

VILMA BARRETTO VILA

**ANÁLISE CITOMORFOANATÔMICA E ELETROFORÉTICA DE
HÍBRIDOS DE *Solanum tuberosum* L. X [*Solanum tuberosum*
L. X *Solanum chacoense* Bitt.].**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Lavras, como parte das exigências
do Curso de Agronomia área de concentração
em Genética e Melhoramento de Plantas, para
obtenção do título de "Mestre".

Orientador
Prof. LISETE CHAMMA DAVIDE

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
1995

Ficha Catalográfica preparada pela Seção de Classificação e Catalogação da
Biblioteca Central da UFLA

Vila, Vilma Barretto

Análise citomorfoanatômica e eletroforética de
híbridos de *Solanum tuberosum* L. X [*Solanum tuberosum* L. X *Sola-
num chacoense* Bitt.] / Vilma Vila
Barretto.—Lavras: UFLA, 1995.

76 p. : il.

Orientadora: Lisete Chamma Davide
Dissertação (Mestrado) - UFLA
Bibliografia

1. Batata híbrida - Análise citomorfoanatômica. 2. Eletroforese. 3. Citomorfoana-
tomica. 4. Batata. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título

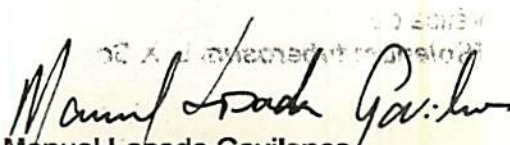
CDD - 633.491
- 633.49123

VILMA BARRETTO VILA


**ANÁLISE CITOMORFOANATÔMICA E ELETROFORÉTICA DE
HÍBRIDOS DE *Solanum tuberosum* L. X [*Solanum tuberosum*
L. X *Solanum chacoense* Bitt.].**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Agronomia área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 30 de agosto de 1995


Prof. Manuel Losada Gavilanes


Prof.^a Maria das Graças G. C. Vieira


Prof.^a Lisete Chamma Davide
(Orientadora)

Fenômenos bioquímicos e citológicos acontecem orientados pela força do Criador assegurando a diversidade e a perpetuação das espécies.

Ao meu esposo Vila

A meus filhos Rodrigo

Gustavo

Helemari

Ávila

Juntos fomos reponsáveis por esse trabalho ter sido concluído com alegria.

Juntos, tivemos ganhos intelectuais e espirituais.

Juntos, temos certezas que continuamos unidos, porque nos amamos.

A meus pais Sérgio e Helena pelo amor, apoio e incentivo durante as etapas de minha vida.

Aos meus irmãos :

Walter, Zezé, sobrinhos Fabiane e Sérgio Luis

Valdomiro, Célia e sobrinha Thaysa

1950

1951

1952

1953

1954

1955

1956

1957

1958

1959

1960

1961

1962

1963

1964

1965

1966

1967

1968

AGRADECIMENTOS

À Deus

Aos meus pais, pelo carinho e incentivo

Aos meus familiares, pelo respeito, torcida, amizade e confiança.

À UFLA, pela oportunidade concedida.

À coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão de bolsa de estudos.

Aos professores e orientadores, Lisete Chamma Davide e César Augusto Brasil Pereira Pinto, pela orientação, ensinamentos transmitidos, pela sugestões apresentada e pelo exemplo de dedicação à pesquisa científica.

Ao pesquisador Dr. Edilson Paiva do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo - CNPMS - EMBRAPA de Sete Lagoas-M.G., pela orientação durante as análises eletroforéticas.

Aos professores do Departamento de Biologia da UFLA, Magno Patto Ramalho, João Bosco dos Santos, Manuel LosadaGavilanes, Iara, Fernando Frierio, pelo convívio e amizade.

Às professoras Maria das Graças G. C. Vieira e Dulcinéia pela colaboração durante o desenvolvimento do trabalho

Ao Rebeca, pela amizade e orientações nas análises estatística.

À minha grande amiga Beatriz (Pelotas-R.S.) que mesmo à distância muito contribuiu na elaboração desse trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Citologia e Anatomia da UFLA, Ana Hortência, Haroldo, Rita, Rupert, Marcelo, Ângela, Juscélio, Renata, Cátia, pela alegria do convívio diário.

Aos grandes amigos Francislei e Rose, pela grande contribuição durante as análises realizadas no Laboratório de Citologia da UFLA.

Aos colegas do curso de pós-graduação, Rebeca e Cristiam, Farias, Erich, Evaristo, Leonardo Rosse, Paulo Rogério, João Acássio, Mari, Valéria, Renata, Elaine, Marcelo Nascimento, Leonardo Melo e Patricia, Giovana e Eduardo, Luciane, Pedro Hélio, Joelson, André, Maurício, Hélia, Flávia, Juscélio, Cintia, Cátia, Gabriela, Ângela e aos demais colegas pelo convívio.

Aos meus amigos Alberto, Denise e Guilherme, pela grande amizade e alegria do convívio e solidariedade em todos os momentos.

Ao Núcleo de Estudos de Genética-GEN-, pelos eventos realizados.

Aos funcionários do Departamento de Biologia da UFLA, pelos auxílios prestados.

Aos funcionários da Biblioteca da UFLA, pelo atendimento e dedicação.

Às minhas amigas Glória, Bernadeth e Rosália de Cáceres - MT, mesmo distante, se fizeram presentes durante a realização desse trabalho.

Ao Serginho Simpson e ao pessoal multimídia da UNEMAT, pela contribuição nas últimas etapas desse trabalho.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para o êxito desse trabalho.

LISTA DE QUADROS

	Página
QUADRO 1 - Resumo das análises de variância para número de cloroplastídeos por célula estomática, diâmetro polar (μm) e número de estômatos mm^2 . UFLA, 1995.....	18
QUADRO 2 - Média do número de cloroplastídeos por célula estomática, diâmetro polar (μm) e número de estômatos por unidade de área (mm^2). UFLA, 1995.....	20
QUADRO 3 - Amplitude das médias nas faces adaxial e abaxial da epiderme para o número de cloroplastídeos por célula estomática, diâmetro polar (μm) e número de estômatos por unidade de área (mm^2). UFLA, 1995.	22
QUADRO 4 - Médias do número de cloroplastídeos por células estomáticas, diâmetro polar (μm) e número de estômatos das faces adaxial e abaxial da epiderme (mm^2). UFLA, 1995.	23
QUADRO 5 - Média das faces adaxial e abaxial da epiderme para número de cloroplastídeos por células estomáticas, diâmetro polar (μm) e número de estômatos por unidade de área (mm^2). UFLA, 1995.....	24
QUADRO 6 - Diâmetros médios do grãos-de-pólen (μm) nos diferentes níveis de ploidia. UFLA, 1995.....	29

	Página
QUADRO 7 - Resumo das análises de variância para as características morfológicas. UFLA, 1995.	34
QUADRO 8 - Médias (mm) das características morfológicas das plantas diplóides, triplóides e tetraplóides. UFLA, 1995.....	35

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 - Número de cromossomos da batata (A) tetraplóide e (B) triplóide. Aumento total: 1472x. UFLA, 1995.	17
FIGURA 2 - Cloroplastídeos nas células estomáticas de diferentes ploidias: A - tetraplóide B - triplóide e C - diplóide. Aumento total: 588,8x UFLA, 1995.	20
FIGURA 3 - Estômatos na na face abaxial da epiderme de folhas de clones de batata: A - tetraplóide; B - triplóide e C - diplóide. Aumento total 1472x. UFLA, 1995.	21
FIGURA 4 - Grãos-de-pólen de batata: A - tetraplóide; B - triplóide e C - diplóide. Aumento total:1472x. UFLA, 1995.	32
FIGURA 5 - Zimograma dos padrões isoenzimáticos de esterase (EST) de tubérculos de batata, descendente do cruzamento entre 'Br 63.65' (B) X clone 26.5 (D). UFLA, 1995.	66
FIGURA 6 - Zimograma dos padrões isoenzimáticos de esterase (EST) de tubérculos de batata, descendente do cruzamento entre 'Aracy' (A) X clone 26.5 (D). UFLA, 1995.	67

FIGURA 7 - Zimograma dos padrões de proteína total na progênie descendente do cruzamento entre 'Br 63.65' (B) X clone 26.5 (D). UFLA, 1995.	68
FIGURA 8 - Zimograma dos padrões de proteína total na progênie descendente do cruzamento entre 'Aracy' (A) X clone 26.5 (D). UFLA, 1995	69

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE QUADROS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMO.....	xii
SUMMARY.....	xii
CARACTERIZAÇÃO DO NÍVEL DE PLOIDIA DE HÍBRIDOS DE <i>Solanum tuberosum</i> L. X [<i>Solanum tuberosum</i> L. X <i>Solanum chacoense</i> Bitt.].....	1
INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Caracterização botânica.....	3
2.2 Melhoramento genético da batata.....	5
2.2.1 Domesticação da batata.....	5
2.2.2 Base genética dos métodos alternativos para o melhoramento da batata.....	7
2.3 Métodos de caracterização do nível de ploidia.....	10
2.3.1 Método citogenético.....	10
2.3.2 Método citoanatômico e morfológico.....	10

	Página
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1 Condução do experimento.....	12
3.2 Material genético	12
3.3 Análise citogenética	13
3.4 Análise citoanatômica	13
3.5 Análise morfológica.....	15
3.6 Análise estatística das características citoanatômicas e morfológicas.....	15
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
4.1 Análise citogenética	17
4.2 Análise citoanatômicas	18
4.2.1 Características anatômicas da folha.....	18
4.2.2 Diâmetro do grão-de-pólen	28
4.3 Análise morfológica.....	32
5 CONCLUSÕES	36
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
RESUMO	46
SUMMARY.....	48
VERIFICAÇÃO DE HIBRIDAÇÃO EM DESCENDENTES DO CRUZAMENTO <i>S. tuberosum</i> L. X [<i>S. tuberosum</i> L. X <i>S. chacoense</i> Bitt.].....	50
1 INTRODUÇÃO	50
2 REFERENCIAL TEÓRICO	52
2.1 Eletroforese	52
2.2 Características isoenzimáticas em plantas.....	53

	Página
2.3 Caracterização de proteína total em plantas.....	55
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	58
3.1 Material genético	58
3.2 Análise eletroforética.....	58
3.2.1 Preparo do gel e soluções tampões.....	59
3.2.2 Eletroforese	59
3.2.3 Revelação e fixação dos géis.....	60
3.3 Proteína total	60
3.4 Interpretação do zimograma	61
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
4.1 Caracterização isoenzimática	62
4.2 Interpretação dos zimogramas	62
4.2.1 Esterase (EST).....	62
4.2.2 Proteína total	63
5 CONCLUSÕES	65
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

RESUMO

VILA, Vilma Barretto. **Caracterização do nível de ploidia de híbridos de *Solanum tuberosum* X [*Solanum tuberosum* L. X *Solanum chacoense* Bitt.]** Lavras: UFLA, 1995. 76p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).^{*}

Foram efetuadas características citogenéticas, citoantômicas e morfológicas em 53 clones, provenientes do cruzamento das cultivares comerciais tetraplóides ($2n = 4x = 48$) 'Aracy' e Br63.65, utilizadas como progenitores femininos, com os híbridos dihaplóides 26.5 e 23, utilizados como progenitores masculinos, visando identificar o nível de ploidia dos descendentes. O ensaio foi realizado em casa de vegetação e no Laboratório de Citologia e Anatomia do DBI - UFLA (Lavras - MG) em 1995. O delineamento experimental adotado foi o de blocos casualizados com três repetições. Cada parcela foi representado por um vaso contendo uma única planta. Na avaliação citogenética obteve-se 96,2% de indivíduos tetraplóides ($2n = 4x = 48$) e 3,8% de triplóides ($2n = 3x = 36$), não ocorrendo nenhum diplóide.

Todos os caracteres citoanatômicos e morfológicos permitiram distinguir os clones diplóides das demais ploidias, porém não foi possível a distinção entre os indivíduos triplóides e tetraplóides. Assim sendo, para um grande número de indivíduos, a diferenciação de diplóides em relação às demais ploidias pode ser feita mais fácil e rapidamente através da contagem do número de estômatos por unidade de área. No entanto, torna-se necessário o uso da análise citogenética quando se deseja diferenciar todos os níveis de ploidia.

^{*} Orientadora: Lisete Chama Davide. Membros da banca: Maria das Graças G. C. Vieira, Manuel Losada Gavilanes

SUMMARY

CHARACTERIZATION OF PLOIDY LEVEL OF HYBRIDS OF *Solanum tuberosum* X [*Solanum tuberosum* L. X *Solanum chacoense* Bitt.] LAVRAS, UFLA, 1995. 76p.

Cytogenetical, cytoanatomical and morphological characterization were accomplished in 53 clones, coming from the crossing of commercial tetraploid cultivars ($2n = 4x = 48$) 'Aracy' and Br63.65 utilized as female parents, as male parents the hybrids 26.5 and 23 were, aiming to identify the ploidy level of the offspring. The trial was undertaken in greenhouse and in the Cytology and Anatomy Laboratory of the Biology Department - UFLA (Lavras - MG), 1995 and the experimental design employed was that of randomized blocks with three replications. Each plant was represented by a pot containing a single plant. In the cytogenetical evaluation, there was found 96,2% of tetraploid individuals ($2n = 4x = 48$) and 3,8% of triploids ($2n = 3x = 36$) not occurring any diploid. All cytoanatomical and morphological characteristics allowed to differentiate diploids from other ploidy levels, nevertheless it was impossible to distinguish triploids from tetraploids.

Thus, to a great number of individuals, the differentiation of diploids from the other ploidies, may be more easy and rapid to do through counting the number of stomata. However, the cytogenetic analysis would be necessary when one wishes to distinguish every ploidy level.

CARACTERIZAÇÃO DO NÍVEL DE PLOIDIA DE HÍBRIDOS DE *Solanum Tuberosum* L X (*Solanum tuberosum* L. X *Solanum chacoense* Bitt.)

INTRODUÇÃO

O melhoramento da batata cultivada *Solanum tuberosum* L. ssp. *tuberosum* ($2n=4x=48$) tem sido um processo árduo devido à complexidade da herança tetrassômica e ao grande tamanho populacional exigido para se obter o genótipo desejado, principalmente se a característica de interesse for de controle poligênico (Peloquin et al., 1989; citado por Ortiz e Peloquin, 1993).

Para superar essas dificuldades, o melhoramento de *S. Tuberosum* requer a adoção de alternativas peculiares para a obtenção de novas de cultivares. Dentre estas, o uso de espécies selvagens diplóides ($2n=2x=24$) tem sido empregado por vários pesquisadores. Uma das espécies selvagens comumente usada em cruzamento interespecífico é a *Solanum chacoense* Bitt. Pois hibridiza facilmente com dihaplóide ($2n=2x=24$) de *S.tuberosum* L.e apresenta também boas características agronômicas tais como: vigor vegetativo, florescimento abundante, alta fertilidade e resistência a *Meloidogyne* ssp., nematóide que afeta muitas cultivares em regiões tropicais quentes e úmidas (Leue e Peloquin, 1980 e Iwanaga e Schmediche, 1989). Esta espécie selvagem apresenta também

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Caracterização botânica

A batata cultivada e a selvagem pertencem à família Solanaceas pelo sistema Cronquist (Gill e Vear, 1965). Esta família é composta por 85 gêneros distribuídos em todo mundo com maior concentração nas Américas, sendo a *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* a principal espécie cultivada em todo o mundo (Joly, 1985; Hawkes, 1963; Dodds (1962), citado por Ugent (1970), reconhece uma espécie cultivada *Solanum tuberosum* L. e subdivide em cinco grupos mais duas cultivares híbridas, sendo o grupo tuberosum ($2n = 48$) originado por seleção artificial do grupo Andigena, de clones introduzidos na Europa, América do Norte e Chile. O grupo Andigena ($2n = 48$) originou-se por duplicação espontânea do número de cromossomos do grupo Phureja e grupo Stenotomum, sua distribuição está da Venezuela ao norte da Argentina, esporadicamente na América Central e México. O grupo Chaucha ($2n = 36$), originou-se por hibridação entre os grupos Andigena e Phureja ou Andigena e Stonotomum, com distribuição do Peru Central ao norte da Bolívia. O grupo Phureja ($2n = 24$), originou-se por seleção da baixa dormência dos tubérculos apresentada pelo grupo Stonotomum, com distribuição da Venezuela ao norte da Bolívia. O grupo Stonotomum ($2n + 24$), originou-se por hibridação natural entre espécies selvagens seguido de seleção artificial, encontra-se distribuído do Sul do Peru ao norte da Bolívia. *Solanum*

Juzepozukii ($2n = 36$), surgiu do cruzamento de *Solanum acaule* com Phureja ou Stonotomum, sendo distribuída do Peru central ao sul da Bolívia. *Solanum curtlobum* ($2n = 60$), originou-se do cruzamento *Solanum juzepozukii* (gametas não reduzidos) com o grupo Andígena.

A classificação de Dodds (1962) citado por Ugent (1970), parece ajustar-se de maneira equilibrada com os fatos genéticos e evolucionários conhecidos.

Solanum tuberosum L. é uma planta anual, cujo porte fica em torno de 60 cm de altura, ramificada, frequentemente pubescente, podendo apresentar-se sob as formas ereta, aberta ou decumbente. O sistema radicular é ramificado, sendo que nas plantas originadas de sementes as raízes tem origem no eixo hipocótilo-radícula e nas originadas de tubérculos são adventícias; a formação dos estolões, que são ramos laterais do caule, começam nos nós mais baixos e progridem para baixo, a região perto da extremidade apical dos estolões sofre um entumescimento e desenvolve-se formando o tubérculo. Os tubérculos são caules subterrâneos modificados; sua forma e cor são características que dependem da cultivar. O caule é ramificado, apresentando certa flexibilidade, normalmente com leve pilosidade, podendo ter nós proeminentes ou não. As folhas possuem disposição alternada no caule possuindo 2 a 4 pares de folíolos primários laterais e um folículo terminal. As flores contém 5 pétalas, cuja cor varia do branco ao violáceo. Os frutos são bagas globosas, com aproximadamente 2 cm de diâmetro, biloculares, de cor verde ou parda. As sementes possuem formato ovalado-achatado cuja cor é castanha ou amarelada (Gill e Vear, 1965; Carl e Loomis, 1968; Esau, 1972 e Esau, 1974).

2.2 Melhoramento genético da batata

2.2.1 Domesticação da batata

As provas mais antigas preservadas de batata, provém de sítios arqueológicos em Chiripa, nas margens do lago Titicaca, nas ruínas Tiahuanaco no norte da Bolívia Pachacamas perto de Lima e em Arica na costa norte do Chile. Estas provas datam de aproximadamente 400 anos A.C. à 1000 anos D.C. e consistem de tubérculos de batata secos que não parecem ter forma diferente das atuais (Christiansen, 1967).

Sabe-se muito pouco sobre a história da batata durante seu período mais crítico da evolução. Acredita-se que o homem tenha migrado para o sul e alcançado as montanhas Andinas, após 10000 anos A.C., levando consigo uma economia baseada apenas na caça, pesca e extrativismo vegetal, onde várias espécies selvagens que produziam tubérculos podiam estar incluídas. Nas regiões circundantes aos acampamentos nômades, restos alimentícios eram depositados, servindo assim como ponto de partida para a evolução de variedades híbridas selvagens espalhando-se ao longo dos caminhos que ligavam os diferentes acampamentos (Christiansen, 1967; Ugent, 1970 e Brush, 1980).

À medida que as populações nômades se estabeleceram, tomando-se dependentes da produção agrícola, aprenderam então a efetuar a seleção clonal em suas culturas e plantar cultivares que mostravam rendimentos favoráveis, sabores desejáveis ou outras boas características, permitindo que genótipos indesejáveis se extinguissem ou crescessem como plantas daninhas ao longo dos limites dos campos de cultivo.

Os agricultores primitivos não adotavam a prática de cultivo limpo e conseqüentemente a origem de cultivares híbridos se deu a partir de cruzamentos de espécies selvagens com cultivadas, porém em número muito reduzido. Plantas que surgiam com

características desejáveis nunca foram submetidas à estabilização através de cruzamentos artificiais, sendo mantidas estritamente por propagação clonal, como hoje (Christiansem, 1967; Laufer, 1968; Ugent, 1970; Brush, 1980; Jackson, 1980 e Zimmerer, 1991).

Salamam (1985), cita evidências de que batatas foram adquiridas em 1573 em Sevilha e concluiu que elas poderiam ter chegado ao sul da Espanha em 1570 aproximadamente e devem ter sido cultivadas em algum lugar na região de Sevilha por alguns anos afim de formar Banco de Germoplasmas. Esta data de 1570 é geralmente citada como a época aproximada da primeira chegada da batata no continente Europeu, como um suprimento de navio e não foi considerada como uma planta de grande importância na época.

Da Espanha a batata se espalhou para a Itália, e então para a Inglaterra no ano de 1596. No ano de 1588, Philippe de Sivry enviou a Vienna dois tubérculos de batata ao famoso botânico Clusius; à partir daí a batata se espalhou por toda Europa apenas como uma curiosidade botânica (Hawkes, 1978 e Brown, 1993).

Uma vez introduzida na Europa a cultura da batata teve que ser selecionada, visando a tuberização em condições de dias longos. Esta seleção tomou as populações de batata mais uniformes e homogêneas, vulneráveis à destruição por doenças e outras causas naturais (Ugent, 1970; Hawkes, 1978 e Simmonds, 1979).

Por volta de 1845 na Irlanda, grandes áreas de cultivos de batata foram dizimadas pela requeima, causada pelo fungo *Phytophthora infestans*, deixando nítida a falha genética (Hawkes, 1978 e Simmonds, 1979).

Esse fato deu ímpeto à busca por novas variedades que tivessem resistência à doença. Goodrich (1863), concebeu a idéia de que a epidemia da requeima durante os anos de 1843 a 1847, foi resultado de uma redução no vigor da batata.

Este mesmo autor não obteve sucesso no controle da doença, contudo, iniciou a base do melhoramento nos Estados Unidos, fornecendo material para ser usado por outros melhoristas. Ocorreu então a ascendência de 170 variedades; dentre estas, inclui-se

variedades bem conhecidas como a Burbank, Early Ohio, Green Mountain e Triumph (Goodrich, 1863 e Plaisted, 1989).

Tendo em vista o aparecimento da segunda epidemia da requeima, causando uma grande destruição nas variedades existentes, os melhoristas concentraram seus esforços na obtenção de cultivares mais resistentes. Nesta mesma época destaca-se o primeiro trabalho sistemático para a produção de sementes através de hibridação controlada, realizada por Prengle de Charlotte, Vermont (Smith, 1949).

O departamento Americano de Agricultura em 1910, assumiu o melhoramento da batata com o objetivo de buscar novas variedades resistentes à requeima. Porém, alguns anos mais tarde com o aparecimento de doenças viróticas como: vírus PLRV (enrolamento da folha), PVX e PVY, percebeu-se logo que a ocorrência difusa em larga escala dessas doenças eram fatores mais agravantes à cultura e poderiam ser controlados com o melhoramento genético através de produção de cultivares mais resistentes (Smith, 1949; Houghland et al., 1958 e Furumoto et al., 1983).

Nos anos 40, iniciou-se o melhoramento genético de batata no Brasil em Pelotas - RS e Campinas- SP, com a produção de várias cultivares, dentre estas a 'Baronesa', obtida no programa de melhoramento do Rio Grande do Sul e a 'Aracy' em São Paulo, que, resolveram em parte os problemas da cultura, por apresentarem certa resistência à requeima e uma resistência intermediária ao vírus PLRV (Costa, 1988 e Costa et al., 1989).

2.2.2 Bases genéticas dos métodos alternativos para o melhoramento da batata.

A batata cultivada *Solanum tuberosum* L. é uma espécie autotetraplóide com 4 genomas idênticos ou quase, e portanto, portadora de herança tetrassômica. Além disso, devido a sua propagação assexuada, erosão genética e isolamento geográfico aos quais a

espécie foi submetida no século passado, possui pouca variabilidade e estreita base genética. Diante do exposto, o melhoramento de batata tetraplóide é conduzido de modo diferente das espécies diplóides propagadas via semente (Lunden, 1960; Chase, 1964; Hawkes, 1978; Iwanaga e Peloquin, 1982; Gottschalk, 1984; Ortiz e Peloquin, 1993).

Em 1958, Hougas e Peloquin sugeriram o uso de indivíduos haplóides (dihaplóides) de *Solanum tuberosum* L., nos programas de melhoramento. O uso de dihaplóides de batata, representa uma possibilidade inicial para romper as dificuldades no estudo da herança genética de um autopolipóide, a ser superado no melhoramento.

Com a descoberta de que os dihaplóides se cruzam prontamente com outras espécies de *Solanum* cultivadas ou não, Chase (1963) propôs um método de melhoramento analítico para batata. De acordo com esse esquema, 3 diferentes estágios foram propostos: a) haploidização do tetraplóide; b) melhoramento ao nível diplóide; c) restauração do nível tetraplóide. A transformação do tetraplóide em dihaplóide não é suficiente para a introdução de novos alelos na população, sendo necessário cruzá-lo com outras fontes de germoplasma (Maris, 1990 e Waara, 1991).

O híbrido gerado, tendo como genitor uma espécie selvagem trás consigo muitos caracteres indesejáveis, e por isso, é necessário ser retrocruzado com a espécie cultivada, visando a eliminação desses caracteres. Contudo, este retrocruzamento envolve indivíduos com diferentes ploidias ($4x \times 2x$), podendo gerar progênes com níveis de ploidia indesejados (Lange e Wagenvoet, 1973). Hanneman e Peloquin (1968) obtiveram uma progênie de cruzamento interespecífico com 91,9% de indivíduos tetraplóides ($4x$), 7,6% de triplóides ($3x$) e 0,6% de diplóides ($2x$).

O problema das ploidias indesejáveis pode ser contornado com a descoberta de que o híbrido diplóide produz gametas $2n$ através de mutantes meióticos, levando à formação de progênie tetraplóide, oferecendo uma oportunidade para aumentar a diversidade genética, multialelismo, e conseqüentemente a produção de tubérculos, (Mok e Peloquin,

1972). Os gametas $2n$ em um cruzamento $4x \times 2x$ transmitem quase 80% da heterozigose do parental $2x$ para a progênie $4x$ juntamente com uma grande fração de epistasia (Peloquin, 1983; Douches e Quiros, 1987, citado por Darro e Peloquin, 1991; Concílio e Peloquin, 1991).

Segundo Mendiburu e Peloquin (1976), o esquema de melhoramento $4x \times 2x$ denominado poliploidização sexual unilateral, com a produção de DT's (diplandróides tetraplóides) tem se mostrado eficiente, pois a utilização de germoplasma selvagem permite a introdução da diversidade genética dentro do pool gênico de *Tuberosum*, além de promover interações alélicas necessárias para a obtenção de alto vigor e produtividade na progênie (Concílio e Peloquin, 1991).

A manipulação com plantas poliplóides tem sido uma ferramenta útil para o melhorista de batata. Iwanaga e Ortiz (1988), avaliando famílias provenientes de cruzamento $4x \times 2x$ e $4x \times 4x$, constataram que somente a família $4x \times 2x$ foi mais estável em condições ambientais adversas. Ortiz, Iwanaga e Peloquin (1994), verificaram que o uso de espécies selvagens tem contribuído em vários aspectos para melhorar a performance da batata cultivada.

O pareamento heterogenético neste caso é um requisito fundamental. Sing et al. (1989) fornecem evidências de pareamento heterogenético no nível diplóide, inferindo que diferentes genomas trocam material genético livremente, tomando como prova o comportamento citológico normal dos cromossomos e a fertilidade do híbrido. Esse comportamento explica também a alta fertilidade do pólen e o vigor encontrado em híbridos haplóides de *tuberosum* de espécies selvagens (Mendiburu et al. 1974, citado por Concílio 1992).

2.3 Métodos de caracterização do nível de ploidia

2.3.1 Método citogenético

A contagem do número de cromossomos em metáfases mitóticas em pontas de raízes é o método mais utilizado para identificação do número de cromossomos em progênies obtidas de cruzamento com espécies que apresentam variações no nível de ploidia. Variações nos níveis de ploidia foram identificadas com segurança através da análise citogenética em diversas plantas como: beterraba (Kloen e Speckmann, 1954; Dudley, 1958); melancia (Medina, Prado e Mendes, 1958); alfafa (Clement e Lehman, 1962); centeio (Speckmann, Post e Dijkstra, 1965); repolho (Speckmann, Dijkstra e Ten Kate, 1967); *Hoedeum Vulgare* (Lange, 1971); beringela (Medina et al., 1972); *Bromus inermis* (Geok-Young e Dunn, 1973); batata-doce (Orjeda, Freyre e Iwanaga, 1990); *Solanum aethiopicum* (Anaso, 1991); batata (Koopmans e Van Der Burq, 1952; Hersen e De Boer, 1971; Mok, Lee e Peloquin, 1974; Karp et al., 1982; Sing, Salmuni e Uhrig, 1989; Preiszner, et al. 1991; Clulow et al., 1991; Chien-An Liu e Douches, 1993). Apesar de ser um método seguro, não oferece garantias quanto a hibridação. Além disso, é laborioso e demorado, oferecendo desvantagens quando se trata de análises em grande número de plantas (Pehu et al., 1987).

2.3.2 Método citoanatômico e morfológico

Outro método usado para a identificação do nível de ploidia de híbridos é a caracterização citoanatômica e morfológica. Características tais como comprimento e diâmetro de folhas, pétalas e estames; número de cloroplastídeos nas células-estomáticas,

comprimento e número de estômatos, na face adaxial e abaxial da epiderme das folhas tem sido utilizadas (Pehu et al., 1987).

O nível de ploidia de híbridos de *Solanum* também pode ser determinado através da mensuração dos grãos-de-pólen, que permite verificar a ocorrência de pólenes n e $2n$ (Quinn, Mok e Peloquin, 1974; Bamberg e Hanneman, 1991).

Em batata, assim como, em muitas plantas poliplóides, há uma correlação entre o nível de ploidia e características morfológicas. Tais correlações tem sido demonstradas por Hermsen (1966); Hermsen e Boer (1971); Fassuliotis (1977); Pehu et al. (1987) e Concilio (1992) em batata; Kloen e Speckmann (1954), Mochizuki e Sueoka (1955) e Dudley (1958), em beterraba; Shearman e Beard (1972) em *Agrostis*, Bingham (1968) e Colen e Dobrenz (1970) em alfafa; Lleras e Medri (1978) em *Hevea brasiliensis*, Hell (1979) e Kerbauy (1981) em *Nicotiana Tabacum*; Speckmann, Post e Dijkstra (1965), em centeio, Santos e Handro (1982) em petunia. Portanto a associação entre o nível de ploidia e características morfológicas pode auxiliar na separação de plantas poliplóides, principalmente porque essas características estão relacionadas com o aumento do tamanho das células ou estruturas inteiras, como resultado de poliploidização (Eigsti e Dustin, 1955; Nistch, 1969; Sree Ramulu et al., 1976 e Fassuliotis, 1977). Essa variabilidade morfogenética é devido a alterações quantitativas no conjunto de cromossomos e não de mutações gênicas (Buatti, 1955, citado por Santos e Handro, 1982).

As análises morfológicas são métodos fáceis e rápidos para a avaliação da ploidia e permitem estimativas de correlações estatísticas, oferecendo segurança na sua identificação (Pehu et al., 1987).

No entanto, de acordo com Desborough e Peloquin (1968), características analisadas através dessa metodologia podem sofrer influências do meio ambiente, tais como deficiência de nutrientes no solo, stress hídrico, que podem interferir nas análises dos resultados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Condução do experimento

O experimento foi instalado em condições de telado com fotoperíodo de 16 horas no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA) em 1994.

O delineamento experimental foi de blocos ao acaso com três repetições sendo cada parcela representada por um vaso contendo uma planta.

3.2 Material genético

Foram avaliados 53 clones supostamente híbridos, obtidos do cruzamento entre *S. Tuberosum* L. X (*S. Tuberosum* L. X *S. Chacoense* Bitt.). Da espécie *S. Tuberosum* L. (4x) empregou-se o clone "Br 63.65" originário dos Estados Unidos e a cultivar nacional 'Aracy'. Como representante do híbrido interespecífico (2x) (*S. Tuberosum* L. X *S. Chacoense* Bitt.) utilizou-se os clones 26.5 e 23 obtidos por Cunha (1992), sendo que do cruzamento 'Br 63.65' (4x) x clone 26.5 (2x) obteve-se 15 clones; 'Aracy' (4x) x clone 26.5 (2x) obteve-se 23 clones e 'Br 63.65' (4x) x clone 23 (2x) obteve-se 15 clones. Para efeitos comparativos foram incluídos 4 clones diplóides (números 47,91, 115 e 116), obtidos por Moraes (1994).

3.3 Análise citogenética

A caracterização citogenética foi feita através da contagem do número de cromossomos em metáfases micóticas encontradas na região meristemática de pontas de raízes originadas de tubérculos enraizados em água.

Para obtenção de metáfases colchicínicas várias amostras de raízes foram coletadas entre 9:30 às 11:00 horas, determinadas através de testes preliminares, tratadas com hidroxiquinoleína 0,029% a temperatura ambiente e fixadas em Carnoy (uma parte de ácido acético para três partes de álcool etílico absoluto), onde permaneciam por um período de 12 horas. Após a fixação, as raízes foram armazenadas em álcool 70%, na geladeira, até o uso. Após tratamento hopotônico e hidrólise em HCL 1N à 60° C, por 10 minutos, as raízes foram esmagadas em ácido acético 45%. A coloração foi feita com Giemsa 2% em tampão fosfato, pH 6,8. Foram avaliadas no mínimo duas lâminas por clone e três metáfases por lâmina, em microscópio Carl Zeiss modelo Janamed 2, a um aumento total de 1000x.

As fotomicrografias dos cromossomos foram feitas utilizando-se filme Kodachrome Kodak 64 ASA.

3.4. Análise citoanatômica

As avaliações citoanatômicas envolveram características de folha e dos grãos-de-pólen.

As folhas foram coletadas 10 dias após o início do florescimento fixadas e armazenadas em álcool 70%.

As avaliações foram feitas de amostras obtidas nas duas faces da epiderme, na região mediana dos primeiros e segundos pares de folíolo e do folíolo terminal. As amostras foram coradas com solução de nitrato de prata a 1% de acordo com Molish (1918), citado por Butterfass (1959).

Para a análise dos grãos-de-pólen as anteras foram coletadas três dias após a abertura das flores e armazenadas em álcool a 70% em geladeira até a sua utilização. A coloração foi feita com Carmim Acético a 2% e as amostras foram constituídas de aproximadamente 200 grãos-de-pólen.

As características avaliadas foram:

1. número de cloroplastídeos nas células-estomáticas nas faces adaxial e abaxial da epiderme, sendo avaliados 10 estômatos por clone;
2. diâmetro polar dos estômatos, sendo medidos 10 por clone, com auxílio da ocular OSM 0,5 a um aumento total de 400x;
3. número de estômatos por mm^2 contados com o auxílio do microscópio Olympus, com o auxílio de câmara clara, com um aumento total de 400x, considerando cinco (5) campos por clone.
4. diâmetro dos grãos-de-pólen, avaliado em três anteras obtidas de três flores por repetição, sendo o diâmetro medido através do auxílio da ocular OSM 0,5 a um aumento total de 400x.

A contagem do número de cloroplastídeos, a medição dos estômatos e o diâmetro dos grãos-de-pólen foram efetuados em microscópio Carl Zeiss modelo Janemad 2.

3.5. Análise morfológica

As características morfológicas listadas a seguir, foram analisadas 10 dias após ao início do florescimento de cada planta.

1. Comprimento e largura (mm) dos folíolos - foram medidos três folíolos por planta, sendo usado o folíolo terminal e o primeiro e segundo pares de folíolos primários, na região mediana da planta.
2. Comprimento e largura (mm) da pétala - foi medida a parte livre da pétala de três flores por planta.
3. Comprimento e diâmetro (mm) da antera - foi medida uma antera a partir de três flores por planta.

3.6. Análise estatística das características citoanatômicas e morfológicas.

Análises de variância foram efetuadas para todos os caracteres, de acordo com seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ij} = m + c_i + b_j + e_{(ij)}$$

Y_{ij} : observação do clone i no bloco j ;

m : média geral do caráter;

c_i : efeito do clone i ; $i = 1,2,3,\dots,60$;

b_j : efeito do bloco j ; $j = 1,2,3$.

$E_{(ij)}$: efeito do erro experimental, associado à observação Y_{ij}

Posteriormente, foi efetuada a análise conjunta da variância para as características citoanatômicas estudadas e para os 60 clones, nas duas faces da epiderme, com base no modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = m + c_j + p_k + pe_{(jk)} + e_{ijk}$$

Y_{ijk} : observação do clone i no bloco j na ploidia k na epiderme 1;

m : média geral do caráter;

b_i : efeito do bloco i ; $i = 1,2,3$;

c_j : efeito do clone j ; $j = 1,2,3,\dots,60$

p_k : efeito da ploidia k ; $k = 1,2,3$;

$pe_{(jk)}$: efeito da interação do clone j com ploidia k com epiderme 1;

$e_{(ijk)}$: efeito do erro experimental, associado a observação Y_{ijk}

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise citogenética

Através da contagem do número de cromossomos, dos 53 clones analisados 51 (96,2%) foram tetraplóides ($2n = 4x = 48$) e apenas dois (3,8%) triplóides, sendo um oriundo do cruzamento de BR 63.65 x 26.5, e o outro descendente de 'Aracy' x 26.5 (Figura 1). Nenhuma planta diplóide foi encontrada.

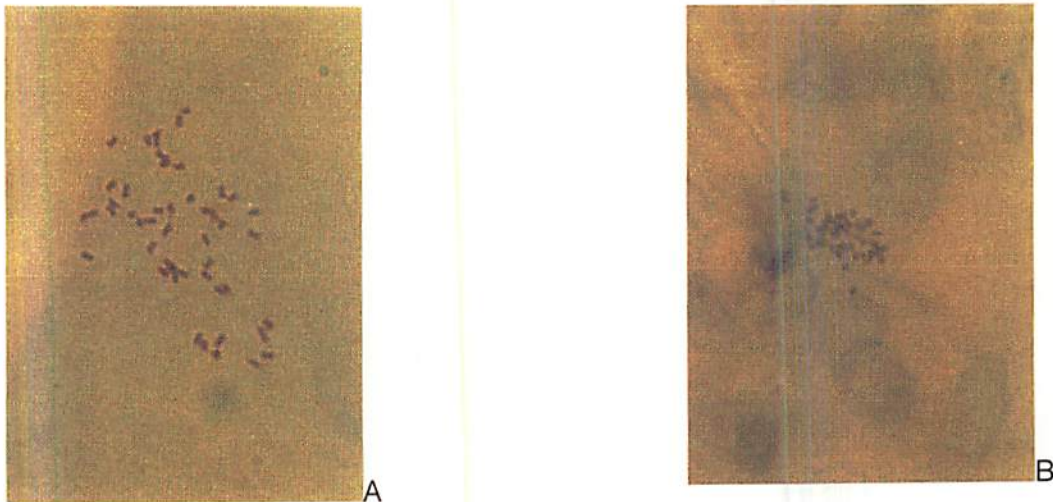


Figura 1: Número de cromossomos da batata (A) tetraplóide, (B) triplóide. Aumento total: 1472x. UFLA, 1995

Hanneman e Peloquin (1968), analisando descendentes de cruzamento $4x \times 2x$ obtiveram 91,9% de tetraplóides, 7,6% de triplóides e 0,6% de diplóides. De acordo com os autores, existe algumas indicações de que a frequência da variação do nível de ploidia se dá de acordo com a cultivar e o híbrido diplóide usado, bem como com a direção do cruzamento.

4.2 Análise citoanatômica

4.2.1 Características anatômicas da folha

O resumo das análises de variância para as características citoanatômicas da folha é apresentado no Quadro 1. Observou-se diferenças significativas entre os clones a nível de 1% de probabilidade para todas as características analisadas.

QUADRO 1 - Resumo das análises de variância para número de cloroplastídeo por célula-estomática , diâmetro polar (μm) número de estômatos por mm^2 . UFLA, 1995.

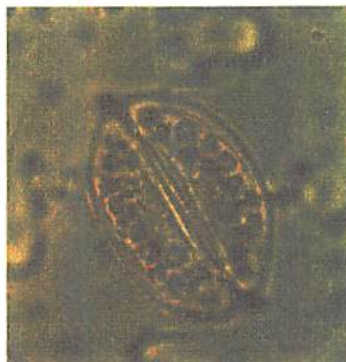
FV	GL	Número de cloroplastídeos	Diâmetro polar	Número de estômatos
Bloco	2	0,55	11,97	1404,30
Clones(C)	(59)	21,65**	21,23**	10071,60**
Ploidia	2	417,15**	373,93**	174953,84**
Entre Tetra	52	8,36**	9,25**	4398,13**
Entre Tri	1	0,80 ^{ns}	5,99 ^{ns}	159,87 ^{ns}
Entre Di	4	1,98 ^{ns}	4,35 ^{ns}	3863,53**
Epiderme (E)	1	357,40**	48,44**	3883794,81**
C X E	(59)	5,96**	4,90**	5614,85**
P X E	2	30,63**	5,99 ^{ns}	81776,28**
Entre Tetra X E	52	5,49**	5,44**	1906,29**
Entre Tri X E	1	0,79 ^{ns}	0,17 ^{ns}	6,40 ^{ns}
Entre Di X E	4	0,97 ^{ns}	0,19 ^{ns}	17149,79**
Erro	238	2,61	2,72	662,93
CV (%)		10,96	5,06	14,46

** F, significativo à 1% de probabilidade para todas as características.

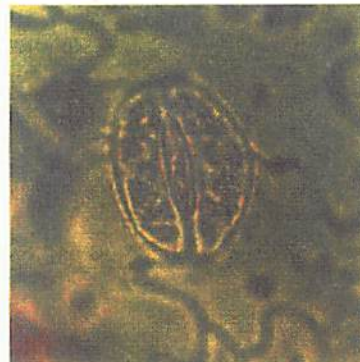
Diferenças altamente significativas foram observadas entre os clones para os três caracteres. A soma de quadrados entre os clones foi então desdobrada entre ploidias e entre clones dentro de cada nível de ploidia. Diferenças entre ploidias foi observada para todos os caracteres. Para o número de cloroplastídeos por célula-estomática os clones diplóides foram bem inferiores aos clones triplóides e tetraplóides, os quais não mostraram diferenças entre si (Quadro 2 e Figura 2). Quanto ao diâmetro polar e número de estômatos por área detectou-se que os diplóides apresentaram um grande número de estômatos de pequeno tamanho (Quadro 2 e figura 3), enquanto que os triplóides apresentaram um menor número de estômatos grandes. Os tetraplóides foram intermediários para os dois caracteres (Quadro 2).



A



B



C

Figura 2: Cloroplastos nas células estomáticas de diferentes ploidias. A - tetraplóide; B - triplóide e C - diplóide.

Aumento total: 588,8 x. UFLA, 1995

QUADRO 2 Média do número de cloroplastídeos por célula estomática diâmetro polar (μm) e número de estômato por unidade de área (mm^2). UFLA, 1995.

Ploidia	Número de cloroplastos	Tamanho de estômatos	Número de estômatos
Diplóide	9,70 b	27.90 c	287.57 a
Triplóide	15,81 a	34,98 a	129.70 c
Tetraplóide	15.16 a	32.71 b	170,37 b

Médias seguidas por letras distintas, diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

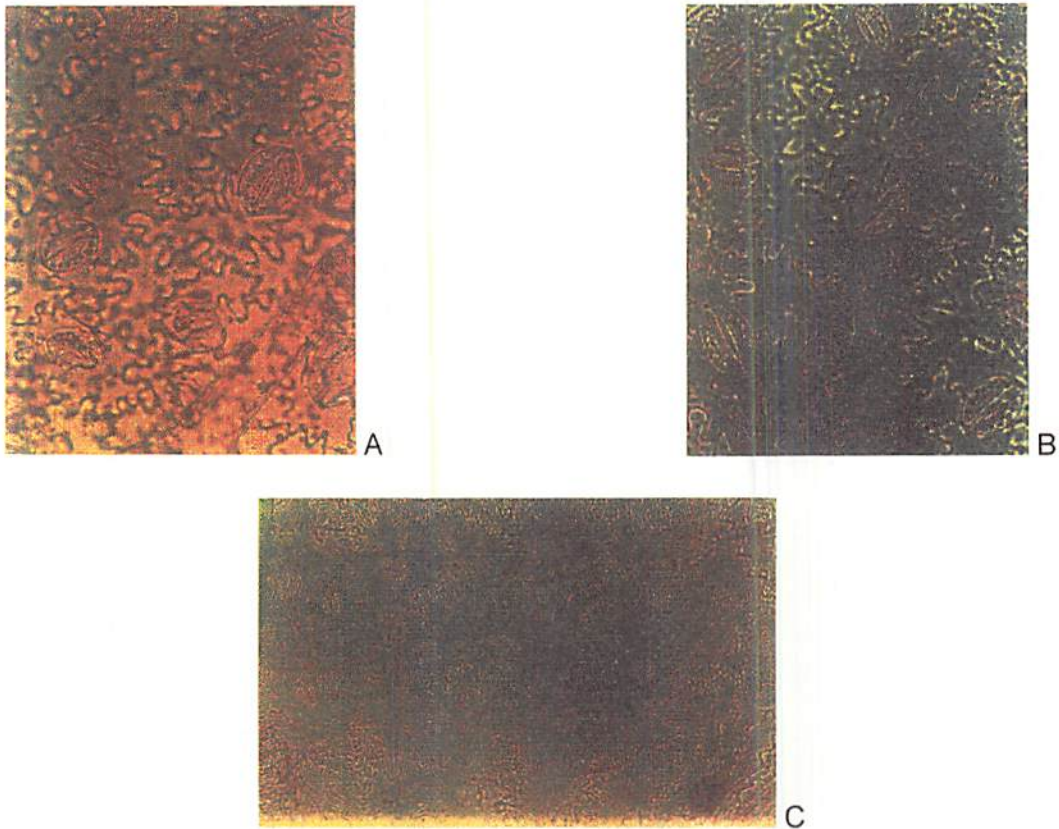


Figura 3: Estômatos da face abaxial da epiderme de folhas de clones de batata: A - tetraplóide; B - triplóide e C - diplóide. Aumento total: 1178x. UFLA, 1995.

Estes resultados mostram que é relativamente fácil distinguir os clones diplóides dos demais, utilizando as características anatômicas da folha. Contudo, a identificação de clones tetraplóides e triplóides é praticamente impossível. Apesar de terem sido detectadas diferenças entre estes níveis de ploidia para tamanho e número de estômatos (Quadro 2), observou-se grande variação entre os clones tetraplóides sendo que as amplitudes das médias destes clones envolveram os valores médios dos clones triplóides (Quadro 3).

QUADRO 4 - Médias do número de cloroplastídeos por células estomáticas, diâmetro polar (μm) e número de estômatos (mm^2) das faces adaxial e abaxial da epiderme. UFLA, 1995.

Ploidia	Face Adaxial			Face Abaxial		
	Número de Cloroplastídeos	Diâmetro Polar dos Estômatos	Número de Estômatos	Número de Cloroplastídeos	Diâmetro Polar dos Estômatos	Número de Estômatos
Diplóide	9,34	27,83	105,89	10,05	27,97	451,24
Triplóide	16,54	36,21	58,40	15,07	33,74	200,99
Tetraplóide	16,29	33,34	71,77	14,03	32,07	268,97
Média	15,72	32,98	74,17	13,73	31,78	281,89

QUADRO 5 - Média das faces adaxial e abaxial da epiderme para o número de cloroplastídeos por célula estomática, diâmetro polar (μm) e número de estômatos por unidade de área (mm^2). UFLA, 1995.

Progênie Diploide						
Face Adaxial				Face Abaxial		
Clone	Nº	Diâmetro Polar	Número de	Nº	Diâmetro Polar	Número de
	Cloroplastídeos	dos Estômatos	Estômatos	Cloroplastídeos	dos Estômatos	Estômatos
56 - 26.5	9,75	28,04	154,76	9,18	27,56	313,41
57 - 47	8,74	28,66	106,09	9,68	28,99	459,41
58 - 91	9,68	27,49	90,52	10,22	27,00	484,72
59 - 115	10,07	28,29	86,62	11,08	28,27	497,37
60 - 116	8,46	26,60	91,49	10,06	28,02	501,26
Média Geral	9,34	27,83	105,89	10,05	27,97	451,24
CV (%)	9,86	2,81	16,44	12,94	3,55	7,52

Progênie Triplóide						
Face Adaxial				Face Abaxial		
Clone	Nº	Diâmetro Polar	Número de	Nº	Diâmetro Polar	Número de
	Cloroplastídeos	dos Estômatos	Estômatos	Cloroplastídeos	dos Estômatos	Estômatos
54 - 05	16,54	35,39	55,48	15,58	33,15	196,61
55 - 36	16,54	37,04	61,32	14,56	34,30	205,37
Média Geral	16,54	36,21	58,40	15,06	33,74	200,99
CV (%)	15,53	3,60	18,71	3,61	2,07	3,09

Progênie Tetraplóide						
Face Adaxial				Face Abaxial		
Clone	Nº	Diâmetro Polar	Número de	Nº	Diâmetro Polar	Número de
	Cloroplastídeos	dos Estômatos	Estômatos	Cloroplastídeos	dos Estômatos	Estômatos
1 - 02	14,88	33,34	75,92	12,96	30,58	276,42
2 - 03	14,46	33,85	64,24	16,71	32,17	250,14

cont...

Quadro 5 cont...

3-04	16,75	34,20	56,45	16,46	33,82	196,61
4-06	17,33	36,56	58,40	14,79	34,81	202,45
5-07	15,04	32,45	80,72	13,05	30,08	265,18
6-11	16,72	30,89	76,89	12,86	30,98	290,05
7-12	18,02	30,51	87,60	12,04	32,44	324,12
8-14	16,31	30,71	79,81	12,53	30,64	360,13
9-18	15,51	28,62	65,21	11,65	32,74	230,68
10-20	14,22	31,33	75,92	14,18	32,66	264,74
11-21	19,80	33,94	51,58	14,88	32,32	221,92
12-24	18,11	35,91	79,84	12,12	31,93	290,05
13-25	16,38	34,63	49,64	11,51	33,54	189,80
14-26	16,95	34,72	82,73	14,75	33,91	246,25
15-29	14,72	30,78	88,57	12,44	33,82	276,42
16-30	15,97	33,49	72,02	14,00	34,90	232,62
17-31	14,07	34,82	69,10	13,32	33,07	268,15
18-38	15,81	33,75	65,21	12,92	32,99	204,40
19-40	14,67	32,26	94,31	13,77	31,27	315,36
20-41	17,20	33,22	60,34	12,42	33,27	225,81
21-43	14,70	34,19	68,13	12,51	33,54	297,84
22-45	16,31	34,71	54,50	12,61	33,05	265,72
23-46	14,96	33,39	87,60	12,54	29,48	301,73
24-47	15,38	35,16	51,58	13,06	33,78	269,61
25-48	16,90	34,52	81,76	14,86	32,08	262,80
26-49	15,14	30,70	88,57	11,14	31,33	337,74
27-51	17,24	34,57	63,26	15,68	32,05	311,41
28-53	16,89	32,01	72,02	12,37	33,38	284,21
29-54	17,51	31,63	91,49	14,26	31,98	296,86
30-56	15,51	32,14	68,13	15,74	31,79	290,05
31-57	16,39	34,47	80,78	15,68	31,86	271,56
32-58	16,56	34,11	75,92	13,57	32,44	251,12

cont...

QUADRO 5 Cont...

33 - 59	16,36	30,64	67,16	13,57	31,81	344,56
34 - 60	16,75	32,75	79,81	15,36	32,35	271,56
35 - 61	17,09	34,66	64,24	16,49	33,95	228,73
36-65	16,15	31,03	91,49	17,20	33,62	335,80
37 - 67	18,14	34,89	52,56	16,00	33,87	209,26
38 - 68	16,47	32,71	84,68	13,17	32,70	316,33
39 - 70	17,32	35,27	60,34	11,40	35,25	177,14
40 - 71	17,72	35,78	67,16	16,10	35,76	221,92
41 - 72	17,72	33,90	70,02	14,03	33,85	263,77
42 - 73	17,59	32,87	90,52	14,28	32,90	319,25
43 - 76	18,13	34,86	69,10	14,11	34,83	245,28
44 - 78	14,15	33,82	43,80	14,83	33,78	208,29
45 - 80	15,53	30,42	61,32	14,98	30,40	265,72
46 - 82	17,10	34,14	59,37	17,31	34,11	283,24
47 - 83	18,08	30,31	60,34	15,60	30,27	261,82
48 - 86	18,53	34,73	54,50	15,75	34,73	218,02
49 - 88	15,96	33,10	94,41	13,77	33,10	324,12
50 - 96	16,60	33,09	65,21	13,96	36,09	255,98
51 - 100	15,85	34,97	74,94	12,17	34,96	269,61
52 - Br63.65	13,25	34,51	97,33	14,75	34,51	333,85
53 - 'Aracy'	12,56	34,53	74,94	13,28	34,52	306,60
Média	16,29	33,34	71,77	14,03	32,07	268,97
CV (%)	10,15	5,93	16,13	11,41	4,06	12,92

Najcevska e Speckmann (1968) analisando plantas poliplóides como o trevo vermelho e branco, através da contagem do número de cloroplastídeos nas célula estomática encontraram diferenças significativas, podendo agrupar as plantas de acordo com seus níveis de ploidia.

Os resultados de pesquisas com beterraba realizadas por Dudley (1958), quando comparados com os resultados dos pesquisadores Mochizuki e Sueoka (1955),

proporcionaram evidências bastante convincentes de que o número de cloroplastídeos por célula estomática constitui um método exato de seleção com grande número de plantas para diferenciar níveis de ploidia.

Omrod e Renney (1968); Colen e Doubrenz (1970), verificaram que em algumas espécies como milho, feijão, abóbora e tomate, o número de estômatos por unidade de área na superfície adaxial da folha foi maior que na superfície abaxial, porém em investigações com ervas daninhas, 57% das plantas analisadas apresentaram maior número de estômatos na superfície abaxial.

Rosen, 1950; Nüesch (1966) e Bingham (1968), avaliando diâmetro polar de estômatos e número de estômatos por unidade de área em plantas de trevo e alfafa, indicaram que esses critérios são incertos para a caracterização de tetraplóides. Os autores concluíram ainda que a determinação do comprimento de estômatos requer medidas tediosas e consomem muito tempo. Esse mesmo fato também foi detectado neste trabalho, reforçando a indicação desses pesquisadores. Há evidências também de que o estágio de desenvolvimento da planta e condições ambientais tais como, baixa temperatura e variação da intensidade de luz e baixa fertilidade, afetam drasticamente o número de estômatos por unidade de área (Peufound, 1931; Cain, 1940; Cooper e Qualls, 1968 e Geok-Young Tan e Dunn, 1973).

Os resultados obtidos neste trabalho e a influência do ambiente sobre as características citoanatômicas permitem sugerir que esses métodos não são seguros para esse tipo de avaliação. No entanto, a avaliação do número de estômatos por unidade de área é rápida e suficiente quando se deseja avaliar um grande número de indivíduos e somente separar os diplóides das demais ploidias. O método citogenético seria o mais indicado para, com segurança, discriminar as diferentes ploidias.

Embora as análises estatísticas para o número de cloroplastídeo por célula estomática, indiquem distinção dos níveis de ploidia, a distribuição espacial das médias neste trabalho possibilitam visualização dos intervalos que agrupam plantas diplóides, triplóides e

tetraplóides, principalmente na face abaxial da epiderme (Quadro 4). Dessa maneira, pode ser mais vantajoso e rápido utilizar comparações de médias para separar populações com diferenças nos níveis de ploidia, com relação a esta característica.

Bingham (1968) através dessas mesmas análises para identificar diferenças de nível de ploidia em alfafa, constatou também que os valores de técnicas citoanatômicas para triagens rápidas são perdidos ao utilizar análises estatísticas para estabelecer diferenças.

4.2.2 Diâmetro dos Grãos de Pólen

O diâmetro do grão-de-pólen serve como critério para a avaliação do nível de ploidia do gameta (Yerk e Peloquin, 1989; Orjeda, Freyre e Iwanaga, 1990; Bamberg e Hanneman, 1991). Para a avaliação do pólen $2n$ e n , são feitas mensurações dos diâmetros dos grãos-de-pólen considerando $2n$ os que apresentarem valores entre 26-33 μm e n aqueles com valores entre 18-23 μm (Quinn, Mok e Peloquin, 1974).

O Quadro 6 apresenta as médias dos grãos-de-pólen dos 60 clones avaliados. As plantas que apresentaram média de 22,5 μm foram classificadas como diplóides, as triplóides com 31,1 μm e as tetraplóides com 29,8 μm . Desse modo as plantas diplóides puderam ser facilmente separadas, contudo, toma-se difícil diferenciar plantas triplóides de tetraplóides devido à sobreposição de médias (Figura 4).

Bamberg e Hanneman (1991) caracterizando nível de ploidia em espécies de *Solanum* através do diâmetro do pólen, identificaram mais de 90% das amostras analisadas. Os autores indicaram que o método é muito seguro para distinguir plantas diplóides de tetraplóides.

QUADRO 6 - Diâmetro médios dos grãos-de-pólen (μm) nos diferentes níveis de ploidia. UFLA, 1995.

Tetraplóide			
Clone	Diâmetro (μm)	Clone	Diâmetro (μm)
02	27,29	52	28,92
03	29,16	53	29,86
04	28,22	54	28,92
06	29,16	56	27,99
07	28,22	57	29,39
11	28,92	58	27,76
12	30,32	59	27,29
14	27,99	60	27,52
18	27,99	61	27,29
20	26,59	65	29,16
21	28,46	67	27,52
24	29,86	68	28,92
25	29,39	70	28,92
26	28,69	71	27,76
29	28,69	72	29,16
30	30,79	73	31,26
31	28,46	76	28,92
38	27,76	78	27,52
40	28,69	80	27,06
41	27,99	82	27,76
43	27,52	83	27,76
45	29,16	86	28,92
46	30,56	88	29,39
47	34,06	96	31,96
48	29,62	100	27,52
49	32,42	Br63.65	28,92
50	28,69	'Aracy'	26,59
51	29,86	Média Geral	29,82

cont...

QUADRO 6 Cont...

Triplóide		Diplóide	
Clone	Diâmetro (μm)	Clone	Diâmetro (μm)
05	32,39	26.5	22,39
36	29,86	47	23,79
		91	21,69
		115	23,09
		116	21,69
Média Geral	31,12	Média Geral	22,53

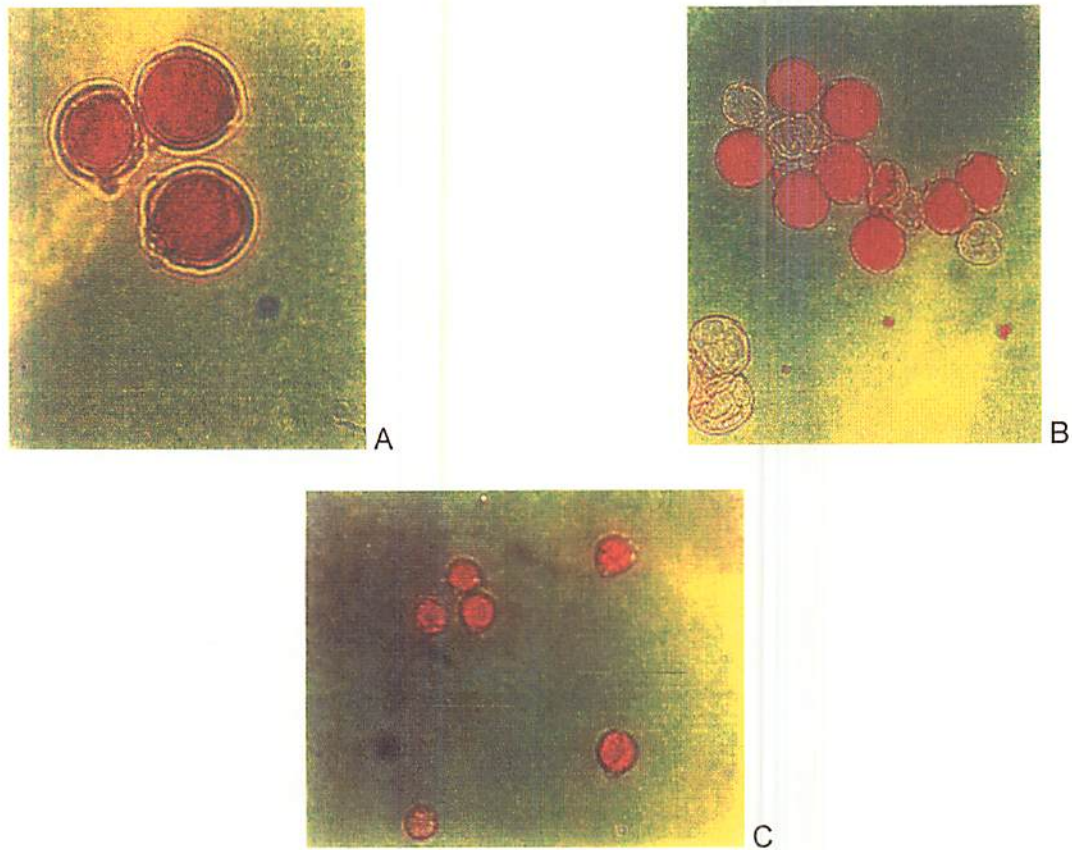


Figura 4: Grãos de pólen de batata: A - tetraplóide; B - triplóide e C - diplóide. Aumento total: 1472x. UFLA, 1995.

Abegg (1942) e Savitisk (1952) avaliando o nível de ploidia em beterraba, afirmaram ser um critério confiável para identificação de poliplóides. Os autores consideraram ainda, que o diâmetro do pólen é mais satisfatório que o diâmetro polar dos estômatos, pois o diâmetro do pólen indicaria ainda o tipo de progênie a ser produzida por uma planta. Kloem e Speckmann (1954), analisando o nível de ploidia em beterraba, abandonaram o uso das análises dos estômatos e pólen devido a impossibilidade de distinção entre triploide e tetraploides com base nas medidas e na dificuldade de se obter pólen equivalente de várias plantas.

Medina et.al.,(1972); Orjeda, Freyre e Iwanaga, (1990); Bamberg e Hanneman (1991) ao contrário, tem recomendado esse método de seleção para identificar diferenças em

níveis de ploidia, quando se deseja a determinação de genótipos duvidosos em populações numerosas, por ser um método rápido.

4.3 Análise morfológica

O resumo das análises de variância para as características morfológicas está apresentado no Quadro 7. Com exceção do comprimento da pétala, todos os demais caracteres apresentaram significância para os níveis de ploidia, indicando possibilidade na discriminação dos clones diplóides, triplóides e tetraplóides com base nestes caracteres morfológicos. Contudo diferenças significativas foram observadas também entre os clones com mesma ploidia, principalmente entre os tetraplóides, presentes em maior número. Para a maioria dos caracteres a variação entre os clones tetraplóides foi muito ampla, envolvendo as médias das demais ploidias e impossibilitando sua identificação precisa. Porém, para a largura do primeiro e segundo pares de folíolos e para o diâmetro da antera, não houve variação entre clones de mesma ploidia (Quadro 7). Os clones diplóides apresentaram folíolos mais estreitos que os clones das outras ploidias (Quadro 8) podendo ser facilmente discriminado. No entanto, as diferenças entre clones triplóides e tetraplóides não foram significativas, indicando que a largura dos folíolos não é um critério confiável para identificá-los (Quadro 7), embora houvesse uma tendência dos clones triplóides apresentarem folíolo de largura intermediária entre tetraplóide e diplóides. Narayanaswamy e Chandy (1971) e Santos e Handro (1982), a partir de análises com os mesmos caracteres morfológicos em *Datura* e *Petúnia*, demonstraram que as características florais tiveram melhor capacidade discriminatória do que os folíolos. Pehu et al., (1987), a partir das mesmas análises com pétalas de batata derivada de cultura de antera, concluíram que características como comprimento da antera, número de cloroplastídeos por célula estomáticas, e largura do folíolo e da corola, foram mais efetivos para diferenciar os níveis de ploidia. Concílio (1992),

caracterizando progênie haplóide de batata, extraída de uma população tetraplóide, também utilizou as mesmas características e através de análise discriminante concluiu que, o número de cloroplastídeos por célula estomática e a largura da antera foram as principais variáveis discriminantes. Esses caracteres taxonômicos são alguns dos mais frequentemente usados para classificar diferentes espécies e plantas por morfologia e tipo ou ploidia.

QUADRO 7 - Resumo das análises de variâncias para as características morfológicas. UFLA, 1995.

F.V.	G.L.	Q. M.									
		Pétala		Antera		1° par Folíolos		2° par Folíolos		Folíolo terminal	
		Comp.	Larg.	Comp.	Diam.	Comp.	Larg.	Comp.	Larg.	Comp.	Larg.
Clones	(59)	7,09**	7,27**	0,44**	0,07**	396,30**	166,53**	514,65**	173,11**	582,21**	209,45**
Ploidia	2	5,70**	54,34**	1,98**	0,67**	4007,20**	3544,06**	4523,74**	3412,75**	3396,88**	3480,96**
Entre tetra	52	6,87**	5,63**	0,38**	0,05	261,69**	45,98	358,88**	59,00	470,63**	92,03**
Entre tri	1	5,10	3,89	0,17	0,12	199,52	0,37	634,48	16,66	35,04	152,00
Entre di	4	11,04	5,78	0,57	0,06	389,80	86,54	505,14	75,78	762,24	114,55
Erro	117	2,62	2,70	0,20	0,04	107,36	38,70	197,77	50,85	171,31	46,21
C.V. (%)		7,65	9,17	6,13	8,43	12,57	14,82	16,39	14,82	12,71	12,13

** F, significativo a 1% de probabilidade.

QUADRO 8 - Médias (mm) das características morfológicas entre as plantas diplóides, triplóides e tetraplóides. UFLA, 1995.

Ploidia	Variáveis									
	Pétala		Antera		1° par Foliolos		2° par Foliolos		Folíolo terminal	
	Comp.	Larg.	Comp.	Diam.	Comp.	Larg.	Comp.	Larg.	Comp.	Larg.
Tetraplóide	21,20 a	18,16 a	7,26 a	2,30 a	84,60 a	49,52 a	88,18 a	50,19 a	105,02 a	58,08 a
Triplóide	21,90 a	17,75 a	7,17 a	2,33 a	79,57 ab	43,18 a	81,02 a	43,97 a	99,12 a	52,60 a
Diplóide	20,44 a	15,35 a	6,73 a	1,99 a	60,49 b	26,96 b	62,69 a	28,05 b	82,91 a	35,60 b

Médias seguidas por letras distintas, diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

5. CONCLUSÕES

A análise citogenética é o único método seguro para caracterizar e agrupar clones de diferentes ploidias.

Na análise citoanatômica todos os caracteres permitiram distinguir os clones diplóides das demais ploidias, porém não distinguem os triplóides dos tetraplóides.

Entre as análises citoanatômicas a mais eficiente e rápida foi a contagem de estômatos por unidade de área na face adaxial da epiderme.

Dos métodos morfológicos a largura do primeiro e segundo pares de folíolo auxilia na caracterização dos clones diplóides, porém, não diferencia triplóides dos tetraplóides.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBEG, F.A. Evolution of polyploid strains derived from curly-top resistant and leafspot-resistant sugar beet varieties. **Proceedings American Society Sugar Beet Technologist**, Detroit, p.470-476, 1942.
- ANASO, H.U. Comparative cytological study of *Solanum aethiopicum* Gilo group, *Solanum aethiopicum* Shum group and *Solanum anquiui*. **Euphytica**, Wageningen, v.53, p.81-85, 1991.
- BAMBERG, J.B.; HANNEMAN, Jr, R.E. Rapid ploidy screening of tuberbearing solanum (potato) species through pollen diameter measurement. **American Potato Journal**, Orono, v.68, p.279-285, 1991.
- BINGHAN, E.T. Stomatal chloroplast in Alfafa at four ploidy levels. **Crop Science**, Madison, v.8, p.509-510, 1968.
- BROWN, C.R. Origin and history of the potato. **American Potato Journal**, Orono, v.70, p.362-373, 1993.
- BRUSH, S.B. Potato taxonomies in Andean agriculture. In: BRORENSHA, D.W.; WARREN, D.M.; WERNER, O. (eds.). **Indigenous Knowledge systems and development**. New York: University Press of America, 1980.
- BUTTERFASS, T.H. Ploidie and chloroplastenzahlen. **Bericht der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, Berlin, v.72, p.440-451, 1959.
- CAIN, S.A.; POTZGER, J.E. A comparison of leaf tissues of *Gaylussacia baccata* grown under different conditions. **American Midland Naturalist**, Notre Dame, v.24, p.444-462, 1940.

- CALIGARI, P.D.S.; POWELL, W.; LIDDELL, K.; MAINE, M.J.; SWAN, G.D.L. Methods and strategies for detecting *S. tuberosum* L. dihaploids in interspecific crosses. With *S. phureja*. *American Applied Biology*, v.112, p.323-328, 1988.
- CARL, L.W.; LOOMIS, W.E. *Botánica*. Mexico, 1968. 684p.
- CHASE, S.S. Analytic breeding of amphipolyploid plant varieties. *Crop Science*, Madison, v.4, p.334-337, 1964.
- CHASE, S.S. Analytic breeding in *S. tuberosum* L. A scheme utilizing parthenotes and other diploid stock. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, Ontario, v.5, p.359-363, 1963.
- CHIEN-AN LIU; DOUCHES, D.S. Production of haploids of potato (*S. tuberosum* subsp. *tuberosum*) and their identification with electrophoretic analysis. *Euphytica*, Wageningen, v.70, p.113-126, 1993.
- CHRISTIANSEN, J. El cultivo de la papa en el Peru. Peur. Talleres de Artes Graficas de Editorial Juridica Lima, 1967. 351p.
- CLEMENT, W.M.; LEHMAN, W.F. Fertility and cytological studies of a dihaploid plant of alfafa, *Medigo sativa* L. *Crop Science*, Madison, v.6, n.2, p.451-453, 1962.
- CLULOW, S.A.; WILKINSON, M.J.; BURCH, L.R. *S. phureja* genes are expressed in the leaves and tubers of aneusomatic potato dihaploids. *Euphytica*, Wageningen, v.69, p.01-06, 1991.
- COLEN, D.F.; DOBRENZ, A.K. Stomate density of alfafa (*Medigo sativa* L.). *Crop Science*, Madison, v.8, p.509-510, 1970.
- CONCILIO, L. Morphological variability of potato haploids ($2n = 2x = 24$) extracted from a broadly genetic based tetraploid population. *Journal of Genetics & breeding*, Roma, v.46, p.35-40, 1992.
- CONCILIO, L.; PELOQUIN, S.J. Evaluation of the 4X x 2X breeding scheme in a potato breeding program adapeted to local conditions. *Journal Genetics & Breeding*, Roma, v.45, p.13-18, 1991.
- COOPER, C.S.; QUALLS, M. Morphology and chlorophyll content of shade and sun leaves of two legumes. *Crop Science*, Madison, v.7, p.672-673, 1968.

- COSTA, D.M. **Experiência de melhoramento e de tubérculos - sementes, com batata (*S. tuberosum* L.) no Brasil e possibilidade de intercâmbio com o Uruguai.** Uruguai, 1988. n.p. (Conferência apresentada em Montividéo - Uruguai).
- COSTA, D.M.; CASTRO, L.A.S.; PETERS, J.A. **Batata: a busca de maior produtividade.** Hortisul. Pelotas, v.1, n.0, p.40-42, 1989.
- CUNHA, A.L. **Caracterização agronômica e produção de pólen 2n de híbridos de hihaplóides de *S. tuberosum* L. x *S. chacoense* Bitt.** Lavras: ESAL, 1992. 83p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- DARMO, E.; PELOQUIN, S.J. **Use of 2x tuberosum haploid-wild species hybrids to improve yield and quality in 4x cultivated potato.** Euphytica, Wageningen, v.53, p.01-09, 1991.
- DESBOROUGH, S.; PELOQUIN, S.J. **Potato variety identification by use of electrophoretic patterns of tuber proteins and enzymes.** American Potato Journal, Orono, v.45, p.220-229, 1968.
- DUDLEY, J.W. **Number of chloroplast in the guard cells of inbred lines of tetraploid and diploid sugar beets.** Agronomy Journal, Madison, v.50, p.169-170, 1958.
- EIGSTI, O.J.; DUSTIN, P.J. **Colchicine: in agriculcure, mediane, biology and chemistry.** Duburgue The Iowa State College Press, 1955.
- ESAU, K. **Anatomia vegetal.** 2.ed. Barcelona: Omega, 1972. 779p.
- ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes.** São Paulo: Edgard Blücher, 1974, 294p.
- FASSULIOTIS, G. **Tetraploids plants regenerated from callus of *Solanun sisymbriifolium*.** (Abstrat) In vitro, Gaithersburg, v.13, p.146-147, 1977.
- FURUMOTO, O.; SOUZA, E.L.S.; FEDALTO, A.A.; CIUDAD, F.P. **Melhoramento genético da batata (*S. tuberosum* subesp. tuberosum).** In: CURSO DE MELHORAMENTO DE HORTALIÇAS, Brasília: EMBRAPA - CNPH, 1983. 31p.
- GEOK-YOUNG TAN; DUNN, G.M. **Relationship of stomatal length and frequendy and pollen-grain diameter to ploidy level in *Bromus inermis* Leyss.** Crop Science, Madison, v.13, p. 332-334, 1973.
- GILL, N.T.; VEAR, K.C. **Botânica agrícola.** 2.ed. Zaragoza: Acribia, 1965. 347p.

- GOODRICH, C.E. The origination and test culture of seedling potatoes. *Trans NYS Agric. Soc* v.23, p.89-134, 1863.
- GOTTSCHALK, W. The origin of the potato an open problem. *The Nucleus*, Boston, v.27, n.1/2, p.37-44, 1984.
- HANNEMAN, R.E.; PELOQUIN, S.J. Ploidy levels of progeny from diploid - tetraploid cross in potato. *American Potato Journal*, Orono, v.45, p.254-261, 1968.
- HAWKES, J.G. History of the potato. In: HARRIS, P.M. *The potato crop: the scientific basis of improvement*. London: Chapman and Hall, 1978. p.01-14.
- HELL, K.G. Morphological characterization of *Nicotiana tabacum* L. plants regenerated from tissue cultures. *Boletín de Botánica*, São Paulo, v.7, p.1-4, 1979.
- HERMSEN, J.G.TH. Crossability, fertility and cytogenetic studies in *S. acoule* X *S. bulbocastanum*. *Euphytica*, Wageningwn, v.15, p.149-155, 1966
- HERMSEN, J.G.TH.; BOER, A.J.E. The efect of colchicine treatment on *S. acoule* e *S. bulbocastanum*; a complete analysis of ploidy chimeras in *S. bulbocastanum*. *Euphytica*, Wageningem, v.20, p.171-180, 1971.
- HOUGAS, R.W.; PELOQUIN, S.J. The potential of potato haploids in breeding and genetic research. *American Potato Journal*, Orono, V.35, N.10, P.701-707, 1958.
- HOUGHLAND, G.V.C.; AKELEY, R.V.; DYKSTRA, T.P.; SHANDS, W.A. "Potato production, in the Northeastern and Nort Central States". U.S. Departament of Agriculture, 1958. (Farmers Bulletin).
- IWANAGA, M.; ORTIZ, R. Comparison of the parental value of F.D.R. 2x and of 4x progenitors in two lacations. *American Potato Journal*, Omo, v.65 p.491, 1988. (abstract).
- IWANAGA, M.; PELOQUIN, S.J. Origin and evolution of cultivated tetraploid potatoes via 2n gametes. *Theoretical and Applied Genetics*, Vienna, v.61, p.161-169, 1982.
- IWANAGA, M.; SCHMIEDICHE. *Uso de espécies silvestres para mejorar los cultivares de papa*. Lima: CIP, 1989. p.1-7. (Circular, 17).

- JACKSON, M.T.; HAWKES, J.G.; ROWE, P.R. An ethnobotanical field study of primitive potato varieties in Peru. *Euphytica*, Wageningen, v.29, p.107-113, 1980.
- JOLY, A.B. **Botânica: introdução a taxonomia vegetal**. 7ed. São Paulo, Companhia Editora Nacional, 1985. 777p.
- KAMERAZ, A. Ya.; ZHITLOVA, N.A.; IWANOVA, V.N. Use of the wild diploid species of the potato *S. chacoense* Bitt. in interspecific hybridization. In: Systematics, breeding New Delhi: United States Department of Agriculture, 1985. p.139.
- KARP, A.; NELSON, R.S.; THOMAS, E.; BRIGHT, S.W.J. Chromosome variation in protoplast derived potato plants. *Theoretical and Applied Genetics*, Vienna, v.63, p.265-272, 1982.
- KERBAUY, G.B. **Aspectos citológicos e fisiológicos de tecidos e calos de *Nicotina tabacum* L. cv. Wisconsin 38**. São Paulo: USP, 1981. 152p. (Tese Doutorado em Botânica).
- KLOEN, D.; SPECKMANN, G.J. The creation of tetraploid beets II Selection in the first generation (the C₁) from the treated material. *Euphytica*, Wageningen, v.3, p.35-42, 1954.
- KOOPMANS, A.; Van Der Burg, A.H. Chromosome number and chromosome behavior of F₁ and F₂ plants of cross *Solanum phureja* X *Solanum tuberosum*. *Genética*, Groningen, v.26, p.102-116, 1952.
- LANGE; WAGENVOOET, M. Meiosis in triploid *S. tuberosum*. *Euphytica*, Wageningen, v.22, n.1, p.8-18, 1973.
- LAUFER, B. **The American plant migration Part I: The potato**. Chicago: Kraus Reprint Company, 1968. v.28, 132p.
- LEUE, E.F.; PELOQUIN, S.J. Selection for 2n gametes and tuberization in *S. chacoense*. *American Potato Journal*, Orono, v.57, p.189-195, 1980.
- LLERAS, E.; MEDRI, M.E. Composição anatômica entre folhas diplóides e poliplóides do híbrido *Hevea brasiliensis* X *benfhamiana* (IAN717). *Acta Amazonica*, Manaus, v.3, n.4, p.565-575, 1978.
- LUNDEN, A.P. Some more evidence of autotetraploid inheritance in the potato (*S. tuberosum* L.), *Euphytica*, Wageningen, v.9, n.2, p.225-234, 1960.

- MARIS, B. Comparison of diploid and tetraploid potato families derived from *S. phureja* X dihaploid *S. tuberosum* L. hybrids and their vegetatively doubled counterparts. *Euphytica*, Wageningen, v.46, p.15-33, 1990.
- MEDINA, D.M.; CRUZ, N.D.; LONGO, C.R.L.; CONAGIN, C.H.T.M.; AZZINI, L.E. Poliploidização em berinjela (*S. melongena* L.). II Observações em plantas resultantes de tratamentos com colquicina. *Bragantia*, Campinas, v.31, n.24, p.289-303, 1972.
- MEDINA, D.M.; PRADO, O.T.; MENDES, A.J.T.; ROESSING, C. A poliploidia artificial na obtenção de melancia sem sementes. *Bragantia*, Campinas, v.17, n.5, p.81-100, 1958.
- MENDIBURU, A.O.; PELOQUIN, S.J. Sexual poluploidization and deploidization: some terminology and definitions. *Theoretical Applied Genetics*, Vienna, v.48, p.137-143, 1976.
- MOCHIZUKI, A.; SUEOKA, N. Genetic studies on the number of platid in stomata I. Effects of autopolyploidy in sugar beets. *Cytologia*, Kyoto, v.20, p.358-366, 1955.
- MOK, D.W.S.; LEE, H.K.; PELOQUIN, S.J. Identification of potato cromosomes with Giemsa. *Americam Potato Journal*, Orono, v.51, p.337-341, 1974.
- MOK, D.W.S.; PELOQUIN, S.J. Three mechanisms of 2n pollen formation in diploid potatoes. *American Potato Journal*, Orono, v.49, n.9, p.362, 1972.
- MORAIS, O.M, Seleção de clones híbridos de dihaplóides de *Solanum tuberosum* L. X *Solanum chacoense* Bitt., para produção, peso específico dos tuberculos e alta freqüência de pólen 2n. Lavras: ESAL, 1994. 70p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de plantas).
- NAJCEUSKA, C.M.; SPECKMANN, G.J. Numbers of chloroplasts and pollen grain pores in diploid and tetraploid varieties of some trifolium species. *Euphytica*, Wageningen, v.17, p.357-362, 1968.
- NARAYANASWAMY, S.; CHANDY, L.P. In vitro induction of haploid, diploid and triploid androgenie embryoids and plantlets in *Datura metel* L. *Annals of Botany*, London, v.35, p.565-542, 1971.
- NITSCH, J.P. Experimetal androgenesis in *Nicotiana*. *Phytomorphology*, Delhi, v.19, p.389-404, 1969.

- NÜESCH, B. The identificatin of tetraploids in red clover by the number of chloroplasts in the stomata. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 10, 1966. *Proceedins...* : ,1966. p.661-663.
- ORJEDA, G. FREYRE, R.; IWANAGA, M. Production of 2n pollen in diploid *Ipomoea trifida* wild ancestor of sweet potato. *Journal of Heredity*, Baltimore, v.81, n.6, p.462-467, 1990.
- ORMROD, D.J.; RENNEY, A.J. A survey of weed leaf stomata and trichomes. *Canadian Journal of Plant Science*, Ottawa, v.48, p.197-209, 1968.
- ORTIZ, R.; IWANAGA, M.; PELOQUIN, S.J. Beeding potatoes for developing countries using wild tuber bearing *solanum* spp. and ploidy manipulations, *Journal of Genetics & breeding*, Roma, v.48, p.89-98, 1994.
- ORTIZ, R. PELOQUIN, S.J. Population improvement in the development of 2x parents in potato using exotic germoplasm. *Journal of Genetics & Breeding*, Roma, v.47, p.81-83, 1993.
- PEHU, E.; VEILLEUX, R.; HILU, K.W. Cluster analysis of anther-derived plants of *S. phyreja* (Solanaceae) based on morphological characteristics. *American Journal of Botany*, Columbus, v.74, n.1, p.47-52, 1987.
- PELOQUIN, S.J. New aproaches to breeding for the potato for the year 2000. In: HOOKER, W.J., ed. *Research for the Potato in the year 2000*. Lima: CIP, 1983. p.32-34.
- PEUFOUND, W.T. Plant anatomy as conditioned by light intensity and soil moisture. *American Journal Botany*, Virginia, v.18, p.558-572, 1931.
- PLAISTED, J.; FEHÉR, A.; VEISZ, O.; SUTKA, J.; DUDITS, D. Characterization of morphological variation and cold resistance in interspecific somatic hybrids between potato (*S. tuberosum* L.) and (*S. brevidens* Phil). *Euphytica*, Wageningen, v.57, p.37-49, 1989.
- PREISZNER, J.; FEHER, A.; VEISZ, O.; SUTKA, J.; D. DUDITS. Characterization of morphological variation and cold resistance in interspecific somatic hybrids between potato *S. tuberosum* L. and *S. brevidens* Phil. *Euphytica*, Wagenigwn, v.57, p.37-49, 1991.
- QUINN, A.A.; MOK, D.W.S.; PELOQUIN, S.J. Distribution and significance of diplandroids among the diploid Solanuns. *American Potato Journal*, Orono, v.51, p.16-21, 1974.

- ROSEN, G. Von. Problems and methods in the production of tetraploids within the genus *Beta*. *Sockerfabriks Aktiebologets Skeifter*, v.5, p.199-217, 1949. In **PLANT BREEDING ABSTRACTS**, Farnham Royal, v.20, n.2, 1950.
- ROSS, H. *Potato breeding problems and perspectives*. Berlin: Verlag Paul Parrey, 1986. 132p.
- SALAMAN, R.N. *The history and the social influence of the potato*. Cambridge: University Press, 1985. 685p.
- SANTOS, R.F.; HANDRO, W. Morphological patterns in *Petunia hybrida* plants regenerated from tissue cultures and differing by their ploidy. *Theoretical and Applied Genetics*, Vienna, v.63, p.265-272, 1982.
- SAVITSKY, H. Polyploid sugar beets. Cytological study and methods of production. *Proceedings of the American Society Sugar Beet Technologist*, Detroit, p.470-476, 1952.
- SHEARMAN, R.C.; BEARD, J.B. Stomatal density and distribution in *Agrostis* as influenced by species, cultivar and leaf blade surface and position. *Crop. Science*, Madison, v.12, p.822-823, 1972.
- SIMMONDS, N.W. Potatoes. In: _____ *Evolution of crop plants*. London, Longman, 1979. p.279-283. 1979
- SING, A.K.; SALMINI, F.; UHEIG, H. Chromosome pairing in 14 F₁ hybrids among 11 diploid potato species. *Journal of Genetics & breeding*, Roma, v.43, p.01-05, 1989.
- SMITH, O. Potato production. *Advances in Agronomy*, New York, v.1, p.142-157, . . 1949.
- SPECKMANN, G.J.; DIJKSTRA, H.; TEN KATE, B.A. An efficient method to separate tetraploid from diploid plants after colchicine treatment of turnips (*Brassica campestris* var. rapa). *Euphytica*, Wageningen, v.16, p.313-318, 1967.
- SPECKMANN, G.J.; POST, J.Jr.; DIJKSTRA, H. The length of stomata as an indicator for polyploid in rye-grasses. *Euphytica*, Wageningen, v.14, p.225-230, 1965.
- SREE RAMULU, K.S.; DEVREUX, M.; ANCORA, G.; LANERI, V. Chimerism in *Lycopersicum peruvianum* plants regenerated from in vitro cultures of anthers and stem internodes. *Zeitschrift. Pflanzenzüchtung*, Berlin, v.76, p.299-319, 1976.

- 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, 1970.
- YERK, G.L.; PELOQUIN, S.J. Comparison of 2n and non-2n pollen producing haploid X wild species hybrids in potato. *Journal of Heredity*, Baltimore, v.80, p.468-471, 1989.
- WAARA, S. **Production and characterization of intraespecific somatic hybrids of potato (*S. tuberosum* L.)**. Uppsala: Uppsala University, 1991. 44p. (PhD Thesis).
- ZIMMERER, K.S. The regional biogeography of native potato cultivars in highland Peru. *Journal of Biogeography*. Oxford, v.18, p.165-178, 1991.

RESUMO

VILA, Vilma Barretto, **Verificação de hibridação em descendentes do cruzamento *Solanum tuberosum* L. X [*Solanum tuberosum* L. X *Solanum chacoense* Bitt.]** Lavras, UFLA, 1995. 76p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)*

Os padrões de esterase e proteína total em tubérculos de batata foram analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida, com o objetivo de identificar a ocorrência de hibridação em 41 clones de batata, oriundos do cruzamento entre cultivares comerciais tetraploides ($2n = 4x = 48$) 'Aracy' e 'Br 63.65' usados como progenitores femininos e híbridos selvagens dihaplóides ($2n = 2x = 24$) como progenitores masculinos 26.5 e 23. As análises foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo em Sete Lagoas MG, 1995. Não foram realizadas análises eletroforéticas na progênie do cruzamento 'Br 63.65' X 23, devido à falta de amostra do progenitor masculino. Do cruzamento entre 'Aracy' X 26.5 foi possível identificar através da análise com isoenzimas esterase em 12 descendentes a presença de apenas uma banda, oito apresentaram duas bandas e cinco três bandas. Descendentes do cruzamento entre 'Br 63.65' X 26.5, seis indivíduos apresentaram uma banda, sete com duas bandas e três com três bandas. De acordo com a hipótese genética a interpretação dos géis indicam que há uma região de atividade (ou locus) o loco Est-1 que possui três alelos (a, b, c) e uma enzima ao manifestar padrão de duas ou três bandas para o híbrido heterozigoto, comporta-

* Orientadora: Lisete Chamma Davide. Membros da banca: Maria das Graças G. C. Vieira, Manuel Losada Gavilanes

se como dimérica e os híbridos que apresentaram apenas uma banda constituem os homozigotos indicando portanto a ocorrência de hibridação. As análises com proteína total neste trabalho proporcionaram melhor identificação dos híbridos devido ao grande número de bandas intermediárias apresentada nos descendentes, sugerindo que padrões protéicos podem ser específicos de cada indivíduo.

SUMMARY

VERIFICATION OF HYBRIDIZATION IN DESCENTS OF THE CROSS *Solanum tuberosum* L. x [*Solanum tuberosum* L. x *Solanum chacoense* Bitt] LAVRAS, UFLA, 1995. 76p.

The patterns of both esterase and total protein in potato tubers were analysed through polyacrilamide gel electrophoreses with the purpose of identifying the occurrence of hybridization in 41 potato clones, coming from the cross between commercial tetraploids cultivars ($2n = 4x = 48$) 'Aracy' and 'Br 63.65' and used as female parents wild dihaploid hybrids ($2n = 2x = 24$) as male parents 26.5 and 23. In the offspring of the cross 'Br 63.65' X 23 were not undertaken electrophoretical analyses owing to the lack of samples from the male parent. From the cross between 'Aracy' X 26.5 it was possible to identify through the analysis with isoenzyme esterase in 12 descents the presence of only a band, eight showed two bands and five three bands. Descents from the cross between 'Br 63.65' X 26.5, six individuals showed one band, seven with two bands and three with three bands. According to the genetical hypothesis, the interpretation of the gels points out that there is an activity region (or loci), the locus Est-1 that possesses three alleles (a, b, c) and an enzyme on displaying pattern of two or three bands for the heterozygous hybrid, it behaves itself as a dimeric and hybrids showing only one band make up the homozygous denoting,

therefore, occurrence of hybridization. The analyses with total protein in this work furnished best identification of hybrids owing to the great number of intermediate bands shown in the descents, suggesting that protein patterns can be specific to each individual.

**VERIFICAÇÃO DE HIBRIDAÇÃO EM DESCENDENTES DO CRUZAMENTO DE *S. tuberosum*
L. [*S. tuberosum* L. *S. chacoense* BIH].**

INTRODUÇÃO

Na procura por aumento de produtividade e resistência à doenças melhoristas de plantas têm obtido resultados relevantes com diversas culturas, explorando recursos biotecnológicos e cruzamento interespecífico. Para a escolha de genótipos excepcionais, tem sido dada ênfase às técnicas eletroforéticas de DNA, isoenzima e proteína total, o que significa maior oportunidade de êxito na escolha de parentais com características agronômicas desejáveis em programas de melhoramento (Cruz e Regazzi, 1994).

Entre os métodos bioquímicos, a eletroforese de proteínas e isoenzimas tem sido bastante utilizada, pois a variação do padrão de bandas proteicas reveladas pode ser diretamente associada à variação nos genes que codificam as enzimas, (Gottlieb, 1987). Uma vez que a análise dos padrões de bandas tem demonstrado segregação mendeliana simples, permite relacionar o fenótipo diretamente ao genótipo (Scandalios, 1969; Brewer e Sing, 1970 ; Pasteur, Pasteur, Bonhome et al., 1988).

Pesquisadores tem utilizado técnica eletroforética de proteínas em conjunto com isoenzima, para identificação de cultivar e para detectar diferenças entre espécies e em investigações sobre o reacionamento genético entre um híbrido e as espécies parentais,

(Swartz, 1960, Johnson e Hall, 1965a; Desborough e Peloquin, 1966; Chu, 1967; Thurman et al. 1967; West e Garber 1967 a; Hart e Bhatia 1967; Desborough e Peloquin 1968; Desborough e Peloquin, 1969; Scandalios, 1969; Marsall e Allard, 1969; Smith, Hamill, Weaver et al. , 1970; Sheen, 1970; Conklin e Smith, 1971; Werner e Sink, 1977; Martinez - Zapater e Oliver, 1984; Quiros e McHale, 1985; Douches e Quiros, 1987; Douches e Ludlam, 1991; Groza e Kahn, 1991; Racusen e Racusen, 1991; Preiszmer, Fehére, Veisz et al. , 1991; Hannapel, 1991; Bennett et al, 1991; Weghe, 1991; Viertz, 1992; Quillet, Vear e Branlard, 1992; Spooner, Douches e Contreras, 1992; Augustin e Costa, 1992; Ortiz et al, 1993; Chien-An e Douches, 1993; Clulow, Wilkinson e Burch, 1993; Alves et. al., 1994; Junior et al., 1994).

Em batata o problema básico está relacionado com as principais características geneticamente estudadas, até agora é a falta de equivalência entre fenótipo e genótipo devido as complicações introduzidas pela variação de herdabilidade, dominância, epistasia e pleiotropia. O estudo de isoenzimas evita todos esse problemas, permitindo as análises de segregações complexas que podem ser esperadas no poliplóide (Martinez - Zapater e Oliver, 1985).

As análises eletroforéticas de várias enzimas em grupos de batatas, cultivadas diplóide e tetraplóide, e em muitas espécies selvagens tem sido realizadas com sucesso (Martinez - Zapater e Oliver 1984, citado por Martinez - Zapater e Oliver, 1985).

O objetivo desse trabalho foi verificar a ocorrência de hibridação entre clones de batata oriundas do esquema de melhoramento $4x \times 2x$, através de caracteres proteicos e isoenzimáticos, para a identificação de associações híbridas promissoras à obtenção de segregantes superiores.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Eletroforese

Eletroforese é o movimento de partículas eletricamente carregadas em uma solução de um campo elétrico. Smithies (1955), iniciou o uso de gel de amido na eletroforese de isoenzimas. Os poros da matriz do gel são, aproximadamente, da mesma ordem de magnitude que as moléculas da proteínas, o que provoca efeitos de fricção e peneiramento molecular, fornecendo fracionamento da amostra protéica, sem interferir na mobilidade das moléculas (Sargent e George, 1975, citados por Alfenas et al., 1991).

A eletroforese de isoenzimas começou a ser utilizada como marcadores bioquímicos a partir de 1957, quando Hunte e Moller desenvolveram técnicas usando as propriedades catalíticas das enzimas para revelar sua presença como métodos histoquímicos. O termo isoenzimas foi introduzido em 1959, por Markert e Moller, para descrever as bandas surgidas após coloração histoquímica, constituídas de forma moleculares múltiplas de uma mesma enzima que ocorrem em um mesmo organismo, com afinidade para um mesmo substrato (Pasteur et al., 1988).

Separação eletroforética de proteínas e isoenzimas tem sido uma técnica valiosa e amplamente usada em estudos quimiotaxonômicos, relacionamentos entre espécies, verificação de híbridos e híbridos interespecíficos visando confirmar hibridações dirigidas. Para tanto faz-se as comparações dos padrões isoenzimáticos dos progenitores e de seus

descendentes, onde as bandas isoenzimáticas dos híbridos são referidas como resumo das bandas derivadas dos progenitores, algumas das quais estão ausentes, em adição ao aparecimento de outras novas bandas (Brewer e Sing, 1970; Pasteur et al., 1988).

Os genes que codificam para isoenzimas existem na forma de um ou mais alelos e geralmente possuem interação intralélica do tipo codominante, isto é, ambos alelos se expressam no indivíduo heterozigoto. Entretanto, nem todos os alelos codificam para produtos detectáveis no gel, sendo denominado de alelos nulos (Scandalios, 1969; Peirce e Brewbaker, 1973 e Pasteur et al., 1988).

2.2. Características isoenzimáticas em plantas

Scandalios (1966), foi o primeiro a relatar estudos genéticos da isoenzima amilase em plantas com linhas endogâmicas de *Zea mays*. Usando extrato de "seedlings" de várias linhas endogâmicas de milho com eletroforese em gel de amido, encontrou variantes eletroforéticas múltiplas para a amilase.

Em espécies do gênero *Nicotiana*, padrões eletroforéticos foram analisados em 17 anfidiplóides sintetizados e seus padrões de bandas esterase e peroxidase foram comparados com as de suas espécies parentais. Em torno de 75% das bandas anfidiplóides mostraram a mesma mobilidade em um ou em ambos pais, enquanto que 25% foram novas bandas (possivelmente híbridos). O número de bandas dos anfidiplóides que equivaleu aos da soma das posições das bandas nos pais diplóides foi maior do que poderiam ser, provavelmente devido ao acaso. Concluiu-se que esse método de determinação de bandas é uma medida de similaridade e pode ser usado para testar a suposta ascendência dessas espécies, uma vez que a correspondência do número de bandas de isoenzimas está correlacionada com a composição genética em anfidiplóides sintéticos conhecidos (Smith et al 1970).

Desborough e Peloquin (1967), formularam duas hipóteses para o padrão isoenzimático de esterase em caracterização de híbridos de *S. tuberosum*. A primeira é bioquímica, e admite que a enzima ativa é tetrâmera composta de um, dois ou três tipos de monômeros combinações de dímeros, tetrâmeros ou octâmeros não resultando em número adequado de bandas. Assim, no mínimo três tipos de monômeros são requeridos para dar 15 bandas distintas. Este resultado não assume que as bandas estreitas têm frequência igual às bandas largas ou que possam ser precisamente classificadas. Parece que a diferença em uma unidade na taxa de mobilidade relativa permite a separação de nove bandas principais. As bandas duplas e triplas diferem em menor grau, isto é, surgindo de uma composição de tetrâmeros com somente dois monômeros diferentes tais como ACCC e BBCC onde ambos possuem mobilidade relativa de 10. A segunda hipótese é genética, e sugere que um alelo E^a controla a produção do monômero A, E^b controla o monômero B e E^c controla o monômero C, onde a mobilidade relativa de A é de um, de B é dois e de C é três, os três alelos podem estar em locos independentes. Existem evidências que bandas não presentes em um parental tetraplóide também não são encontradas em seus haplóides e que as bandas encontradas em híbridos são semelhantes àquelas encontradas em qualquer um dos parentais.

Essa mesma metodologia foi utilizada para caracterização de 12 cultivares de batata, onde se obteve maior nitidez de bandas e repetibilidade dos padrões de isoenzimas nos sistemas de peroxidase em folhas, esterase em tubérculos e folhas e fosfatase ácida em tubérculos. Os resultados indicaram que as cultivares puderam ser diferenciadas (Augustin e Costa, 1992)

A análise isoenzimática em batata tem sido amplamente usada como marcadores de expressão codominante. Oliver e Martinez - Zapater, (1985); Douches e Lundlam, (1991), tem utilizado essa metodologia na identificação de cultivares; Waara et al., (1989), em híbridos somáticos derivados de cultura de antera em clones haplóides de batata; Martinez-Zapater e Oliver, (1985); Spooner et.al., (1992), analisaram o modo de formação de

óvulo 2n; Douches e Quiros, (1988 c); tem se valido dessa mesma técnica para investigar recombinações e ligações genéticas (Douches e Quiros, 1987, 1988a, 1988b).

A identificação de cultivares de girassol dependia de características morfológicas e fisiológicas, o que dificultava a análise porque esses caracteres tem determinação poligênica e sofrem influências do meio ambiente. Para minimizar ou superar essas dificuldades, tem sido dada ênfase ao uso de eletroforese com isoenzimas (Quillet, Vear e Branlard, 1992).

Essas análises tem sido amplamente difundidas por melhoristas nas mais variadas espécies de plantas e nos mais diferentes objetivos, como para identificar genótipos de trigo Fedak, (1974); Autran e Bourdet, (1975); de milho, Cardy e Kannenberg, (1982); de cevada, Nielsen e Johansen, (1986) de feijão Koenig e Gepts, (1989), de fungos e essências florestais, Alfenas et al., 1991.

2.3 Caracterização de proteína total em plantas.

Análise eletroforética de proteína em gel de poliácridamida, proporciona capacidade de identificar diferenças químicas quantitativas e qualitativas entre cultivares, tendo sido utilizada com sucesso para análises em várias espécies de plantas Righetti e Bosisio (1981); Cooke (1984); Gupta e Robbelen (1986); Gardiner e Forde (1988); Gilliland (1989). É também uma técnica segura, rápida e exige uma pequena quantidade de amostra, e que vem sendo amplamente utilizada em diversos estudos, como caracterização e identificação de plantas (Desborough e Peloquin, 1966).

Gardiner e Forde (1987), analisaram através de eletroforese em gel SDS de poliácridamida, proteínas de sementes de diferentes espécies e cultivares de *Festuca*, *Lolium*, *Bromus* e *Dactylus*. Os padrões obtidos proporcionaram a separação das cultivares, apesar

de alguns cultivares de *Bromus* não apresentarem variação detectável após a revelação de proteínas dos géis. Os autores determinaram que a técnica utilizada possui grande potencial no reconhecimento de cultivares, certificação de sementes e manutenção do gemoplasma.

Segundo Hussain et al. (1988), oito cultivares de *Stylosanthes capitata*, foram identificadas pelos padrões de eletroforese de proteínas da semente como marcadores genéticos em gel de poliacrilamida. Alguns padrões foram muito semelhantes indicando alta similaridade de genótipos.

Utilizando eletroforese de proteínas, Möller e Spoor (1993) identificaram e separaram com sucesso cultivares de *Lolium*, através da proteína de sementes armazenadas com sucesso. De acordo com os autores, o único inconveniente foi o tempo necessário de corrida das proteínas no gel, que levou em torno de 5 a 8 horas.

Analisando proteínas de sementes de *Sida acuta*, *Sida rhombifolia*, *Sida spinosa* e *Sida cordifolia* em gel de poliacrilamida, Vieritz (1992) verificou que os padrões de proteínas de sementes desconhecidas puderam ser comparados com os padrões proteicos de sementes conhecidas em condições idênticas, para determinar a similaridade entre elas. Pôde ainda caracterizar subespécie de *Sida* com peso molecular das proteínas.

A respeito de afinidades filogenética em Triticale, Johnson e Hall (1965b) analisaram através de eletroforese de proteínas das espécies *Triticum monococcum* (AA), *T. dicoccum* (AABB) e *T. aestivum* (AABBDD) e confirmaram as evidências dos métodos convencionais que os genomas A e B são diferentes, que o genoma A (*T. dicoccum*) é parcialmente homólogo ao genoma *T. monococcum*, e que a afinidade entre *T. dicoccum* e *T. aestivum* envolve genomas A e B. Mostrou também que o genoma de *T. monococcum* tem mais afinidade com o de *T. aestivum* do que com o de *T. dicoccum*. Com os resultados obtidos os autores sugerem que a eletroforese de proteínas pode promover novos discernimentos dentro de alguns problemas relacionados à sistemática e evolução.

Resultados semelhantes foram obtidos por Desborough e Peloquin (1966 e 1968), analisando espécies de *Solanum* e híbridos interespecíficos, em que os autores concluíram que diferenças, especialmente nas bandas principais, sugerem que os padrões proteicos podem ser específicos de espécie. Em alguns casos, híbridos interespecíficos parecem ter um maior número de bandas do que as espécies parentais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material genético

Foram avaliados 41 dos 53 clones supostamente híbridos, obtidos do cruzamento entre *S. tuberosum* L. X (*S. tuberosum* L. X *S. chacoense* Bitt.). Da espécie *S. tuberosum* (4x) empregou-se o clone Br 63.65 originário dos Estados Unidos e a cultivar nacional 'Aracy' como representante do híbrido interespecífico (2x) (*S. tuberosum* L. X *S. chacoense*) utilizou-se os clones 26.5 e 23 obtidos por Cunha (1992), sendo que do cruzamento Br 63.65 x clone 26.5 obteve-se 15 descendentes; 'Aracy' x clone 26.5 obteve-se 23 descendentes. A progênie oriunda do cruzamento Br 63.65 x clone 23 não foi analisada, por falta de amostra do clone 23. Para efeitos comparativos foram incluídos 4 clones diplóides (números 47, 91, 115, 116), obtidos por Morais (1994) .

3.2 Análise eletroforética

As análises eletroforéticas foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo - CNPMS, em Sete Lagoas - MG. Empregou-se metodologia relatada por Scandalios (1969), modificado por Paiva et al (1982).

Os sistemas enzimáticos utilizados foram a esterase (EST) e fosfatase ácida (ACP).

Os tubérculos foram coletados de plantas provenientes da casa de vegetação e armazenados em câmara fria . Amostras foram feitas a partir de extratos obtidos de 1,0g de tubérculo pela maceração uniforme em 5,0 ml de tampão de extração. A homogeneização foi realizada com bastões de vidro esmerilhado, em placas de acrílico escavadas, e centrifugadas a 14000 rpm à 4° C por 2 minutos e armazenadas à frio até sua aplicação no gel, que foi realizada no mesmo dia da extração. Durante todo o processo de preparo as amostras foram mantidas em cuba de gelo, para evitar desnaturação das enzimas.

3.2.1 Preparo do gel e soluções tampões

Para obtenção dos eletroferogramas das isoenzimas, foi utilizado o método de sistema contínuo em eletroforese horizontal em gel de poliacrilamida a 6%.

Os tampões do gel foram: Lítio Borato (A) e Tris-cítrico (B), em uma proporção de uma parte do tampão A para nove partes do tampão B (Scandalios, 1969).

3.2.2 Eletroforese

Foram aplicados 10 µl de cada amostra por cavidade do gel num total de 20 amostras por gel. A corrida eletroforética se deu em uma temperatura constante de 4° C em uma cuba LKB 2117 multiphor.

Cada uma das cubas foi preenchida com 500 ml do tampão de corrida, descrito por Paiva et al (1982).

As pontes entre a solução e o gel foram de papel filtro dobrado e disposto de forma a manter um afastamento de 12 cm entre as pontes.

As migrações foram feitas aplicando-se uma diferença de potencial de 10 volts/cm linear. A migração foi interrompida quando a linha de frente atingiu uma distância de 9 cm do ponto de aplicação o que levou de 8 a 10 horas

3.2.3 Revelação e fixação dos géis

Após a corrida dos géis foi efetuada a coloração (revelação) para os sistemas enzimáticos utilizados. Os géis foram acondicionados em bandejas refratárias, tipo Pyrex, onde receberam a solução corante correspondente para a revelação das zonas de esterase e fosfatase ácida, segundo metodologia descrita por Scandalios (1969).

Os géis foram imersos na solução corante e colocados em estufas à 37°C até o aparecimento da zona de atividade. Em seguida, o corante foi descartado em água corrente e o gel fixado por 12 horas à temperatura ambiente.

3.3 Proteína total

As amostras foram obtidas de modo semelhante às amostras das análises das isoenzimas, exceto que o tampão de extração foi o Tris. pH 6,8 .

Para a obtenção dos eletroferogramas utilizou-se o método de sistema descontínuo, em eletroforese vertical em gel de poliacrilamida à 12,5% com formulações de acordo com Paiva et al. (1982).

As migrações eletroforéticas foram realizadas em ambiente com ar refrigerado.

A diferença de potencial na fonte foi mantida em 60 volts, desligada quando a frente formada pelo corante atingia a marca de 9 cm, por volta de 5 horas de corrida.

As cubas dos eletrodos equipados com fios de aço inoxidável receberam 250 ml de solução tampão.

3.4 Interpretação do Zimograma

A leitura das bandas das isoenzimas como da proteína total foi realizada com auxílio de um compasso e papel milimetrado. Reproduziram-se as bandas, transferindo-se as medidas tomadas pelo compasso no gel, para o papel milimetrado.

Logo após, calculou-se a mobilidade relativas (M_r) pela razão entre a distância percorrida por uma banda e a distância percorrida pela frente do corante. O conjunto de bandas de diferentes mobilidades eletroforéticas foi colocado em suas respectivas posições

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização isoenzimática

Dos ensaios preliminares utilizou-se a escolha de 1 g de tubérculos para 5,0 ml de tampão de extração A:B, descrito por Scandalios (1969), que apresentou os melhores resultados quanto a atividade enzimática e resolução de bandas.

Os sistemas de tampão do gel com pH 8,3 e do tanque das cubas com pH 7,6 proporcionaram melhores resoluções para esterase (EST). O sistema fosfatase ácida (ACP) foi descartado por apresentar-se monomórfico.

4.2 Interpretação dos zimogramas

4.2.1 Esterase (EST)

Foi detectada a presença de 3 bandas nos progenitores femininos que são tetraplóides e apenas uma banda no progenitor masculino diplóide. A progênie foi composta de clones que apresentavam de uma a 3 bandas, em geral as bandas que foram encontradas nos híbridos estavam presentes em um ou outro parental (Figura 5).

O clone 'Br 63.65' utilizado como progenitor feminino apresentou 3 bandas e o masculino 26.5 uma banda. Em seus descendentes encontrou-se seis indivíduos com

apenas uma banda, sete apresentaram duas bandas e três foram compostos de três bandas (Figura 5). O progenitor feminino 'Aracy' apresentou três bandas e o progenitor masculino clone 26.5 apenas uma banda. Em seus descendentes 12 apresentaram apenas uma banda, 8 apresentaram duas bandas e 5 apresentaram três bandas (Figura 6).

De acordo com a hipótese genética, descrita por Desbourogh e Peloquin (1967) a interpretação dos géis indica que há uma região de atividade (ou locos), o loco Est-1 que possui três alelos (a,b,c), e uma enzima ao manifestar padrão de duas ou três bandas para o híbrido heterozigoto, comporta-se como dimérica e os híbridos que apresentaram apenas uma banda constituem os homozigotos, o que torna esses resultados coerentes com os relatados por estes autores. Embora obtendo-se polimorfismo nos genótipos analisados, tomar-se-ia necessário que cada enzima analisada fosse submetida um número maior de substratos e outras isoenzimas fossem analisadas para se obter maior segurança nos resultados.

4.2.2 Proteína total

Na análise da progênie descendente do cruzamento entre 'Br 63.65' x clone 26.5 a observação dos géis foi feita através de comparação com relação à presença e à posição de bandas proteicas. Bandas densas e largas foram definidas como principais, essas em contraste com as bandas secundárias que são menores e mais distintas onde seu número e local são prontamente determinados para cada espécie. As bandas menores podem ser claramente diferenciadas, de acordo com o proposto por Desborough e Peloquin (1966).

À partir do zimograma 7 e 8, pode-se constatar que os progenitores femininos tetraplóides ('Br 63.65' e 'Aracy') possuem duas bandas principais sendo uma mais densa que a outra, o progenitor masculino diplóide (26.5) possui apenas uma banda principal

densa. Na progênie estas bandas estão presentes, sendo que alguns genótipos apresentam bandas mais densas que os progenitores. Os Dts 11, 12 e 14 apresentaram as bandas principais mais delgadas como mostra o zimograma (Figura 7).

As bandas que melhor diferiram nas progênies, foram as bandas secundárias como mostra o zimograma na Figura 7 e 8. Pode-se dizer que ocorreu hibridação entre os descendentes pois, encontrou-se na progênie bandas que foram intermediárias àquelas encontradas nos dois progenitores.

Observações encontradas em batata por Desborough e Peloquin (1966 e 1968), estão compatíveis com as análises encontradas neste trabalho, onde os autores identificaram variedades de batata através de eletroforese de proteína e isoenzimas. Esses autores sugeriram que, quando ocorrem dificuldades na interpretação dos zimogramas com isoenzimas, as comparações com proteínas são mais eficientes, devido ao fato que as enzimas estão mais sujeitas à degradação que as proteínas, o que pode resultar em géis de difícil resolução.

De acordo com os autores, a identificação de híbridos interespecíficos pode ser possível sem o conhecimento específico das proteínas envolvidas, visto que, a distribuição total das proteínas de tubérculos, deve ser característica do próprio tubérculo e também dos pais do qual ele foi obtido.

5 CONCLUSÃO

A utilização de um único padrão de isoenzimas e um tipo de substrato foi insuficiente para verificar a ocorrência de hibridação.

O padrão de proteína total forneceu maior número de bandas intermediárias permitindo constatar a ocorrência de hibridação

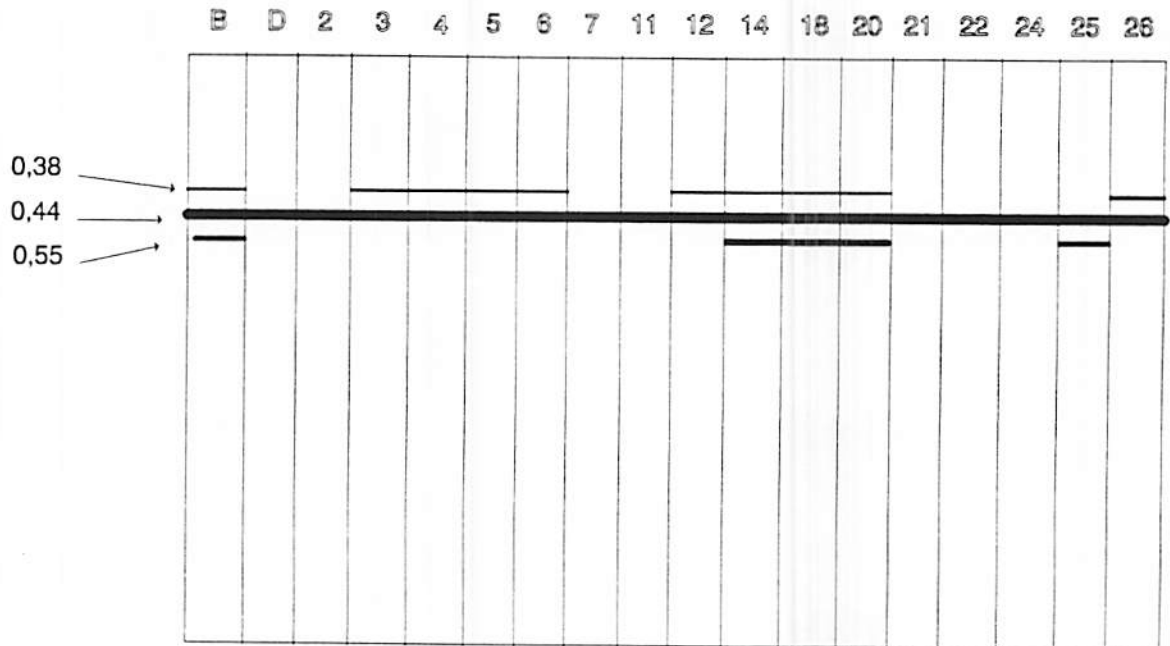


FIGURA 5 Zimograma dos padrões isoenzimático de esterase (EST), de tubérculos de batata descendentes do cruzamento entre 'Br 63.65'(B) X clone 26.5 (D). UFLA, 1995.

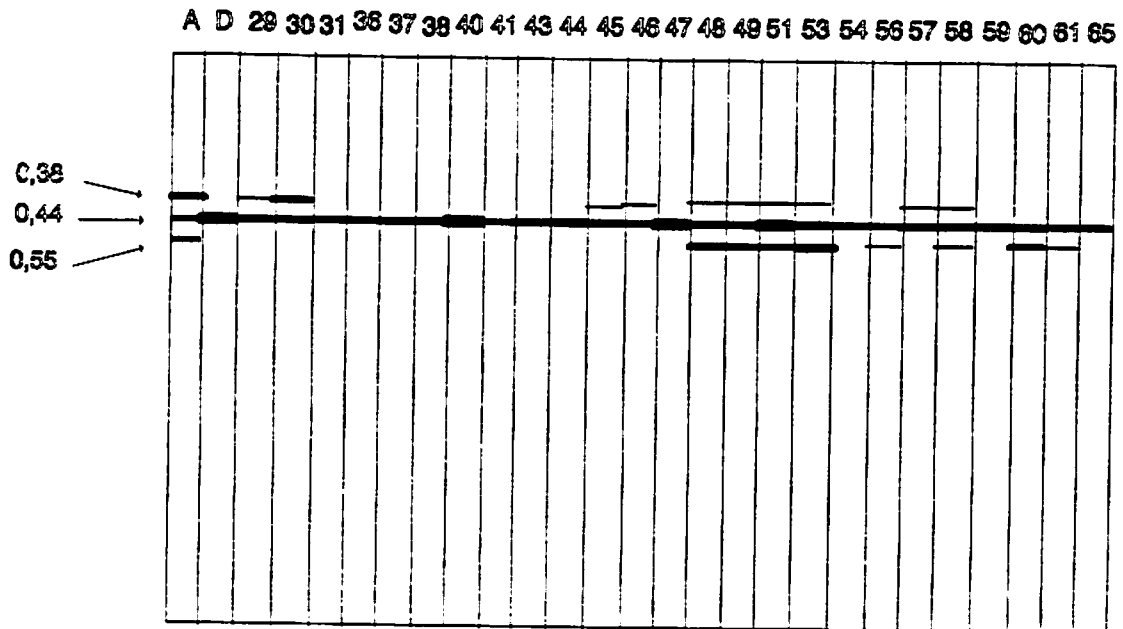


FIGURA 6 Zimograma dos padrões isoenzimático de esterase (EST), de tubérculos de batata descendentes do cruzamento entre 'Aracy'(A) X clone 26.5 (D). UFLA, 1995.

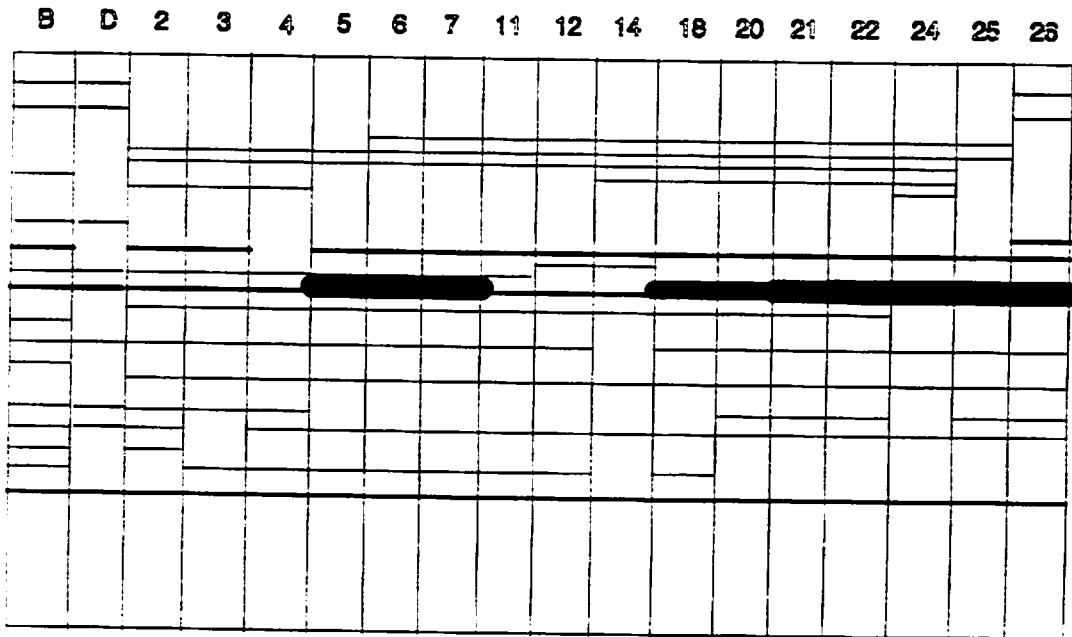


FIGURA 7 Zimograma dos padrões protéina total de tubérculos de batata descendentes do cruzamento entre 'Aracy'(A) X clone 26.5 (D). UFLA, 1995.

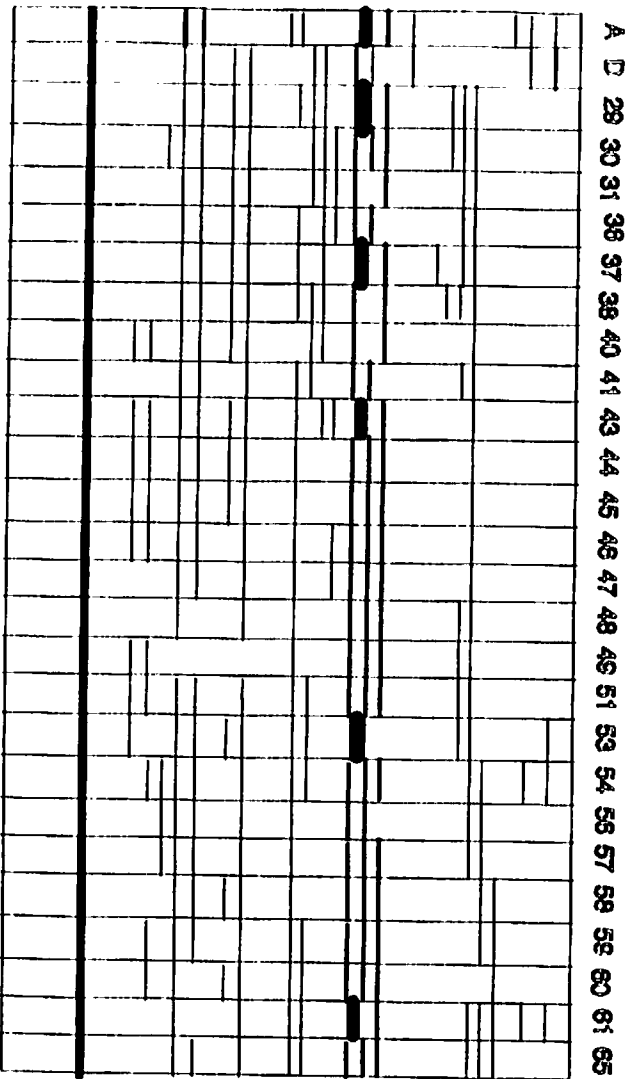


FIGURA 8 Zimograma dos padrões protéina total de tubérculos de batata descendentes do cruzamento entre 'Aracy'(A) X clone 26.5 (D). UFPA, 1995.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, 1991. 242p.
- ALVES, J.M.C.; SIHACHAKE, D.; ALLOT, M.; TIZROUTINE, S.; MUSSIO, I.; SERVAES, A.; DUCREUX. Isozyme modifications and plant regeneration through somatic embryogenesis in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). **Plant Cell Reports**, Washington, v.13, p.437-441, 1994.
- AUGUSTIN, E.; COSTA, D.M. Caracterização de cultivares de batata através de isoenzimas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.10, n.1, p.3-5, 1992.
- AUTRAN, J.C.; BOURDET, B. L'identification des variétés de blé. Etablissement d'un tableau général d'identification fondé sue les diagrammes electrophorétiques des gliadines du grain. **Annales de l'amelioration des Plantes**, Paris, v.25, p.277-301, 1975.
- BENNET, J.H.; SAJID, G.M.; CHATTERTON, N.J.; ASAY, H. Electrophoretic characterization of *quackgrass* X *bluebunch* wheatgrass hybrid seed. **Seed Science and Techonology**, New Delhi, v.19, p.355-362, 1991.
- BREWER, G.J.; SING, C.F. **An introduction to isozyme techniques**. New York: Academic Press, 1970. 186p.
- CARDY, B.J.; KANNENBERG, L.W. Allozyme variability among maize inbred lines and hybrids: application for cultivar identification. **Crop Science**, Madison, v.22, p.1016-1020, 1982.
- CHIEN-AN LIU; DOUCHES, D.S. Production of haploids of potato (*S. tuberosum subsp. tuberosum*) and their identification with electrophoretic analysis. **Euphytica**, Wageningen, v.70, p.113-126, 1993.

- CHU, Y.E. Variations in peroxidase isozyme of *Oryza perennis* and *O. sativa*. *Jap. Journal Genetics*, Madison, v.42, p.233-244, 1967.
- CLULOW, S.A.; WILKINSON, M.J.; BURCH, L.R. *S. phureja* genes are expressed in the leaves and tubers of aneusomatic potato dihaploids. *Euphytica*, Wageningen, v.69, p.01-06, 1993.
- CONKLIN, M.E.; SMITH, H.H. Peroxidase isozymes: A measure of molecular variation in ten herbaceous species of *Datura*. *American Journal Botany*, Columbus, v.58, n.7, p.688-696, 1971.
- COOKE, R.J. The characterisation and identification of crop cultivars by electrophoresis. *Electrophoresis*, Deerfield Beach, v.5, p.59-72, 1984.
- CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, 1994. (no prelo), 390p.
- CUNHA, A.L. **Caracterização agrônômica e produção de pólen 2n de híbridos de hihaplóides de *S. tuberosum* L. x *S. chacoense* Bitt.** Lavras: ESAL, 1992. 83p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- DESBOROUGH, S.; PELOQUIN, S.J. Disc electrophoresis of tuber proteins from solanun species and interspecific hybrids. *Phytochemistry*, Madison, v.5, p.727-733, 1966.
- DESBOROUGH, S.; PELOQUIN, S.J. Esterase isozyme from solanum tubers. *Phytochemistry*, Madison, v.6, p.989-994, 1967.
- DESBOROUGH, S.; PELOQUIN, S.J. Potato variety identification by use of electrophoetic patterns of tuber proteins and enzymes. *American Potato Journal*, Orono, v.45, p.220-229, 1968.
- DESBOROUGH, S.; PELOQUIN, S.J. Tuber proteins from haploid selfs and cultivars of group *tuberosum* separated by an gel disc electrophoresis. *Theoretical and Applied Genetics*, Viena, v.39, p.43-47, 1969.
- DOUCHES, D.S.; LUDLAM, K. Electroforetic characterization of north American potato cultivars. *American Potato Journal*, Orono, v.68, p.767-780, 1991.
- DOUCHES, D.S.; QUIROS, C.F. Additional isozyme loci in tuber-bearing *Solanum*: Inheritance and linkage relationships. *Journal of Heredity*, Baltimore, v.79, p.377-384, 1988a

- DOUCHES, D.S.; QUIROS, C.F. Genetic recombination in a diploid synaptic mutant and a *S.tuberosum* X *S. chacoense* diploid hybrid. *Heredity*, Edinburgh, v.60, p.183-191, 1988b.
- DOUCHES, D.S.; QUIROS, C.F. Genetic strategies to determine the mode of 2n egg formation in diploid potatoes. *Euphytica*, Wageningen, v.38, p.247-260, 1988c.
- DOUCHES, D.S.; QUIROS, C.F. Use of 4x - 2x crosses to determine gene - centromere map distance of isozyme loci in *Solanum* species. *Genome*, Ottawa, v.29, p.519-527, 1987.
- FEDAK, G. Allozymes as aids to canadian barley cultivar identification. *Euphytica*, Wageningen, v.23, p.166-173, 1974.
- GARDINER, S.E.; FORDE, M.B. Identificaton of cultivars and species of pasture legumes by sodium dodecylsuptate-polyacrylamide gel electrophoresis of seed proteins. *Plant Varieties an Seeds*, v.1, p.13-26, 1988.
- GARDINER, S.E.; FORD, M.B. SDB polyacrylamide gel electrophoresis of grass seed proteins: a method for cultivar identification of pasture grasses. *Seed Science and Tecnology*, New Delhi, v.15, n.3, p.663-674, 1987.
- GILLILAND, T.J. Electrophoresis of sexually and vegetatively propagated cultivars of allogamous species. *Plant Varieties and seeds*, v.2, p.15-25, 1989.
- GOTTLIEB, L.D. Electrophoretic evidence and plant systematic. *Annalsof Missouri Botanical Garden*, St. Louis, v.64, n.2, p.161-180, 1987.
- GROZA, H.; KAHN, R. Use of isozyme patterns in characterization of potato mutant lines selected for agronomic quantitative trits. *Euphytica*, Wageningen, v.57, p.189-194, 1991.
- GUPTA, S.K.; ROBBELEN, G. Ientification of rapeseed (*Brassica napus*L.) cultivaars by electrophoresis. *Zeitschrift Für Pflanzenzüchtung*, Berlin, v.96, p.363-370, 1986
- HANNAPEL, D.J. Caraceterization of the early events of potato tuber development. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.83, p.568-573, 1991.
- HART, G.E.; BHATIA, C.R. Acrylamide gel electrophoresis of soluble leaf proteins from *Nicotina* species. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, Ontario, v.9, p.367-374, 1967.

- HUSSAIN, A.; RAMIREZ, H.; BUSHUK, W.; ROCA, W.M. Identification of cultivars of *Stylosanthes capitata*. Vog by polyacrilamide gel electrophoresis of seed proteins. *Euphytica*, Wageningen, v.37, n.2, p.117-119, 1988.
- JOHNSON, B.L.; HALL, O. Analysis of phylogenetic affinities in the triticeae by protein electrophoresis. *American Journal Botany*, Columbus, v.52, n.5, p.506-513, 1965a.
- JOHNSON, B.L.; HALL, O. Electrophoretic studies of species relationships in *Triticum*. *Acta Agricultural Scandinavica*, Supplement, v.16, p.222-224, 1965b.
- JÚNIOR, A.A.T.; SILVA, D.J.H.; SEDIYAMA, M.A.N.; CASALI, V.W.D.; CRUZ, C.D. Dissimilaridade genética de descritores botânicos - agronômicos e isoenzimáticos em clones de couve-comum. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.12, n.2, p.113-117, 1994.
- KOENING, R.; GEPTS, P. Allozyme diversity in wild *Phaseolus vulgaris*: further evidence for two major centers of genetics diversity. *Theoretical and Applied Genetics*, Viena, v.78, p.809-817, 1989.
- LENNART JOHNDON, B.; HALL, O. Analysis of phylogenetic affinities in the triticeae by protein electrophoresis. *American Journal of Botany*, Columbus, v.52, n.5, p.506-513, 1965.
- MARSHALL, D.R.; ALLARD, R.W. The genetics of electrophoretic variants in *Avena*. I The esterase E₄; E₉; E₁₀, phosphatase P₅ and anodal peroxidase APX loci in *A. barbata*. *The Journal of Heredity*, Baltimore, v.60, p.17-19, 1969.
- MARTINEZ - ZAPATER, J.M.; OLIVER, J.L. Genetic analysis of isozyme loci in tetraploid potatoes (*Solanum tuberosum* L.) *Genetics*, Madison, v.108, p.669-679, 1985.
- MÓLLER, M.; SPOOR, W. Discrimination and identification of *Lolium* species and cultivars by rapid SDS-PAG electrophoresis of seed storage proteins. *Seed Science & Technology*, New Delhi, v.21, p.213-223, 1993.
- MORAIS, O.M. Seleção de clones híbridos de dihaplóides de *Solanum tuberosum* L. X *Solanum chacoense* Bitt., para produção, peso específico dos tuberculos e alta frequência de pólen 2n. Lavras: ESAL, 1994. 70p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de plantas).

- NIELSON, G.; JOHANSEN, H.B. Proposal for the identification of barley based on the genotypes for 2 hordein and 39 isozyme loci 47 reference varieties. *Euphytica*, Wageningen, v.35, p.717-728, 1986.
- OLIVER, J.L.; MARTINEZ-ZAPATER, J.M. A genetic classification of potato cultivars based on allozyme patterns. *Theoretical Applied Genetics*, Viena, v.69, p.305-311, 1985.
- ORTIZ, R. PELOQUIN, S.J. Population improvement in the development of 2x parents in potato using exotic germoplasm. *Journal of Genetics & Breeding*, Roma, v.47, p.81-83, 1993.
- PAIVA, E.; LISTER, R.M.; PARK, W.D. Comparison of protein in axillary bud tubers and underground stolon tubers in potato. *American Potato Journal*, Orono, v.59, p.425-433, 1982.
- PASTEUR, N.; PASTEUR, G.; BONHOME, F.; CATALAN, J.; BRITTON-DAVIDIAN, J.; COBB, M. *Practical isozyme genetics*. New York: Halsted Press, 1988. 215p.
- PIERCE, L.C.; BREWBAKER, J.L. Application of isozyme analysis in horticultural science. *Hort Science*, Madison, v.8, n.1, p.17-22, 1973.
- PREISZNER, J.; FEHÉR, A.; VEISZ, O.; SUTKA, J.; DUDITS, D. Characterization of morphological variation and cold resistance in interspecific somatic hybrids between potato (*S. tuberosum* L.) and *S. brevidens* Phil. *Euphytica*, Wageningen, v.57, p.37-49, 1991.
- QUILLET, M.C.; VEAR, F.; BRANLARD, G. The use of isozyme polymorphism for identification of sunflower (*Helianthus annuus*) inbred lines. *Journal Genetics & Breeding*, Roma, v.46, p.295-304, 1992.
- QUIROS, C.F.; McHALE, M. Genetics analysis of isozyme variants in diploid and tetraploid potatoes. *Genetics*, Madison, v.111, p.131-145, 1985.
- RACUSEN, D.; RACUSEN, R. Esterase activity and structural heterogeneity in patatin from a wild potato species. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v.70, p.597-600, 1992.
- RIGHETTI, P.G.; BOSISIO, A.B. Application of isoelectric focusing to the analysis of plant and food proteins. *Electrophoresis*, Deerfield Beach, v.2, p.65-75, 1981.
- SCANDALIOS, J.G. Amylase isozyme polymorphism in maize. *Planta*, Berlin, v.69, p.244, 1966.

- SCANDALIOS, J.G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. **Biochemical Genetics**, New York, v.3, p.37-39, 1969.
- SHEEN, S.J. The distribution of polyphenols, chlorogenic acid oxidase and peroxidase in different plant parts of tobacco. **Phytochemistry**, Madison, v.8, p.1839-1847, 1970.
- SMITH, H.H.; HAMILL, D.E.; WEARER, E.A.; THOMPSON, K.H. Multiple molecular forms of peroxidases and esterases among *Nicotiana* species and amphiploids. **The Journal of Heredity**, Baltimore, v.61, p.203-212, 1970.
- SMITHIES, O. Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. **Biochemical Journal**, London, v.61, p.629-641, 1955.
- SPOONER, D.M.; DOUCHES, D.S.; CONTRERAS, A.C. Allozyme variation within *Solanum* sect. *petota*, ser. *eutuberosa* (Solanaceae). **American Journal of Botany**, Columbus, v.79, n.4, p.467-471, 1992.
- SWARTZ, D. Genetic studies on mutant enzymes in maize: Synthesis of hybrid enzymes by heterozygotes. **Proceedings of the National Academic of Science of the United States of America**, Washington, v.46, p.1210-1215, 1960.
- THURMAN, D.A.; BOULTER, D.; DERBYSHIRE, E.; TURNER, B.L. Electrophoretic mobilities of formic and glutamic dehydrogenase in the Fabaceae: a systematic survey. **New Phytologist**, Cambridge, v.66, p.37-45, 1967.
- VIERITZ, A.M. Distinguishing *Sida acuta*, *Sida rhombifolia*, *Sida spinosa* and *Sida cordifolia* seeds by gel electrophoresis. **Seed Science and Technology**, New Delhi, v. 20, p.465-471, 1992.
- WAARA, S.; TEGELSTRÖM, H.; WALLIM, A.; ERIKSSON, T. Somatic hybridization between anther derived dihaploid clones of potato (*S. tuberosum* L.) and the identification of hybrid plants by isozyme analysis. **Theoretical Applied Genetics**, Vienna, v.77, p.49-56, 1989.
- WEGHE, L.V. Comparative study of electrophoretic methods for cultivar identification of wheat and triticale. **Seed Science and Technology**, New Delhi, v.19, p.41-50, 1991.
- WERNER, D.J.; SINK, Jr. K.C. Identification of poinsettia cultivars by electrophoretic analysis of proteins and peroxidases. **The Journal of Heredity**, Washington, v.68, p.35-40, 1977.

WEST, N.B.; GARBER, E.D. Genetic studies of variant enzymes. I. An eletrophoretic survey of esterase entre leucine aminopeptidase in the Genus *Phaseolus*. *Canadias Journal of Genetics and Cytology*, Ontario, v.9, p.640-645, 1967.