

**MEIOSE E VIABILIDADE DO PÓLEN DE**  
*Solanum commersonii* ssp. E *Solanum tuberosum* L.

**LÍVIA GRACIELLE OLIVEIRA TOMÉ**

**2004**

**LÍVIA GRACIELLE OLIVEIRA TOMÉ**

**MEIOSE E VIABILIDADE DO PÓLEN DE *Solanum commersonii* ssp. E  
*Solanum tuberosum* L.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora  
Profa. Dra. Lisete Chamma Davide

**LAVRAS**  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2004

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Tomé, Lívia Gracielle Oliveira

Meiose e viabilidade do pólen de *Solanum commersonii* ssp. e *Solanum tuberosum* L. / Lívia Gracielle Oliveira Tomé. -- Lavras : UFLA, 2004.

73 p. : il.

Orientador: Lisete Chamma Davide.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Batata. 2. Pólen. 3. Meiose. 4. Melhoramento genético vegetal. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-635.2123

**LÍVIA GRACIELLE OLIVEIRA TOMÉ**

**MEIOSE E VIABILIDADE DO PÓLEN DE *Solanum commersonii* ssp. E  
*Solanum tuberosum* L.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 30 de julho de 2004

Prof. Giovana Augusta Torres UFLA

Prof. Sandro Barbosa UFLA

Prof. César Augusto Brasil Pereira Pinto UFLA

Prof. Lisete Chamma Davide  
UFLA  
(Orientadora)

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL

Aos meus pais, Maria da Conceição Oliveira e Levi Tomé de Oliveira.

Ao meu irmão, Leandro Tomé de Oliveira.

Aos meus avós *in memoriam*.

A todas as minhas tias e tios, que sempre me deram o apoio, carinho e compreensão.

Ao Adriano Bortolotti da Silva pelo companheirismo, paciência, força, amor, amizade e dedicação aos meus ideais.

**Dedico**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, presente em todos os momentos da minha vida.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), em especial ao Departamento de Biologia (Setor Genética) e professores, pela oportunidade concedida para a realização deste curso de Pós-Graduação.

Ao CNPq, pela bolsa de estudos.

Aos professores Lisete Chamma Davide e César Augusto Brasil Pereira Pinto, pela orientação, amizade, boa vontade, conselhos e apoio nos momentos difíceis.

Aos colaboradores deste trabalho, Alexandre Alonso Alves e Caio Césio Salgado, pela ajuda na condução do experimento.

A todos os colegas do Programa de Melhoramento da Batata na UFLA, pela atenção e ajuda.

Ao Laboratório de Citogenética da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Ao Raimundo, Soraya e Lamartine, pelo apoio técnico.

Aos colegas do Laboratório de Citogenética, Rose, Cássia, Josiane, Alexandre, Caio, Rosana, Suellen, Larissa, Bárbara, Juliane, Patrícia, Saulo, José Marcelo, Fernanda, Soraya, Mívia, Hermínio, Sandro, Sarah, Elisa, Marcelo e Bruno, pelo apoio, carinho e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Biologia da UFLA.

Ao Adriano Bortolotti da Silva, pelo companheirismo, paciência, força, amor e amizade.

Aos meus familiares, pelo amor, carinho e apoio, tornando possível vencer mais uma etapa em minha vida.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

**MUITO OBRIGADA**

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Origem e domesticação da batata.....	3
2.2 Classificação botânica.....	4
2.3 Base genética e melhoramento.....	6
2.3.1 Número de equilíbrio do endosperma (EBN).....	11
2.3.2 Microsporogênese e megasporogênese.....	17
2.3.3 Viabilidade do pólen.....	24
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 Material genético .....	28
3.2 Características avaliadas.....	30
3.2.1 Viabilidade do pólen.....	30
3.2.2 Meiose.....	31
3.2.3 Produção de pólen não reduzido.....	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1 Viabilidade do pólen por coloração, germinação in vitro e produção do pólen .....	34
4.2 Anormalidades meióticas em <i>Solanum commersonii</i> ssp. e <i>Solanum tuberosum</i> .....	39
4.3 Estudo da diacinese e do diplóteno em <i>S. commersonii</i> ssp.....	43
4.4 Pólen 2n e mecanismos meióticos de formação.....	51
5 CONCLUSÕES.....	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

## RESUMO

TOMÉ, Livia Gracielle Oliveira. **Meiose e viabilidade do pólen em *Solanum commersonii* ssp. e *Solanum tuberosum* L.** UFLA, 2004. 73p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)\*.

Dentre as dificuldades de se promover a introgressão de genes presentes em espécies selvagens na espécie cultivada da batata, destacam-se as barreiras da ploidia, do número de balanço do endosperma (EBN) e anormalidades meióticas. Neste trabalho avaliaram-se a viabilidade do pólen, a meiose e a frequência de polens não reduzidos com o objetivo de indicar materiais promissores para o melhoramento genético. Foram avaliados três clones de *Solanum commersonii commersonii*, dois de *Solanum commersonii malmeanum* e seis clones, quatro cultivares e um híbrido de *Solanum tuberosum* nos estudos de viabilidade do pólen pelas técnicas de germinação *in vitro* e coloração. Os diâmetros de polens de *S. commersonii* ssp. foram medidos para a estimativa da frequência de polens não reduzidos. Para a avaliação da meiose, utilizou-se a metodologia de esmagamento nos clones de *S. commersonii* ssp., bem como para a cultivar Chiquita de *S. tuberosum*. A técnica de meiose por maceração enzimática e secagem ao ar foi utilizada para o estudo do pareamento cromossômico nos clones de *S. commersonii* ssp. De maneira geral, os clones selvagens apresentaram maior viabilidade do pólen em relação à espécie cultivada. O clone SCC 07 destacou-se em relação aos demais clones de *S. commersonii* ssp. por apresentar bom percentual de germinação de pólen e produzir pólen não reduzido, além de apresentar baixas frequências de anormalidades meióticas. O clone SCC 100, apesar de apresentar boa frequência de pólen não reduzido, possui baixa viabilidade de pólen explicada por um alto índice de anormalidades meióticas. Os clones SCM 57 e SCM 60, apesar de não terem apresentado polens não reduzidos, possuem mecanismos meióticos para produzi-los, sendo, inclusive, os clones de *S. commersonii* ssp. com as maiores taxas de viabilidade de pólen. A cultivar Chiquita apresentou boa viabilidade do pólen e baixo percentual de anormalidades meióticas, confirmando seu bom desempenho no programa de melhoramento da UFLA, como genitor masculino. Nos estudos de pareamento cromossômico, o clone SCC 07 mostrou pareamento regular, com doze bivalentes em todas as células avaliadas.

---

\*Comitê orientador: Lisete Chamma Davide – UFLA (Orientadora) e César Augusto Brasil Pereira Pinto – UFLA (Co-orientador).

## ABSTRACT

TOMÉ, Livia Gracielle Oliveira. **Meiosis and pollen viability in *Solanum commersonii* ssp. and *Solanum tuberosum* L.** UFLA, 2004. 73p. (Dissertation – Master Program in Genetic and Plant Breeding).

One of the main difficulties to promote genes introgression from wild species to the cultivated species consists in the ploidy barriers, endosperm balance number (EBN) and meiotic abnormalities. In this work the evaluations consisted of pollen viability, meiosis and frequency of non-reduced pollens, with the objective to indicate promising materials, which may be used in breeding programs. Three *Solanum commersonii commersonii* (SCC) clones and two *Solanum commersonii malmeanum* (SCM) were evaluated, together with six other clones, 4 different cultivars and a hybrid of *Solanum tuberosum*, in the studies of pollen viability by the techniques of *in vitro* germination and staining. Diameters of *S. commersonii* ssp pollens were measured to estimate the frequency of non-reduced pollens. For meiosis evaluation, the squashing technique was used in the clones *S. commersonii* ssp., as well as to the Chiquita cultivar of *S. tuberosum*. The techniques of enzymatic maceration and air-drying, for meiosis studies, were used to verify chromosome pairing in the *S. commersonii* ssp clones. In general, the wild clones presented higher amounts of viable pollens, in relation to other cultivated species. The SCC 07 clone outstands from the other *S. commersonii* ssp clones for presenting a high percentage of pollen germination associated to the occurrence of non-reduced pollen, besides presenting low frequencies of meiotic abnormalities. Thus, it can be considered a promising material to be used for breeding. Although the SCC 100 clone has presented a high frequency of non-reduced pollen, it showed low pollen viability, due to a high percentage of meiotic abnormalities. Although the SCM 57 and SCM 60 clones, have not presented non-reduced pollens, they have meiotic mechanisms which possibly can conduct to the formation of non-reduced pollen, and also the *S. commersonii* ssp clones with the highest rates of pollen viability. The Chiquita cultivar presented good pollen viability and a low percentage of meiotic abnormalities, confirming its good behavior as male parent in the UFLA breeding program. In the chromosome pairing studies, the SCC 07 clone presented regular pairing showing twelve bivalents in all cells evaluated.

---

Major Professor: Lisete Chamma Davide – UFLA (Advisor); César Augusto Brasil Pereira Pinto – UFLA (Co-advisor).

## 1 INTRODUÇÃO

A batata cultivada *Solanum tuberosum* L. é uma espécie autotetraplóide e apresenta uma estreita base genética explicada por isolamento geográfico e erosão genética (Simmonds, 1979).

Uma das alternativas para aumentar a base genética da cultura é por meio de cruzamentos com espécies selvagens diplóides ( $2n=2x=24$ ) que transmitem genes de interesse e aumentam o nível de diversidade e interações alélicas a partir do germoplasma exótico para a batata cultivada (Peloquin & Ortiz, 1992).

Dentre as espécies selvagens de interesse para o melhoramento, *Solanum commersonii* ssp. destaca-se por possuir alelos de resistência a baixas temperaturas, resistência à murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* e à podridão mole e canela preta, causadas por *Erwinia carotovora* (Carputo et al., 2003).

No entanto, algumas dificuldades de se promover a introgressão de genes presentes em espécies selvagens na espécie cultivada podem ser apontadas, entre elas as barreiras de ploidia e do número de equilíbrio do endosperma. A espécie *S. commersonii* ssp. ( $2n=2x=24$ ; 1 EBN) não pode ser diretamente cruzada com as espécies cultivadas de *S. tuberosum* L. ( $2n=4x=48$ ; 4 EBN) devido ao nível de ploidia do gameta e do endosperma (EBN). A produção de pólen não reduzido por clones de espécies selvagens, diplóides e com EBN igual a 1, permite que estes sejam cruzados com diplóides de *S. tuberosum*, *S. phureja* e *S. chacoense*, que possuem 2 EBN. Esses cruzamentos têm sido utilizados como ponte para a introgressão de genes de interesse na espécie cultivada ( $2n=4x=48$ ; 4 EBN).

O emprego de espécies selvagens nos programas de melhoramento ainda depende de estudos sobre a esterilidade e produção do pólen e da produção de gametas não reduzidos, que são de especial interesse para a identificação dos melhores genitores para possíveis hibridações com a batata cultivada. Como conseqüência, a análise do comportamento meiótico desses clones pode explicar as possíveis causas da infertilidade. Também em clones de *S. tuberosum* L., os estudos sobre a produção e viabilidade do pólen são importantes para a escolha de genitores, uma vez que a condição tetraplóide favorece a formação de micrósporos desbalanceados e, conseqüentemente, inviáveis.

O presente trabalho objetivou avaliar o comportamento meiótico e a viabilidade do pólen em clones de *Solanum commersonii* e *Solanum tuberosum* L., estimar a freqüência de polens não reduzidos e os mecanismos de sua formação em clones de *Solanum commersonii*, para indicar os melhores materiais a serem utilizados em programas de melhoramento.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Origem e domesticação da batata

O centro de origem da batata compreende os Andes, do sul do Peru ao norte da Bolívia, onde materiais silvestres ainda existem (Hawkes, 1993). Vavilov (1951) considera que a batata cultivada teve dois centros de origem: o Chiloé, da batata cultivada *Solanum tuberosum* e o Sul Americano (Equador, Peru e Bolívia), onde está a batata cultivada andina *Solanum andigenum*. Hawkes (1967), entretanto, defende que a região do Lago Titicaca, no Peru, seria o centro de origem da batata cultivada, pois lá havia nascido a agricultura mais primitiva baseada no cultivo dessa espécie. Os centros de diversidade encontram-se em países da América do Sul e no México (Ross, 1963).

As espécies silvestres do gênero *Solanum* ocorrem apenas nas Américas, do sudoeste dos Estados Unidos até o Chile, sendo aproximadamente 199 no total. Estudos mostram que a batata silvestre está distribuída por 16 países, entre as latitudes de 38° N e 41° S. A riqueza dessas espécies é encontrada nas regiões montanhosas das Américas Central e do Sul. O maior número de espécies está no Peru, 93, seguido pela Bolívia, com 39 espécies, México, 36, Argentina, 28 e, no Brasil, foram observadas duas espécies, a *S. commersonii* com as subespécies *commersonii* e *malmeanum* e a *S. chacoense* ssp. *muelleri*. O Peru também se destaca por apresentar o maior número de espécies raras (Hijmans & Spooner, 2001).

Algumas espécies diplóides encontradas no Peru e na Bolívia estão envolvidas no processo evolutivo da batata cultivada. A espécie diplóide *S. stenotomum* é considerada a mais primitiva. Provavelmente, ela derivou-se da espécie silvestre diplóide *S. leptophyes* ou da *S. canasense*, uma vez que ambas

ocorrem no mesmo local de distribuição de *S. stenotomum*, na parte central do Peru e da Bolívia. Evidências indicam que a hibridação de *S. stenotomum* com *S. sparsipilum*, por meio de gametas não reduzidos ou por gametas haplóides e a subsequente duplicação cromossômica, produziu a tetraplóide *S. tuberosum* ssp. *andigena* (Cribb & Hawkes, 1986). Alguns pesquisadores, contudo, consideram que as batatas tetraplóides andinas são derivadas de *S. stenotomum* pela simples duplicação cromossômica. Muitos questionamentos são feitos sobre a origem da ssp. *andigena*. Acredita-se que esta espécie seja o ancestral direto do *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*, principal espécie cultivada comercialmente no mundo (Hawkes, 1993).

A batata moderna é o resultado de um processo evolutivo que pode ser dividido em 3 estágios: i) domesticação de espécies selvagens diplóides da América do Sul há cerca de 7000 anos; ii) emergência de formas tetraplóides cultivadas no Chile e posterior introdução na Europa; iii) importância do cultivo da batata tetraplóide como alimento básico nos países europeus (Pereira & Daniels, 2003).

As batatas introduzidas estavam adaptadas a desenvolver tubérculos sob períodos de dias curtos, de 12 horas, nas condições dos Andes e não sob dias longos de 16 -18 horas, que ocorrem na Europa (Hawkes, 1993). As formas andinas da batata tetraplóide (*Solanum tuberosum* L. subsp. *andigena*) necessitaram de grande período de seleção para se adaptarem às condições de dias longos de verão do norte da Europa (Pereira & Daniels, 2003).

## **2.2 Classificação botânica**

A batata é uma planta Magnoliopsida, pertencente à família Solanaceae e ao gênero *Solanum*, o qual contém mais de 2.000 espécies, das quais pouco mais de 150 são produtoras de tubérculos (Pereira & Daniels, 2003).

As espécies produtoras de tubérculos pertencem ao subgênero *Potatoe* (*Pachystemonum*), seção *Petota* (*Tubebarium*). A seção *Petota* é subdividida em 19 séries, das quais se destacam, com participação mais significativa no melhoramento genético, as seguintes: *Bulbocastana* (*S. bulbocastanum*), *Commersoniana* (*S. chacoense*, *S. commersonii*), *Acaulia* (*S. acaule*), *Demissa* (*S. demissum*), *Longipedicellata* (*S. stoloniferum*) e *Tuberosa* (*S. tuberosum*, *S. berthaultii*, *S. bukasovii*, *S. gourlayi*, *S. kurtzianum*, *S. microdontum*, *S. sparsipilum*, *S. spegazzinii*, *S. vernei* e *S. verrucosum*) (Harris, 1978)

Entre as cultivadas, a mais importante, economicamente, produzida no mundo é a espécie *Solanum tuberosum ssp tuberosum*, que é cultivada em, pelo menos, 140 países. As espécies silvestres têm sido objeto de estudos em programas de melhoramento devido à sua variabilidade, sendo utilizadas em cruzamentos para a introgressão de genes de interesse agrônômico na batata cultivada (Trognitz et al., 1997).

Nas Solanáceas, o número básico de cromossomos é  $x=12$ , sendo que nas batatas cultivadas o nível de ploidia pode variar do diplóide,  $2n=2x=24$ , ao hexaplóide,  $2n=6x=72$ . O nível de ploidia, em espécies cultivadas, é a classificação mais aceita, do ponto de vista taxonômico (Pereira & Daniels, 2003).

No grupo das diplóides ( $2n=2x=24$ ) estão as espécies *S. goniogalyx*, *S. phureja*, *S. stenotomum* e *S. x ajanhuiri*, supostamente um híbrido natural entre *S. stenotomum* e a espécie silvestre *S. megistacrolobum*. As triplóides ( $2n=3x=36$ ) cultivadas são as *S. x chaucha*, *S. x juzepczukii*, a qual é considerado um híbrido natural entre a espécie silvestre tetraplóide *S. acaule* e a espécie cultivada diplóide *S. stenotomum*. A espécie *S. x chaucha* é o resultado do cruzamento natural entre as espécies cultivadas *S. tuberosum ssp. andigena* e a espécie diplóide *S. stenotomum*. As espécies cultivadas tetraplóides ( $2n=4x=48$ ) são *S. tuberosum ssp tuberosum*, a mais produzida no mundo e *S.*

*tuberosum* ssp. *andigena*, cultivada apenas na região dos Andes. No grupo pentaplóide ( $2n=5x=60$ ), *S. x curtilobum* é considerada um híbrido resultante do cruzamento natural entre as espécies *S. x juzepczukii* e *S. tuberosum* ssp. *andigena* (Párraga & Cardoso, 1981; León, 1987).

Quanto aos aspectos morfológicos, as folhas são compostas, apresentam um folíolo terminal e alguns pares laterais, podendo existir folíolos secundários menores entre os laterais, folhas simples podem ser encontradas nas espécies silvestres (Ortiz & Huaman, 1994). A inflorescência é do tipo cimosa, com flores pentâmeras, androginosporangiada e o cálice constituído por quatro sépalas de cor verde ou não pigmentado. A corola apresenta cinco pétalas, cuja cor varia de branca a roxo. O tipo de corola mais comum é a rodada, podendo haver variações. O androceu possui cinco estames, alternados com as pétalas. O gineceu é bicarpelar com ovário súpero, globoso e sincápio (Ortiz & Huaman, 1994). Os frutos maduros, denominados baga, são de forma arredondada a oval, de coloração verde e amarelado ou de castanho-escuro a violeta. Possuem poucos lóculos e podem formar numerosas sementes, porém, devido a fatores de esterilidade, os frutos podem ser formados com a ausência de sementes (Icochea, 1980).

### **2.3 Base genética e melhoramento**

No Brasil, a batata é uma das principais olerícolas, ocupando, anualmente, cerca de 153 mil hectares com produção estimada em 3,07 milhões de toneladas métricas por hectare, sendo ela cultivada principalmente nas regiões Sul e Sudeste do país. Os estados de Minas Gerais, São Paulo e do Paraná são considerados os principais produtores, respondendo por uma produção de 943.795, 726.740 e 659.230 toneladas métricas por hectare, respectivamente (FAO, 2003).

A maior parte da produção de batata no Brasil é destinada à comercialização *in natura* e este tipo de utilização requer materiais com boas qualidades culinárias, após o cozimento ou ao processamento industrial. No entanto, não existem cultivares de batata nacionais apropriadas ao processamento industrial, nem mesmo cultivares estrangeiras adaptadas às condições de cultivo no Brasil (Costa & Pereira, 1996).

As cultivares destinadas ao processamento industrial devem conter teores de sólidos totais acima de 20%, para que possam absorver pouca quantidade de óleo durante a fritura, sendo mais econômicas e resultando em produtos processados de melhor qualidade (Almeida et al., 1983). No Brasil, existe um crescente mercado para a produção da batata industrializada, no entanto, há fatores limitantes, como a falta de qualidade da batata *chips*, da batata palha e o elevado custo de produção para a pré-frita congelada. O desenvolvimento dessa cultura requer o melhoramento genético nas principais áreas produtoras, visando ao desenvolvimento de germoplasma melhorado na forma de novas cultivares. Dessa forma, a obtenção de cultivares ideais para o processamento industrial tem sido possível por meio do melhoramento de tetraplóides a partir de espécies diplóides silvestres e primitivas que apresentam elevados teores de matéria seca (Mendoza, 1990).

Espécies silvestres da série Commersoniana, originárias da Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai e Uruguai, juntamente com espécies das séries Demissa e Longipedicellata, do México, são de especial interesse para o melhoramento, uma vez que apresentam altos teores de matéria seca com conteúdo de amido elevado. No Brasil ocorrem apenas duas espécies silvestres de batata, *Solanum commersonii* com as subespécies *commersonii* e *malmeanum*, e *Solanum chacoense* ssp *muelleri*, com características agrônômicas de interesse, como rusticidade e fácil adaptação às condições climáticas extremas. Em *Solanum*

*chacoense*, os teores de matéria seca atingem valores acima de 33,4% e em *Solanum commersonii*, os valores atingem 27,7% (Hawkes & Hjerting, 1969).

Rocha et al. (2000) avaliaram os teores de matéria seca e os padrões isoenzimáticos de aspartato transaminase e isocitrato desidrogenase de 50 e 38 clones, respectivamente, de batata silvestre das subespécies *S. commersonii commersonii*, *S. commersonii malmeanum*, *S. chacoense muelleri* e *Solanum* spp. Dentre estes materiais analisados, foram avaliados os clones de *S. commersonii commersonii*, de identificação SCC 100, SCC 176 e SCC 07 e os clones de *S. commersonii malmeanum*, de identificação SCM 57 e SCM 60. Os teores médios de matéria seca obtidos, com variação entre 24,05% e 40,08% foram considerados altos quando comparados com outros citados na literatura. Das análises de matéria seca foram obtidas as seguintes porcentagens médias para os clones SCC 100, SCC 176 e SCC 07: 32,69%, 35,29% e 34,55%, respectivamente. Para os clones SCM 57 e SCM 60, foram obtidas as porcentagens médias de 35,74% e 37,41%, respectivamente.

A espécie *Solanum commersonii* ssp. é diplóide ( $2n=2x=24$ ) e, portanto, segue um padrão de herança dissômico. O conjunto das espécies diplóides representa mais de 70% do reservatório de genes das quase 200 espécies de *Solanum* produtoras de tubérculos (Pereira & Daniels, 2003).

Pelo fato de a batata cultivada *S. tuberosum* L. apresentar pouca variabilidade genética, possuir herança tetrassômica e ser de propagação assexuada, muitas características importantes, nesta espécie, são dependentes de interações intralocos e de genótipos com locos multialélicos, o que torna o seu melhoramento genético complexo (Howard, 1970, citado por Carputo et al., 1997). Além disso, a batata cultivada possui uma estreita base genética, que pode ser explicada por processos de isolamento geográfico e perdas de tubérculos, por más condições de armazenamento dos tubérculos e seu apodrecimento em navios, quando da introdução da cultura na Europa. Um outro

acontecimento histórico ocorrido na Irlanda, por volta de 1840, foi a dizimação de grandes áreas de cultivo, devido à ocorrência de requeima, causada por *Phytophthora infestans* (Hawkes, 1978; Simmonds, 1979; Ugent, 1970). Nesse sentido, muitos são os trabalhos visando à ampliação da base genética do cultivar tetraplóide e à criação de novas combinações gênicas favoráveis explorando o germoplasma silvestre (Iwanaga & Peloquin, 1982, citados por Oliveira, 1994).

O germoplasma silvestre tem contribuído para o desenvolvimento de cultivares de bom comportamento agrônômico, por possuir características genéticas não exploradas, especialmente no que se refere à resistência a pragas, doenças e tolerância a estresses abióticos. A incorporação do genoma silvestre às cultivares possibilita a obtenção de híbridos interespecíficos vigorosos, com pareamento normal de cromossomos, o que lhes assegura fertilidade e ocorrência normal de permuta genética, viabilizando a introgressão de genes ou segmentos cromossômicos (Hanneman & Bamberg, 1986; Ross, 1986; citados por Hanneman, 1999). Esta é uma das estratégias para aumentar a base genética da batata cultivada *Solanum tuberosum* L.

Segundo Magallanes et al. (1996), dentre os mecanismos genéticos empregados para a introgressão de genes das espécies diplóides ao germoplasma tetraplóide, pode ser citada a obtenção de clones diaplóides de *S. tuberosum* L. por meio da técnica de cultura de anteras ou, preferencialmente, pela indução com polinizadores da espécie *S. phureja* ( $2n=2x=24$ ).

Um método alternativo de melhoramento visando à obtenção de progênies híbridas tetraplóides com heterozigose máxima foi proposto por Chase, em 1963, pelo qual o tetraplóide seria convertido em diplóide (diaplóide) e com posterior restauração da tetraploidia. Diaplóides ( $2n=2x=24$ ) de *S. tuberosum* L. são cruzados com espécies diplóides ( $2n=2x=24$ ), produzindo híbridos também diplóides ( $2n=2x=24$ ). Estes híbridos seriam posteriormente

cruzados com *S. tuberosum* L. ( $2n=4x=48$ ), via utilização de gametas não reduzidos, gerando progênies tetraplóides (Iwanaga & Schmiediche, 1989). A simples transformação do tetraplóide em diaplóide não acarreta a introdução de novos alelos na população, sendo necessário, portanto, cruzá-lo com outras fontes de germoplasma (Maris, 1990). Podem-se, então, utilizar espécies selvagens, uma vez que estas são boa fonte de variabilidade quanto à presença de alelos de interesse agrônômico como alelos de resistência a insetos, vírus, fungos, nematóides, bactérias e alto conteúdo de matéria seca (Hanneman & Bamberg, 1986; Ross, 1986; citados por Hanneman, 1999).

Um outro mecanismo para aumentar a base genética nas cultivares é a produção de gametas não reduzidos (óvulo ou pólen  $2n$ ) pelo diplóide, levando à formação de uma progênie tetraplóide (Iwanaga & Schmiediche, 1989). A maioria das espécies de *Solanum* spp. apresenta algum nível de produção de gametas  $2n$  (den Nijs & Peloquin, 1977; Novy & Hanneman, 1991; Watanabe & Peloquin, 1989). A presença de gametas  $2n$  oferece uma possibilidade de as espécies se hibridizarem não apenas com aquelas de seu mesmo nível de ploidia, mas também com outras de nível de ploidia superior. Essa forma de hibridação tem possibilitado a transferência de material genético entre espécies que apresentam diferentes níveis de ploidia (Barone et al., 1999; Carputo et al., 1997). Neste mecanismo, três estratégias são utilizadas em programas de melhoramento da batata para a introdução de alelos de interesse, provenientes de espécies selvagens: (i) o método de poliploidização sexual unilateral que corresponde ao cruzamento de cultivares tetraplóides ( $4x$ ) e espécies selvagens ( $2x$ ), produtoras de pólen não reduzido, como fonte de diversidade genética; (ii) o método de poliploidização sexual bilateral que corresponde à formação de tetraplóides provenientes do cruzamento de duas espécies diplóides através de pólen  $2n$  e oosfera  $2n$ ; (iii) produção de tetraplóides a partir de duplicação cromossômica induzida com substâncias antimitóticas, como a colchicina, em

espécies diplóides, o que é denominado de poliploidização somática (Hanneman, 1999).

As espécies silvestres de *Solanum*, apesar de apresentarem alelos de interesse agrônomico, possuem algumas características indesejáveis, como alto conteúdo de glicoalcalóides no tubérculo e estolões longos. Além disso, essas não tuberizam sob condições de dias longos e não podem ser diretamente cruzadas com haplóides de *S. tuberosum* ssp *tuberosum*, devido a incompatibilidades pós-zigóticas (Johnston et al., 1980 e Hanneman, 1982).

### **2.3.1 Número de equilíbrio do endosperma (EBN)**

O sucesso e a formação de uma boa semente depende da funcionalidade normal do endosperma. Sabe-se que o endosperma é um tecido peculiar resultante da dupla fertilização, nas angiospermas. Após a fertilização, o endosperma se desenvolve rapidamente e se diferencia em tecido nutritivo para o sustento do embrião. Em algumas espécies, o endosperma permanece efêmero, mas, em outras, ele persiste ao longo do período de germinação (Brink & Cooper, 1947).

A constituição nuclear do endosperma difere do embrião em apenas uma unidade extra de cromossomos maternos. O desenvolvimento do endosperma, portanto, é dependente dos mesmos genes que acompanham o desenvolvimento do embrião, mas em diferentes dosagens. O endosperma atua com significativa participação na evolução das angiospermas devido às suas relações fisiológicas e genéticas com o embrião. A importância das relações genéticas entre o embrião e o endosperma na evolução dos vegetais superiores tem sido apontada para o melhoramento de culturas, devido a incompatibilidades em ploidia entre os endospermas dos genitores envolvidos, proporcionando um isolamento reprodutivo entre espécies que possuem o mesmo nível de ploidia ou, ainda,

quando ocorre uma aproximação reprodutiva entre espécies de ploidias diferentes, porém, quando intercruzadas, apresentam compatibilidades na ploidia do endosperma (Stebbins, 1974; Beck, 1976; Grant, 1981 e Peloquin, 1981; citados por Hanneman, 1999).

Os cruzamentos entre diplóides e seus autotetraplóides geralmente não produzem descendentes viáveis. Este fato, em certas ocasiões, pode ser atribuído a alguma falha no desenvolvimento normal do endosperma, resultando na senescência do embrião. Várias hipóteses foram sugeridas na tentativa de explicar falhas em cruzamentos interploidias, ou seja, falhas no processo de formação de sementes, devido a incompatibilidades de ploidias dos endospermas envolvidos. Tais hipóteses começaram a surgir a partir de observações de proporções variadas nos níveis de ploidia dos tecidos que compõem as sementes, tecido materno, endosperma e embrião. Em 1930, Muntzing propôs a proporção de 2:3:2 da ploidia para o desenvolvimento normal da semente, sendo 2 tecido materno:3 endosperma:2 embrião. Watkins, em 1932, propôs que apenas a proporção de 3:2 de 3 endosperma:2 embrião era a ideal para formação de semente viável. Valentine, em 1954, propôs a proporção de 2:3 sendo 2 tecido materno:3 endosperma. Alguns cruzamentos interespecíficos, no entanto, não seguem estas regras gerais para o sucesso do desenvolvimento normal da semente. Apenas em 1966, Nishiyama e Inomata sugeriram que o sucesso do desenvolvimento do endosperma depende da proporção de 2:1 dos genomas materno e paterno, respectivamente, no próprio endosperma, independente do nível de ploidia dos tecidos materno e embrionário (Hanneman, 1999).

Lin, em 1984, estudando cruzamentos interespecíficos no milho, concluiu que nem a ploidia do genitor materno e nem mesmo a ploidia do embrião influenciavam o desenvolvimento do endosperma e que todo endosperma, com desenvolvimento normal, tem sua ploidia múltipla de três, mas, a maioria dos endospermas apresentava ploidia que consistiam de 2

genomas maternos para 1 genoma paterno. Em algumas amostras, foi possível observar que o endosperma 6x com a proporção de 4 genomas maternos:2 genomas paternos era normal, entretanto, o endosperma 6x com a proporção de 5 genomas maternos:1 genoma paterno era abortivo. Um outro exemplo foi a observação de amostras que apresentavam endosperma de ploidia 4x, com a proporção de 3 genomas maternos:1 genoma paterno, o resultado era a formação de sementes em miniatura, e endospermas de ploidia 4x com a proporção 2 genomas maternos:2 genomas paternos resultavam em sementes abortivas. Estas conclusões, com relação à proporção de 2:1, suportam a necessidade da contribuição dos genomas materno e paterno para o desenvolvimento e a funcionalidade normal do endosperma (Hanneman, 1999).

Os primeiros trabalhos de embriologia da batata foram realizados por von Wangenheim e colaboradores, na década de 1960, que propuseram a necessidade da proporção de 2 genomas maternos para 1 genoma paterno no endosperma, em cruzamentos interespecíficos, para o sucesso na produção de sementes. Em vários cruzamentos inter e intraespecíficos (2x e 4x, por exemplo), as sementes são abortivas no início do desenvolvimento devido a incompatibilidades do endosperma. Este tipo de comportamento foi observado em outros cruzamentos interespecíficos em alfafa (Lesins, 1961), algodão (Stephens, 1942), datura (Avery et al., 1959), cevada (Nishiyama & Yabuno, 1978), tomate (Cooper & Brink, 1945) e trigo (Gill & Waines, 1978). A hipótese do endosperm balance number, ou EBN, foi estabelecida para interpretar, explicar e prever a capacidade de cruzamentos interespecíficos entre genótipos com diferentes ploidias, sendo mais importante do que o número de cromossomos envolvidos nos cruzamentos (Peloquin & Ortiz, 1992).

O valor do EBN foi primeiramente atribuído às espécies de *Solanum* por meio do cruzamento de cada uma das espécies com espécies padrão de EBNs já estabelecidos. Para algumas espécies diplóides da América do Norte e da

América Central, como a *S. commersonii* Dun., foi inicialmente atribuído o valor de EBN igual a 1 e, para algumas espécies tetraplóides, o valor de 2 EBN e, nas espécies hexaplóides, 4 EBN. Posteriormente, novos cruzamentos foram conduzidos entre diferentes espécies e aquelas que, quando cruzadas, geravam descendentes férteis e viáveis, eram classificadas como pertencentes a um mesmo grupo de valor de EBN. Percebeu-se, então, que algumas espécies diplóides, 2x (2EBN), eram capazes de se hibridizar com algumas espécies triplóides, 3x (2EBN) e com algumas tetraplóides, 4x (2EBN), enquanto outras diplóides cruzavam apenas com elas mesmas, 2x (1EBN). Tais espécies diplóides, portanto, eram reprodutivamente isoladas de outras diplóides. Foi também observado que algumas espécies tetraplóides eram capazes de se hibridizar com algumas espécies hexaplóides, 4x (4EBN) e 6x (4EBN), respectivamente. Com estes resultados, foi atribuído o efetivo número que pode não refletir diretamente a ploidia da espécie, mas o grau de combinação entre espécies na ploidia do endosperma, em alguns casos, espécies não relacionadas. Foram, então, estabelecidos os seguintes valores de EBN para as respectivas ploidias 2x (1EBN), 2x (2EBN), 3x (2EBN), 4x (2EBN), 4x (4EBN) e 6x (4EBN) (Johnston et al., 1980).

Estudos iniciais para determinar quantos genes ou quantos cromossomos estão envolvidos na determinação do EBN na batata sugeriram mais de um gene, mas poucos e, provavelmente, em poucos cromossomos (Johnston, 1980).

Smith & Desborough (1986), investigando os mecanismos de falhas na produção de sementes em cruzamentos intra e interespecíficos por quantificações do DNA nuclear de embriões e do endosperma, concluíram que o balanço genômico em cruzamentos intra e interespecíficos é crucial, tanto para o embrião quanto para o endosperma. Birchler (1993) revisou o efeito da compensação de dosagem no desenvolvimento do endosperma do milho, incluindo a sua ploidia, o efeito materno e o EBN molecular. Este autor

observou que a hipótese do endosperma proposta por Lin (1984) deve-se a um controle de silenciamento de genes paternos que podem ou não ser expressos no endosperma da progênie.

Cruzamentos entre espécies correlacionadas de diferentes EBN quase nunca têm sucesso. Duas espécies próximas, evolutivamente, de mesma ploidia, mas de diferente EBN, podem ser totalmente incompatíveis. Por meio do mecanismo de isolamento reprodutivo via EBN, é possível a formação de populações simpátricas (Carputo, 1999). Um exemplo disso é o fato de que *Solanum acaule* ( $2n=4x=48$ ) não forma híbridos com outras tetraplóides sul-americanas por possuírem incompatibilidade no endosperma (von Wangenheim, 1955, citado por Hanneman, 1999). Entretanto, *S. acaule*, quando cruzada com espécies diplóides ( $2n=2x=24$ ) ou com diaplóides ( $2n=2x=24$ ) de *S. tuberosum* ( $2n=4x=48$ ), produz sementes férteis e vigorosas com embriões  $3x$  e endosperma normal (Irikura, 1968).

Espécies com ploidia  $2x$  (2EBN) podem ser cruzadas apenas com outras espécies que possuem 2EBN, por exemplo,  $2x$  (2EBN) ou  $4x$  (2EBN). Caso estas espécies diplóides,  $2x$  (2EBN), produzam gametas não reduzidos em grande quantidade, elas podem se comportar como se possuíssem 4EBN podendo, então, ser cruzadas com uma  $4x$  (4EBN) ou  $6x$  (4EBN). E, dessa forma, essas espécies podem ser utilizadas em programas de melhoramento da batata para ampliar as possibilidades de transferência de genes, da espécie selvagem, diplóide, para as cultivadas (Hanneman, 1999).

Recentemente, com o objetivo de superar os obstáculos em cruzamentos de espécies silvestres ( $2x$ , 1EBN) que possuem uma grande diversidade de alelos de interesse agrônomico e as cultivadas ( $4x$ , 4EBN), os programas de melhoramento têm desenvolvido a estratégia de cruzamentos ponte. Trata-se do cruzamento entre um híbrido diplóide, proveniente de um diaplóide de *S. tuberosum tuberosum* ( $2x$ , 2EBN) e *S. phureja* ( $2x$ , 2EBN) e um material

silvestre que teve o seu genoma duplicado via poliploidização somática. Esta estratégia foi inicialmente desenvolvida por Carputo et al. (1997) (Figura 1).

Na tentativa de recuperação da tetraploidia e das características de interesse da cultivar, o híbrido triploide resultante do cruzamento ponte é retrocruzado com a cultivar tetraploide original, via gametas não reduzidos, os quais geralmente são produzidos nas espécies de *Solanum* spp. Sucessivos retrocruzamentos são feitos com esse objetivo. Outros trabalhos já foram conduzidos para verificar o potencial de recombinação entre os genomas da espécie silvestre e da cultivar, os quais, utilizaram tecnologias de marcadores moleculares RAPD e AFLP e análise citológica do grau de pareamento cromossômico, na meiose, do genoma dos híbridos obtidos (Carputo et al., 1997; Barone et al., 1999 e 2001, Carputo et al., 2003).

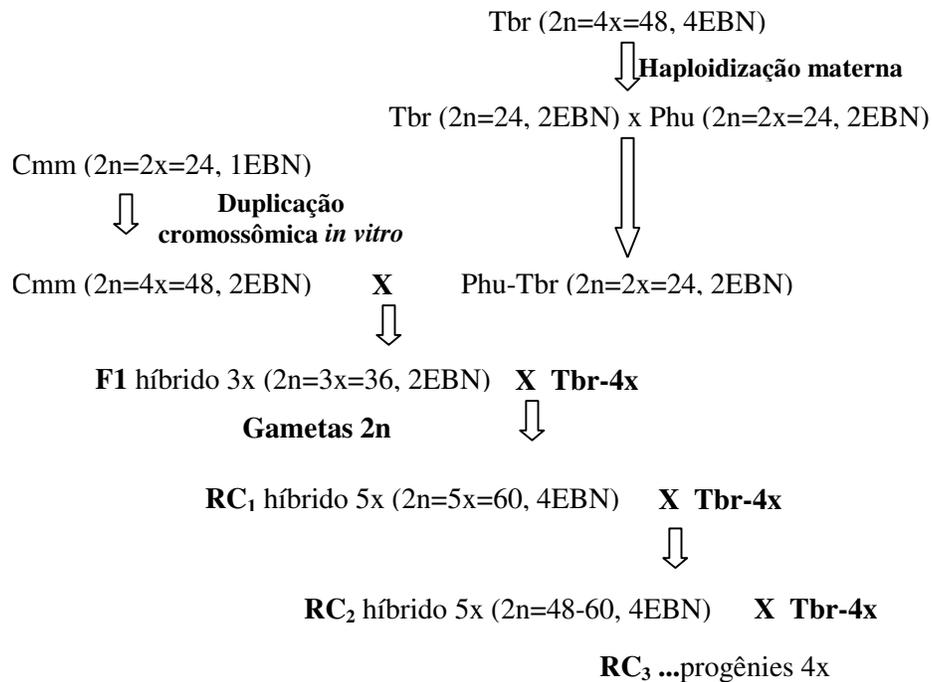


FIGURA 1 Representação esquemática de melhoramento alternativo visando à introgressão de genes da espécie diplóide *S. commersonii* (Cmm), 1 EBN para a cultivar *S. tuberosum* ssp *tuberosum* (Tbr-4x), 4EBN (Fonte: Carputo et al., 1997).

### 2.3.2 Microsporogênese e megasporogênese

A meiose é o processo de divisão celular que ocorre nos organismos de reprodução sexuada, no qual uma célula somática dá origem a quatro gametas haplóides. Todos os organismos de reprodução sexuada, independente de sua complexidade evolutiva, ao final de um processo meiótico normal, têm seu número de cromossomos reduzidos à metade. Este fato favorece o balanço do número de cromossomos ao final da fertilização dos núcleos masculino e feminino, garantindo a manutenção do número de cromossomos na espécie ao

longo das sucessivas gerações (Golubovskaya, 1979; citado por Pagliarini, 2000).

A micro e a megasporogênese normais compreendem três estágios seqüenciais que culminam com a formação do gameta. Esses estágios são a pré-meiose, a meiose e a pós-meiose, os quais são controlados por uma grande diversidade de alelos. A pré-meiose refere-se ao estágio de interfase pré-meiótica, em que a célula somática tem cerca de 99,7% do seu DNA duplicado e concomitante síntese de aparato protéico necessário para a regulação do processo meiótico. O estágio da meiose compreende o início do pareamento dos cromossomos homólogos, a associação do complexo sinaptonêmico, a formação de uma conexão estável nos sítios de permuta genética entre os cromossomos homólogos, a recombinação, a formação de quiasmas e a formação dos produtos meióticos haplóides. A etapa pós-meiótica compreende as sucessivas divisões equacionais, mitoses, para a formação do gametófito (Singh, 2003).

Todo o processo de meiose é regulado por um grande número de alelos. A seqüência precisa das etapas envolvidas no processo de meiose, eventualmente, é interrompida pela ação de alguns alelos mutantes. Tais alelos intervêm de forma a alterar o comportamento normal dos cromossomos e, conseqüentemente, os produtos finais da meiose. Existe uma grande diversidade de alelos mutantes que podem atuar desde a síntese de DNA, pré-meiótica, até o estágio pós-meiótico. Os mutantes pré-meióticos atuam no estágio da síntese de DNA. Os mutantes meióticos podem ser do tipo sinápticos, que atuam na prófase I ou mutantes de disjunção, que ocorrem desde a anáfase I até telófase I. Os mutantes pós-meióticos são os que atuam no término da segunda divisão meiótica (Singh, 2003).

Os mutantes meióticos são, primeiramente, identificados por meio de anormalidades meióticas, por evidências genéticas e pelos percentuais de germinação de pólen e de óvulos abortados. Em alguns casos, os mutantes

meióticos podem promover alterações no desenvolvimento dos vegetais. A ocorrência desses mutantes pode ser de origem espontânea, em populações naturais, induzidos por agentes mutagênicos ou podem ser resultado de hibridações interespecíficas. Em geral, mutantes meióticos apresentam herança monogênica recessiva e são identificados na geração segregante (Singh, 2003).

Os eventos meióticos são precisamente corrigidos de forma a assegurar a integral ocorrência de cada etapa da divisão celular. Entretanto, mutantes sinápticos podem afetar o pareamento normal dos cromossomos na prófase I. Tal acontecimento pode interferir de forma que não haja pareamento dos homólogos no paquíteno. Esses mutantes sinápticos são denominados do tipo assinápticos. Se mutantes sinápticos atuarem no complexo sinaptonêmico e promoverem falhas na terminalização do pareamento, estes são designados como sendo do tipo dessinápticos. Na observação citogenética é perceptível maior frequência de cromossomos univalentes na diacinese e na metáfase I é possível inferir a atuação de mutantes assinápticos. Este tipo de comportamento foi descrito, no milho, por Beadle, em 1930 (Singh, 2003).

Na microsporogênese normal da batata, formam-se bivalentes na placa equatorial, que segregam, de forma balanceada, na anáfase I. Na anáfase II, forma-se um ângulo de aproximadamente 60 graus entre um complemento haplóide e outro, levando à formação de quatro micrósporos reduzidos (Mok & Peloquin, 1975). No entanto, variantes meióticas que conduzem à formação de polens não reduzidos foram encontrados nas espécies e nos híbridos de batata e, têm sido empregados em métodos alternativos de melhoramento genético da cultura (Oliveira et al., 1995). Esses mutantes causam pareamento anormal ou reduzem a formação de quiasmas, afetando a recombinação dos cromossomos na meiose.

Mok & Peloquin (1975) descreveram dois mecanismos de formação de pólen  $2n$  que ocorrem devido à ação de variantes meióticas. Um deles,

controlado pela ação de alelos recessivos *ps* (*parallel spindles* ou fusos paralelos), difere da microsporogênese normal por levar à formação de fusos paralelos na metáfase II e não à orientação de um ângulo de 60°. Como consequência, na anáfase II, apenas dois complementos cromossômicos permanecem paralelos e, na telófase II, ocorrendo então a formação de dois micrósporos 2n em vez de quatro micrósporos n. Um outro mecanismo relatado é o de fusos fundidos, causado por alelos recessivos *fs* (*fused spindles*), em que os dois conjuntos cromossômicos, na metáfase II, tornam-se unidos, levando à formação de dois micrósporos não reduzidos. Esses dois alelos mutantes, fusos paralelos e fusos fundidos promovem a restituição da primeira divisão meiótica, *First Division Restitution* ou FDR (Hanneman, 1999). A partir da análise da estrutura dos cromossomos, da frequência e da localização de quiasmas, tem sido possível estimar a porcentagem de heterozigidade transmitida. É estimado que o mecanismo de FDR permite que de 70% a 80% da heterozigose sejam transferidos do genoma parental para o da progênie. Isso implica que uma grande parte das interações epistáticas é mantida e esteja promovendo um método de transferência de interações intra-interlocos do genótipo parental para a progênie (Mok & Peloquin, 1975, citados por Hanneman, 1999).

Estudos revelam que as interações que envolvem mais de dois alelos são fundamentais para o vigor e a produção de tubérculo. Assim, a maximização da heterozigose é um fator importante para a produtividade da batata (Chase, 1963; Mendiburu & Peloquin, 1977). Todos os locos do centrômero à primeira permuta genética que são heterozigotos no genoma parental permanecem heterozigotos nos gametas. Uma metade dos locos parentais em heterozigose, além da primeira permuta genética, permanecerá heterozigota nos gametas (Peloquin et al., 1999).

Outros dois mecanismos são causados por dois genes, que causam a citocinese prematura (*pc1* e *pc2*), formando micrósporos não reduzidos pela

omissão da segunda divisão meiótica após a telófase I (*pc1*) ou após a prófase II (*pc2*) (Mok e Peloquin, 1975, citados por Hanneman, 1999). Nos mecanismos de citocinese prematura (*pc1* e *pc2*), os micrósporos formados são geneticamente idênticos à *Second Division Restitution* ou SDR, ou seja, à restituição da segunda divisão meiótica. O núcleo restitui-se após a separação disjuncional dos cromossomos homólogos, isto é, após a anáfase I. Cada produto da separação disjuncional – um complemento haplóide – divide-se mitoticamente, mas as cromátides irmãs não se separam para os pólos, devido à citocinese prematura (Ramanna, 1979). A diferença genética entre a FDR e a SDR está, principalmente, no percentual de heterozigidade transmitida. A restituição da segunda divisão meiótica transfere em torno de 40% da heterozigose parental à progênie (Hermesen, 1984). Todos os locos do centrômero até a primeira permuta genética serão homozigotos nos gametas e todos aqueles, após a primeira permuta genética, que são heterozigotos no parental permanecerão heterozigotos nos gametas. É esperado que gametas provenientes dos resultados do mecanismo de restituição da primeira divisão sejam semelhantes aos clones parentais. Em contraste, é esperado que o mecanismo de restituição da segunda divisão produza uma população heterogênea, mas com gametas altamente homozigotos (Peloquin et al., 1999).

A identificação de espécies diplóides com caracteres agrônômicos de interesse e produtoras de gametas  $2n$ , em alta frequência, é um importante passo para a realização de hibridações com cultivares tetraplóides. Entretanto, na maioria das espécies diplóides e tetraplóides a produção de gametas  $2n$  é baixa (Werner & Peloquin, 1991; citados por Sebastiano et al., 2001). Os mecanismos citológicos que conduzem à formação de gametas  $2n$  são controlados por alelos recessivos. No entanto, a sua herança nem sempre é simples e a sua expressão fenotípica é altamente influenciada por alterações ambientais (Veilleux, 1985 e Bani AAmour et al., 1992, citados por Sebastiano et al., 2001).

A descoberta de mutantes sinápticos associados aos mutantes meióticos tem despertado a atenção dos melhoristas para a utilização de cultivares produtores de gametas  $2n$  (Jongedijk & Ramanna, 1988 e Peloquin et al., 1989; citados por Hanneman, 1999). O mutante sináptico designado *sy4*, por exemplo, apresenta herança monogênica recessiva (Iwanaga & Peloquin, 1979). As anormalidades meióticas oriundas da sua presença são: reduzido pareamento entre homólogos, alta frequência de univalentes na diacinese, falta de pareamento na metáfase I, dispersão dos cromossomos na anáfase I e produção de pólen estéril devido ao desbalanço cromossômico (Iwanaga, 1984). No entanto, quando este mutante é combinado com o mutante meiótico *ps* (fuso paralelo), pólen  $2n$  fértil é produzido. Mutantes assinápticos podem transferir aproximadamente 95% do genótipo parental intacto, sendo, portanto, possível a transmissão de quase 100% da heterozigose do genótipo parental para o genótipo da descendência. Isso é possível se o mutante sináptico é completamente assináptico, não havendo pareamento e, conseqüentemente, não havendo permuta genética. Dessa forma o mutante sináptico (*sy4*), aliado ao mutante meiótico (*ps*), propicia um importante método de melhoramento que maximiza a heterozigose e a epistasia parental para a progênie (Peloquin, 1983; citado por Hanneman, 1999).

Um outro mutante meiótico designado por *sy3* foi encontrado na progênie de cruzamentos de parentais diplóides, ambos portadores de alta frequência de alelos *ps*. A expressão do mutante *sy3* é caracterizada por uma quase ausência de permuta. Em alguns clones portadores de *sy3*, apenas univalentes são visualizados na metáfase I e permanecem distribuídos aleatoriamente no núcleo em telófase I. Este fenômeno, em geral, conduz à quase completa macho esterilidade. Entretanto, quando o alelo mutante *sy3* é combinado com alelos *ps*, por exemplo, um genótipo duplo homozigoto *sy3/sy3*

*ps/ps*, uma alta frequência de grãos de pólen  $2n$  funcionais é formada (Peloquin et al., 1999).

Durante a megasporogênese normal das espécies de *Solanum*, a primeira e a segunda divisão meiótica são seguidas por citocinese. No final da segunda divisão, quatro megásporos  $n$  são formados, entretanto, três são degenerados e apenas um é funcional. O único megásporo remanescente sofre três divisões mitóticas para formar o gametófito feminino. No entanto, dois mutantes meióticos, na cultura da batata, podem atuar promovendo a formação de óvulos  $2n$ . Um deles se refere ao controle da omissão da segunda divisão meiótica (*os*), sendo o mecanismo predominante no gênero *Solanum* para a formação de óvulos  $2n$ . O outro mutante é o da falha na citocines (*fc*), o qual acontece após a segunda divisão meiótica e promove uma fusão nuclear. Os mecanismos envolvidos nestes dois variantes são geneticamente equivalentes ao mecanismo de SDR (Peloquin et al., 1999).

A ação dos mutantes meióticos nas espécies de *Solanum* é de grande importância para os programas de melhoramento da cultura. As estratégias de melhoramento, em grande parte, utilizam a capacidade de formação de gametas não reduzidos, principalmente nas espécies selvagens ou nas espécies cultivadas que são fonte de diversidade gênica. Por exemplo, haplóides de *S. tuberosum* e *S. andigena* são bons materiais para o aumento da diversidade alélica das cultivares. Os gametas  $2n$  são formas efetivas e eficientes para transmissão de alelos de interesse. Atualmente, uma das estratégias mais usadas envolve a obtenção de progênes a partir do cruzamento de espécies tetraplóides e diplóides, no qual a forma parental diplóide seja produtora de pólen  $2n$  via mutante meiótico *ps*. Esta estratégia de melhoramento é designada por poliploidização sexual unilateral (Peloquin et al., 1999).

### 2.3.3 Viabilidade do pólen

A propagação da batata pode ser feita de forma assexuada, no entanto, a utilização de sementes botânicas, pelos melhoristas, para a produção de novas variedades e o emprego da polinização controlada, em cruzamentos inter e intraespecíficos, para ampliar a base genética da cultura, defrontam-se com o problema da grande variação na quantidade de pólen viável produzido pelas diferentes variedades de batata. De modo geral, a literatura tem mostrado que as espécies silvestres produzem pólen em abundância e com alta viabilidade, enquanto as variedades cultivadas apresentam baixa produção de pólen, podendo ocorrer também problemas de viabilidade.

Os estudos sobre viabilidade do pólen possibilitam indicar ao melhorista a habilidade do material disponível em produzir pólen viável e permitem mostrar a existência de diferenças intervarietais ou interespecíficas entre os genótipos empregados no programa de melhoramento. Além disso, irregularidades meióticas são eventos descritos como responsáveis pela menor porcentagem de polens viáveis. A condição tetraplóide da batata cultivada ( $2n=4x=48$ ) contribui para a segregação irregular dos cromossomos na meiose e, conseqüentemente, para a produção de micrósporos desbalanceados. Assim, um melhor conhecimento sobre a meiose e a viabilidade do grão de pólen é importante para o sucesso em programas de melhoramento da batata (Davide, 1998).

Por meio de dados de viabilidade de pólen, é possível obter correlações com anormalidades meióticas, auxiliar na seleção de materiais genéticos e fazer inferências sobre os melhores cruzamentos, tornando-se uma ferramenta útil na condução de experimentos nas áreas agrícola e biotecnológica (Techio, 2002).

A viabilidade do pólen pode ser determinada por técnicas de coloração, em que são usados corantes como carmim acético, azul de anilina, azul de algodão, iodeto de potássio (Hauser & Morrison, 1964; Stanley & Linskens,

1974) e verde malaquita com ácido fucsínico (Alexander, 1980). Considerando que existe uma correlação viabilidade-coloração, a estimativa é dada pela contagem dos polens não abortados e abortados que se mostram corados e não corados, respectivamente, ou com cores diferentes, como é o caso do corante de Alexander (Techio, 2002).

Alguns estudos têm sido feitos com substâncias químicas que estimulam o desenvolvimento do tubo polínico *in vitro*, oferecendo perspectivas para o aumento da produção de várias culturas por meio da obtenção do índice máximo de fertilização. No entanto, fatores ambientais, como composição do meio de cultura, temperatura, pH e umidade, são intrínsecos à própria natureza do pólen e estão relacionados com o seu estado de maturação fisiológica, sua origem, suas características genéticas e nutrição da planta (Oliveira Júnior, 1999).

Na germinação de grãos de pólen *in vitro* consideram-se polens viáveis aqueles cujo tubo polínico emitido tiver o seu comprimento igual ou superior ao diâmetro do pólen. O método consiste em germinar uma pequena amostra em meio apropriado e observar em microscópio, após a emissão do tubo polínico (Galletta, 1983). O processo de emissão do tubo polínico é geralmente rápido, iniciando-se pelo estímulo de componentes químicos como água destilada, ácido bórico, ácido nítrico, nitrato de cálcio, sulfato de magnésio, sacarose e nitrato de potássio (Kwack & Brewbaker, 1963).

Em geral, os meios de cultura devem ser constituídos por carboidratos e elementos estimulantes, como ácido bórico, ácido cítrico, nitrato de cálcio e reguladores de crescimento. A causa das principais fontes de variação no meio de germinação do pólen tem sido as diferentes concentrações de boro (Miranda & Clement, 1990). A sacarose tem por finalidade proporcionar o equilíbrio osmótico entre o pólen e o meio de germinação e fornecer energia para auxiliar o processo de desenvolvimento do tubo polínico (Stanley & Linskens, 1974). Todo o período de formação do tubo polínico é controlado por substâncias

naturais de crescimento, as quais incluem tanto promotores quanto inibidores, sugerindo que os promotores de crescimento dirigem o tubo polínico por quimiotropismo, não necessitando de luz para ocorrer o processo. Nos testes envolvendo a emissão do tubo polínico, sugere-se que os meios utilizados podem ser líquidos (Chichiricco & Caiola, 1986) ou sólidos (Pasqual et al., 1982).

Mendes (1994) estudou a viabilidade do pólen em cultivares comerciais de *Solanum tuberosum* (Baronesa, Baronesa Branca, Monte Bonito e Trapeira) e em espécies selvagens *S. commersonii* ssp *commersonii* e *S. commersonii* ssp *malmeanum*, tanto pela técnica de coloração com carmim acético quanto pela técnica de germinação do tubo polínico *in vitro*. A autora verificou, por ambas as técnicas, que a viabilidade do pólen em espécies selvagens é significativamente maior que a dos cultivares comerciais.

Em seus estudos sobre a viabilidade do grão de pólen de *Solanum* spp, Mendes (1994) fez uma revisão em trabalhos em que foram discutidos o diâmetro e a viabilidade do pólen de mais de 100 espécies e híbridos de batata. Com base nesses trabalhos, os diâmetros médios das espécies e híbridos diplóides apresentaram de 17,55 a 30,40  $\mu\text{m}$ , os tetraplóide de 22,10 a 32,92  $\mu\text{m}$  e os hexaplóides de 22,67 a 30,38  $\mu\text{m}$ . Tarn & Hawkes (1986) citam o diâmetro de 21,30 e 23,20  $\mu\text{m}$  para as subespécies *commersonii* e *malmeanum*, respectivamente.

Pandolfi (1998) observou, pela técnica de coloração com carmim acético 2%, aproximadamente 200 grãos de pólen por botão floral para as espécies de *S. commersonii commersonii* e um percentual de polens viáveis com médias em torno de 78,93% e para *S. commersonii malmeanum* um percentual de polens viáveis com médias em torno de 60,33%.

É recomendado que os procedimentos para coloração visando o estudo da viabilidade do pólen sejam determinados a partir de vários testes, os quais

poderão auxiliar na padronização de um protocolo para a espécie em estudo, levando em consideração as características morfofisiológicas e químicas do grão de pólen.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material genético

O experimento foi conduzido no Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), no período de abril de 2003 a julho de 2004.

O material genético avaliado constituiu-se de clones da espécie silvestre *Solanum commersonii* ( $2n=2x=24$ ) e de clones e cultivares da batata cultivada *Solanum tuberosum* ( $2n-4x=48$ ). O material silvestre utilizado foi representado por 3 clones de *Solanum commersonii commersonii* (SCC) SCC 07, SCC 176, SCC 100 e 2 clones de *Solanum commersonii malmeanum* (SCM) SCM 60 SCM 57, os quais vêm sendo utilizados em programas de melhoramento como fonte de resistência à murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* e a podridão mole e canela preta, causadas por *Erwinia carotovora* (Carputo et al., 2003), além de apresentarem um elevado índice de matéria seca. Os tubérculos desses clones eram provenientes da Coleção de Germoplasma da Batata do Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado (CPACT), da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Pelotas, RS. A Tabela 1 mostra os respectivos locais de procedência e ano de coleta de cada clone de *Solanum commersonii commersonii* e *Solanum commersonii malmeanum*.

TABELA 1 Procedência e ano de coleta dos clones de *Solanum commersonii commersonii* e *Solanum commersonii malmeanum*. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Clone	Procendência	Ano de coleta
SCC 100	Santa Vitória do Palmar, RS	1988
SCC 176	São Borja, RS	1989
SCC 07	Uruguai	1986
SCM 57	Santo Ângelo, RS	1987
SCM 60	Porto Lucena, RS	1987

Fonte: Rocha et al. (2000).

Os clones de *S. tuberosum* ESL 7-6; ESL 9-4; ESL 22-08; CBM 8-26; CBM 24-06 e LT9, e as cultivares Garant, Niska, Jenseng, Chiquita e o híbrido Baraka x Chiquita também foram estudados. Os clones de *Solanum tuberosum* designados ESL são híbridos tetraplóides entre clones *Solanum tuberosum* spp *andigena* (resistente a *Phytophthora infestans*) e *Solanum tuberosum* (Lambert, 2001). Já os clones denominados CBM 8-26 são híbridos entre Baronesa e DTO-28 e o CBM 24-06 é um híbrido entre os clones DTO-28 e LT9 (Menezes, 1999), sendo os clones DTO-28 e LT9 provenientes do Centro Internacional de La Papa (CIP) e considerados tolerantes ao calor. A cultivar Garant apresenta elevado índice de matéria seca e resistência a *P. infestans*. Niska e Jenseng apresentam bom potencial produtivo e resistência ao vírus X e Y. As cultivares Baraka e Baronesa têm alto potencial produtivo e a cultivar Chiquita é adaptada às condições encontradas no sul de Minas Gerais. Os materiais utilizados para a realização dos trabalhos encontravam-se no Banco de Germoplasma da Batata do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (DBI/UFLA), Lavras, MG

Os tubérculos, com brotações previamente induzidas, foram plantados em vasos plásticos contendo substrato Plantmax<sup>®</sup>. As plantas foram mantidas em casa de vegetação do DBI/UFLA, durante os meses de abril a julho de 2003, sob 16 horas de fotoperíodo. Os botões florais e flores foram coletados no período da manhã, aproximadamente às 9 horas e as análises meióticas foram realizadas no Laboratório de Citogenética, DBI/UFLA.

## **3.2 Características avaliadas**

### **3.2.1 Viabilidade do pólen**

Para a avaliação da viabilidade polínica foram realizados dois procedimentos: (i) teste de germinação do grão de pólen *in vitro* e (ii) coloração dos grãos de pólen com carmim acético 2%. Foram avaliadas 5 lâminas e 200 grãos de pólen por lâmina por material. Estes testes de viabilidade do grão de pólen foram realizados em todo o material vegetal descrito.

#### **(i) Viabilidade do pólen por germinação *in vitro***

Foram coletadas 5 flores de cada clone de batata, tendo cada flor constituído-se de uma repetição, para germinação *in vitro* do grão de pólen. Três anteras de cada flor foram retiradas e fixadas em carnoy, etanol/ácido acético (3:1), por, pelo menos, 24 horas. Duas anteras de cada flor foram utilizadas para inoculação dos grãos de pólen no meio de cultura contendo 165 gL<sup>-1</sup> de sacarose, 12 gL<sup>-1</sup> de ágar, 20 mgL<sup>-1</sup> de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> .4H<sub>2</sub>O, 10 mgL<sup>-1</sup> de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, dissolvidos em água destilada (Mendes, 1994). As lâminas com meio de cultura e grãos de pólen a serem germinados foram armazenados em câmara germinadora a 25°C-28°C para os clones SCC 07, SCC 176 e SCM 60 e em temperatura ambiente (20°C-22°C) para os clones SCC 100, SCM 57 e para os demais materiais de S.

*tuberosum*, por 24 horas. Posteriormente, foram avaliados 200 grãos de pólen por lâmina, num total de 5 lâminas, na objetiva de 20X. As anteras fixadas foram armazenadas no freezer por, no mínimo, 24 horas, para posterior preparo de lâminas para o teste de coloração.

#### (ii) Produção e viabilidade do pólen por coloração

Das anteras fixadas em carnoy e armazenadas em freezer, foram montadas lâminas por esmagamento para a liberação dos grãos de pólen. Os grãos de pólen foram corados em solução carmim acético 2%. Posteriormente, foram avaliadas 5 lâminas de cada material e, de cada lâmina, foram avaliados 200 grãos de pólen entre viáveis e não viáveis. Nestas lâminas também foi avaliado o número médio de grãos de pólen, sendo contado, na objetiva de 20X, o número total de polens em 5 campos por lâmina avaliada.

### 3.2.2 Meiose

Realizaram-se dois tipos de avaliações na meiose, descritos a seguir.

#### (i) Identificação de anormalidades meióticas

As avaliações das anormalidades meióticas foram realizadas seguindo-se a técnica de esmagamento proposta por Oliveira et al. (1995) nos clones de *Solanum commersonii* ssp. *commersonii* e *Solanum commersonii* ssp. *malmeanum*, bem como na cultivar Chiquita (*Solanum tuberosum*). Foram coletados botões florais de cada táxon. Os botões florais foram fixados em carnoy (3 partes de álcool etílico:1 parte de ácido propiônico) e armazenadas a 4°C até o uso. Para a montagem das lâminas foram extraídos os meiócitos de

cada antera por esmagamento e corados em solução carmim propiônico 2%. Foram avaliadas 6 lâminas de cada material, sendo analisados 100 meiócitos por lâmina.

## **(ii) Avaliação da diacinese e do diplóteno**

O pareamento cromossômico foi avaliado em diplótenos e diacineses, utilizando-se a técnica de maceração enzimática e secagem ao ar (Carvalho, 1993) nos clones de *Solanum commersonii* ssp *commersonii* e *Solanum commersonii* ssp *malmeanum*. Aproximadamente 100 anteras de cada clone foram colocadas em recipiente com fixador, metanol/ácido acético (3:1) e transferidas para um tubo Eppendorf, especialmente adaptado com tela de náilon (poro de 100 µm) na extremidade. As anteras foram lavadas em água destilada por um período de 3 minutos para que o fixador fosse removido. Após, o excesso de água foi retirado, sobrepondo-se o tubo com as anteras sobre um papel filtro. O tubo contendo as anteras foi imerso em solução enzimática concentrada Pectinex<sup>®</sup>, o suficiente para cobrir as anteras. Em seguida, foi colocado em banho-maria, a 34°C, por 1h 30 min. Após o tempo de digestão, o tubo filtro especial contendo as anteras foi transferido para outro Eppendorf, 0,5 mL, com fixador, metanol/ácido acético (3:1), o suficiente para atingir a tela. As anteras contidas no tubo especial foram maceradas, cuidadosamente, com o auxílio de uma agulha de costura (cabeça), de modo que as células-mãe do grão de pólen (PMCs) fossem transferidas naturalmente do tubo especial, através da tela do náilon, pelo efeito de gravidade, para o tubo Eppendorf com a solução fixadora. A solução foi centrifugada a 2000 rpm, por 3 minutos. O sobrenadante foi retirado, deixando apenas o pellet no final. Completou-se novamente com a solução fixadora, ressuspensão celular e nova centrifugação, 2000 rpm, por 3

minutos. Esta etapa foi repetida duas vezes com posterior armazenamento da suspensão em freezer por, pelo menos, 24 horas.

Na montagem das lâminas realizou-se a ressuspensão celular, a qual foi gotejada sobre uma lâmina bem limpa e gelada, a uma altura de aproximadamente 20 cm. A lâmina foi seca ao ar e, posteriormente, em placa aquecedora a 50°C. Em seguida, a mesma foi imersa em solução de ácido acético 45%, por 1 minuto e corada com solução giemsa 10%, por 3 minutos. Seguiram-se duas lavagens rápidas em água destilada e secagem ao ar e em placa aquecedora.

A análise das lâminas foi feita em fotomicroscópio Olympus BX60 e as imagens foram capturadas por meio de uma microcâmera Optronics.

### **3.2.3 Produção de pólen não reduzido**

O pólen não reduzido é considerado aquele que apresenta o mesmo número de cromossomos que a célula somática que lhe deu origem. Anteras provenientes das flores utilizadas para o teste de viabilidade do pólen por germinação *in vitro* foram fixadas em carnoy e armazenadas em freezer por, no mínimo, 24 horas. Em seguida, foi feita a montagem de lâminas por esmagamento para a liberação dos grãos de pólen. Os grãos de pólen foram corados em solução carmim acético 2%. Posteriormente, foram avaliadas 5 lâminas de cada táxon e, de cada lâmina, foram medidos os diâmetros de 200 grãos de polens viáveis (Quin et al., 1974 e Ramanna, 1974), com o auxílio de ocular micrometrada, em objetiva de 20 X.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Viabilidade do pólen por coloração, germinação *in vitro* e produção do pólen

Houve diferenças significativas para todas as variáveis analisadas no estudo de viabilidade de pólen, a 1% de probabilidade, conforme a Tabela 2 de análise de variância. Na Tabela 3 estão apresentados os valores percentuais médios de polens viáveis, pelo método de coloração e germinação *in vitro*. A Figura 2 apresenta polens viáveis e inviáveis, observados pelos métodos de coloração com carmim acético 2% (Figura 2A) e germinação *in vitro* (Figura 2B).

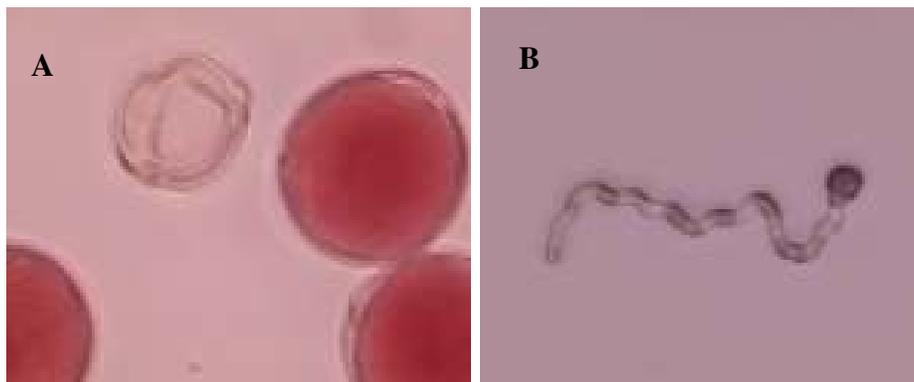


FIGURA 2 Grãos de pólen de *Solanum* spp. A- polens corados, viáveis e polens não corados, inviáveis; B- grão de pólen germinado *in vitro*. UFLA, Lavras, MG, 2004.

TABELA 2 Análise de variância para viabilidade de pólen pelos métodos de coloração por carmim acético 2% e germinação *in vitro* e produção de grãos de pólen. UFLA, Lavras, MG, 2004.

FV	Quadrado médio			
	GL	Coloração	<i>In vitro</i>	Produção pólen
Genótipos	15	4806,9191**	4295,079**	92918,899**
Resíduo	64	104,404	83,378	7724,74
CV(%)		17,26	34,51	29,41
Média		59,18	26,46	298,84

\*\*significativo a 1% de probabilidade.

Segundo o método de coloração, consideraram-se como grãos de pólen viáveis aqueles corados em vermelho e como grãos de pólen inviáveis os que não foram corados. Os percentuais médios de polens viáveis, pelo método de coloração, foram entre 6,4% e 83,8% para os clones de *S. tuberosum* L. Os clones de *S. commersonii* ssp. apresentaram médias entre 52,8% e 97,8% de polens viáveis. Nas avaliações de viabilidade do pólen por meio da germinação *in vitro*, consideraram-se polens viáveis aqueles cujo comprimento do tubo polínico emitido fosse igual ou superior ao diâmetro do pólen. O percentual médio de polens viáveis por este método variou de 1% a 60%, para os clones de *S. tuberosum* ssp e de 5,6% a 78,5%, para os clones selvagens de *S. commersonii* ssp (Tabela 3).

TABELA 3 Médias relativas aos percentuais de polens viáveis avaliados pelo método de coloração em solução carmim acético 2%, por germinação *in vitro* do grão de pólen e da produção de grãos de pólen, por campo na lâmina. UFLA, Lavras, MG, 2004.

<b>Genótipos</b>	<b>Coloração (%)</b>	<b><i>In vitro</i> (%)</b>	<b>Produção de polens</b>
LT9	6,40 e	1,00 e	127,12 c
Garant	7,00 e	1,00 e	307,40 b
Niska	36,20 d	1,10 e	147,36 c
Jenseng	81,50 b	8,40 e	176,80 c
Chiquita	63,30 c	60,00 b	198,84 c
Baraka x Chiquita	56,00 c	26,80 d	362,36 a
CBM 8-26	48,80 c	4,70 e	279,76 b
CBM 24-06	10,10 e	1,00 e	85,24 c
ESL 7-6	60,80 c	4,50 e	306,20 b
ESL 9-4	78,60 b	3,50 e	269,88 b
ESL 22-08	83,80 b	49,50 c	200,00 c
SCC 07	73,00 b	58,00 b	438,80 a
SCC 100	52,80 c	5,60 e	514,00 a
SCC 176	97,80 a	44,60 c	434,40 a
SCM 57	94,40 a	78,50 a	454,20 a
SCM 60	96,50 a	75,00 a	476,20 a
<b>Média geral</b>	<b>59,187</b>	<b>26,46</b>	<b>298,845</b>
<b>CV (%)</b>	<b>17,26</b>	<b>34,51</b>	<b>29,41</b>
<b>Correlação (coloração/<i>in vitro</i>)</b>	<b>0,6923</b>		

Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott (1974), a 5% de probabilidade.

Os clones de *S. commersonii* ssp em relação aos materiais avaliados de *S. tuberosum*, com exceção do clone SCC100, apresentaram maiores médias de polens viáveis, por ambos os métodos de avaliação empregados. Para a maioria dos clones avaliados observou-se que o método de coloração indica uma maior média de polens viáveis em relação ao método de germinação *in vitro*. Os clones da espécie selvagem de batata SCM 57 e SCM 60 destacaram-se por apresentarem a maior viabilidade de pólen em ambos os testes empregados.

Estes resultados de viabilidade de pólen pelo método de coloração estão de acordo com os obtidos por Mendes (1994), que encontrou elevadas médias de viabilidade para os clones SCC e SCM, apresentando respostas superiores a 80%. Para Parfitt & Ganeshan (1989), a coloração em carmim acético não produz resultados confiáveis, pois estes autores inviabilizaram grãos de pólen por meio de altas temperaturas e, mesmo assim, o teste com este corante detectou alto nível de aparente viabilidade polínica. Isto pode explicar os maiores valores encontrados para viabilidade, pelo método de coloração, quando comparados com os de germinação *in vitro*. A coloração, embora seja um procedimento simples e barato, não é totalmente confiável, podendo superestimar os valores de viabilidade (Techio, 2002). Neste trabalho foi feita a correlação entre os métodos de avaliação da viabilidade do pólen por coloração e germinação *in vitro* (Tabela 3). Do resultado encontrado,  $r = 0,6923$ , pode-se concluir que a seleção de polens viáveis com base apenas no método da coloração não é adequada para explicar os percentuais encontrados na germinação *in vitro*.

Os resultados obtidos para germinação *in vitro* diferem dos obtidos por Mendes (1994) e Pandolfi (1998), que encontraram taxas de germinação entre 57% e 94%, para os clones de SCC e de 20% e 93% para os clones de SCM. Essas diferenças são, provavelmente, devido aos diferentes clones de SCC e SCM utilizados, bem como às diferenças climáticas no momento da coleta.

Além disso, a germinação *in vitro*, embora forneça um sistema experimental controlado, não reproduz completamente o crescimento do tubo polínico *in vivo*, podendo ocorrer interações entre a composição do meio de cultura e os diferentes materiais vegetais. Entretanto, é possível concordar com Mendes (1994), que se refere à técnica de germinação *in vitro* como aquela que apresenta resultados mais próximos aos que, provavelmente, ocorrem *in vivo*. Os resultados obtidos neste trabalho, com relação à viabilidade do pólen, vêm confirmar os dados de Mendes (1994) e Pandolfi (1998) que mostraram que as espécies selvagens normalmente produzem maior percentual de polens viáveis, quando comparadas com a espécie cultivada. Pode-se ressaltar que o comportamento meiótico dos tetraplóides tende a ser mais complexo em relação aos diplóides. Isso pelo fato de que a condição tetraplóide da batata cultivada ( $2n=4x=48$ ) contribui para a segregação irregular dos cromossomos na meiose, de forma que micrósporos desbalanceados são formados levando à formação de gametas inviáveis.

Quanto à produção dos grãos de pólen em cada clone (Tabela 3), observou-se que as médias dos clones selvagens foram superiores às médias das cultivares e clones de *S. tuberosum* L., com exceção do híbrido Baraka x Chiquita, que apresentou média significativamente alta (362,36) para esse teste, comparada às dos clones de *S. commersonii* ssp. Já a cultivar Chiquita apresentou, em média, uma produção de 198,84 polens por lâmina. Este poderia ser considerado um valor de referência para o estabelecimento de um limite mínimo quanto à uma boa produção de polens, uma vez que esta cultivar é considerada um bom genitor nos programas de melhoramento genético da UFLA.

#### **4.2 Anormalidades meióticas em *Solanum commersonii* ssp. e *Solanum tuberosum* L. (cultivar Chiquita)**

A Tabela 4 apresenta o percentual total de células anormais e os tipos de anormalidades observadas nos clones que tiveram a meiose avaliada. Avaliaram-se 5.775 meiócitos dos clones de *S. commersonii commersonii* e *S. commersonii malmeanum*, dos quais, 11% (635) eram anormais.

Somente a cultivar Chiquita foi avaliada com relação às anormalidades meióticas. Entre as fases da meiose de todos os clones de *S. commersonii* ssp e da cultivar Chiquita, a metáfase II foi aquela que apresentou maior frequência de anormalidades (32%); em seguida, obtiveram-se 17% de células anormais na metáfase I, 20% na anáfase I e 14% na anáfase II. As demais anormalidades em *S. commersonii* ssp. estão distribuídas em baixas frequências nas demais fases da meiose.

Das 920 células observadas da cultivar Chiquita, 9% eram anormais (Tabela 4). É importante salientar que, entre as cultivares de *S. tuberosum* L., a Chiquita é a que apresenta os melhores resultados de germinação de pólen (Tabela 3). Estes resultados demonstram que o percentual das anormalidades na cv. Chiquita assemelham-se aos encontrados para os clones de *S. commersonii* ssp. com menores taxas de anormalidades e estão coerentes com o bom desempenho, em relação à possibilidade de hibridações viáveis, da cultivar Chiquita no programa de melhoramento genético da UFLA (Pinto, 2004 - comunicação pessoal).

TABELA 4 Percentual de anormalidades meióticas encontradas nos clones de *S. commersonii* ssp. e na cultivar Chiquita. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Anormalidades	SCC 07	SCC 100	SCC 176	SCM 57	SCM 60	Chiquita
Micronúcleo (PI)	7	1	12	4	3	4
Asc. precoce (MI)*	30	42	52	22	13	12
Asc. precoce (MII)**	3	1	0	8	5	13
Divisão assincrônica	36	15	16	38	22	50
Fusos paralelos	18	7	0	27	22	11
Fusos fundidos	0	7	10	0	0	8
Micronúcleo (PII)	6	6	10	1	9	0
Triade	0	21	0	0	26	2
<b>Número de células anormais</b>	<b>77</b>	<b>308</b>	<b>64</b>	<b>85</b>	<b>70</b>	<b>83</b>
<b>Total de células</b>	<b>773</b>	<b>1540</b>	<b>917</b>	<b>846</b>	<b>779</b>	<b>920</b>
<b>% Células anormais</b>	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>7</b>	<b>10</b>	<b>9</b>	<b>9</b>

\*Ascensão precoce na metáfase I, \*\*Ascensão precoce na metáfase II, PI= prófase I e PII= prófase II.

Com relação à *S. commersonii* ssp, de modo geral, os clones SCC 07, SCC 176, SCM 57 e SCM 60 apresentaram em torno de 10% de células anormais e viabilidade pelo teste de germinação *in vitro* variando entre 58% e 78,50% (Tabelas 3 e 4). Pode-se notar que este percentual de células anormais não foi o suficiente para ocasionar uma alta taxa de inviabilidade do pólen tanto para os clones de *S. commersonii* ssp. quanto para a cultivar Chiquita. Por outro lado, o clone SCC 100 apresentou o dobro de células anormais 20% (Tabela 4) e isto pode ter contribuído para a baixa viabilidade de pólen (5,6%) detectada pelo teste de germinação *in vitro*.

Em todos os clones de *S. commersonii* ssp. foram encontrados fusos paralelos e ou fusos fundidos (Tabela 4). Esses tipos de alterações na formação das fibras do fuso são de especial interesse para a transmissão de graus variados de heterozigose em hibridações visando ao melhoramento da batata e, por levarem à formação de pólen não reduzido, serão discutidos separadamente.

Dentre as anormalidades freqüentes na microsporogênese da batata selvagem *S. commersonii* ssp e da cultivar Chiquita, destacam-se a ascensão precoce dos cromossomos durante a metáfase I e a divisão assincrônica na metáfase II (Tabela 4). No entanto, a divisão assincrônica, possivelmente, não é a principal causa de inviabilidade do pólen, uma vez que nos clones de SCC 07 e SCM 57, que apresentaram alto percentual desta anormalidade, não foi observada alta inviabilidade do pólen. Por outro lado, a ascensão precoce de cromossomos foi a anormalidade mais freqüente no clone SCC 100, que apresentou a maior taxa de polens inviáveis.

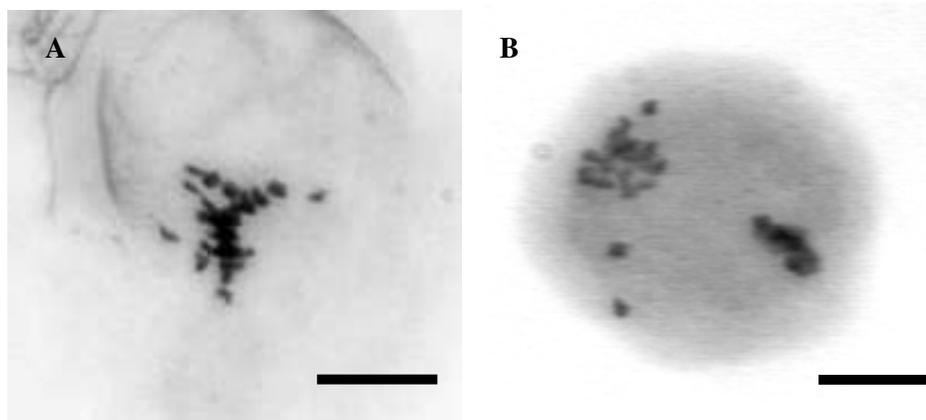


FIGURA 3 Metáfases meióticas do clone SCC 100. A- metáfase I, apresentando cromossomos em ascensão precoce; B- divisão assincrônica e ascensão precoce, na metáfase II. Barra = 5  $\mu$ m. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Este resultado foi compatível com o apresentado por Pandolfi (1998), que também acompanhou o ciclo meiótico de clones de *S. commersonii commersonii*, *S. commersonii malmeanum* e *S. tuberosum*. A autora detectou entre 5,18% e 51,07% de cromossomos em ascensão precoce ou cromossomos atrasados nas duas subespécies de *S. commersonii* spp, o que a levou a sugerir a existência de problemas no pareamento cromossômico ou de terminalização precoce de quiasmas. Esta autora observou, ainda, maior frequência de anormalidades meióticas do tipo ascensão precoce e cromossomos atrasados no clone de *S. commersonii malmeanum* em relação à frequência encontrada nos clones de *S. commersonii commersonii* e de *S. tuberosum*. As diferenças em relação aos resultados deste trabalho possivelmente foram devido aos diferentes genótipos utilizados e às variações ambientais.

Masuelli & Camadro (1992) citam que um híbrido triplóide, envolvendo *S. commersonii* como um dos pais, apresentou 87% de células com 2 a 8 cromossomos fora da placa metafásica, na segunda divisão. Neste trabalho foram observados entre 1 e 5 cromossomos perdidos. Pagliarini (2000), em uma discussão sobre o comportamento meiótico de várias espécies como milho, cana-de-açúcar, primavera e outros, cita que a anormalidade meiótica mais comum é a segregação irregular de cromossomos, caracterizada pela ascensão precoce dos mesmos nas fases de metáfase I e anáfase I ou cromossomos atrasados. A mesma autora cita que a presença de cromossomos univalentes nos meiócitos pode favorecer a uma certa frequência de cromossomos em ascensão precoce na metáfase I ou cromossomos atrasados na anáfase I ou II. A cromátide “adiantada ou retardatária” poderá ser incluída em um dos núcleos ou isolar-se, formando um micronúcleo que, posteriormente, pode ser eliminado. Isso também poderia ser devido à baixa frequência de quiasmas, como é o caso da batata.

#### 4.3 Estudo da diacinese e do diplóteno em *S. commersonii* ssp.

Quanto às avaliações do pareamento cromossômico, o clone SCC 07 apresentou todas as 30 células em diacineses normais, sendo sempre observados 12 bivalentes. Já o clone SCC 100 foi o que apresentou maior percentual de anormalidades (100%) em relação ao seu total de diacineses avaliadas (Tabela 5). Na Tabela 5, estão apresentadas as anormalidades encontradas nos meiócitos em diplóteno e diacinese e suas respectivas frequências de ocorrência.

Koopmans (1951), em seu trabalho sobre estudos citogenéticos de *Solanum tuberosum* e algumas espécies relacionadas, cita o pequeno tamanho dos cromossomos e que aderências entre os mesmos dificultam a análise citológica. Esse tipo de observação também foi relatado por Sangowawa & Choudhuri (1986), Sangowawa (1987) e Masuelli & Camadro (1992), os quais ressaltam a dificuldade em analisar, na meiose, os cromossomos metafásicos, devido à sobreposição dos mesmos na placa equatorial. Além da dificuldade de se conseguir cromossomos bem espalhados, deve-se ressaltar que a diacinese ocorre em período muito curto (Schulz-Schaeffer, 1980). Neste trabalho, também se obteve baixa frequência de meiócitos em diplótenos e diacineses. Os valores obtidos foram 4,65% para o clone SCC 07, 19,23% para o clone SCC 100, 4,43% para o clone SCC 176, 14,10% para o clone SCM 57 e 16% para o clone SCM 60, em um total de 645, 130, 677, 227 e 175 meiócitos por clone, respectivamente.

TABELA 5 Frequência de anormalidades (%) observadas em células nas fases diplóteno/diacinese, para os clones de *S. commersonii commersonii* e *S. commersonii malmeanum* e totais de células avaliadas. UFLA, Lavras, MG, 2004.

<b>Anormalidades</b>	<b>SCC 07</b>	<b>SCC 100</b>	<b>SCC 176</b>	<b>SCM 57</b>	<b>SCM 60</b>
<b>1. Univalentes</b>	0,00	24,00	33,33	5,88	12,50
<b>2. Trivalentes</b>	0,00	28,00	16,67	11,76	25,00
<b>3. Tetravalentes</b>	0,00	4,00	33,33	0,00	0,00
<b>4. Multivalentes</b>	0,00	8,00	0,00	0,00	0,00
<b>5. Anel de translocação</b>	0,00	28,00	16,67	5,88	50,00
<b>6. Condensação tardia</b>	0,00	4,00	0,00	0,00	0,00
<b>7. Fragmentação</b>	0,00	4,00	0,00	76,48	12,50
<b>Número de células anormais</b>	0,00	25,00	12,00	18,00	6,00
<b>Total de diplótenos/ diacinese</b>	30,00	25,00	30,00	32,00	28,00
<b>(%) Células anormais</b>	0,00	100,00	40,00	56,25	21,43

Ao acompanhar o pareamento cromossômico, foi possível encontrar, no clone SCC 100, 4% de tetravalentes, fragmentação e condensação tardia, 24% de univalentes, 28% de trivalentes, anel de translocação e 8% de associações multivalentes (Figura 4A).

O clone SCC 176 apresentou um total de 30 células em diacinese e 40% (12 células) delas eram anormais. Além de ter sido detectada a presença de 16,67% de trivalentes (Figura 5A e 5B) e anel de translocação, 33,33% de univalentes (Figura 4B e 5B) e tetravalentes.

No clone SCM 57, em 56,25% de células anormais, a principal anormalidade foi a do tipo fragmentação cromossômica (76,48%), seguida de 11,76% de trivalentes e 5,88% de univalentes e anel de translocação. O clone

SCM 60, em 28 células avaliadas, apresentou 21,42% de diacineses anormais. Foram encontradas frequências de 12,50% de univalentes e fragmentação cromossômica, 25% de trivalentes e 50% de anel de translocação (Tabela 5).

Em geral, a maioria dos bivalentes observados, nas diacineses, apresentou forma de anel com quiasmas terminalizados e, freqüentemente, dois deles aparecem em forma de bastão ou em anel aberto, presos em uma das extremidades (Figura 4B). Rieger & Michaelis (1958), citados por Schulz-Schaefer (1980) definiram bivalentes em bastão como um tipo de associação no pareamento que tem a formação de quiasma e a sua terminalização em apenas um dos braços do cromossomo em cada um dos homólogos envolvidos. Esta definição pode também ser aplicada a bivalentes em anéis abertos. Segundo Schulz-Schaefer (1980) existe uma diferença óbvia entre bivalentes em bastão e os bivalentes em anéis abertos. Segundo este autor, bivalentes em bastão são o resultado de uma sinapse que ocorreu apenas em uma pequena porção distal em um dos braços de cada um dos homólogos envolvidos. Na associação bivalente em anéis abertos, a sinapse e a repulsão seguintes geralmente causam um dobramento na estrutura cromossômica, resultando em bivalentes em anel parcialmente fechados.

Em *Solanum*, os pequenos cromossomos apresentam baixa frequência de quiasmas (Hermesen, 1984) que, aliada às terminalizações precoces ou à presença de mutantes sinápticos ou dessinápticos na prófase I, geram univalentes. Independente das causas de origem de cromossomos univalentes, em geral, sua presença nos meiócitos irá favorecer uma certa frequência de cromossomos em ascensão precoce na metáfase I ou cromossomos atrasados na anáfase I. Em ambos os casos, eles podem dar origem a micronúcleos na telófase I ou na meiose II (Pagliarini, 2000), como os encontrados neste trabalho.

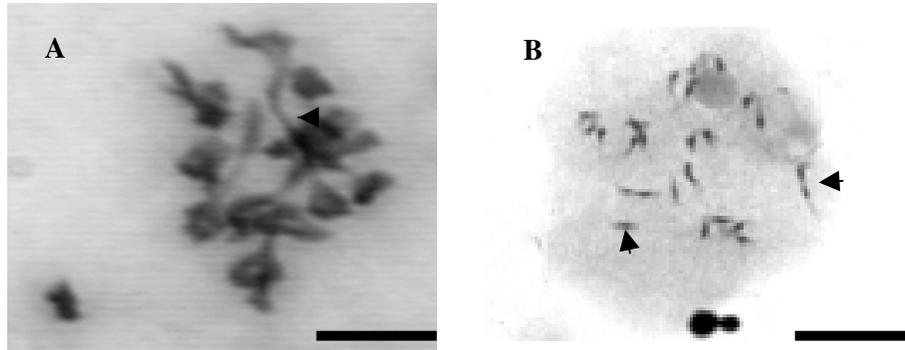


FIGURA 4 Meiócitos do clone SCC 100 de *S. commersonii commersonii*. A- diacinese com multivalente; B- quiasmas terminalizados em forma de bastão, 12 bivalentes e um univalente, no clone SCC 176. Barra = 5 µm. UFLA, Lavras, MG, 2004.

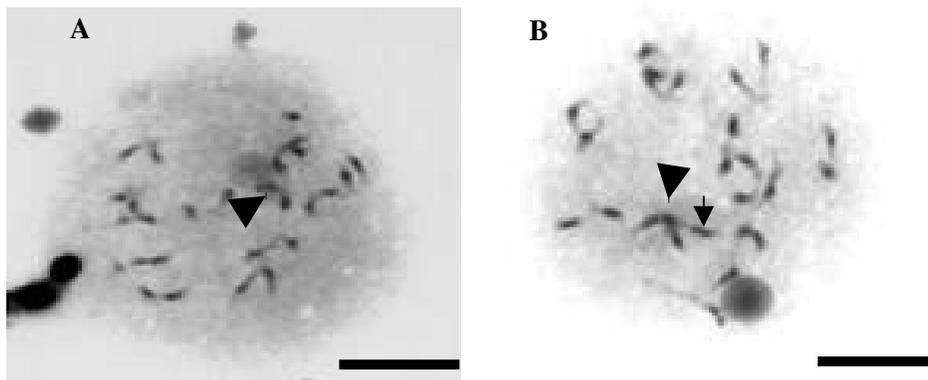


FIGURA 5- Meiócitos do clone SCC 176. A- diacinese com 12 bivalentes e um trivalente B- diacinese com 12 bivalentes, 1 trivalente e 1 univalente. Barra = 5 µm. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Todas essas alterações contribuíram para a formação de gametas aneuplóides, desbalanceados e, normalmente, inviáveis, em todos os clones de *S. commersonii*, com exceção do SCC 07. Guerra (1988) associa a formação de multivalentes em alopoliplóides como sendo uma das causas de macho esterilidade. Assim sendo, as associações multivalentes observadas em células no clone SCC100 podem estar relacionadas à formação de polens anormais.

Vários autores relacionam as alterações cromossômicas na diacinese, como sendo uma das causas da macho esterilidade. Defani-Scoarize et al. (1995) associaram a ocorrência de macho esterilidade no milho devido à ação de irregularidades meióticas do tipo cromossomos univalentes, seguidas por segregações cromossômicas irregulares. Amma et al. (1990) e Nirmala & Kaul (1994) também consideram a formação de univalentes com posterior segregação irregular dos cromossomos como sendo as principais causas da ocorrência de macho esterilidade em *Hevea brasiliensis* e *Pisum sativum*, respectivamente. Pagliarini (1986) cita que esses fatores podem ser responsáveis pela baixa habilidade de algumas linhagens de milho hibridarem-se e que tais condições anormais podem afetar a produção de grãos de pólen viáveis.

Singh (2003) relaciona a presença de cromossomos univalentes e trivalentes à redução na taxa de recombinação entre os homólogos, por consequência, à segregação anormal na progênie resultando em aneuplóides que, por sua vez, ocasionam redução da fertilidade. Um exemplo clássico de surgimento de aneuplóides na natureza é o milho ( $2n=20$ ), em que, esporadicamente, surgem indivíduos com um cromossomo a mais ( $2n=21$ ) ou a menos ( $2n=19$ ). Os indivíduos aneuplóides podem surgir a partir de gametas com número irregular de cromossomos. Esses gametas se formam geralmente durante a meiose I, quando os cromossomos homólogos do bivalente não se separam corretamente um para cada lado, resultando em núcleos telofásicos da

primeira divisão com número desigual de cromossomos. Beadle & McClintock (1928) estudando cromossomos do milho, observaram que a maioria dos esporócitos na metáfase I apresentava 20 univalentes e, raramente, 10 bivalentes. Tais plantas mutantes davam origem a polens e a óvulos abortivos (Singh, 2003).

As translocações cromossômicas também poderiam explicar a esterilidade encontrada em alguns clones. Anéis de translocação envolvendo quatro cromossomos (Figura 6A), bem como tetravalentes em cadeia com forma irregular e alongada (Figura 6B), foram observados. Com a repulsão dos homólogos, a partir do diplóteno, esses cromossomos tendem a assumir a forma de um anel. Na metáfase I, essa forma de anel só é mantida se houver pelo menos um quiasma em cada braço da cruz para manter os cromossomos presos entre si. Caso não ocorra quiasma em um dos braços da cruz, ou haja uma terminalização precoce em um dos braços, o anel se rompe e assume uma configuração idêntica à de um tetravalente em cadeia, como visualizado nas Figuras 6B e 7A. Translocações envolvendo um univalente e um bivalente podem dar origem ao trivalente em cadeia observado na Figura 7B.

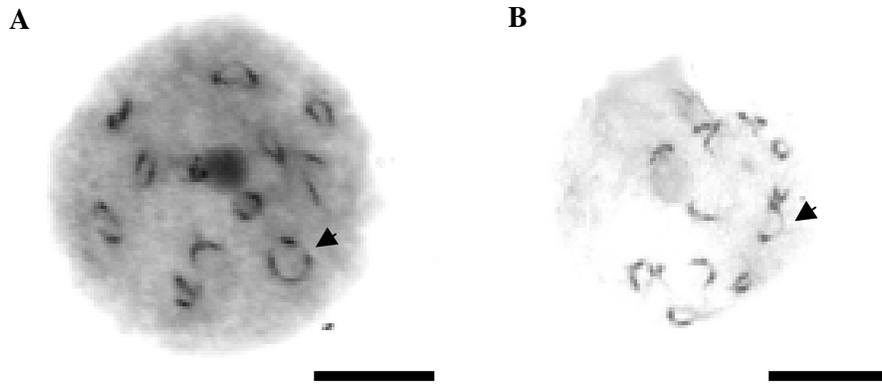


FIGURA 6 Meiose do clone SCC 176 de *S. commersonii commersonii*. A- diacinese com 26 cromossomos 11 bivalentes, 1 tetravalente em anel de translocação; B- diacinese com 10 bivalentes e um tetravalente em cadeia. Barra = 5 µm. UFLA, Lavras, MG, 2004.

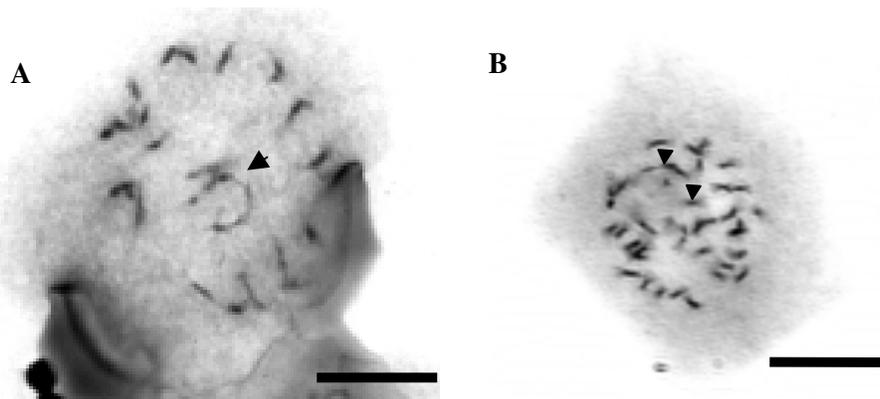


FIGURA 7 A- diacinese apresentando 1 tetravalente em cadeia, no clone SCM 60; B- diacinese apresentando um trivalente em cadeia e um univalente, no clone SCC 100. Barra = 5 µm. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Uma outra alteração encontrada na meiose foi a fragmentação cromossômica. O clone SCM 57 apresentou a mais alta frequência dessa anormalidade (Tabela 5 e Figura 8).

Embora o aparecimento de alterações espontâneas não seja usual nos vegetais, a fragmentação cromossômica já foi observada em cromossomos de milho e sua ocorrência foi associada a danos nos mecanismos de reparo do DNA. Tais danos podem ser devido a fatores genéticos e ambientais. O aparecimento espontâneo de fragmentação cromossômica tem sido atribuído à induções por radiações e à exposição dos vegetais a intensos agentes químicos mutagênicos (Pagliarini, 2000). Este fator também pode levar a um desbalanço no número de cromossomos nos gametas.

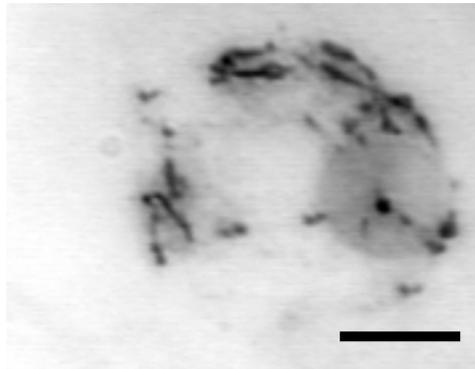


FIGURA 8 Fragmentação cromossômica no clone SCC 100 de *S. commersonii commersonii*. Barra = 5  $\mu$ m. UFLA, Lavras, MG, 2004.

#### 4.4 Pólen 2n e mecanismos meióticos de formação

Na Tabela 6 de análise de variância pode-se observar que houve efeito significativo para as variáveis diâmetro de pólen e pólen não reduzido a 1% e 5% de significância, respectivamente.

A Tabela 7 apresenta os valores médios e a amplitude dos diâmetros dos grãos de pólen encontrados em cada clone. Pode-se observar que houve uma tendência de os diâmetros médios dos clones de *S. commersonii commersonii* (19,40  $\mu\text{m}$  a 23,04  $\mu\text{m}$ ) serem superiores aos diâmetros médios dos clones de *S. commersonii malmeanum* (18,58  $\mu\text{m}$  a 18,63  $\mu\text{m}$ ). Estes resultados estão de acordo com aqueles relatados por Tarn & Hawkes (1986) para *S. commersonii commersonii* (22,10  $\mu\text{m}$ ). No entanto, para *S. commersonii malmeanum*, estes autores encontraram valor maior (23,00  $\mu\text{m}$ ) e Johnston et al. (1986) relataram 17,55  $\mu\text{m}$  para *S. commersonii ssp.*

TABELA 6 Análise de variância para diâmetro de pólen e para pólen não reduzido, respectivamente. UFLA, Lavras, MG, 2004.

FV	GL	Quadrado médio	
Genótipos	4	17,7246**	634,965*
Resíduo	20	2,3141	113,785
CV(%)		7,56	147,33
Média		20,1252	7,24

\*\*significativo a 1% de probabilidade, \*significativo a 5% de probabilidade.

TABELA 7 Diâmetros médios de grãos de pólen em cinco repetições e amplitude de variação dos diâmetros em cada clone. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Clones	Diâmetro ( $\mu\text{m}$ )	Amplitude
SCC 07	20,92 b	14,64 – 47,48
SCC 100	23,04 a	16,56 – 71,63
SCC 176	19,47 c	11,28 – 24,85
SCM 57	18,63 c	12,57 – 23,90
SCM 60	18,58 c	11,64 – 23,56

Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem entre si, pelo Teste Scott-Knott (1974), a 5% de probabilidade.

Erdtman, citado por Fahn (1990), classificou os grãos de pólen de *Solanum* spp. de acordo com o seu tamanho em perminuta, se o diâmetro for inferior a 10  $\mu\text{m}$ ; minuta, se o diâmetro for de 10 a 25  $\mu\text{m}$ ; média, de 25-50  $\mu\text{m}$ ; magna, de 50-100  $\mu\text{m}$ ; permagna 100-200  $\mu\text{m}$  e gigante, se o diâmetro for maior que 200  $\mu\text{m}$ . Mendes (1994) verificou, em espécies diplóides, triplóides, hexaplóide e pentaplóide de *Solanum* spp., que seus grãos de pólen estão nas classes minuta e média, por apresentarem diâmetro médio de 16,50 a 34,77  $\mu\text{m}$ . Os grãos de polens dos taxa avaliados no presente trabalho estão enquadrados na classe minuta, seguindo a proposta de Fahn (1990), por apresentarem valores entre 18,58 a 23,04  $\mu\text{m}$  (Tabela 7).

Para a distinção entre polens reduzidos e não reduzidos seguiu-se a proposta de Quinn et al. (1974) e Ramanna (1974), que estipularam 25  $\mu\text{m}$  como o valor mínimo de corte para determinação de polens não reduzidos. Nas condições ambientais a que foi submetido, o clone SCC 100 apresentou a maior frequência de polens não reduzidos, 26% (Tabela 8). Apesar de não ter sido detectada diferença significativa entre os clones SCC 07 (9,4%), SCC 176

(0,7%), SCM 57 (0%) e SCM 60 (0%), pode-se afirmar que o clone SCC 07 produziu polens não reduzidos (Tabela 8).

De modo geral, o clone SCC 07 se destacou em relação aos demais clones de *Solanum commersonii* ssp. Pode-se dizer que tem um bom percentual de germinação de pólen associado à ocorrência de pólen não reduzido, além de apresentar baixas frequências de anormalidades meióticas, podendo ser considerado um material promissor no programa de melhoramento genético. O clone SCC 100, apesar de apresentar boa frequência de pólen não reduzido, possui baixa viabilidade de pólen, o que pode representar uma limitação em trabalhos de hibridação.

TABELA 8 Frequências relativas à produção de pólen não reduzido e dos possíveis mecanismos meióticos envolvidos. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Clone	Frequência de pólen 2n	Frequência de mecanismos
SCC 07	9,4% b	18% fusos paralelos
SCC 100	26,1% a	14% fusos paralelos e fundidos
SCC 176	0,7% b	10% fusos fundidos
SCM 57	0,0% b	27% fusos paralelos
SCM 60	0,0% b	22% fusos paralelos

Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem entre si, pelo Teste Scott-Knott (1974), a 5% de probabilidade.

Apesar de ter sido identificado, nas avaliações meióticas, mecanismos de formação de pólen não reduzidos no clone SCC 176, uma baixa frequência de pólen  $2n$  (0,7%) foi encontrada. Portanto, estudos devem ser realizados neste clone para determinar se ele pode ser empregado como produtor de pólen não reduzido, em cruzamentos (Tabela 8). Os clones SCM 57 e SCM 60, da mesma forma, apesar de não terem apresentado polens não reduzidos, possuem mecanismos meióticos (fusos paralelos) que, possivelmente, podem conduzi-los à formação de pólen não reduzido, sendo, inclusive, os clones de *S. commersonii* spp. com as maiores taxas de viabilidade de pólen.

Watanabe & Peloquin (1993) verificaram que as frequências de polens  $2n$  em espécies diplóides, tetraplóides e hexaplóides de *Solanum* variaram entre 1,9% e 36,3%. Werner & Peloquin (1991), citados por Carputo et al. (2003), relataram uma significativa variação na frequência de micrósporos  $2n$  em espécies de *Solanum* (4,9% a 22,6%). Os resultados encontrados neste trabalho estão de acordo com aqueles apresentados na literatura (Tabela 7).

Entretanto, Sebastiano et al. (2001), analisando dois híbridos diplóides de *S. phureja* x *S. tuberosum*, em diferentes anos, observaram um alto percentual de pólen não reduzido, variando de 68% a 82,1%, resultados superiores aos encontrados neste trabalho. Estes autores observaram que os genótipos avaliados diferiram quanto à estabilidade na produção de pólen não reduzido. Esta falta de estabilidade entre os genótipos também pôde ser observada no presente trabalho. Pode ser observado que diferenças dentro de cada clone ocorrem, ou seja, entre as flores de um mesmo clone. Em SCC 07, essas variações ficaram entre 1% e 41% e no SCC 100, entre 8% e 48,5%. Esses dados estão de acordo com a afirmação de Veilleux & Lauer (1981), que relataram que a ocorrência de polens não reduzidos não foi constante nas repetições; cada flor é uma repetição, podendo ocorrer variações nas diferentes flores dentro de um mesmo clone, bem como nas anteras e tecas de cada flor.

Já o valor de 25  $\mu\text{m}$  de diâmetro, sugerido por Quinn (1974) e Ramanna (1974), como valor limite entre grãos de pólen reduzidos e não reduzidos, pode ser questionado, uma vez que tal limite é incapaz de detectar não redução em espécies cujos grãos de pólen tenham dimensões menores. Os clones SCM 57 e SCM 60 de *S. commersonii malmeanum*, por exemplo, apresentaram maiores frequências de mecanismos meióticos para a formação de polens não reduzidos, 27% e 22%, mas nas medições de diâmetros de grãos de pólen não foram detectados polens superiores a 25  $\mu\text{m}$  (Tabela 8).

Este resultado pode ter sido devido ao efeito da grande variabilidade genotípica, penetrância incompleta e baixa expressividade dos alelos de formação de pólen  $2n$ , além da variação ambiental. No entanto, considerando a aleatoriedade das avaliações, as médias dos diâmetros de polens avaliados por lâmina e a amplitude de tamanho dos polens encontrados, verifica-se que os grãos de pólen de SCM 57 e SCM 60 são menores que os dos clones da subespécie *S. commersonii commersonii* (Tabela 7).

Desse modo, a alteração desse limite torna-se necessária para os clones de *S. commersonii malmeanum*. No entanto, para que um novo limite possa ser estabelecido, novos estudos devem ser realizados. Poder-se-ia pensar em estudos de campo nos quais esses clones, SCM 57 e SCM 60 seriam cruzados com *Solanum phureja* ou *S. chacoense*, as quais possuem 2EBN. Se fosse obtida progênie, estaria confirmado que, apesar de não terem sido detectados grãos de pólen não reduzidos pela avaliação de diâmetro, estes existem. Esta observação torna-se possível, uma vez que espécies diplóides que possuem 1EBN, tais como os materiais aqui trabalhados, quando produtoras de pólen não reduzidos, passam a se comportar como se possuíssem 2EBN. Esse tipo de teste foi realizado por Masuelli et al. (1992) em cruzamentos usando (i) *S. commersonii* Dun. ( $2n=2x=24$ , 1EBN), como genitor feminino e *S. gourlayi* Haw. ( $2n=2x=24$ , 2EBN), como genitor masculino, e (ii) *S. acaule* Bitt. ( $2n=4x=48$ , 2EBN), como

genitor feminino e *S. commersonii* Dun. ( $2n=2x=24$ , 1EBN), como genitor masculino. Nas avaliações desses cruzamentos seriam consideradas a quantidade de plantas polinizadas, a quantidade de frutos por planta, a frequência de produção de pólen não reduzido nos descendentes, bem como a ocorrência de mecanismos para a sua formação. Tendo esses resultados em mãos, poder-se-ia propor um novo limite, em que os grãos de pólen não reduzidos fossem eficientemente agrupados, por meio de medições do diâmetro dos mesmos. Uma outra alternativa seria a avaliação em citômetro de fluxo dos grãos de pólen desses dois clones ou dos híbridos provenientes dos cruzamentos com *S. phureja* ou *S. chacoense* para quantificação do DNA, para verificar o nível de ploidia dos gametas.

Nos clones SCC 07 e o SCC 100, que apresentaram maiores frequências de polens não reduzidos, observou-se, no clone SCC 07, a presença de fusos paralelos em 18% de suas células anormais. No clone SCC 100, foram observados 14% de fusos paralelos e fusos fundidos, sendo 7% de cada um (Tabela 8), além de terem sido detectados 21% de tríades. As outras anormalidades constaram, na sua maioria, de micronúcleo (7%), ascensão precoce (43%) e divisão assincrônica (15%), conforme apresentado na Tabela 4.

A presença de fusos paralelos pode estar relacionada diretamente com a ocorrência de polens não reduzidos. Iwanaga & Peloquin (1982) relataram uma alta frequência do alelo *ps* (0,69 e 0,71) em 63 cultivares de *S. tuberosum* estudadas, sendo que das 117 plantas produtoras de pólen  $2n$ , 85% apresentam fusos paralelos. Watanabe & Peloquin (1991 e 1993) relataram que o mecanismo mais comum para a formação de pólen  $2n$ , em espécies diplóides de batata provenientes do México, América Central e do Sul, foi relacionado à presença de fusos paralelos na maioria dos genótipos analisados.

Sabe-se que polens não reduzidos podem ser formados por diferentes mecanismos meióticos. Clones que apresentam os mecanismos de fusos

paralelos ou fusos fundidos, geneticamente correspondentes à restituição da primeira divisão meiótica, têm a capacidade de transmitir até 85% de sua heteroziguidade e locus de interações epistáticas para a progênie. Já os clones que apresentam os mecanismos de citocinese prematuras I e II, geneticamente equivalentes à restituição da segunda divisão meiótica, transmitem apenas 40% de sua heteroziguidade (Mendiburu et al., 1974; Hermsen, 1984).

O mecanismo de fuso paralelo é identificado principalmente na metáfase II, ficando os dois conjuntos cromossômicos dispostos de forma paralela (Figura 9A). Esse tipo de alteração faz com que ocorra a formação de díades geneticamente equivalentes a *first division restitution* ou FDR. Uma outra anormalidade encontrada na metáfase II é a do tipo fusos fundidos (Figura 9B), em que os dois conjuntos cromossômicos ficam unidos, levando à formação de díades geneticamente equivalentes a *second division restitution* ou SDR.

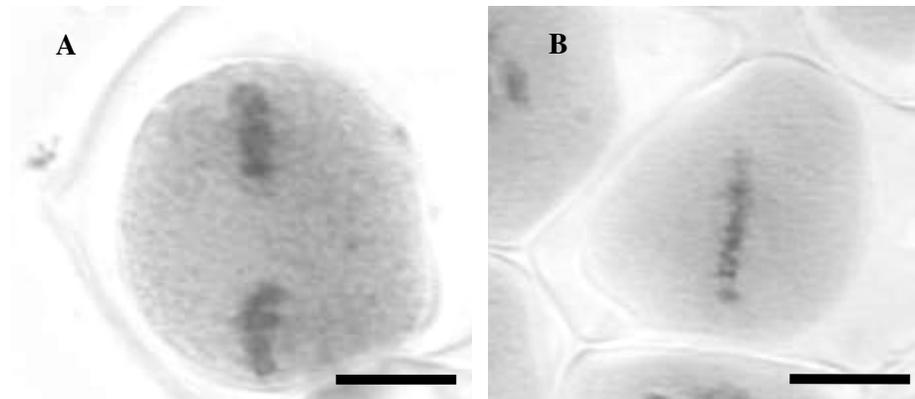


FIGURA 9 Meiócitos do clone SCC100. A- fusos paralelos; B- fusos fundidos. Barra = 5  $\mu$ m. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Oliveira et al. (1995), estudando os mecanismos de produção de pólen  $2n$  em híbridos de dihaplóides de *S. tuberosum* L. com espécies selvagens, *S. chacoense* Bitt., gerando progênies tetraplóides, concluiu que a formação de pólen não reduzido é uma condição necessária para o sucesso dos cruzamentos entre espécies tetraplóides e diplóides e para a transmissão de maior heterozigose às progênies. Em suas observações, foram encontrados três mecanismos de formação de pólen  $2n$ , fusos paralelos, fusos fundidos e citocineses prematuras I e II. Destes, o mecanismo de fusos paralelos foi o mais freqüente, encontrado em 23 dos 28 clones avaliados. O mecanismo de fusos fundidos foi detectado em 16 dos 28 clones avaliados. O mecanismo de citocinese prematura II foi encontrado em 6 dos 28 clones avaliados, além de terem sido encontrados 12 clones que apresentavam os mecanismos de restituição da primeira e da segunda divisão meiótica. Foi possível afirmar que um único clone de batata pode produzir micrósporos não reduzidos por mais de um mecanismo.

Cunha (1994) também analisou 81 clones híbridos de dihaplóides de *S. tuberosum* x *S. chacoense* quanto à produção e freqüência de pólen  $2n$ , visando à seleção das melhores combinações para serem cruzadas com materiais tetraplóides. Dois ensaios foram conduzidos entre outubro a dezembro (primavera) e entre março a maio (outono). Essa autora verificou que a freqüência de pólen  $2n$  foi baixa no ensaio de primavera e mais elevada no outono e ela associou esta ocorrência ao fato de as temperaturas mais amenas serem as de outono. A viabilidade do pólen  $2n$  também foi maior no ensaio de outono, 54,9% e 32,9% na primavera. Segundo esta autora, isto indicou que, mesmo sendo o fotoperíodo mais curto no outono, as temperaturas amenas são ideais para a maioria dos clones avaliados. Indicou também que, tais clones podem ser utilizados em retrocruzamentos com *S. tuberosum*, principalmente

neste período quando a frequência de pólen  $2n$  é maior e há possibilidade do sucesso nos cruzamentos também ser aumentado.

Veilleux & Lauer (1981) sugerem que o mecanismo de fusos fundidos pode ser uma manifestação diferente do gene *ps* (fusos paralelos) e, com isso, levaria à formação de díades. Ramanna (1974) atribuiu a este mecanismo à formação de tríades, havendo a presença de um micrósporo não reduzido ( $2n$ ) e dois micrósporos reduzidos ( $n$ ).

Masuelli et al. (1992) investigaram os mecanismos citológicos envolvidos na formação de pólen  $2n$  em híbridos de *S. commersonii commersonii* e *Solanum gourlayi* Haw. Eles observaram, em três híbridos triplóides, que a frequência de meiócitos em díades (5%) ou tríades (3% a 23%) foi apresentada em concordância com a frequência de meiócitos com anormalidades do tipo fusos fundidos (3% a 5%) e fusos tripolares (13% a 20%). No entanto, a alta frequência de meiócitos em anáfase II, que apresentavam anormalidades do tipo fusos paralelos, 44% a 54%, não foi coincidente com a formação de díades (5%), tríades (3% a 23%) e a produção de polens  $2n$ . Esses autores discutem que a ocorrência de fusos paralelos na anáfase II pode ser uma condição necessária, mas não suficiente para a formação de díades e polens  $2n$ , nos materiais analisados. Provavelmente, vários mecanismos estão atuando na de citocinese de modo a afetar a produção e a constituição de díade. Segundo eles, isso deveria estar ocorrendo de modo que a ausência de certos mutantes meióticos na díade não conduz à formação de pólen  $2n$ .

Seria necessário entender se a formação de pólen  $2n$  é controlada por apenas um determinado tipo de mutante meiótico ou pela interação de mais de um mutante. Caso haja interação de mais de um tipo de mutante meiótico, surge o questionamento sobre os alelos mutantes envolvidos expressam-se independentemente ou em interação epistática (Masuelli et al., 1992).

A importância de se averiguar a produção de polens não reduzidos está no fato de que clones diplóides, com 1EBN, que os produzem em frequência relativamente alta podem ser utilizados em programas de melhoramento em cruzamentos com espécies diplóides com 2EBN, como a *S. phureja*, para posteriormente, utilizar o híbrido resultante deste cruzamento em outros cruzamentos com a *S. tuberosum*.

A frequência com que os gametas  $2n$  são formados é muito importante, uma vez que pode afetar na taxa de formação dos novos poliplóides. A dificuldade de transferência do germoplasma de espécies com 1 EBN para as formas cultivadas, com 4 EBN, leva ao isolamento reprodutivo entre espécies selvagens e cultivadas, principalmente no gênero *Solanum*. Neste contexto, a poliploidização sexual, em algumas espécies, é um potencial mecanismo de aproximação da capacidade de cruzamentos entre espécies reprodutivamente isoladas (Masuelli et al., 1992). Esta estratégia faz uso da manipulação do nível de ploidia entre as espécies envolvidas, as chamadas espécies ponte. O nível de ploidia da espécie *S. commersonii* pode ser aumentada tanto por duplicação somática dos cromossomos com o uso de agentes antimitóticos, poliploidização assexual, como pela ação de gametas com número cromossômico não reduzidos, em cruzamentos intra ou interploidias, poliploidização sexual. Os clones que apresentaram produção de pólen  $2n$  podem ser utilizados para introgressão de genes de interesse na batata cultivada, sem a necessidade de manipulação da ploidia dos genitores (Hanneman, 1999).

A variabilidade de pólen  $2n$  encontrada no gênero *Solanum* é consoante com a encontrada em outras espécies, tais como *Dactylis glomerata*, *Trifolium nigrescens* e *Manihot medicago*. Essa variabilidade tem sido atribuída, principalmente, à penetrância incompleta e expressividade variável dos alelos mutantes responsáveis pela formação de gametas  $2n$ , os quais também podem sofrer os efeitos de fatores ambientais. Ramsey & Schemske (1998) sugeriram

que a alta frequência de espécies poliplóides no ambiente pode estar relacionada com impactos nas condições ambientais, levando à produção de gametas  $2n$ . Tais informações têm apontado para uma taxa na frequência de gametas  $2n$  entre 1% e 40%, que não é considerada muito alta. Isto sugere uma tendência dos vegetais produzirem altas frequências de gametas reduzidos, provavelmente para manter o seu nível de ploidia diplóide e não se poliploidizar (Carputo et al., 2003).

## 5 CONCLUSÕES

Os clones selvagens de *Solanum commersonii* ssp. possuem maiores percentuais de polens viáveis em relação aos genótipos de *S. tuberosum* analisados.

A ascensão precoce dos cromossomos nas metáfases I e II e alterações no pareamento cromossômico foram as principais causas de inviabilidade do pólen nos genótipos avaliados.

O clone SCC 07 é o mais indicado em programas de melhoramento genético via poliploidização sexual unilateral ou bilateral, pois apresenta meiose regular e polens não reduzidos.

Um novo valor limite para determinação de polens não reduzidos em clones de *Solanum commersonii malmeanum* deve ser proposto.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, M. P. A vesatile stain for pollen from fungi, yeast and bacteria. **Stain Technology**, Berkeley, v. 55, n. 1, p. 13-18, 1980.

ALMEIDA, L. A. F. B.; GASPARINO FILHO, J.; PASCHOALINO, J. E.; BENBERNHARDT, L. W.; CANTO, W. L. **Batata pré-frita e hortaliças congeladas: economia e industrialização**. São Paulo: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1983. 90 p. (ITAL. Estudos econômicos: Alimentos processados, 18).

AMMA, C. K.; NAMBOODIRI, A. N.; PANIKKAR, A. O. N. Meiotic abnormalities in a sterile clone of *Hevea brasiliensis* (Willd. Ex Adr. de Juss.) Muell. Arg. **Cytologia**, San Francisco, v. 55, n. 2, p. 225-229, June 1990.

AVERY, A. G.; SATINA, S.; RIETSEMA, J. BLAKESLEE: **The genus *Datura***. Ronald Press: New York, 1959. 289 p.

BARONE, A.; SEBASTIANO, A.; CARPUTO, D. Chromosome pairing in *Solanum commersonii* – *S. tuberosum* sexual hybrids detected by commersonii-specific RAPDs and cytological analysis. **Genome**, Ottawa, v. 42, n. 2, p. 218-224, Apr. 1999.

BARONE, A.; SEBASTIANO, A.; CARPUTO, D.; DELLA ROCCA, F.; FRUSCIANTE, L. Molecular marker-assisted introgression of the wild *Solanum commersonii* genome into the cultivated gene pool. **Theoretical and Applied Genetics**, Vienna, v. 102, n. 6/7, p. 900-907, May 2001.

BIRCHLER, J. A. Dosage analysis of maize endosperm development. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 27, n. 1, p. 181-204, 1993.

BRINK, R. A.; COOPER, D. C. The endosperm in seed development. **Botanic Review**, New York, v. 132, n. 1, p. 423-541, Mar. 1947.

CARPUTO, D. Cytological and breeding behavior of pentaploids derived from 3x X 4x crosses in potato. **Theoretical and Applied Genetics**, Vienna, v. 106, n. 5, p. 883-888, Mar. 2003.

CARPUTO, D. Post-zygotic gametic selection due to endosperm balance number explains unusual chromosome numbers of 3x X 2x progeny in *Solanum*. **Sexual Plant Reproduction**, New York, v. 12, n. 1, p. 27-31, Mar. 1999.

CARPUTO, D.; BARONE, A.; CARDI, T.; SEBASTIANO, A.; FRUSCIANTE, L.; PELOQUIN, S. J. Endosperm balance number manipulation for direct *in vivo* germplasm introgression to potato from a sexually isolated relative (*Solanum commersonii* Dun.). **Proceedings of National Academy of Science**, New York, v. 94, n. 22, p. 12013-12017, Oct. 1997.

CARPUTO, D.; GARREFFA, P.; MAZZEI, M.; MONTI, L.; CARDI, T. Fertility of somatic hybrids *Solanum commersonii* (2x, 1EBN) (+) *S. tuberosum* haploid (2x, 2EBN) in intra and inter-EBN crosses. **Genome**, Ottawa, v. 41, n. 6, p. 776-781, Dec. 1998.

CARVALHO, C. R de. An air drying technique for maize chromosome. **Biotechnic and Histochemistry**, New York, v. 63, n. 4, p. 107-113, 1993.

CHASE, S. S. Analytic Breeding in *Solanum tuberosum* L. :a schema utilizing parthenotes in other diploid stocks. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, Ontario, v. 5, n. 5, p. 359-363, 1963.

CHICHIRICCO, G.; CAIOLA, M. G. *Crocus sativus* pollen germination and poll en tube growth in vitro and after intraspecific and interespecific polination. **Canadian Journal Botany**, Ottawa, v. 64, n. 11, p. 2774-2777, Nov. 1986.

COOPER, D. C.; BRINK, R. A. Seed collapse following matings between diploid and tetraploid races of *Lycopersicon pimpinellifolium*. **Genetics**, Madison, v. 30, n. 4, p. 376-401, 1945.

COSTA, E. M; PEREIRA, A da S. Criação de cultivares de batata (*Solanum tuberosum* L.) para mesa e processamento. In: REUNIÃO ANUAL DE PESQUISA COM BATATA EM SANTA CATARINA E NO RIO GRANDE DO SUL, 2., 1995, Araranguá. **Relatório...** Pelotas: EMBRAPA-CPACT, 1996. p. 8-10.

CRIBB, P. J.; HAWKES, J. G. Experimental evidence for the origin of *S. tuberosum* subsp. *andigena*. In: DARCY, W. G. (Ed.). **Solanaceae: biology and systematics**. New York: Columbia University Press, 1986. p. 383-404.

CUNHA, A. L.; PINTO, C. A. B. P.; DAVIDE, L. C. Flowering behaviour and 2n pollen formation in dihaploid *Solanum tuberosum* x *Solanum chacoense*

hybrids. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 17, n. 1, p. 305-308, Mar. 1994.

DAVIDE, L. C. Citogenética aplicada ao melhoramento de plantas na UFLA. In: CONGRESSO MINEIRO DE GENETICISTAS, 5., 1998, Viçosa. **Anais..** Viçosa: Sociedade Brasileira de Genética Regional de Minas Gerais, 1998. v. 1, p. 9.

DEFANI-SOARIZE, M. A.; PAGLIARINI, M. S.; AGUIAR, C. G. Causes of partial male sterility in an inbred maize line. **Cytologia**, San Francisco, v. 60, n. 1, p. 311-318, 1995.

DenNIJS, T. P. M.; PELOQUIN, S. J. Polyploid evolution via 2n gametes. **American Potato Journal**, Orono, v. 54, n. 1, p. 377-386, Jan. 1977.

FAHN, A. **Plant anatomy**. 4. ed. Oxford: Pergamon Press, 1990. 588 p.

FAO, 2003. [http:// www.fao.org/](http://www.fao.org/)

GALLETA, G. J. Pollen and seed management. In: MOORE, J. N.; JANICK, J. **Methods in fruits breeding**. Indiana, 1983. p. 23-47.

GILL, B. S.; WAINES, J. C. Paternal regulation of seed development in wheat hybrids. **Theoretical and Applied Genetics**, Vienna, v. 51, n. 1, p. 265-270, 1978.

GUERRA, M. **Introdução à citogenética geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. 142 p.

HANNEMANN, R. E. JUNIOR. The reproductive biology of the potato and its implication for breeding. **Potato Research**, Wageningen, v. 42, n. 1, p. 283-312, 1999. Supplement.

HARRIS, P. M. **The potato crop: the scientific basis of improvement**. London: Chapman and Hall, 1978. p. 730

HAUSER, E. J. P.; MORRISON, J. H. The cytochemical reduction of nitro blue tetrazolium as an index of pollen viability. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 51, n. 7, p. 748-752, 1964.

HAWKES, J. G. The history of the potato. **Journal of the Royal Horticultural Society**, London, v. 92, n. 3, p. 207-365, 1967.

HAWKES, J. G. Origins of cultivated potatoes and species relationships. In: BRADSHAW, J. E.; MACKAY, G. R. (Ed.) **Potato genetics**. Cambridge: CAB International, 1993. p. 3-42.

HAWKES, J. G.; HJERTING, J. D. **The potato of Argentina, Brazil, Paraguay and Uruguay**. Oxford: Claredon, 1969. 525 p.

HERMSEN, J. G. Mechanisms and genetic implications of 2n gametes formation. **Iowa State Journal of Research**, Ames, v. 58, n. 4, p. 421-434, 1984.

HIJMANS, R. J.; SPOONER, D. M. Geographic distribution of wild potato species. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 88, n. 11, p. 2101-2112, Nov. 2001.

ICOCHEA, T. A. La papa. In: **Compendio de enfermedades de la papa**. Lima: Centro Internacional de la Papa, 1980. p. 2-4.

IRIKURA, Y. Studies on interspecific crosses of tuber-bearing Solanums. Overcoming cross-incompatibility between *Solanum tuberosum* and other *Solanum* species by means of induced polyploids and haploids. **Hokkaido National Agricultural Experimental Station Research Bulletin**, Hokkaido, v. 92, n. 1, p. 21-37, 1968.

IWANAGA, M. Discovery of a synaptic mutant in potato haploids and its usefulness for potato breeding. **Theoretical and Applied Genetics**, Vienna, v. 68, n. 1/2, p. 87-93, 1984.

IWANAGA, M.; PELOQUIN, S. J. Origin and evolution of cultivated tetraploid potatoes via 2n gametes. **Theoretical and Applied Genetics**, Vienna, v. 61, n. 2, p. 161-169, 1982.

IWANAGA, M.; PELOQUIN, S. J. Synaptic mutant accepting only megasporogenesis in potato. **The Journal of Heredity**, Baltimore, v. 70, n. 6, p. 385-389, Dec. 1979.

IWANAGA, M.; SCHMIEDICHE, P. Uso de especies silvestres para mejoramiento los cultivares de papa. **CIP CIRCULAR**, Jaboticaba, v. 17, n. 2, p. 1-7, 1989.

JOHNSTON, S. A.; HANNEMANN, R. E. JUNIOR. Support of the endosperm balance number hypothesis utilizing some tuber-bearing *Solanum* species.

**American Potato Journal**, Orano, v. 57, n. 1, p. 7-13, Jan. 1980.

JOHNSTON, S. A.; den NIJS, T. P. M.; PELOQUIN, S. J.; HANNEMANN, R. E. JUNIOR. The significance of genic balance to endosperm development in interspecific crosses. **Theoretical and Applied Genetics**, Vienna, v. 57, n. 1, p. 5-9, 1980.

JOHNSTON, S. A.; RUHDE, R. W.; HLENFELDT, M. K.; HANNEMANN, R. E. JUNIOR. Inheritance and microsporogenesis of a synaptic mutant (sy-2) from *Solanum commersonii* Dun. **Canadian Journal Genetic Cytology**, Ottawa, v. 28, n. 4, p. 520-524, 1986.

KOOPMANS, A. Cytogenetic studies on *Solanum tuberosum* L. and its relatives. **Genetics**, Madison, v. 25, n. 2, p. 193-337, Feb. 1951.

KWACK, B. H.; BREWBAKER, J. L. The essential role of calcium ion pollen germination and pollen tube growth. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 59, n. 9, p. 859-865, Sept. 1963.

LAMBERT, E. S. de **Híbridos interespecíficos de batata com diferentes proporções do genoma de espécies exóticas**. 2001. 90 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

LEÓN, J. **Botánica de los cultivos tropicales**. San José: IICA, 1987. 445 p.

LESINS, K. Interespecific crosses involving alfafa. I *Medicago dzhawakhetica* (Bordz.) Vass. X *M. sativa* L. and its peculiarities. **Canadian Journal of Genetics and Cytology** Ontario, v. 3, n. 1, p. 135-152, 1961.

LIN, B. Y. Ploidy barrier to endosperm development in maize. **Genetics**, Madison, v. 107, n. 1, p. 103-115, 1984.

MAGALLANES, M. G. R.; PINTO, C. A. B. P.; DAVIDE, L. C. Determinação citomorfológica do nível de ploidia de clones de batata (*Solanum tuberosum* L.) obtidos por cruzamentos interespecíficos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 20, n. 4, p. 480-484, out./dez. 1996.

- MARIS, B. Comparison of diploid and tetraploid potato families derived from *Solanum phureja* x dihaploid *Solanum tuberosum* hybrids and their vegetatively double counterparts. **Euphytica**, Wageningen, v. 46, n. 1, p. 15-33, Mar. 1990.
- MASUELLI, R. W.; CAMADRO, E. L. Cytological analysis and fertility of *Solanum commersonii* Dun. X *Solanum gourlayi*. HAW. triploid hybrids **Cytologia**, San Francisco, v. 57, n. 2, p. 161-166, June 1992.
- MASUELLI, R. W.; CAMADRO, E. L.; MENDIBURU, A. O. 2n gametes in *Solanum commersonii* and cytological mechanisms of triplandroid formation in triploid hybrids of *Solanum commersonii* X *Solanum gourlayi*. **Genome**, Ottawa, v. 35, n. 5, p. 864-869, Oct. 1992.
- MENDES, M. da S. **Viabilidade do grão de pólen de *Solanum* spp.** 1994. 76 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- MENDIBURU, A. O.; PELOQUIN, S. J. The significance of 2n gametes in potato breeding. **Theoretical and Applied Genetics**, Vienna, v. 49, n. 1, p. 53-61, 1977.
- MENDIBURU, A. O.; PELOQUIN, S. J.; MOK, D. W. S. Potato breeding with haploids and 2n gametes. In: KASHA, K. J. (Ed.). **Haploids in higher plants**. Canada: University Press, 1974. p. 249-258.
- MENDOZA, H. A. Mejoramiento poblacional: una estrategia para la utilización del germoplasma de papa cultivada primitiva y especies silvestres. In: HIDALGO, O. A.; RYNCÓN, H. R. (Ed.). **Avances en el mejoramiento genético de la papa en los países del cono sur**. Lima: Centro Internacional de la Papa, 1990. p. 47-62.
- MENEZES, C. B. de. **Escolha de genitores e seleção de clones de batata para as safras de inverno e das águas**. 1999. 117 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- MIRANDA, P. A.; CLEMENT, C. R. Germination and storage of pejibaye (*Bactris gasipaes*) palmar pollen. **Revista de Biología Tropical**, San José, v. 38, n. 1, p. 29-33, June 1990.

MOK, D. W. S. A.; PELOQUIN, S. J. The inheritance of three mechanisms of diplandroid (2n pollen) formation in diploid potatoes. **Heredity**, Baltimore, v. 35, n. 2, p. 295-302, 1975.

NIRMALA, C.; KAUL, M. L. H. Male sterility in Pea V. Gene action during heterotypic divisions. **Cytologia**, San Francisco, v. 59, n. 3, p. 43-50, 1994.

NISHIYAMA, I.; YABUNO, T. Causal relationships between the polar nuclei in double fertilization and interspecific cross incompatibility in Avena. **Cytologia**, San Francisco, v. 43, n. 3, p. 453-466, Sept. 1978.

NOVY, R. G.; HANNEMAN, R. E., Jr. Hybridization between gp. Tuberosum haploids and 1 EBN wild potato species. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 68, n. 1, p. 151-169, Jan. 1991.

OLIVEIRA, M. N. **Mecanismos de produção de pólen não reduzido em híbridos de dihaplóides de *Solanum tuberosum* L. x *Solanum chacoense* Bitt.** 1994. 66 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

OLIVEIRA, M. N. de; DAVIDE, L. C.; PINTO, C. A. B. P. Mechanisms of 2n potato pollen formation in dihaploid *Solanum tuberosum* L. x *S. chacoense* Bitt. Hybrid clones. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 18, n. 3, p. 445-450, Sept. 1995.

OLIVEIRA JÚNIOR, A. F. **Ação do iprodione e cálcio sobre alguns aspectos fisiológicos da germinação de grãos de pólen do pessegueiro diamante (*Prunus persicae* L. Bastch).** 1999. 58 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

ORTIZ, R.; HUAMAN, Z. Inheritance of morphological and tuber characteristics. In: BRADSAHW, J. E.; MACKAY, G. R. **Potato genetics**, Cambridge: CAB International, 1994. p. 263-284.

PAGLIARINI, M. S. Meiotic behavior of economically important plant species: the relationship between fertility and male sterility. **Genetics and Molecular Biology**, London, v. 23, n. 4, p. 997-1002, Dec. 2000.

PAGLIARINI, M. S.; MIRANDA FILHO, J. B.; AGUIAR-PERECIN, M. L. R. Correlação entre frequência de quiasmas e capacidade de combinação em linhagens autofecundadas de milho. In: CONGRESSO NACIONAL DE

MILHO E SORGO, 15., 1984, Maceió. **Anais...** Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 1986. p. 183-188.

PANDOLFI, V. **Microsporogênese em *Solanum commersonii***. 1998. 65 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

PARFITT, D.; GANESHAN, S. Comparison of procedures for estimating viability of prunus pollen. **Hortscience**, Alexandria, v. 24, n. 2, p. 354-356, Apr. 1989.

PÁRRAGA, M. S.; CARDOSO, M. R. O. Botânica, taxonomia e espécies cultivadas de batata. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 76, n. 1, p. 10-12, abr. 1981.

PASQUAL, M.; PETRI, J. L.; MATTOS, C. S. Polinização da macieira III. Cultivares BR-1 e Mollies Delicious. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 10, p. 1477-1481, out. 1982.

PELOQUIN, S. J.; BOITEAUX L.; CARPUTO. D. Meiotic mutants in the potato- valuable variants. **Genetics**, Madison, v. 153, n. 4, p. 1493-1499, Dec. 1999.

PELOQUIN, S. J.; ORTIZ, R. Techniques for introgressing unadapted germplasm to breeding populations. In: STALKER, T. P.; MURPHY, J. P. (Ed.). **Plant breeding populations in 1990s**. Wallingford: CAB International, 1992. p. 485-507.

PEREIRA, A. S.; DANIELS, J. **O cultivo da batata na região Sul do Brasil**. Brasília: Embrapa Clima Temperado. Brasília, 2003. 565 p.

QUINN, A. A.; MOK, D. W. S.; PELOQUIN, S. J. Distribution and significance of diplandroids among the diploid Solanums. **American Potato Journal**, Orono, v. 51, n. 1, p. 16-21, Jan. 1974.

RAMANNA, M. S. The origin of unreduced microspores due to aberrant cytokinesis in the meiocytes of potato and its genetic significance. **Euphytica**, Wageningen, v. 23, n. 1, p. 20-23, 1974.

RAMANNA, M. S. A re-examination of the mechanisms of 2n gametes formation in potato and its implication for breeding. **Euphytica**, Wageningen, v. 28, n. 3, p. 537-61, 1979.

RAMSEY, J.; SCHEMSKE, D. W. Pathways, mechanisms, and rates of polyploidy formation in flowering plants. **Annual Review Ecology Systematic**, Palo Alto, v. 29, n. 1, p. 467-501, 1998.

ROCHA, B. H. G.; AUGUSTIN, E.; SILVA, J. B. da; PEREIRA, A. S. da, Associação entre isoenzimas e matéria seca em batata silvestre. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 12, p. 2415-2421, dez. , 2000.

ROSS, H. The importance of the potato gene centre for breeding and for the understanding of the origin of the cultivated potato. **Genetica Agraria**, Ginn, v. 17, n. 2, p. 123-134, 1963.

SANGOWAWA, B. G. Chromosome studies in a diploid potato (*Solanum mochicense* Ochoa) **Cytologia**, San Francisco, v. 52, n. 2, p. 335-342, June 1987.

SANGOWAWA, B. G. Meiotic studies in a wild tetraploid potato (*Solanum hjertingii* Hawkes) **Cytologia**, San Francisco, v. 54, n. 4, p. 617-626, Dec. 1989.

SANGOWAWA, B. G.; CHOUDHURI, H. C. Cytological studies in a tetraploid potato (*Solanum polytrichon* Rydb.) **Cytologia**, San Francisco, v. 51, n. 4, p. 767-776, Dec. 1986.

SCHULZ-SCHAEFFER, J. **Cytogenetics: plants, animals, humans**. New York: Springer-Verlag, 1980. 446 p.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Raleigh, v. 30, n. 3, p. 507-512, Sept. 1974.

SEBASTIANO, A.; CARPUTO, D.; CONSIGLIO, F.; FILOTICO, F.; FRUSCIANTE, L.; BARONE, A. FDR and FDR+SDR 2n pollen for true potato seed production. **Journal of Genetic and Breeding**, Baltimore, v. 55, n. 2, p. 159-163, June 2001.

SINGH, R. J. **Plant cytogenetics**. Londres: CRC Press, 2003. 391 p.

SMITH, J. A. e DESBOROUGH, S. L. Interpretation of genomic balance in seed formation in interspecific hybrids of *Solanum*. **Theoretical and Applied Genetics**, Vienna, v. 72, n. 3, p. 346-352, 1986.

SMMONDS, N. W. **Potatoes: evolution of crop plants**. London: Longman, 1979. p. 279-283.

STANLEY, R. G.; LINSKENS, H. F. **Pollen biology biochemistry management**. Berlin: Springer-Verlag, 1974. 307p.

STEPHENS, S. C. Colchicine produced polyploids in *Gossipium*. I. An autotetraploid Asiatic cotton and certain of its hybrids with wild diploid species. **Canadian Journal of Genetics**, Ottawa, v. 44, n. 2, p. 272-295, 1942.

TARN, T. R.; HAWKES, J. G. Cytogenetic studies and the occurrence of triploidy in the wild potato species *Solanum commersonii* Dun. **Euphytica**, Wogeningen, v. 35, n. 1, p. 293-302, Mar. 1986.

TECHIO, V. H. , **Meiose e análise genômica em *Pennisetum spp.*** 2002. 104p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

TROGNITZ, B. R.; ESLAVA, M.; PORTAL, L.; RAMÓN, P. **Resistance to late blight from diverse wild sources**. Lima: CIP, 1997. p. 127-137.

UGENT, D. The potato: what is the botanical origin of this important crop plant, and how did it first become domesticated? **Science**, Washington, v. 170, n. 3963, p. 1161-1166, Dec. 1970.

VAVILOV, N. I. **The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants**. New York: Chronica Botanica, 1951. 364 p.

VEILLEUX, R. E.; LAUER, F. I. Variation for 2n pollen production in clones of *Solanum phureja* Juz. and Buk. **Theoretical and Applied Genetics**, Vienna, v. 59, n. 2, p. 95-100, 1981.

WATANABE, K. Origin and evolution of cultivated tetraploid potatoes via 2n gametes. **Theoretical and Applied Genetics**, Vienna, v. 61, n. 2, p. 161-169, 1982.

WATANABE, K.; PELOQUIN, S. J. Cytological basis of 2n pollen formation in a wide range of 2x, 4x and 6x taxa from tuber-bearing *Solanum* species. **Genome**, Ottawa, v. 36, n. 1, p. 8-13, Mar. 1993.

WATANABE, K.; PELOQUIN, S. J. Occurrence of 2n pollen and ps gene frequencies in cultivated groups and their related wild in tuber-bearing Solanums. **Theoretical and Applied Genetics**, Vienna, v. 78, n. 3, p. 329-336, 1989.

WATANABE, K.; PELOQUIN, S. J. Occurrence and frequency of 2n pollen in 2x, 4x and 6x wild tuber-bearing *Solanum* species from Mexico and Central and South Americas. **Theoretical and Applied Genetics**, Vienna, v. 82, n. 5, p. 621-626, 1991.