento obteve-se um percentual de 67,3%.

**Tabela 5** - Média, desvio padrão e porcentagem, em 30 campos por placa, de células vivas (sem divisão), de células mortas e de células em diversas fases de divisão, para três repetições de cultivo de protoplastos do teste n° 1 para espécie *Passiflora edulis*. Avaliação aos sete dias de cultivo em meio de cultura.

| Número da Placa | Células vivas (sem divisão) | Células mortas | Células em primeira divisão | Células acima da 1ª divisão | Total |
|---|---|---|---|---|---|
| 3 | 3,56±1,56 | 9,13±3,94 | 6,33±3,56 | 8,76±4,67 | 27,78 |
| 4 | 4,03±2,34 | 10,6±4,76 | 7,66±2,95 | 10,3±3,77 | 32,59 |
| 6 | 3,43±2,25 | 8,40±3,61 | 7,36±3,45 | 6,43±2,92 | 25,62 |
| Média ± Desvio Padrão | 3,67±0,31 | 9,37±1,12 | 7,11±0,70 | 8,49±1,95 | 28,66±3,57 |
| Porcentagem (%) | 12,8 | 32,7 | 24,8 | 29,7 | 100 |

No teste n.º 2, onde foi utilizado 120mg de cotilédones e 2,0ml de solução enzimática, os cotilédones tinham 13 dias de idade e permaneceram 108 horas no escuro antes do isolamento, obteve-se um rendimento de 2,4 x $10^6$ protoplastos por g de material vegetal. Aos 7 dias de cultivo foi realizada a primeira avaliação. Na tabela 6 pode se observar uma taxa de 36,6% de células acima da primeira divisão, o que significa 57,54% das células vivas. E uma taxa de 36,45% de células mortas no total da avaliação. A eficiência de plaqueamento inicial foi de 51,1%.

Após 21 dias de cultivo em meio K8 e K8P (modificados conforme anexo 2) no escuro, as microcolônias desenvolvidas foram transferidas para meio MD modificado (Anexo 6), onde permaneceram por 28 dias. Passados os 28 dias de cultivo, no escuro, os microcalos desenvolvidos foram transferidos para o mesmo meio fresco, onde permaneceram por mais 28 dias. Os calos formados foram transferidos para MS suplementado 2 $mg.L^{-1}$ de 6-BA e 2,5

$mg.L^{-1}$ Nitrato de Prata, onde permaneceram por 28 dias, no claro. Não foi observada regeneração.

**Tabela 6** – Média, desvio padrão e porcentagem de 30 campos por placa, de células vivas (sem divisão), de células mortas e de células em diversas fases de divisão, para três repetições de cultivo de protoplastos do teste n° 2 para a espécie *Passiflora edulis*. Avaliação aos sete dias de cultivo.

| Número da Placa | Células vivas (sem divisão) | Células mortas | Células em primeira divisão | Células acima da 1ª divisão | Total |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 4,00±1,83 | 8,10±3,53 | 2,93±1,53 | 10,56±6,40 | 25,59 |
| 2 | 3,06±1,68 | 8,73±3,70 | 2,70±1,68 | 7,86±4,03 | 22,35 |
| 3 | 2,46±1,50 | 10,8±4,48 | 5,46±2,68 | 9,40±3,40 | 28,12 |
| Média ± Desvio Padrão | 3,17±0,77 | 9,21±1,41 | 3,69±1,53 | 9,27±1,35 | 25,35±2,89 |
| Porcentagem (%) | 12,5 | 36,4 | 14,5 | 36,6 | 100 |

No teste n° 3, onde se utilizou 63,9mg de cotilédones com 1,5 ml de solução enzimática, os cotilédones tinham 8 dias de idade e permaneceram no escuro desde a germinação, obteve-se rendimento de isolamento de 9,5 x $10^6$ protoplastos por g de material vegetal. Efetuou-se a avaliação das microcolônias aos 19 dias de cultivo em meio K8 e K8P, ambos modificados (Anexo 2). Na tabela 7 observa-se a porcentagem de microcalos vivos e mortos após 23 dias de cultivo em meio de cultura. Obtiveram-se 65,5% de microcalos vivos e 34,5% de microcalos mortos. Assim, a eficiência de plaqueamento final foi de 65,5 %.

Passado os 21 dias de cultivo, as placas que continham as células em desenvolvimento foram descartadas, pois todas as células estavam mortas até mesmo as que haviam dividido e formado microcolônias. Isto pode ter ocorrido devido à necessidade de maior nutrição para as microcolônias quando formadas, o que poderia ter sido contornado com uma troca mais freqüente de meio de cultura ou com uma densidade menor de protoplastos plaqueados.

**Tabela 7 –** Média, desvio padrão e porcentagem de 12 campos por placa, de número de microcalos oriundos do isolamento de protoplastos, para três repetições de cultura de protoplastos do teste n° 3 para espécie *Passiflora edulis*, após 23 dias de cultivo em meio de cultura.

| Placas | Microcalos vivos | Microcalos mortos | Total |
|---|---|---|---|
| 4 | 9,85±6,05 | 4,93±2,76 | 14,80 |
| 3 | 10,0±4,56 | 5,48±3,60 | 15,50 |
| Média ± Desvio Padrão | 9,92±0,10 | 5,20±0,40 | 15,15±0,49 |
| Percentagem (%) | 65,5 | 34,5 | 100 |

No teste n° 4, onde utilizou-se 125,6mg de cotilédones adicionado de 1,5ml de solução enzimática, que tinham 14 dias de idade e permaneceram desde a germinação no escuro, obteve-se rendimento 4,6 x $10^6$ de protoplastos por g de material vegetal. Efetuou-se a avaliação das microcolônias formadas aos 19 dias de cultivo. Após 21 dias de cultivo as placas contendo as células foram descartadas, as células estavam mortas, até mesmo as que haviam apresentado divisão.

Foi realizada avaliação de médias, de desvio padrão e de porcentagem das microcolônias vivas e mortas aos 23 dias de cultivo. Na tabela 8 observa-se que houve uma taxa de 55,8% para os calos vivos e de 44,2% para calos oxidados obtendo-se uma eficiência de plaqueamento final de 55,8%, aos 23 dias de cultivo.

**Tabela 8** – Média, desvio padrão e porcentagem de 12 campos por placa, do número de microcalos oriundos do isolamento de protoplastos, para 2 repetições de cultura de protoplastos do teste n° 4 para espécie *Passiflora edulis*, após 23 dias de cultivo em meio de cultura.

| Placas | Microcalos vivos | Microcalos mortos | Total |
|---|---|---|---|
| 1 | 7,80±3,98 | 5,07±3,07 | 12,87 |
| 4 | 5,36±3,00 | 5,35±3,36 | 10,71 |
| Média ± Desvio Padrão | 6,58±1,72 | 5,21±0,19 | 11,79±1,52 |
| Percentagem(%) | 55,8 | 44,2 | 100 |

### 4.2.2 *P. nitida*

No teste nº 1 obteve-se um rendimento de 3,5 x $10^6$ de protoplastos por g de material vegetal. Realizaram-se avaliações de células vivas, mortas e em divisão aos 7 dias (placas n° 2, n° 3 e n° 4) e aos 12 dias (placas n° 1, n° 2 e n° 4) de cultivo. Na tabela 9 pode se observar uma baixa taxa de células em divisão de 20,8% (eficiência de plaqueamento inicial) aos 7 dias de cultivo, tendo 47,8% de células vivas e 31,4% de células mortas.

Aos 21 dias de cultivo as microcolônias foram transferidas para meio MD modificado (Anexo 5). Com 26 dias observou-se que todas as microcolônias haviam se oxidado sem nenhum desenvolvimento adicional.

**Tabela 9** - Média, desvio padrão e porcentagem de células vivas (sem divisão), de células mortas e de células em diversas fases de divisão, de 30 campos por placa, para três repetições de cultura de protoplastos do teste n° 1 para a espécie *Passiflora nitida.* Avaliação aos 7 dias de cultivo.

| Número da Placa | Células vivas (sem divisão) | Células mortas | Células em primeira divisão | Células acima da 1ª divisão | Total |
|---|---|---|---|---|---|
| 2 | 7,30±5,0 | 7,90±5,7 | 1,03±1,7 | 0,80±0,9 | 17,03 |
| 3 | 6,60±2,9 | 4,76±2,6 | 3,00±2,6 | 0,76±0,7 | 15,12 |
| 4 | 8,93±4,0 | 2,26±2,1 | 3,10±2,6 | 1,20±1,3 | 15,49 |
| Média ± Desvio Padrão | 7,61±1,19 | 4,97±2,8 | 2,37±1,1 | 0,92±0,2 | 15,97±1,1 |
| Porcentagem (%) | 47,8 | 31,4 | 14,9 | 5,9 | 100 |

Na tabela 10 pode se observar avaliação aos 12 dias de cultivo da placa n° 2 que também foi avaliada aos 7 dias de cultivo. A média de células em divisão passou de 1,83 para 4,26 e a média de células mortas teve um pequeno acréscimo de 7,9 para 8,83. A porcentagem de células em divisão aumentou de 20,8% (eficiência de plaqueamento inicial) para 32% (eficiência de plaqueamento final).

**Tabela 10** – Média, desvio padrão e porcentagem de células vivas (sem divisão), de células mortas e de células em diversas fases de divisão, de 30 campos por placa para 3 repetições de cultura de protoplastos do teste n° 1 para a espécie *Passiflora nitida.* Avaliação aos 12 dias de cultivo.

| Número da Placa | Células vivas (sem divisão) | Células mortas | Células em primeira divisão | Células acima da 1ª divisão | Total |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 1,75±1,29 | 6,14±2,81 | 1,14±0,97 | 2,46±1,89 | 11,49 |
| 2 | 0,93±1,11 | 8,83±4,18 | 0,83±0,91 | 3,43±3,72 | 14,02 |
| 4 | 3,63±2,84 | 5,80±3,32 | 1,46±1,38 | 3,43±1,87 | 14,32 |
| Média ± Desvio Padrão | 2,10±1,38 | 6,92±1,66 | 1,14±0,31 | 3,10±0,56 | 13,27±1,55 |
| Porcentagem (%) | 15,8 | 52,2 | 8,6 | 23,4 | 100 |

No teste nº 2 foram utilizadas células em suspensão, obtidas de calogênese de discos foliares de *P. nitida*. Após a digestão enzimática obteve-se um rendimento de 1,2 x $10^6$ de protoplastos por g de material vegetal. Realizou-se a avaliação das células vivas, mortas e em divisão aos 7 dias de cultivo (Tabela 11). A porcentagem de células vivas após 7 dias de cultivo foi de 24,1%. Destas, 7% eram de células que apresentavam divisão, algumas já formando microcolônias (10,4%), sendo de 17,4 % a eficiência de plaqueamento inicial e de 6,7% a taxa de células que não haviam entrado em divisão. A porcentagem de células mortas mostrou-se alta 75,9%.

Após 21 dias de cultivo as microcolônias formadas foram transferidas para meio MD modificado (Anexo 7), com o dobro da concentração dos hormônios 2,0 $mg.L^{-1}$ 6-BA, 5,0 $mg.L^{-1}$ NAA e 5,0 $mg.L^{-1}$ IAA, no escuro. Após 15 dias os micro calos formados foram transferidos para meio MD modificado (Anexo 7), permanecendo 28 dias no escuro, não foi observado desenvolvimento.

**Tabela 11** - Média, desvio padrão e porcentagem de 30 campos por placa, de células vivas (sem divisão), de células mortas e de células em diversas fases de divisão, para três repetições de cultura de protoplastos do teste n° 2 para a espécie *Passiflora nitida.* Avaliação aos 7 dias de cultivo.

| Número da Placa | Células vivas (sem divisão) | Células mortas | Células em primeira divisão | Células acima da 1ª divisão | Total |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 1,5 | 35,3 | 1,9 | 7,1 | 45,8 |
| 4 | 1,8 | 32,3 | 2,7 | 4,4 | 41,2 |
| 5 | 4,8 | 23,9 | 3,9 | 1,1 | 33,7 |
| Media ± Desvio Padrão | 2,7±1,8 | 30,5±5,9 | 2,8±1,0 | 4,2±3,0 | 40,2±6,1 |
| Porcentagem (%) | 6,7 | 75,9 | 7,0 | 10,4 | 100 |

### 4.3 Verificação do Efeito da Idade de Cotilédones e do Efeito da Luz, Durante a Germinação de Sementes, no Comportamento de Protoplastos Isolados de *Passiflora edulis*

Quando os cotilédones possuíam 6 dias de idade e foram germinados na ausência de luz obteve-se um rendimento do isolamento de 14,2 x $10^6$ de protoplastos por g de material vegetal e quando germinados na presença de luz obteve-se o rendimento do isolamento de 32,0 x $10^6$ de protoplastos por g de material vegetal (Tabela 12).

Quando os cotilédones possuíam 21 dias de idade e foram germinados na ausência de luz obteve-se um rendimento do isolamento de 3,2 x $10^6$ protoplastos por g de material vegetal e quando foram germinados na presença de luz obteve-se 1,2 x $10^6$ protoplastos por g de material vegetal.

As células provenientes de cotilédones com 6 dias de idade foram cultivadas apenas até 4ª troca do meio de cultura (14 dias), pois aparentemente estavam mortas, mesmo as que entraram em divisão. As células provenientes de cotilédones com 21 dias de idade se dividiram e formaram microcolônias. Estas foram transferidas para meio MD modificado (Anexo 6), permanecendo no escuro por 28 dias. Notou-se um insignificante desenvolvimento das microcolônias em pequenos calos, transferiu-se os calos para meio MD modificado

(Anexo 6) fresco, onde permaneceu por mais 28 dias no escuro. Não se observou desenvolvimento dos mesmos, sendo então descartados. A tabela 12 apresenta o número total de protoplastos isolados para cotilédones com 6 e 21 dias de idade de sementes germinadas na luz ou no escuro.

**Tabela 12 -** Idade e peso dos cotilédones utilizados como explantes e número de protoplastos isolados no experimento sob luz e ausência de luz.

| Tratamentos | Média da idade do explante | Peso do material vegetal (mg) | Número de protoplastos isolados/ml |
|---|---|---|---|
| 1 (Ausência de luz) | 6 dias | 137,0 | $43,0 \times 10^5$ |
| 2 (Presença de luz) | 6 dias | 140,8 | $20,0 \times 10^5$ |
| 3 (Ausência de luz) | 21 dias | 63,0 | $2,0 \times 10^5$ |
| 4 (Presença de luz) | 21 dias | 297,0 | $3,5 \times 10^5$ |

Realizaram-se as avaliações das células vivas, mortas e em divisão aos 7 dias de cultivo, para os 4 tratamentos (Tabela 13). A taxa de células em divisão para o tratamento que utilizou cotilédones com 6 dias de idade foi de 3,7% e 2,9%, sob ausência e presença de luz, respectivamente. E para o tratamento que utilizou cotilédones com 21 dias de idade foi de 6,6% e 19,5%, sob ausência e presença de luz, respectivamente.

**Tabela 13 -** Média, desvio padrão e porcentagem de 30 campos por placa, de células vivas (sem divisão), de células mortas e de células em diversas fases de divisão para a espécie *Passiflora edulis.* Avaliação aos 7 dias de cultivo.

| Tratamentos | Células vivas (sem divisão) | Células mortas | Células em primeira divisão | Células acima da 1ª divisão | Total |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 (Ausência de luz) | 7,5±1,3 | 19±1,5 | 0,96±0,01 | 0,08±0,06 | 27,5 4 |
| 2 (Presença de luz) | 4,0±0,8 | 11±0,3 | 0,57±0,27 | 0,23±0,21 | 15,80 |
| 3 (Ausência de luz) | 19,6±4 | 9,7±0,7 | 2,00±0,20 | 0,07±0,09 | 31,37 |
| 4 (Presença de luz) | 4,6±0,2 | 4,9±0,2 | 1,8±0,4 | 0,5±0,12 | 11,80 |

Nos tratamentos em que os cotilédones apresentavam 21 dias de idade as porcentagens de células em divisão foram maiores. Embora os cotilédones com 6 dias de idade tenham apresentado maior rendimento, os protoplastos não conseguiram sustentar a divisão.

## 4.4 Fusão de Protoplastos entre Espécies de *Passiflora* spp.

### 4.4.1 Fusão entre *P. edulis* e *P. cincinnata* utilizando solução de fusão com diferentes valores de pH

Neste experimento para espécie *P. cincinnata* obteve-se o rendimento de 3,0 x $10^6$ protoplastos por g de material vegetal e de 103,0 x $10^6$ protoplastos por g de material vegetal para a espécie *P. edulis*.

Foram realizados dois experimentos de fusão simultaneamente, onde apenas o que diferiu foi o valor do pH da solução de fusão. Durante o procedimento da fusão foi possível realizar a contagem de dímeros nos eventos de aglutinação de protoplastos, que são mostrados nas tabelas 14 e 15.

Para a solução de fusão com pH 5,8 obteve-se a média de 4,8 eventos por campo, em 5 campos contados, e a média de dímeros por campo foi de 0,80. Para a solução de fusão com pH de 7,0 foi observada uma média de 6,0 eventos por campo, em 5 campos contados, e a media de 1,2 dímero por campo.

Após 4 dias de cultivo em meio de cultura K8P e K8, ambos modificado (Anexo 2), todas as placas apresentaram contaminação, sendo então descartadas.

### 4.4.2 Fusão entre *P. edulis* e *P. cincinnata* com regeneração de plantas provenientes de calos formados dos produtos de fusão

Neste experimento obteve-se uma produção total de 273,0 x $10^6$ protoplastos por para *P. edulis* e de 61,3 x $10^6$ protoplastos para espécie *P. cincinnata*. Após três meses do procedimento de fusão foram realizadas avaliações onde se anotou o número e porcentagem de plantas regeneradas, calos verdes e oxidados. Foi obtido um máximo de 2265 calos (Tabela 16) para o procedimento 1 (Tabela 3) e o mínimo de 101 calos (Tabela 16) no procedimento 2 (Tabela 3). As maiores porcentagens de regeneração foram encontradas no procedimento 3 (Tabela 3) de 5,86% e de 5,02% para o procedimento 4 (Tabela 3).

**Tabela 14** - Contagem de eventos de aglutinação de protoplastos e de dímeros no momento da fusão, utilizando solução de fusão com PEG 30% (P. M. 4000), autoclavada e o valor do pH 5,8.

| Campo | Eventos | Dímeros |
|---|---|---|
| 1 | 5 | 1 |
| 2 | 6 | 1 |
| 3 | 4 | 0 |
| 4 | 6 | 1 |
| 5 | 3 | 1 |
| Média ± Desvio Padrão | 4,80 ± 1,30 | 0,80 ± 0,44 |

**Tabela 15 -** Contagem de eventos de aglutinação de protoplastos e de dímeros no momento da fusão, utilizando solução de fusão com PEG 30% (P. M. 4000), autoclavada e valor do pH 7,0.

| Campo | Eventos | Dímeros |
|---|---|---|
| 1 | 5 | 1 |
| 2 | 9 | 2 |
| 3 | 4 | 0 |
| 4 | 5 | 1 |
| 5 | 7 | 2 |
| Média ± Desvio Padrão | 6,00 ± 2,00 | 1,20 ± 0,83 |

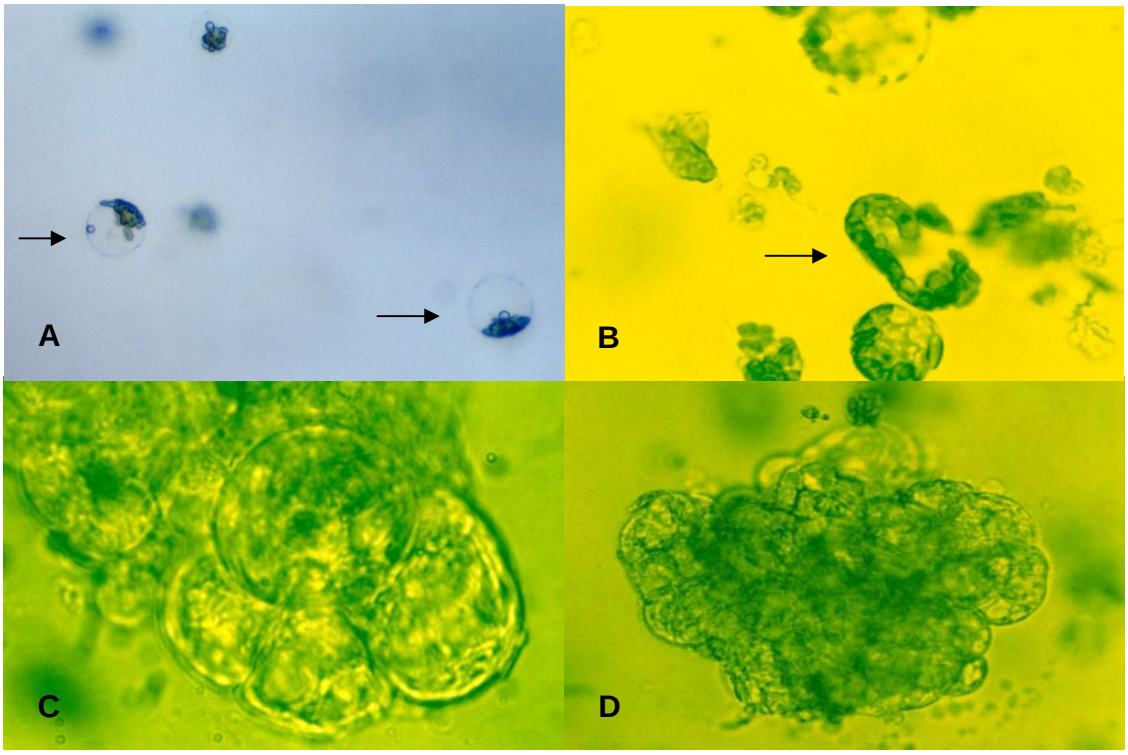


**Figura 1** - Isolamento e cultura de protoplastos e de produtos de fusão: **a.** Protoplastos isolados de cotilédones da espécie *P. edulis*. Setas indicando protoplastos. **b.** Fusão de protoplastos no experimento com as espécies *P. edulis* e *P. nitida*, após adição da solução de PEG. Setas indicando possível fusão. **c.** Células aos 15 dias de cultivo em divisão da espécie *P. edulis*. **d.** Microcalo formado aos 15 dias de cultivo em experimento de fusão entre *P. edulis* e *P. cincinnata*.

**Tabela 16** - Número e porcentagem de plantas regeneradas, de calos verdes e de calos inoculados no experimento de fusão de protoplastos entre as espécies *Passiflora edulis* e *P. cincinnata* após 3 meses de cultivo

| Tratamento | Número de plantas | | Número de calos verdes | | Número de calos inoculados |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 19 | 0,82% | 40 | 1,72% | 2265 |
| 2 | 02 | 1,98% | 05 | 4,95% | 101 |
| 3 | 57 | 5,86% | 25 | 2,57% | 972 |
| 4 | 46 | 5,02% | 56 | 6,11% | 917 |
| 5 | 04 | 1,13% | 34 | 9,55% | 356 |

Foram obtidas 269 plantas regeneradas no total, de todos os procedimentos, após 1 ano de cultivo. Cada planta recebeu um número de identificação. Realizou-se análise citogenética nas plantas que apresentaram raízes. As análises moleculares foram efetuadas em plantas poliplóides, confirmadas por análises citogenéticas, e em plantas que apresentavam morfologia intermediária aos pais.

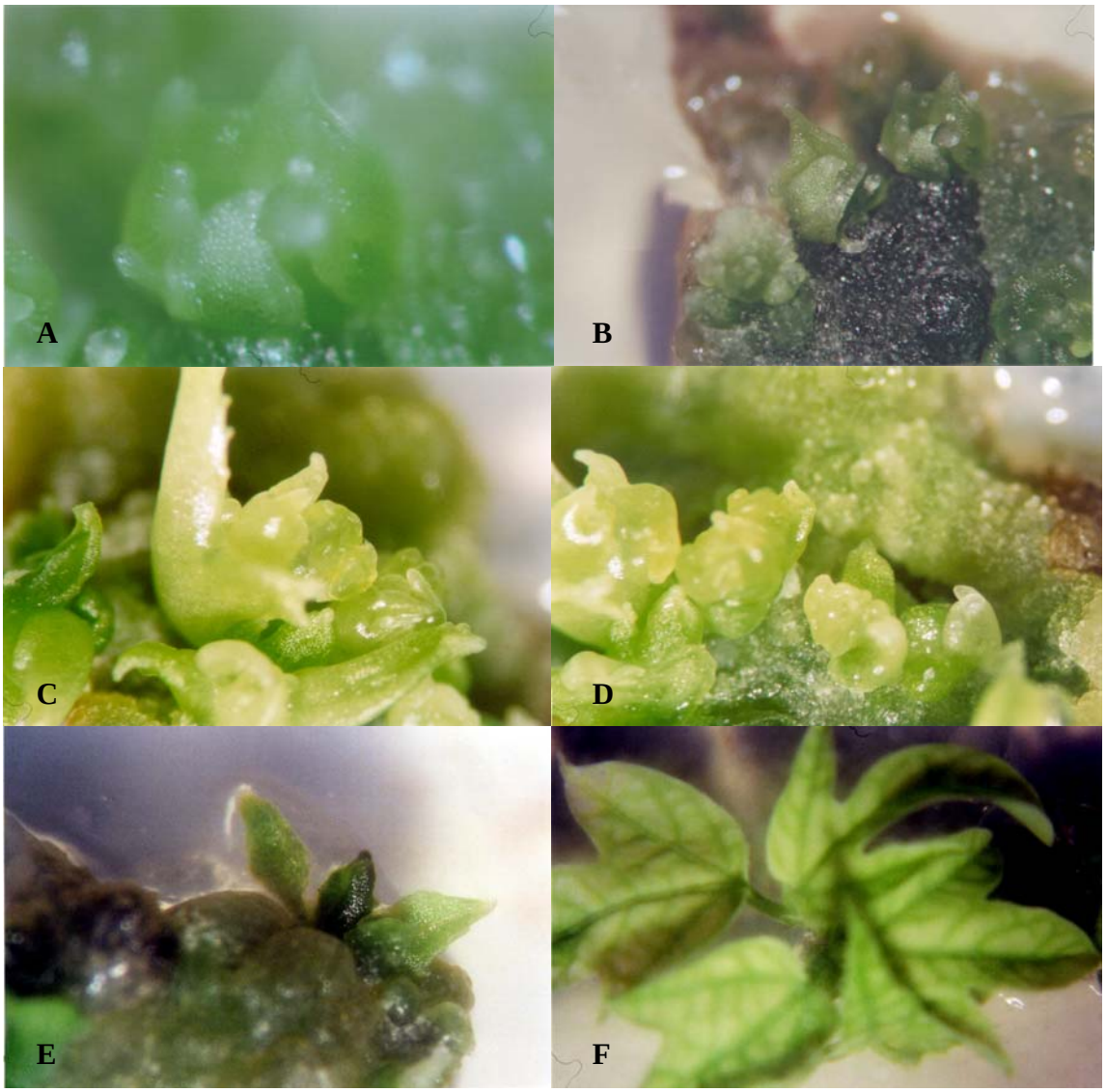


**Figura 2** – Regeneração de híbridos somáticos putativos entre *Passiflora edulis* e *P. cincinnata*, via organogênese adventícia: **a**, **b**, **c**, **d** e **e** - Gemas se desenvolvendo em calos provenientes da fusão; **f.** Planta regenerada a partir de calos formados do produto de fusão.

Nas plantas identificadas com o número 02, 41, 64 e 178 foi notada a presença de uma estrutura floral. Em uma das flores foi possível observar o androceu e o gineceu, sendo uma flor perfeita (Figura 3b). Em outra, a estrutura floral encontrada possuía corona, característica da flor de *Passiflora* spp., de cor rosa clara, com a parte masculina e feminina desenvolvida parcialmente (Figura 3d). Todas as plantas que apresentaram flores foram provenientes do procedimento 1 (Tabela 3) onde os calos ficaram 16 dias em meio MD 2x (Anexo 7) e foram transferidos diretamente para o claro em meio MS/R.

SCORZA & JANICK (1980) realizaram estudos sobre os aspectos de florescimento *in vitro* induzido pelo hormônio citocinina. Explantes foliares de hipocótilo e gavinhas de *P. suberosa* floresceram *in vitro* no meio de cultura MS suplementado de 3% de sacarose, glicina e vitaminas. O tratamento que se mostrou efetivo para indução de florescimento foi o que continha 0,1 $mg.L^{-1}$ de 6-BA, o florescimento ocorreu em 21 dias de cultivo. Estes autores relatam que a citocinina é um requisito absoluto para o florescimento *in vitro* de *P. suberosa*. No entanto o explante de tecido basal ou jovem não floresce igualmente na sua presença. Isto sugere que outro fator presente no tecido do explante que produz flor inicia o florescimento juntamente com a citocinina.

Ainda, dentro do procedimento 1 observou-se regeneração via embriogênese somática nos calos, embora a principal via de regeneração em *Passiflora* spp seja a organogênica. Na figura 3 observa-se um embrião desenvolvendo-se a partir do calo formado pelo produto de fusão. ROUSTAN et al. (1990) estudaram os efeitos do nitrato de prata e do etileno na embriogênese somática de cenoura (*Daucus carota* L.). Estes autores observaram que o nitrato de prata, nas concentrações de 10-20μM, causou duas vezes o aumento no número de eventos de embriogênese somática. E sugerem que o nitrato de prata estimula a embriogênese somática em cenouras pela inibição da ação do etileno.

Em nossos experimentos o nitrato de prata foi componente sempre presente na concentração de 2,5$mg.L^{-1}$ nos meios de cultura para crescimento de calo e para regeneração de plantas (PASSOS et al., 2002b).

**Figura 3** – Florescimento *in vitro* e embriogênese somática em plantas regeneradas de calos oriundos da fusão entre *Passiflora cincinnata* e *P. edulis*: **a**, **b**, **c**, **d** e **e**. florescimento *in vitro* no procedimento 1; seta de **a**, **c** e **e** indicando o botão floral; seta 1 em **b** indicando a parte feminina e seta 2 indicando parte masculina da flor aberta; seta em **d** indicando a corona; **f**. planta regenerada do calo via embriogênese somática.

### 4.4.3 Fusão entre as espécies *Passiflora edulis* e *Passiflora nitida*

Para a espécie *P. edulis* foi obtido 1,1 x $10^5$ protoplastos totais e para espécie *P. nitida* 10 x $10^5$ protoplastos totais. Foram realizadas as avaliações aos 4 dias e 14 dias de cultivo.

Para as placas com volume inicial de 9,0ml de meio de cultura o valor da eficiência de plaqueamento inicial foi de 24,3% e para as placas com volume inicial de 9,6ml de meio de cultura foi de 31,1%, aos 4 dias de cultivo (Tabela 17). As placas com volume inicial de 9,0 e 9,6ml tiveram uma porcentagem muito baixa de células mortas (0,4% e 0,0% respectivamente).

**Tabela 17** - Média, desvio padrão e porcentagem de células vivas (sem divisão), de células mortas e de células em diversas fases de divisão, para duas placas e 30 campos por placa, de cada cultura de protoplastos do produto de fusão entre *P. edulis* e *P. nitida*. Avaliação aos quatro dias de cultivo.

| Número da Placa | Células vivas (sem divisão) | Células mortas | Células em início de primeira divisão | Células em 1ª divisão | Total |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 (9ml) | 8,30±3,50 | 0,00±0,00 | 2,40±1,70 | 0,20±0,40 | 10,90 |
| 2 (9ml) | 6,70±2,90 | 0,07±0,25 | 2,00±1,50 | 0,23±0,43 | 9,00 |
| Média ± Desvio Padrão | 7,5±1,33 | 0,03±0,05 | 2,20±0,28 | 0,21±0,02 | 9,95±1,34 |
| 3 (9,6ml) | 9,80±3,80 | 0,00±0,00 | 4,10±2,30 | 0,17±0,38 | 14,07 |
| 4 (9,6ml) | 11,0±4,00 | 0,00±0,00 | 5,10±2,70 | 0,00±0,00 | 16,10 |
| Média ± Desvio Padrão | 10,4±0,85 | 0,00±0,00 | 4,6±0,70 | 0,08±0,12 | 15,1±1,43 |

Para a placa n° 3, que continha um volume inicial de 9,6ml de meio de cultura, realizou-se avaliação aos 13 dias de cultivo (Tabela 18).

Foram avaliadas 6 gotas inteiras contando-se o número de células que apresentavam divisão e formação de microcolônias. A média de células em primeira divisão por gota de

agarose foi de 81,0±23,4 e de células acima da primeira divisão foi de apenas 3,2±1,9. Tendo uma média de 2,3±1,9 microcolônias.

**Tabela 18** - Avaliação da média e desvio padrão de células em divisão e microcolônias formadas aos 13 dias de cultivo, em gotas de agarose, da placa nº 3, para produto de fusão entre *P. nitida* e *P. edulis*.

| Gota | Células em primeira divisão | Células acima da 1ª divisão | Microcolônias |
|---|---|---|---|
| 1 | 96 | 05 | 02 |
| 2 | 44 | 05 | 01 |
| 3 | 84 | 03 | 04 |
| 4 | 95 | 04 | 05 |
| 5 | 105 | 00 | 02 |
| 6 | 62 | 02 | 00 |
| Média ± Desvio Padrão | 81,0±23,4 | 3,2±1,9 | 2,3±1,9 |

Na tabela 19 observa-se a eficiência de plaqueamento final para as placas com volume inicial de 9,0ml e para a placa com volume inicial de 9,6ml de meio de cultura, que foram de 31,5 e 23,4%, respectivamente. Aparentemente, placas com volume inicial de 9,0ml apresentaram resultados melhores. Mas, para comprovação desses resultados há necessidade de se repetir o experimento.

### 4.5 Efeito do Hormônio Ácido Indolbutírico (AIB) nas Plantas Regeneradas da Fusão entre *P. edulis* e *P. cincinnata*

Neste experimento foram avaliados o número e porcentagem de indivíduos que emitiram raízes quando cultivados em meio de cultura com e sem hormônio IBA (1,0 $mg.L^{-1}$). Na tabela 20 observa-se uma porcentagem de 21% de indivíduos que emitiram raízes quando cultivado em meio com IBA e 26% de indivíduos que emitiram raízes quando cultivado em meio sem hormônio. O resultado observado deve ser devido à utilização de

uma dose inadequada da auxina, pois se esperava que as plantas quando submetidas ao tratamento com o hormônio IBA, tivessem uma porcentagem maior de emissão de raízes.

**Tabela 19** - Média, desvio padrão e porcentagem de 30 campos por placa, de células vivas (sem divisão), de células mortas e de células em diversas fases de divisão. Avaliação aos 14 dias de cultivo. Para cultura de protoplastos do produto de fusão de *P. nitida* e *P. edulis*.

| Número da Placa | Células vivas (sem divisão) | Células mortas | Células em primeira divisão | Células acima da 1ª divisão | Total |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 (9ml) | 1,30±1,40 | 2,60±1,40 | 1,20±1,00 | 0,43±0,80 | 5,53 |
| 2 (9ml) | 0,83±0,83 | 3,97±1,60 | 1,80±1,70 | 0,57±0,82 | 7,17 |
| Média ± Desvio Padrão | 1,06±0,33 | 3,28±0,96 | 1,50±0,42 | 0,50±0,10 | 6,35±1,16 |
| 5 (9,6ml) | 2,40±1,80 | 5,70±2,50 | 1,70±1,10 | 0,77±1,00 | 10,57 |

**Tabela 20** - Número e porcentagem de plantas que emitiram ou não raízes sob cultivo em meio de cultura com IBA e meio MS.

| Número de plantas | Meio de cultura | Plantas com raiz | | Plantas sem raiz | |
|---|---|---|---|---|---|
| 81 | MS+IBA | 17 | 21% | 64 | 79% |
| 100 | MS | 26 | 26% | 74 | 74% |

### 4.6 Caracterização dos Híbridos

#### 4.6.1 Análise citogenética através da contagem de cromossomos

Para a análise citogenética foram utilizadas 15 plantas, sendo elas os indivíduos n° 8, n° 40, n° 108, n° 124, n° 132, n° 157, n° 171,n° 175, n° 195, n° 203, n° 210, n° 227, n° 228, n° 240, n° 258 . Dos indivíduos analisados 11 apresentaram 4n=36, sendo eles n° 8, n° 40, n° 108, n° 124, n° 132, n° 157, n° 195, n° 227, n° 228, n° 240, n° 258 e 4 apresentaram

2n=18 n° 171, n° 175, n° 203, n° 210. A figura 4 apresenta fotos dos cromossomos em metáfase para 6 diferentes plantas, sendo que apenas uma apresenta 2n=18 cromossomos. JOURDAN & SALAZAR (1993) relatam que podem ser encontradas plantas aneuplóides ou com ploidias superiores a 4n em fusões envolvendo protoplastos.

SOARES-SCOOT (1998) estudou a caracterização citogenética de alguns híbridos interespecíficos de *Passiflora*, no híbrido sexual *P. edulis f. flavicarpa* x *P. setacea* o número cromossômico observado foi de 2n = 18. No híbrido somático *P. edulis f. flavicarpa* + *P. incarnata* mostra 2n = 36. Este híbrido foi originado por fusão de protoplastos e deste modo, dois lotes cromossômicos das espécies genitoras foram reunidos no núcleo. Como resultado desta fusão foram obtidas células com 2n = 36, ou seja, a soma dos números cromossômicos das espécies genitoras.

A hibridação interespecífica é o mecanismo de obtenção de variabilidade genética mais utilizado no melhoramento genético. Na hibridação sexual normalmente os genitores já passaram pela fase reducional da meiose para a produção dos gametas masculinos e femininos e, assim, o número cromossômico deste híbrido deve ser igual ao das espécies genitoras, conforme observado nos estudo com híbrido sexual *P. edulis f. flavicarpa* x *P.setacea* (SOARES-SCOOT, 1998). No caso dos híbridos somáticos não há redução do número cromossômico, já que as células genitoras não passam por meiose. Estas células são de origem somática e o híbrido recebe um lote diplóide de cada célula genitora, conforme observado no híbrido somático *P. edulis f. flavicarpa* + *P. incarnata* (SOARES-SCOOT, 1998). Segundo WOLTERS et al. (1994), os genomas completos de duas espécies diferentes podem ser combinados em uma única célula através da hibridação somática. Se as duas espécies em questão são suficientemente próximas, espera-se que os híbridos resultantes sejam geneticamente balanceados e conseqüentemente contenham a soma dos complementos cromossômicos parentais.

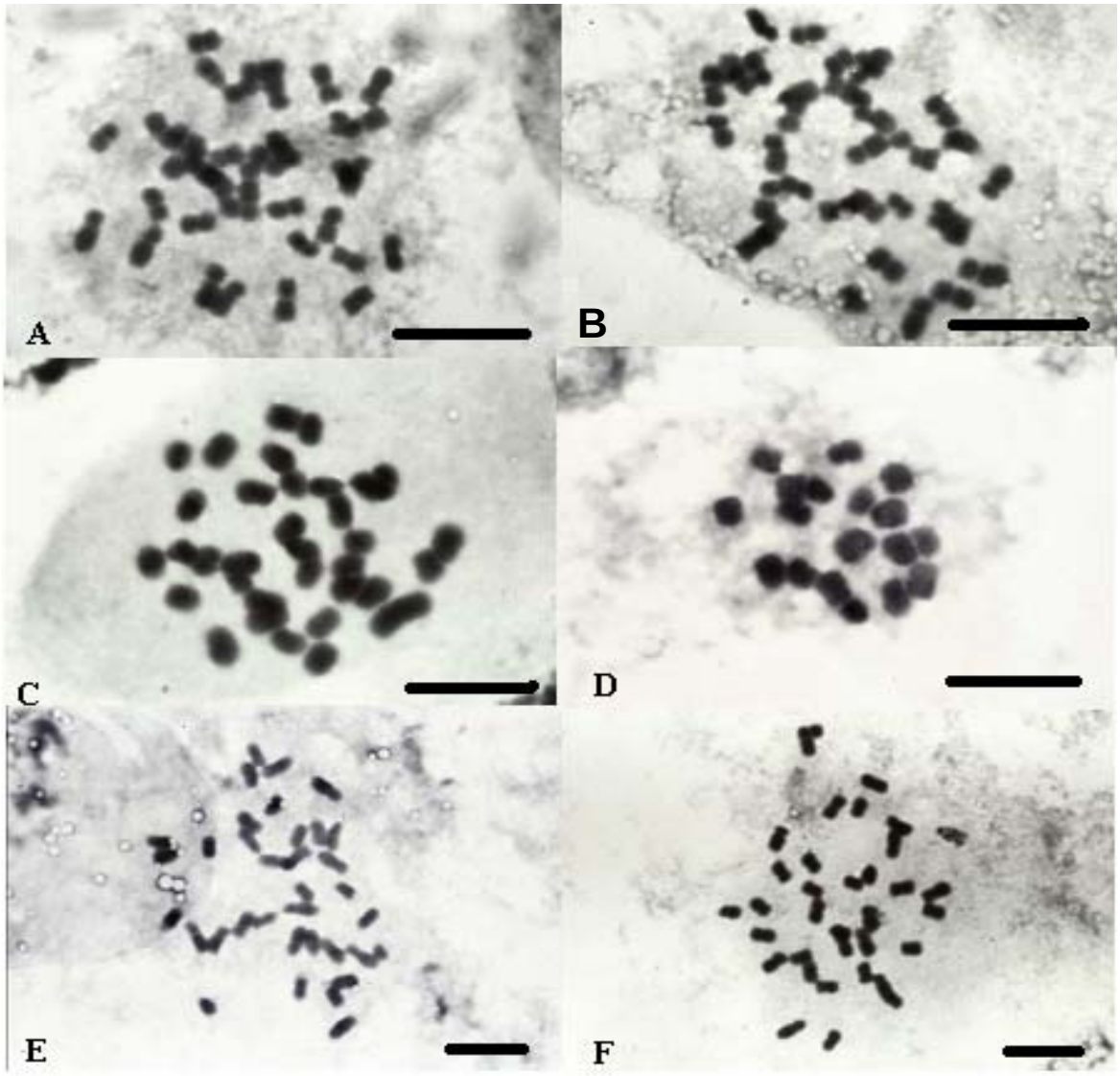


**Figura 4 -** Cromossomos metafásicos de plantas tetraplóides (5) e diplóide (1) de indivíduos regenerados de calos provenientes da fusão de protoplastos entre *Passiflora edulis* e *P. cincinnata*: **a**, **b**, **c**, e **e**. Indivíduos n° 228, n° 08, n° 258, n° 132 e n° 227, respectivamente, com 4n = 36 cromossomos; **d**. Indivíduo n° 171 com 2n = 18 cromossomos. Barra de 10µm.

### 4.6.2 Análise molecular

A confirmação das plantas híbridas foi efetuada por meio da análise molecular utilizando os marcadores RAPD e AFLP.

#### 4.6.2.1 Marcadores RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso)

Dos 15 *primers* testados dez (OPH 4, 8, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18 e 19) proporcionaram polimorfismo de bandas, ao se comparar inicialmente, apenas os parentais. Estes mesmo *primers* foram utilizados nas análises posteriores que envolviam os híbridos putativos, além dos parentais.

O resultado obtido encontra-se na figura 5, onde se utilizou o *primer* OPH13. Foram consideradas apenas bandas que se apresentaram mutuamente exclusiva nos parentais, estando, todavia, presente na mistura física dos parentais. Com a utilização do *primer* OPHH13 foi observada a amplificação de fragmentos específicos dos parentais, sendo conclusiva a determinação da hibridação em nível molecular. Também foi possível observar a presença de bandas adicionais, que não foram visualizadas em nenhum dos pais, o que sugere uma possível recombinação entre o material genético.

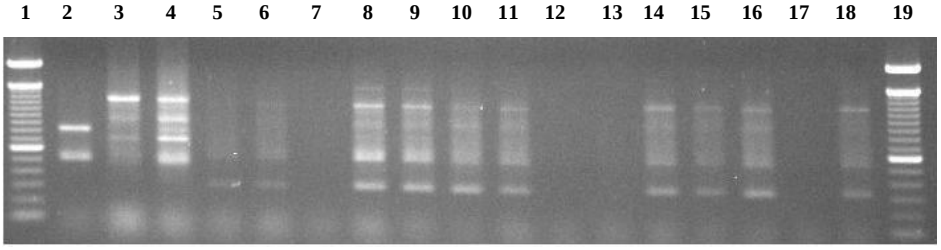


**Figura 5** - Eletroforese em gel de agarose (1,4%) do produto de PCR dos híbridos putativos provenientes da fusão entre *Passiflora edulis* e *P. cincinnata*.

Onde, 1 - Padrão de DNA de 100pb *ladder*; 2 - *P. cincinnata*; 3 - *P. edulis*; 4 - Mistura física; 5 - Indivíduo 8; 6 - Indivíduo 40; 7 - Indivíduo 108; 8 - Indivíduo 124 ; 9 - Indivíduo 132 ; 10 - Indivíduo 157; 11 - Indivíduo 171; 12 - Indivíduo 195; 13 - Indivíduo 203; 14 - Indivíduo 221; 15 - Indivíduo 227; 16 - Indivíduo 228; 17 - Indivíduo 240; 18 - Indivíduo 258; 19 - Padrão de DNA de 100pb *ladder.*

Pelos padrões de bandas apresentados pelos indivíduos 8, 9 e 18 na figura, verificou-se que continham o material genético dos pais, *P. edulis* e *P. cincinnata*.

O uso de marcadores moleculares é ideal para confirmação da hibridicidade. Muitos marcadores têm sido usados, incluindo RAPD (LIU et al., 2005). A técnica de RAPD oferece inúmeras vantagens, dentre elas rapidez, relativa simplicidade de execução e considerável freqüência na determinação de polimorfismo (OTONI, 1995).

Em OTONI (1995) observou-se quatro híbridos obtidos pela fusão de protoplastos, esta confirmação foi dada através do marcador molecular RAPD. ARAÚJO (2004) com a mesma técnica obteve a confirmação de uma planta híbrida, produto de fusão de protoplastos irradiados para espécie *Nicotiana*. Segundo BINSFELD (1999) foi possível constatar a transferência genômica parcial do genoma de *Helianthus maximiliani* para *Helianthus annus*, pela identificação das bandas comuns ao doador e receptor do micronúcleo nas plantas regeneradas após a fusão, através da técnica de RAPD.

#### 4.6.2.2 Marcadores AFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados)

A figura 6 confirma a origem híbrida das plantas analisadas, através do marcador molecular AFLP. A partir de oito combinações de *primers EcoRI* e *MseI* (AAC/CAC; ACC/CAC; AAG/CAC; ACC/CTG; AAC/CTG; ACA/CAC; ACA/CTT; ACC/CTG), inicialmente testadas, duas combinações (AAC/CAC; ACA/CAC) foram favoráveis para confirmação da presença do genoma de ambos os pais nos híbridos putativos, ou seja, presença de banda num pai e ausência no outro. Em uma das combinações testadas (AAC/CTG) foi observada apenas presença de bandas do pai *P. cincinnata*, embora as plantas escolhidas para análise molecular apresentassem características morfológicas que lembram *P. edulis*. Tal resultado também sugere a origem híbrida do material testado.

Os indivíduos nº 8, nº 40, nº 124, nº 132, nº 157, nº 221, nº 227, nº 210, nº 258 e nº 108 apresentaram material genético de ambos os pais. Ou seja, todos os indivíduos testados, exceto nº 228 que obteve padrão de banda diferente dos pais, confirmaram a hipótese sugerida pelas análises citogenéticas, onde os indivíduos com 36 cromossomos mostraram-se híbridos.

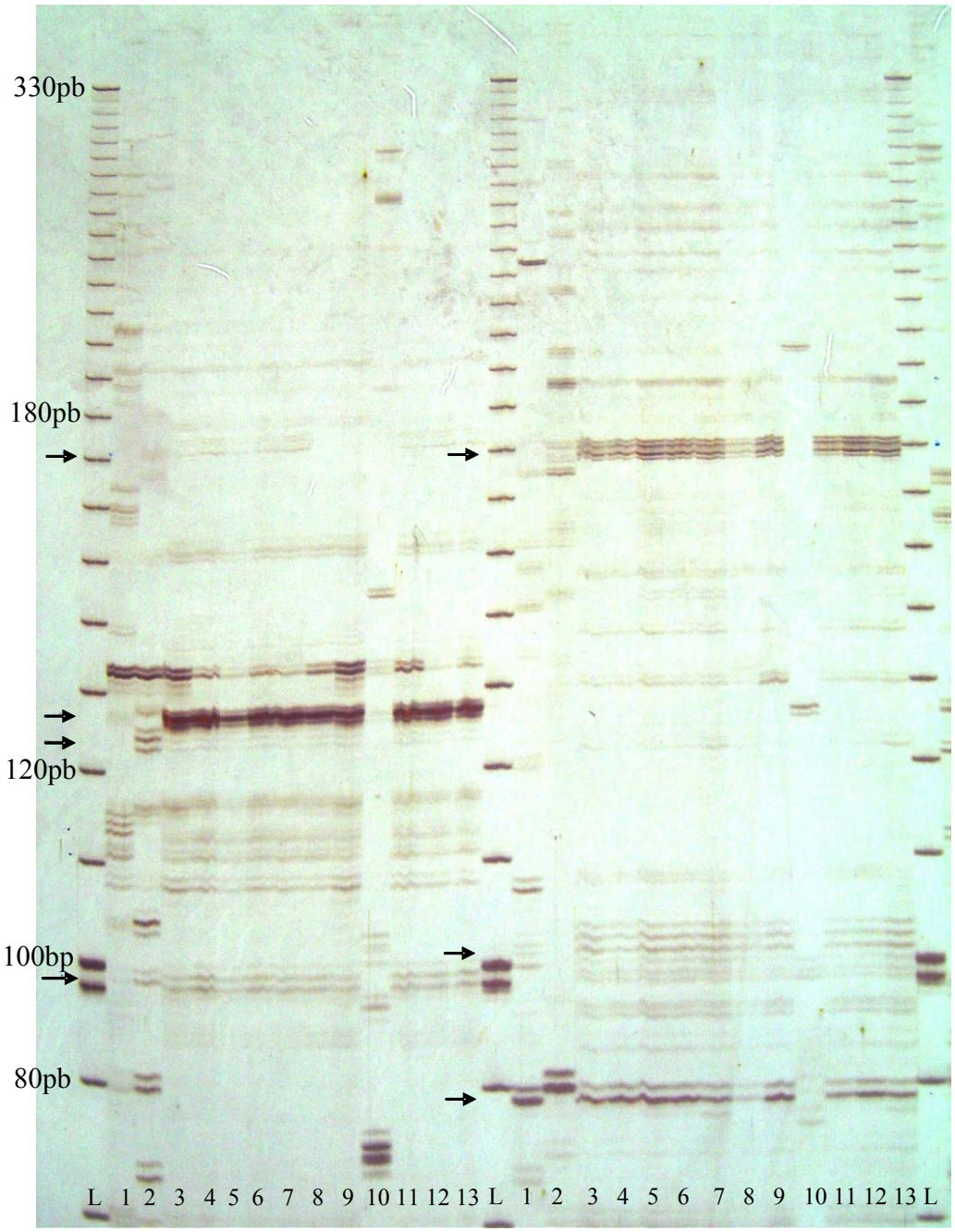


**FIGURA 6.** Resultado parcial do polimorfismo dos fragmentos amplificados com primers AFLP (EcoRI – ACC/ MseI – CAC e EcoRI – ACA/ MseI – CAC). As setas indicam origem híbrida.

Onde L - Padrão de DNA de 10 pb *ladder*; 1 - *P. cincinnata*; 2 - *P. edulis*; 3- Indivíduos 08; 4 - Indivíduo 40; 5 - Indivíduo 124; 6 - Indivíduo 132; 7 - Indivíduo 157; 8- Indivíduo 221; 9 - Indivíduo 227; 10 - Indivíduo 228; 11 - Indivíduo 240; 12 – Indivíduo 258; 13 – Indivíduo 108.

Em algumas combinações foram observados fragmentos exclusivos dos híbridos, ou seja, não estavam presentes em nenhum dos pais. Este fato pode ser explicado por se tratar de plantas crescidas *in vitro*, pois se sabe que o desenvolvimento *in vitro* pode levar à variação somaclonal, esta pode ser devido à variação numérica e morfológica dos cromossomos e a variação enzimática entre as plantas regeneradas (HEINZE & MEE, 1971). A metilação de DNA é uma provável variação somaclonal epigenética, a qual pode ser causada pela presença de citocininas no meio de cultura. A metilação do DNA tem sido associada com a expressão gênica alterada em numerosas espécies de plantas (KAEPPLER et al., 1998 citado por JAIN, 2001). A metilação pode aumentar as variações das características quantitativas porque muitos genes podem ser afetados simultaneamente (PHILLIPS et al., 1990 citado por JAIN, 2001). O aumento na metilação *in vitro* potencialmente agrava a atividade e a regulação do gene (JAIN, 2001). JOYCE et al. (2002) determinaram a metilação de citocinina do DNA, em microplantas desenvolvidas *in vitro,* com diferentes morfologias foliares, através do marcador AFPL, empregando enzimas de restrição sensíveis à metilação (análises MSAP) para testar a hipóteses de que a metilação do DNA poderia ser usada para caracterizar diferenças entre microplantas.

Omaterial híbrido obtido neste trabalho é extremamente importante, pois reúne novas combinações gênicas entre espécies geneticemente distantes, podendo ser utilizadas em curto prazo, como porta enxertos.

## 5 CONCLUSÕES

1. Um maior número de protoplastos isolados foram observados utilizando-se cotilédones jovens (6 dias) provenientes de sementes germinadas sob luz ou no escuro.

2. Para se obter uma maior eficiência de plaqueamento deve-se utilizar cotilédones por volta de 21 dias após a germinação, sendo esta realizada no escuro.

3. Obtiveram-se híbridos somáticos utilizando-se protocolos de fusão química, onde os protoplastos foram cultivados em meio K8P, K8, e MD, modificados a partir de protocolos originais publicados.

4. Os híbridos somáticos putativos mostraram 2n = 36 cromossomos, comprovando citologicamente a fusão dos protoplastos.

5. Foi possível a identificação dos híbridos somáticos por meio da técnica molecular de RAPD e AFLP.

6. Análises citogenéticas e moleculares permitiram identificar dez plantas híbridas somáticas.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS


ARAUJO, D. G. de. Metodologia visando a obtenção de hibridação interespecifica em *Nicotiana* spp**.** 2004. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiros", Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2004.

AUSTIN, S.; BAER, M., EHLENFELDT, M.; KAZMIERCZAK, P.J.; HEGELSON, J.P. Intra-specific fusion in *Solanum tuberosum*. **Theoretical and Applied Genetics,** v.71, p. 172-175, 1985.

BAJAJ, Y.P.S. Somatic hybridization- A rich source of genetic variability. In: BAJAJ Y.P.S. (Ed.) Biotechnology in Agriculture and Foresty, v.27, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, p.3-18. 1994.

BARBOSA, L.V.; VIEIRA, M.L.C. Meiotic behavior of passion fruit somatic hybrids, *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deneger + *P. amethystine* Mikan. **Euphytica**, v.98, p.121-127, 1997.

BERNACCI, L.C. ; VITTA, F.A. Flora Fanerogâmica da Reserva do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (São Paulo, Brasil): 54 – Passifloraceae. **Hoehnea,** São Paulo, v.26, n.2, p.135-147, 1999.

BINSFELD, P.C. 1999. Production and characterization of interspecifc transgenic plants in the genus *Helianthus* using microprotoplast techinique. 1999. Göttingen. Cuvillier Verlag, 1999.

BUI, P.T.; JENNS, A.E.; SCHNEIDER, S.M.; DAUB, M.E. Resistance to tabaco mosaic virus and *Meloidogyne arenaria* in fusion hybrids between *Nicotina tabacum* and an *N. Rapanda* x *N. sylvestris* hybrid. **Phytopathology**, v.82, p.1305-1310, 1992.

CAMPOS, F. Utilização das Passifloraceae na criação de borboletas. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (eds). Maracujá: Germoplasma e Melhoramento genético. Embrapa. Planaltina, D.F., p.467-472, 2005.

COSTA, A.M.; TUPINAMBÁ, D.D. O maracujá e suas prorpiedades medicinais - estado da arte. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (eds). Maracujá: Germoplasma e Melhoramento genético. Embrapa. Planaltina, D.F., p. 475-506, 2005.

COSTA, M.A.P.C.; MENDES, B.M.J.; FILHO, F.A.A.M. Somatic hibridization for improvement of citrus rootstock: production of five new combinations with potential for improved disease resistance. **Australian Journal Experimental Agriculture** v. 43, p.1151-1156, 2003.

CRESTE, S.; TULMANN-NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphism in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v.19, n.4, p.1-8, 2001.

DAVEY, M.R.; ANTHONY, P.; POWER, J.B.; LOWE, K.C. Plant protoplasts: status and biothecnological perspectives. **Biotechnology Advances**, v.23, p.131-171, 2005.

DENG, X.X.; GROSSER, J.W.; GMITER, F.G. Jr. Intergeneric somatic hibridization plants from protoplasts fusion of *Fornunella crassifolia* cultivar 'Meiwa' whit *Citrus sniensis* cultivar 'Valencia'. ***Scientia Horticulturae***, v.49, p.55-62, 1992.

DORNELAS, M.C.; VIEIRA, M.L.C. Plant regeneration from protoplasts cultures of *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg., *P. amethystina* Mikan. and *P. cincinnata* Mast. **Plant Cell Reports**, v.13, p.103-106, 1993.

DORNELAS, M.C. Cultura e fusão de protoplastos de *Passiflora* spp. 182p. 1995. Tese Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba. 1995.

DORNELAS, M.C.; TAVARES, F.C.A.; OLIVEIRA, J.C.DE; VIEIRA, M.L.C. Plant regeneration from protoplast fusion in *Passiflora* ssp. **Plant Cell Reports**, v.15, p.106-110, 1995.

D'UTRA VAZ, F.B.; SANTOS, A.V.P.; MANDERS, G.; COCKING, E.C.; DAVEY, M.R.; POWER, J.B. Plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of the tropical woody plant, passionfruit (*Passiflora edulis* fv. *flavicarpa* Deg.): the importance of the antibiotic cefotaxime in the culture medium. **Plant Cell Reports**, v.12, p.220-225, 1993.

ENDO, T.; HAMAGUCHI, N.; ERIKSSON, T.; YAMADA, Y. Alkaloid biosynthesis in somatic hybrids of *Duboisia leichhardtii* F. Muell. and *Nicotina tabacum* L. **Planta**, v.48, p.505-510, 1991.

FREARSON, E.M.; POWER, J.B.; COCKING, E.C. The isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. **Developmental Biology**, v.33, p.130-137, 1973.

FUNGARO, M.H.P.; VIEIRA, M.L.C. Protoplastos de plantas: isolamento e regeneração. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.41, p.1151-1159, 1989.

GLEBA, Y.Y.; SYTNIK, K.M. Protoplast fusion genetic engineering in higher plants. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, p.220. 1984.

GLIMELIUS, K.; FAHLESON, J.; LANDGREE, M.; SJÖDIN, C.; SUNBERG E. Gene transfer via somatic hybridization in plant. **Tibtech**, v.9, p.24-30, 1991.

GROSSER, J.W.; CHANDLER, J.L. New Rootstocks via protoplast fusion. **Acta Horticulturae**, v.622, p.491-497, 2003.

GROSSER, J.W.; GMITER, F.G.Jr; CHANDLER, J.L. Intergeneric somatic hybrid plants from sexually incompatible woody especies: *Citrus sinensis* and *Severinia disticha*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.75, p.397-401, 1988a.

GROSSER, J.W.; GMITER, F.G.Jr & CHANDLER, J.L. Intergeneric somatic hybrid plants of *Citrus sinensis* cv. Hamlin *and Poncitrus trifoliate* cv. Flyng Dragon. **Plant Cell Reports**, v.7, p.5-8, 1988b.

GROSSER, J.W.; GMITER, F.G.Jr; TUSA, N.; CHANDLER, J.L. Somatic hybrid plants from sexually incompatible woody especies: *Citrus reticulata* and *Citropisis gillentiana.* **Plant Cell Reports**, v.8, p.656-659, 1990.

GROSSER, J.W.; MOURAO-FO, F.A.A.; GMITLER, F.G. Jr.; LOUZADA, E.S.; JIANG, J.; BAERGEN, K.; QUIROS, A.; CABASSON, C.; SCHELL, J.; CHANDLER, J.L. Allotetraploid hybrids between citrus and seven related genera produced by somatic hibridization. **Theoretical and Applied Genetics**, v.92, p.577-582, 1996.

GROSSER, J.W.; OLLITRAULT, P.; OLIVARES-FUSTER, O. Somatic hybridization in *Citrus*: an effective tool to facilitate variety improvement. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v.36, p.434-449, 2000.

GUO, W.W.; CHENG, Y.J.; DENG, X.X. Regeneration and molecular characterization of intergeneric somatic hybrids between *Citrus reticulata* and *Poncirus trifoliate*. **Plant Cell Reports**, v.20, p.829-834, 2002.

HEINZE, D.J.; MEE, G.W.P. Morphologic, cytogenetic and enzymatic variation in Saccharum species hybrid clones derived from callus culture. **Amer Journal Botanic**, v.58, p.257-262, 1971.

HENN, H-J. Erstellung, regenerarion and charakterisierung von somatichen hybriden aus *Helianthus annus* L. und *Sclerotinia* resistente *Helianthus* wildarten. Unversität Bonn, p.121, 1997.

HENN, H.J.; WINGENDER, R.; SCHNABL, H. Regeneration of fertile interspecific hybrids from cell fusion between *Helianthus annus* L. and wild *Helianthus* specie. **Plant Cell Reports**, v.18, p.220-224, 1998.

JAIN, S.M. Tissue culture-derived cariation in crop improvement. **Euphytica**, v.118, p.153-166, 2001.

JOURDAN, P.; SALAZAR, E. *Brassica carinata* resynthesized by protoplast fusion. **Theoretical and Applied Genetics**, v.86, p.567-572, 1993.

JOYCE, S.M.; CASSELLS, A.C. Variation in potato microplant morphology in vitro and DNA methylation. **Pant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.20, p.125-137, 2002.

KAO, K.N. Chromosomal behaviour in somatic hybrids of soybean – *Nicotiana glauca*. **Molecular and General Genetics**, v.150, p.225-230, 1977.

KAO, K.N.; MICHAYLUK, M. A method for hight frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. **Planta**, New York, v.115, p.335-339, 1974.

LEINO, M.; TEIXEIRA, R.; LANDGREN, M. GLIMELUS, K. *Brassica napus* lines with rerranged *Arabidopsis* mitochondria display CMS and a range developmental aberrations. **Theoretical and Applied Genetics**, v.106, p.1156-1163, 2003.

LING, J.T.; IWAMASA, M. Somatic hybridization between *Citrus reticulata* and *Citropsis gabunensis* through eletrofusion. **Plant Cell Reports**, v.13, p.493-497, 1994.

LIU, J.H.; DENG, X.X. Regeneration of intergeneric tetraploid somatic hybrids via eletrofusion in *Citrus* (in Chinese). **Science Agriculture**, v.33, p.98-100, 2000.

LIU, K.B.; LI, Y.M; SINK, K.C. Asymmetric somatic hybrid plants between an interespecific *Lycopersicon* hybrid and *Solanum melongena*. **Plant Cell Reports**, v.14, p.652-656, 1995.

LIU, J.; XU, X.; DENG, X. Intergeneric somatic hibridization and its application to crop genetic improvement. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.82, p.19-42, 2005.

LYNCH, P.T.; DAVEY, M.R.; POWER, J.B. Plant protoplasts fusion and somatic hybridization. Methods in enzymology. (eds). Academic Press. v.221, p.370-393, 1995.

MATOS, G.V.C.; VIERA, M.A.R.; ANTUNES, L.C.; BERNACCI, L.C.; MELETTI, L.M.M.; SOARES-SCOOT, M.D.; SIQUEIRA, W.J.; PASSOS, I.R.S. Estabelecimento e manutenção de células em suspensão para cinco espécies (*Passiflora* spp.). In: 49 CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 49., Águas de Lindóia, 2003.

MELETTI, L.M.M. Caracterização agronômica de progênies de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Degener). 1998. 64p.Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba. 1998.

MELETTI, L.M.M.; MAIA, M.L. Maracujá – produção e comercialização. Campinas. Instituto Agronômico, n. 181 (IAC, Boletim Técnico), 1999.

MELETTI, L.M.M.; BERNACCI, L.C.; SOARES-SCOTT, M.D.; AZEVEDO FILHO., J.A. de. Caracterização de germoplasma de Passiflora II - *P. amethystina* e *P. cincinnata*. In: Reunião Técnica de Pesquisa em Maracujazeiro, Londrina, 1999.

MELETTI, L.M.M.; SOARES-SCOTT, M.D.; BERNACCI, L.C. Caracterização fenotípica de três seleções de maracujazeiro roxo (*Passiflora edulis* SIMS). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.27, n.2, p.268-272, 2005.

MENEZES, J.M.T. Seleção de porta-enxertos tolerantes à morte prematura de plantas para *Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg. e comportamento de *Passiflora nitida* H.B.K. na região de Jaboticabal. 97p. 1990. Tese Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal. 1990.

MENEZES, J.M.T.; OLIVEIRA, J.C.; RUGGIERO, C.; BANZATTO, D.A. Avaliação da taxa de pegamento de enxertos de maracujá-amarelo sobre espécies tolerantes à "morte prematura de plantas". **Científica**, v.22, n.1, p.95-104, 1994.

MEYER, P.; HEIDMANN, I.; FORKMAN, G.; SAEDLER, H. A new petunia flower color generated by transformation of mutant with a maize gene. **Nature**, v.330, p.677-678, 1987.

MIRANDA, M.; MOTOMURA, T.; IKEDA, F.; OHGAWARA, T.; SAITO, W.; ENDO, T.; OMURA, M.; MORIGICHI, T. Somatic hybrids obtained by fusion between *Poncirus trifoliata* (2x) and *Fortunella hindsii* (4x) protoplasts. **Plant Cell Reports**, v.16, p.401-405, 1997.

MOTOMURA, T.; HIDAKA, T.; MORIGUCHI, T.; AKIHAMA, T.; OMURA, M. Intergeneric somatic hybrid between *Citrus* and *Atalantia* or *Severina* by electrofusion and recombination of mitochondrial genomes. **Breeding Science**, v.45, p. 309-314, 1995.

MOTOMURA, T.; HIDAKA, T.; AKIHAMA, T.; KATAGI, S.; BERHOW, M.; MORIGUCHI, T.; OMURA, M. Protoplasts fusion for production of hybrids plants between *Citrus* and its related genera. **Journal of Japan Horticulture Science**, v.65, p.685-692, 1997.

MOURAD-AGHA, N.; DEXHEIMER, J. Étude ultrastructurale de la différenciation des éléments conducteurs dans une culture de tissue de *Passiflora quadragularis* L. I. Cals cultivés à l'obscurité. **Cytologia**, v.44, p.615-631, 1979.

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

NAGATA, T.; EIBL, H.; MELCHERS, G. Fusion of plant protoplasts induced by a positively charged synthetic phospholipids. **Naturforch Sect C**, v.34, p.460-462, 1979.

OCHATT, S.J.; PATAT-OCHATT, E.M.; RECH, E.L.; DAVEY, M.R.; POWER, J.B. Somatic hibridization os sexually incompatible top-fruit tree rootstock, wild pear, (*Pyrus communis* var. *Pyraster* L.) and Colt cherry (*Prunus avium* x *pseudocerasus*). **Theoretical and Applied Genetics**. v.81, p.3-41, 1989.

OHGAWARA, T.; KOBAYASHI, S.; OHGAWARA, E.; UCHIMIYA, H.; ISHII, S. Somatic hybrids plants obtained by protoplasts fusion between *Citrus sinensis* and *Poncitrus trifoliata*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.71, p.1-4, 1991.

OLLITRAULT, P.; DAMBIER, D.; LURO, F. Somatic hybridization in *Citrus*: some new hybrids and alloplasmatic plants. **Proceeding of International Society Citriculture,** v.2, p.907-912, 1996.

OLIVEIRA, J.C. Melhoramento genético. In: RUGGIERO, C. (ED.). Cultura de maracujazeiro, Ribeirão Preto: Editora Legis Summa, p.218-246, 1987

OLIVEIRA, J. C.; FERREIRA, F. R. Melhoramento genético do maracujazeiro. In: SÃO JOSÉ, A. R.; FERREIRA, F. R.; VAZ, R. L. (Coord.). A cultura do maracujá no Brasil. Jaboticabal, FUNEP, p. 211-239, 1991.

OTONI, W.C. Hibridização e embriogênese somática e transformação genética em espécies de *Passiflora*. 198p. 1995. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 1995.

OTONI, W.C.; BLACKHALL, N.W.; D'UTRA VAZ, F.B.; CASALI, V.W.; POWER, J.B.; DAVEY, M.R. Somatic hybridization of the Passiflora species, *P. edulis* f. *flavicarpa* Degener and *P. incarnata* L. **Journal of Experimental Botany**, v.46, p.777-785, 1995.

OTONI, W.C.; CASALI, V.W.D.; CECON, P.R.; POWER, J.B.; DAVEY, M.R. Isolamento de protoplastos de mesofilo de *Passiflora suberosa* L.: influência da idade das plantas matrizes. **Revista Ceres**, v.43, n.246, p.157-164, 1996.

PASSOS, I.R.S. Comportamento *in vitro* em *Vitis* ssp e em *Passiflora nitida* H.B.K. 112p. 1999. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba. 1999.

PASSOS, I.R.S.; MATOS, G.V.C.; BAZZO, M.C.Z.; MELLETI, L.M.M.; SOARES-SCOTT, M.D.; BERNACCI, L. C. Estabelecimento *in vitro* por meio de sementes, de cinco espécies de maracujá (*Passiflora edulis* Sims, *Passiflora nitida* Kunth, *Passiflora alata* Curtis, *Passiflora cincinnata* Mast e *Passiflora setacea* DC. In: III Reunião Técnica de Pesquisa em Maracujazeiro, Viçosa, Anais, p.121-123, 2002a.

PASSOS, I.R.S., MATOS, G.V.C., SOARES-SCOTT, M.D.; MELETTI, L.M.M.; BERNACCI, L.C.; VIEIRA, M.A.R.; Regeneração de Plantas via Organogênese *in vitro* para cinco espécies de maracujá (*Passiflora* spp.). In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 48, Águas de Lindóia, 2002b.

PASSOS, I.R.S.; MATOS, G.V.C.; MELETTI, L.M.M.; SOARES-SCOTT, M.D.; BERNARCCI, L.C.; VIEIRA, M.A.R. Utilização de ácido giberélico para a quebra de dormência de sementes de *Passiflora nitida* germinadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.26, p.380-381, 2004a.

PASSOS, I.R.S.; MATOS, G.V.C. ; BINSFELD, P.C.; ROSALES, M.B.; SOARES-SCOTT, M.D.; SAWASAKI, H.E.; MELETTI, L.M.M.; BERNACCI, L.C.; SIQUEIRA, W.J. Protoplasts: isolation, culture and plant regeneration in species of the genus *Passiflora*. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular, XII e Congresso da Sociedade Iberoamericana de Biologia Celular, IX. Campinas, 2004b.

PASSOS, I.R.S.; BERNACCI, L.C. Cultura de tecidos aplicada à manutenção de germoplasma *in vitro* e melhoramento genético do maracujá (*Passiflora* spp.). In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (eds). Maracujá: Germoplasma e Melhoramento genético. Embrapa. Planaltina, D.F., p.361-383, 2005.

PEIXOTO, M. Problemas e perspectivas do maracujá ornamental. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F'. (eds). Maracujá: Germoplasma e Melhoramento genético. Embrapa. Planaltina, D.F., p.457-463, 2005.

ROUSTAN, J. P.; LATCHE, A.; FALLOT; J. Control of carrot somatic embryogenic by $AgNO_3$, an inhibitor of ethylene action: effect on argenina decarboxylase activity. **Olant Science**. v.67, p.89-95, 1990.

RUTGERS, E.; RAMULU, K.S; DIJKHUIS, P.; BLAAS, J.; KRENS, F.A.; VERHOEVEN, H.A. Identification and molecular analysis of transgenic potato chromosomes transferred to tomato through micro protoplast fusion. **Theoretical and Applied Genetics**, v.94, p.1053-1059, 1997.

SCORZA, R.; JANICK, J. *In vitro* flowering of *Passiflora suberosa* L. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v.105, n.6, p.892-897, 1980.

SOARES-SCOTT, M. D. Caracterização citogenética de algumas espécies e híbridos interespecíficos de Passiflora. 89p.1998. Tese ( de Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 1998.

SOARES-SCOTT, M.D.; BERNACCI, L.C.; MELETTI, L.M.M.; AZEVEDO, J.A.FILHO; BENTO, M.M. Seleção de espécies nativas de passiflora (maracujá) para melhoramento genético: *P. quadrangularis* e *P. setacea*.. In: Encontro de Biólogos, 10., São Carlos, 1999a.

SOARES-SCOTT, M.D.; MELETTI, L.M.M.; BERNACCI, L.C.; AZEVEDO, J.FILHO. Caracterização de germoplasma de *Passifloras*: *P.quadrangularis, P. setacea-digitata* e *P. setacea*. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 45., Gramado, 1999b.

SOARES-SCOTT, M.D.: MAGOLIN, C.A.; RICCO-PIMENTEL, S.M. Análise citogenética padronização de métodos de isolamento de DNA genômico de espécie e híbridos de *Passiflora*. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 45., Gramado, 1999c.

SOARES-SCOTT, M.D.; MELETTI, L.M.; RECCO-PIMENTEL, S.M. Meiotic behavior and pollen fertility in sexual and somatic hybrids of Passiflora species. **Caryologia**, v.56, p.129-138, 2003.

SOUSA, J.S.I. DE; MELETTI, L.M.M. Maracujá: espécies, variedades, cultivo. Piracicaba - FEALQ, p.15-126,1997.

TAKAMI, K.; MATSUMARA, A.; YAHATA, M.; IMAYAMA, T.; KUNITAKE, H.; KOMATSU, H. Production of intergeneric somatic hybrids between round kumquat (*Fortunella japonic* Swingle) and 'Morita navel' orange (*Citrus sinensis* Osbeck). **Plant Cell Reports**, v.23, p.39-45, 2004.

VARDI, A. BREIMAN, A.; GALUN, E. Citrus cybrid: production by donos-recipient protoplast-fusion-recipient protoplasts-fusion and verification by mithocondrial-DNA restriction profiles. **Theoretical and Applied Genetics**, v.75, p.51-58, 1987.

VARDI, A.; ARZEE-GONEN, P.; FRYDMAN-SHANI, A.; BLEICHMAN, S.; GALUN, E. Protoplasts-fusion-mediated transfer of organelle from *Microcitrus* into *Citrus* and regeneration of novel alloplasmic trees. **Theoretical and Applied Genetics**, v.78, p.741-747, 1989.

VIEIRA, M.L.C. Hibridação somática em plantas: A importância das espécies selvagens como fonte de genes. Biotecnologia – Ciência e Desenvolvimento, p. 36-40, 1997.

VON KELLER A.; TEWINKEL M.; WINGENDER R.; VOLKMANN D.; SCHNABL H. Intracelular movements and reorganization of electrical fused sunflower protoplasts. **International Journal of Plant Science**, v.156, n.6, p.764-773, 1995.

VOS P.; HOGERS R.; BLEEKER M.; REIJANS M.; LEE T. V.; HORNES M.; FRITES A.; POT J.; PALEMAN J.; KUIPER M.; ZABEAU M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v.23, n.21, p.4407-4414, 1995.

XIA, G.M.; CHEN, S.Y.; XIANG, F.N.; QUAN, T.Y.; CHEN, H.M. Study on salt-tolerance of F3-F5 hybrids originated from somatic hybridization between wheat and *Agropyron elongatum*. **Shandong Agroculture Science**, v.6, p.12-14, 2001.

WAARA, S.; GLIMELIUS, K. The potential of somatic hybridization in crop breeding. **Euphytica**, v. 85, p.217-233, 1995.

WOLTERS, A.M.A.; JACONSEN, E.; O'CONNEL, M.; BONNEMA, G.; RAMULU, K.S.; JONG, J.H.DE; WIJBRANDI, J.; KOORNNEEF, M. Somatic hybridization as a tool for tomato breeding. **Euphytica**, v.79, p.265-277, 1994.