

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA OCORRÊNCIA  
DE PÓLENS NÃO REDUZIDOS EM BATATA  
DIPLÓIDE

SANDRA SALAZAR DA ROSA

Tese apresentada ao programa de Pós-  
graduação em Agronomia e Medicina  
Veterinária da UPF, para obtenção do  
título de Doutor em Agronomia – Área de  
Concentração em Produção Vegetal.

Passo Fundo, outubro de 2007

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA OCORRÊNCIA  
DE PÓLENS NÃO REDUZIDOS EM BATATA  
DIPLÓIDE

SANDRA SALAZAR DA ROSA

Orientadora: Dra. Maria Irene Baggio  
Co-orientador: Dr. Dilson Bisognin  
Colaboradora: Prof<sup>a</sup>. Ph.D. Magali Ferrari Grandó

Tese apresentada ao programa de Pós-  
graduação em Agronomia e Medicina  
Veterinária da UPF, para obtenção do  
título de Doutor em Agronomia – Área de  
Concentração em Produção Vegetal.

Passo Fundo, outubro de 2007

Aprovação da Comissão Examinadora



## AGRADECIMENTOS

Há pessoas que com um simples gesto de compreensão e boa vontade podem decidir o futuro de outro. Ao Sr. José Ivanor Dal Pizzol, que em 1993, como funcionário do setor de bolsas da UPF, abriu caminho para que eu pudesse continuar e concluir o curso de Ciências Biológicas. Sou grata a ti por todas as minhas vidas.

A Getúlio Vargas Zauza por ajudar-me a desenvolver o pensamento científico.

À Universidade de Passo Fundo, por ter oportunizado e oferecido às condições necessárias para que eu realizasse este curso.

À Prof<sup>ª</sup>. Dra. Maria Irene Baggio, pela orientação, pelo apoio e sobretudo pela compreensão nos meus momentos de angústia e aflição.

Ao Prof. Dr. Dilson Bisognin, pela co-orientação, e pela cordialidade com a qual sempre me atendeu quando precisei do seu auxílio.

À Prof<sup>ª</sup>. Dra. Judith Viégas pelas sugestões úteis.

À Prof<sup>ª</sup>. Ph.D. Magali Ferrari Grandó, pelas orientações e apoio.

À Prof<sup>ª</sup>. M.Sc. Lizete Augustin pelo apoio e sugestões.

Aos funcionários do Laboratório de Biotecnologia Vegetal M.Sc. Marilei Suzin, Clarício Machado dos Santos, Abrelino Oliveira e a estagiária M.Sc. Larissa Giroto pela colaboração, disponibilidade e empenho.

À Profª. M.Sc. Dileta Cecchetti pelas orientações e disponibilidade para auxiliar na análise estatística.

À Marlise Valiati pelo auxílio na parte experimental.

À Embrapa - Trigo por disponibilizar seu acervo bibliográfico.

À Marcelo Caio pela paciência, compreensão e companheirismo. Obrigada por estar comigo nos momentos mais difíceis.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

À Deus por tudo.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	14
I REVISÃO DA LITERATURA .....	16
1.1 Classificação e descrição botânica da batata.....	16
1.2 Origem e evolução .....	18
1.3 Melhoramento da batata .....	21
1.3.1 Citogenética no melhoramento .....	29
1.3.1.1 Citogenética no melhoramento e utilização de gametas não reduzidos .....	32
1.4 Controle genético da meiose em plantas .....	39
1.4.1 Mutantes meióticos que afetam a micro e macrosporogênese em batata.....	44
1.5 Processo de microsporogênese.....	47
1.5.1. Influência da temperatura.....	49
1.5.1.1 Na planta.....	49
1.5.1.2 Na meiose .....	51
1.5.1.3 Na formação de gametas 2n.....	53
II MATERIAL E MÉTODOS .....	55
2.1 Origem do material vegetal.....	55
2.2 Cultivo do material vegetal .....	56
2.3 Análise dos grãos de pólen.....	57
III RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	59
3.1 Reação das plantas aos tratamentos .....	59
3.2 Tamanhos de grãos de pólen nos clones diplóides DLB1-140 e DLB1-150.....	65
3.2.1 Grãos de pólen normais e vazios nos clones diplóides DLB1- 140 e DLB1-150.....	71
3.2.2 Grãos de pólen com 22,5µm de diâmetro .....	75
3.3 Cultivar Atlantic.....	80
IV CONCLUSÕES .....	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
APÊNDICES .....	93

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Porcentagem dos tipos e tamanhos de grãos de pólen nos clones diplóides DLB1-140 e DLB1-150, submetidos a diferentes temperaturas durante a microsporogênese – Passo Fundo, FAMV/UPF, 2007. ....	67
Tabela 2. Frequências dos pólenes com 22,5µm de Ø nos clones diplóides submetidos a quatro temperaturas durante a microesporogênese - Passo Fundo, FAMV/UPF, 2007 .....	78
Tabela 3. Frequência dos pólenes estéreis e viáveis da cultivar Atlantic submetida a três temperaturas durante a microsporogênese conforme o tipo – Passo fundo, FAMV/UPF, 2007 .....	81



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Origem e evolução das batatas cultivadas e seus níveis e ploidia (HAWKES 1994).....	20
Figura 2. Clone DLB1-150 submetido a temperatura de 10°C durante a microsporogênese – Passo Fundo, FAMV/UPF, 2007.....	61
Figura 3. Clone DLB1-140 submetido a temperatura de 10°C durante a microsporogênese (amarelamento e lesões folhares) – Passo Fundo, FAMV/UPF,2007.....	61
Figura 4. Clone DLB1-150 submetido a temperatura de 35°C durante a microsporogênese – Passo Fundo, FAMV/UPF, 2007.....	62
Figura 5. Cultivar Atlantic submetida a temperatura de 30°C durante a microsporogênese, – Passo Fundo, FAMV/UPF, 2007.....	62
Figura 6. Clone DLB1-140 submetido a temperatura de 30°C durante a microsporogênese, – Passo Fundo, FAMV/UPF, 2007.....	63
Figura 7. Inflorescência do clone DLB1-140 submetido a temperatura de 30°C durante a microsporogênese – Passo Fundo, FAMV/UPF, 2007. ....	63
Figura 8. Clone DLB1-150 (apresentando botões florais) submetido a temperatura de 15°C durante a microsporogênese – Passo Fundo, FAMV/UPF, 2007. ....	64
Figura 9. Inflorescência da cultivar Atlantic submetida a temperatura de 20°C durante a microsporogênese – Passo Fundo, FAMV/UPF, 2007. ....	64
Figura 10. Clones DLB1-140 e DLB1-150 submetidos a temperatura de 25°C durante a microsporogênese – Passo Fundo, FAMV/UPF, 2007. ....	65
Figura 11. Grãos de pólen normais, considerados viáveis : quatro com 20,0µm e um com 25,0µm de Ø(acima à direita), do clone DLB1-140 (400X) – Passo Fundo, FAMV/UPF, 2007.....	68
Figura 12. Dispersão dos valores percentuais de grãos de pólen com 25,0µm de Ø nos clones diplóides DLB1-140 e DLB1-150, submetidos a quatro temperaturas durante a microsporogênese – Passo Fundo, FAMV/UPF, 2007. ....	69
Figura 13. Dispersão dos valores percentuais de grãos de pólen com 27,5µm de Ø nos clones diplóides DLB1-140 e DLB1-150,	

submetidos a quatro temperaturas durante a microsporogênese – Passo Fundo, FAMV/UPF, 2007. ....	70
Figura 14. Dispersão dos valores percentuais de grãos de pólen com 30,0µm de Ø nos clones diplóides DLB1-140 e DLB1-150, submetidos a quatro temperaturas durante a microsporogênese – Passo Fundo, FAMV/UPF, 2007. ....	71
Figura 15. Dispersão dos valores percentuais de grãos de pólen normais nos clones diplóides DLB1-140 e DLB1-150, submetidos a quatro temperaturas durante a microsporogênese – Passo Fundo, FAMV/UPF, 2007. ....	72
Figura 16. Dispersão dos valores percentuais de grãos vazios nos clones diplóides DLB1-140 e DLB1-150, submetidos a quatro temperaturas durante a microsporogênese – Passo Fundo, FAMV/UPF, 2007. ....	73
Figura 17. Grãos de pólen vazios do clone DLB1-150 a 30°C (1000X) – Passo Fundo, FAMV/UPF, 2007. ....	74
Figura 18. Pólen normal com 20,0µm e pólen com 22,5µm de Ø ampliados 1000x do clone DLB1-150 a 15°C – Passo Fundo, FAMV/UPF, 2007. ....	76
Figura 19. Dispersão dos valores percentuais de grãos de pólen com 22,5µm de Ø nos clones diplóides DLB1-140 e DLB1-150, submetidos a quatro temperaturas durante a microsporogênese – Passo Fundo, FAMV/UPF, 2007. ....	77
Figura 20. Pólens vazios da cultivar Atlântic e pólen normal com 25µm a 15°C, ampliados 400x – Passo Fundo, FAMV/UPF, 2007. ....	82
Figura 21. Dispersão dos valores percentuais de grãos normais e vazios da cultivar Atlantic submetida a três temperaturas durante a microsporogênese – Passo Fundo, FAMV/UPF, 2007. ....	83

# INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA OCORRÊNCIA DE PÓLENS NÃO REDUZIDOS EM BATATA DIPLÓIDE

Sandra Salazar do Rosa<sup>1</sup>, Maria Irene Baggio<sup>2</sup>, Dilson A. Bisognin<sup>3</sup>

RESUMO: O pólen não reduzido ( $2n$ ) é importante no melhoramento da batata, possibilitando, através da poliploidização sexual, a transferência de genes entre níveis de ploidia diferentes. Com o objetivo de avaliar a influencia da temperatura na ocorrência de grãos de pólen não reduzidos nos clones diplóides DLB1-140 e DLB1-150 e no grau de esterilidade de pólen da cultivar Atlantic, tubérculos foram plantados em câmara de crescimento a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 16h. Pouco antes do início da fase reprodutiva, as plantas foram transferidas para outra câmara com temperaturas de 10, 15, 20, 25, 30 e  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Para cada tratamento foram cultivadas 10 plantas de cada clone, avaliada a frequência de grãos estéreis (vazios) através da coloração com carmim acético a 2% e, nos clones diplóides, efetuada também a medição do diâmetro dos pólenes. As

---

<sup>1</sup> Bióloga, aluna do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Produção vegetal, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV) da Universidade de Passo Fundo (UPF).

<sup>2</sup> Orientadora, Dr.<sup>a</sup> em Ciências: Genética, Professora do Programa de Pós-graduação em Agronomia FAMV/UPF.

<sup>3</sup> Co-orientador, PhD em Genética e Melhoramento de Plantas, Professor do Programa de Pós-graduação em Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

amostras eram constituídas de 1000 pólenes por antera, sendo cada antera de uma flor e cada flor de uma planta. Os pólenes foram classificados quanto ao tipo (normal e vazio) e tamanho. Os diâmetros observados nos clones diplóides foram de 20,0 $\mu$ m, considerados normalmente reduzidos; de 22,5 $\mu$ m, considerados não reduzidos (2n) e, em baixas frequências, foram encontrados valores de 25,0, 27,5 e 30,0 $\mu$ m. Os resultados, avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis a 5%, comparando as categorias dentro do mesmo clone, mostraram que pólenes com 22,5 $\mu$ m foram mais freqüentes a 15°C com média de 30,70% para o clone DLB1-140 e 7,65% para o clone DLB1-150. O teste de Wilcoxon a 5% comparou os genótipos diplóides e mostrou que o clone DLB1-140 superou, significativamente, o clone DLB1-150 na produção de pólenes com 22,5 $\mu$ m, em todos os tratamentos. O clone DLB1-150 e a cultivar Atlantic apresentaram maior viabilidade a 15 e 20°C, enquanto no clone DLB1-140, isto foi a 20°C. Todos os clones mostraram aumento da esterilidade com o aumento da temperatura.

Palavras chave: gametas 2n, diâmetro de pólen, estresse de temperatura, esterilidade.

## TEMPERATURE INFLUENCE ON UNREDUCED POLLEN GRAINS IN POTATO DIPLOID

Sandra Salazar da Rosa <sup>1</sup>, Maria Irene Baggio <sup>2</sup>, Dilson A. Bisognin <sup>3</sup>

ABSTRACT. Unreduced (2n) pollen grains are important in potato breeding, making possible through sexual polyploidy, to introgress genes from different ploidy levels. The purpose of this work was investigate the effect of temperature on 2n pollen grains occurrence in the diploid clones DLB1-140 and DLB1-150 and pollen sterility in the tetraploid cultivar Atlantic. Tubers were planted in growth chamber at  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  and 16h day. Just before the beginning of flowering the plants were transferred to another growth chamber and maintained at the temperatures of 10, 15, 20, 25, 30 and  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ; 10 plants of each clone and treatment were cultivated and the frequency of pollen sterility (empty grains) was quantified with acetocarmin staining at 2%. Pollen grain diameter was also measured in diploid clones. Pollen samples were taken from one flower of one anther and 1000 pollen grains were analyzed and classified as viable and sterile (empty. Pollen diameter of diploid clones was measured: 20,0m $\mu$  size was considered as normally reduced 22,5m $\mu$ , as unreduced (2n); and, in lower frequencies, the sizes of 25,0m $\mu$ , 27,5 and 30,0m $\mu$  were found. Kruskal-Wallis test at 5% indicated higher frequency of 22,5m $\mu$  size at 15 $^{\circ}\text{C}$  (mean 30,70%) in the DLB1-140 clone and (mean 7,65%) in the DLB1-150 clone. Wilcoxon test showed that

DLB1-140 clone had higher frequency 22,5m $\mu$  pollen grains than DLB1-150 in all treatments. DLB1-150 clone and Atlantic had higher pollen stainability at 15°C and the clone DLB1-140 at 20°C. In all clones analyzed pollen stainability increased with temperature during microsporogenesis

Key words: 2n gametes, pollen size, temperature stress, pollen sterility.

## INTRODUÇÃO

As cultivares de batata, disponíveis aos produtores na Região Sul do Brasil, apresentam problemas de adaptação às condições ecológicas, principalmente aquelas referentes ao ciclo e suscetibilidade às doenças causadas por fungos, bactérias e vírus. A esses fatores associa-se a falta de qualidade comercial da batata produzida para a agroindústria. Existe ainda o problema da variabilidade genética restrita da batata cultivada, confirmada por estudos baseados em genealogias, marcadores morfológicos e moleculares. Diante dessas limitações, tornam-se essenciais estudos que sirvam de subsídios para o planejamento de estratégias que auxiliem os trabalhos de melhoramento, visando a obtenção de cultivares adaptadas à Região Sul, que sejam menos suscetíveis às principais doenças e que apresentem tubérculos com boa qualidade comercial e nutricional.

Gametas  $2n$  possibilitam a poliploidização sexual e a transferência de genes desejáveis entre plantas de níveis de ploidia diferentes sendo, portanto, uma importante ferramenta que pode ser aplicada ao melhoramento da cultura. Pólen  $2n$  tem importância primordial no aproveitamento da heterose e conseqüente maximização da heterozigose no melhoramento. Gametas  $2n$  têm sido fundamentais para superar os estágios críticos de introgressão de genes em programas de melhoramento, evitando o abortamento do embrião.

Este trabalho envolveu pesquisa básica no sentido específico de estudar um fenômeno: a influência da variação da temperatura na formação de pólen  $2n$  na microsporogênese de clones diplóides de batata. No entanto, reveste-se também de grande importância do ponto de vista aplicado ou pragmático, por fornecer subsídios para o melhoramento genético desta cultura. Além disso, acrescenta contribuição às pesquisas na área da citogenética, ao estudar o efeito dos estresses de temperatura na microsporogênese e gerar recomendações em relação às condições ambientais mais propícias para a realização tanto de cruzamentos interespecíficos como intervarietais, de hibridização bem sucedidas nos programas de melhoramento de batata.

O presente trabalho, através de análise citológica de grãos de pólen, teve como objetivos: avaliar a influência da variação da temperatura (1) na formação de pólenes não reduzidos (gametas  $2n$ ), em clones diplóides selecionados de batata resistente a várias doenças; e (2) na formação de pólenes normais na cultivar tetraplóide de batata Atlantic.



## I REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 Classificação e descrição botânica da batata

A batata (*Solanum tuberosum* L.) é uma planta dicotiledônea, pertencente à família Solanaceae, gênero *Solanum*, que contém mais de 2.000 espécies, das quais pouco mais de 150 são produtoras de tubérculos (FORTES e PEREIRA, 2003).

As espécies de batata cultivadas e silvestres estão classificadas dentro da família Solanaceae, pertencentes ao gênero *Solanum* e subgênero *Potatoe* (*Pachystemonum*), seção Petota (*Tuberarium*). A seção Petota é dividida em duas subseções: Estolonífera, a qual é constituída pelas séries Eutuberosa e Juglandifolia, plantas não formadoras de tubérculos, e subseção Potato (*Hyperbasarthum*), plantas formadoras de tubérculos (SIMMONDS, 1976).

São conhecidas sete espécies cultivadas e 225 espécies silvestres. Do ponto de vista genético, existem espécies diplóides ( $2n = 2x = 24$ ), triplóides ( $2n = 3x = 36$ ), tetraplóides ( $2n = 4x = 48$ ), pentaplóides ( $2n = 5x = 60$ ) e hexaplóides ( $2n = 6x = 72$ ). Do total da diversidade genética catalogada, pertencente ao germoplasma de batata, mais de 70% são espécies diplóides, 15% são tetraplóides, 8% são hexaplóides e 7% são triplóides e pentaplóides. Quanto às espécies cultivadas, duas são diplóides, duas triplóides, duas tetraplóides e uma pentaplóide. A tetraplóide *S. tuberosum* é a espécie cultivada mais importante e tem duas

subespécies: *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*, que apresenta adaptação para dias longos e é cultivada em regiões de climas tropicais e subtropicais, e *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*, adaptada para dias curtos, cujo cultivo está restrito à região dos Andes da América do Sul (BISOGNIN, 2003).

A batata é uma planta herbácea anual potencialmente perene devido à sua capacidade de reprodução por tubérculos. É uma planta que apresenta hábito de crescimento prostrado, podendo mudar conforme a espécie. As plantas podem desenvolver-se de sementes ou de tubérculos. As oriundas de sementes possuem características típicas de uma planta dicotiledônea, com raiz primária (radícula), hipocótilo, cotilédones e epicótilo, dos quais se desenvolvem os talos e as folhas. As plantas originadas de tubérculos desenvolvem-se a partir de gemas (pontos de brotação, nós). As raízes, quando as plantas são oriundas de semente verdadeira (sementes botânicas), são do tipo pivotante com raízes laterais (revisão efetuada por PANDOLFI, 1998). Fortes e Pereira (2003), ressaltam que, quando as plantas são oriundas de tubérculo, as raízes são adventícias e crescem a partir dos nós.

A parte aérea tem altura que pode variar entre 50 a 70cm podendo, entretanto, alcançar até 1,5m na fase adulta. O ciclo vegetativo da cultura pode ser precoce (<90 dias), médio (90-110 dias) ou longo (> 110 dias), dependendo da cultivar (FORTES e PEREIRA, 2003). As folhas são compostas, embora folhas simples possam ser encontradas nas espécies silvestres. A inflorescência é denominada cimosa, com flores

pentâmeras e bissexuais, sendo o cálice constituído por quatro sépalas de cor verde ou não pigmentado. A corola tem coloração que varia do branco ao roxo. O androceu possui cinco estames, alternados com as pétalas. O gineceu é bicarpelar com ovário súpero, globoso e sincárpico. O fruto é do tipo baga, bilocular, geralmente arredondado, de cor verde ou parda, com diâmetro de 1 e 3 cm. Desenvolvem-se no fruto, numerosas sementes que, dependendo da cultivar, podem chegar a 200 por fruto. As sementes são pequenas e sua coloração varia de amarelo a castanho (revisão de PANDOLFI, 1998).

## 1.2 Origem e evolução

De acordo com as revisões sobre origem, evolução e genética da batata apresentadas por Motley et al (2006), Choer (2003), Hijmans et al (2002), Pinto (1999) e Pandolfi (1998), embora o gênero *Solanum* estenda-se ao redor do mundo, com exceção dos extremos norte e sul, o centro de diversidade encontra-se na América do Sul e no México. O centro de origem da cultura pode ter sido a região dos Andes, do sul do Peru ao norte da Bolívia, onde protótipos silvestres ainda existem. Cabe ainda ressaltar que a batata foi, por muito tempo, a cultura de subsistência dos pré-Incas e Incas, cuja agricultura era baseada no cultivo de batatas silvestres e outras plantas tuberosas, na região dos Andes. Entre os cinco grupos citológicos já mencionados, as espécies diplóides ( $2n = 2x = 24$ ), geralmente possuem sistema gametofítico de auto-incompatibilidade.

Quando o nível de plóidia é aumentado, torna-se possível a auto-fecundação. Batatas tetraplóides têm taxas de auto-fecundação que variam de 10 a 74% em material macho fértil. As espécies cultivadas de batata distinguem-se dos seus ancestrais silvestres por apresentarem tubérculos com menor concentração de alcalóides (os quais apresentam um gosto amargo); por formarem tubérculos em cachos ao redor da base dos brotos devido ao fato dos estolões serem curtos e por produzirem tubérculos maiores do que as espécies silvestres. Quatro espécies silvestres participaram no processo de origem das espécies cultivadas: *Solanum sparsipilum* (2x), *Solanum leptophytes* (2x), *Solanum magistracrobium* (2x) e *Solanum acaule* (4x) Figura 1.

Estudos meióticos realizados em híbridos de espécies diplóides selvagens têm demonstrado que a maioria das espécies possui um genoma básico comum ( $x = 12$ ). Na espécie tetraplóide cultivada, os cromossomos consistem de quatro cópias estruturalmente idênticas, o que é indicador da origem tetraplóide, sendo que a estrutura dos cromossomos no paquíteno da meiose serve de parâmetro para comparação. Através dos estudos comparativos dos genomas paquítenicos de *S. tuberosum* (tetraplóide) e de 19 espécies diplóides de *Solanum* produtoras de tubérculos, ficou demonstrado o alto grau de similaridade genética entre os grupos tetraplóides e diplóides, bem como entre as espécies diplóides (revisão de PINTO, 1999).

A batata moderna é resultado de um processo evolutivo que, segundo Pereira e Daniels (2003) pode ser dividido em três estágios: (1)

domesticação de espécies selvagens diplóides da América do Sul há cerca de 7000 anos; (2) emergência de formas tetraplóides cultivadas no Chile, com posterior introdução na Europa; (3) crescimento da importância da batata tetraplóide como alimento básico nos países europeus.

A principal batata cultivada comercialmente, denominada (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*), tem constituição tetraplóide ( $2n = 4x = 48$  cromossomos), com herança tetrassômica e multialelismo como determinantes básicos do desempenho (PEREIRA, 2003).

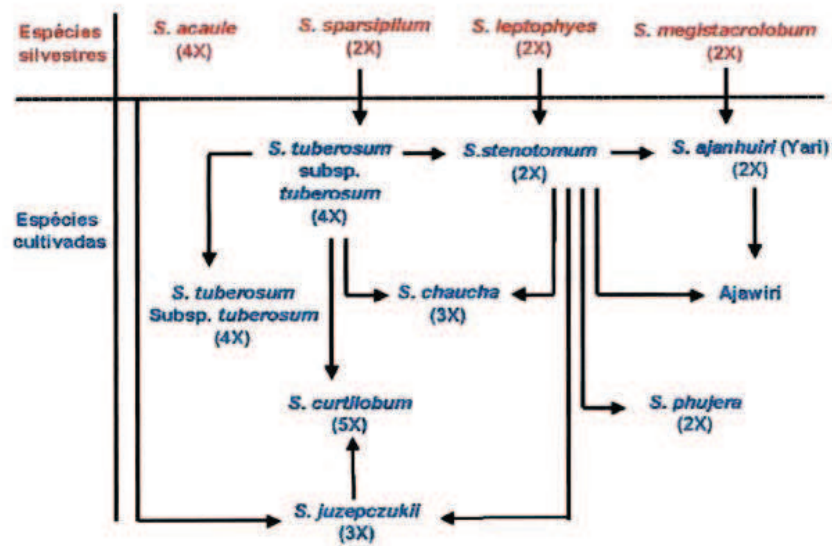


Figura 1. Origem e evolução das batatas cultivadas e seus níveis e ploidia (HAWKES 1994)

### 1.3 Melhoramento da batata

Embora a batata tenha sua origem na América do Sul, a distribuição para o resto do mundo ocorreu a partir da Europa. O processo de disseminação e adaptação para o cultivo em diferentes condições ambientais, combinado com o intenso trabalho de melhoramento genético, ocasionou drástica redução da variabilidade genética. Estudos baseados em pedigrees, marcadores morfológicos e moleculares confirmam que a batata é caracterizada por restrita variabilidade genética, o que torna a cultura geneticamente mais vulnerável (BISOGNIN 2003). Esta vulnerabilidade é importante principalmente em relação às adversidades ambientais, sendo uma das causas dos baixos ganhos em produtividade observados nos programas de melhoramento em todo mundo (PEREIRA et al, 2003). A ampliação da base genética da batata cultivada pode ser obtida através do cruzamento com espécies silvestres diplóides (PELOQUIN et al., 1999).

Os produtores de batata no Brasil têm historicamente utilizado cultivares desenvolvidas em países de clima temperado, principalmente Holanda, Suécia, Alemanha e, mais recentemente, nos Estados Unidos. Essas cultivares, por terem sido desenvolvidas para as condições agroecológicas diferentes, necessitam de doses maiores de insumos agrícolas, o que, conseqüentemente, aumenta os custos de produção (BUSO e BOUTEUX, 2001).

Na região Sul do Brasil, a produção da batata apresenta deficiências, tanto em relação à aparência de tubérculos quanto ao processamento para uso alimentar. Devido ao uso de cultivares estrangeiras, não adaptadas aos agroecossistemas regionais, principalmente no que se relaciona ao ciclo (sensibilidade ao fotoperíodo), normalmente apresentam dormência longa, dificultando a realização de dois plantios anuais. Esses problemas de adaptação resultam em instabilidade de produção e de qualidade (rachaduras e formatos irregulares). Além disso, há o problema da suscetibilidade às principais doenças da região, entre as quais estão a requeima (*Phytophthora infestans*), pinta-preta (*Alternaria solani*), PVY (vírus Y da batata) e PLRV (vírus do enrolamento da folha da batata). Portanto, a boa produtividade exige aumento dos custos de produção, sendo necessárias muitas aplicações de defensivos, renovação constante de sementes e altas doses de fertilizantes (PEREIRA, 2003).

O melhoramento genético da batata na região Sul foi iniciado em 1942, na Estação Experimental de Horticultura, no município de Rio Grande. Este programa contribuiu para o desenvolvimento de diversas cultivares, as quais tiveram boa aceitação, mas desapareceram na década de sessenta, dizimadas pela murchadeira (*Ralstonia solanacearum*) que infestou inclusive as áreas experimentais da Estação. Em 1946, em Pelotas, o Instituto Agrônomo do Sul, atualmente Embrapa Clima Temperado, iniciou um programa de melhoramento que liberou até o momento treze cultivares (PEREIRA, 2003). Destas, a cultivar Baronesa,

liberada em 1955, foi a que atingiu maior expressão devido ao alto potencial produtivo, sob ampla variação de condições ambientais. Seu cultivo concentra-se no Rio Grande do Sul há mais de 40 anos. A cultivar Macaca também é muito cultivada, em especial na região central do Estado, onde tem apresentado expansão em área plantada (PINTO, 2003). No Paraná, o IAPAR (Instituto Agrônomo do Paraná) e a Embrapa Hortaliças desenvolveram duas cultivares: Contenda e Araucária, liberadas em 1987 e 1999, respectivamente. Em Santa Catarina, a EPAGRI, em programa associado com a Embrapa Clima Temperado, desenvolveu a cultivar Catucha, liberada em 1995.

O mercado de batata para processamento é crescente no Brasil, oferecendo oportunidade para produção integrada com a indústria. Para atender as exigências da agroindústria na produção de batata chips, de batata palha e produção de batata pré-frita congelada, fez-se necessário o melhoramento genético visando o desenvolvimento de germoplasma melhorado na forma de novas cultivares (PEREIRA, 2003). Além da qualidade de processamento, o melhoramento para resistência a doenças, principalmente à requeima, a mais devastadora das doenças no Brasil e no mundo é essencial para a redução dos custos de produção (BISOGNIN, 2003).

O método de melhoramento da batata mais empregado é o da seleção clonal, que consiste no cruzamento de duas cultivares ou clones-elite, altamente heterozigóticos, que geram uma população segregante, a partir da qual se selecionam os melhores clones (PINTO, 2003). Esse



método tradicional de melhoramento consiste na manipulação de grandes populações clonais oriundas de cruzamentos 4x-4x. Entretanto, é baixa a frequência de indivíduos com características agronômicas superiores (BUSO et al., 1999). Isso se deve, em parte, à utilização de parentais fortemente relacionados (DOUCHES et al., 1996). Outro possível fator associado à baixa frequência de clones superiores no esquema de melhoramento tradicional é a ocorrência de disrupção durante a meiose, ou devido às interações gênicas presentes nos parentais de alto rendimento (PELOQUIN et al., 1989).

As características biológicas que restringem o progresso no melhoramento da batata são o fato de: (1) ser uma planta de propagação vegetativa e o material utilizado na multiplicação ser volumoso e pesado (1,5 t de batata-semente por ha); (2) ser uma espécie tetraplóide, altamente heterozigota e com elevada segregação; (3) ser de difícil identificação na primeira geração clonal devido à herança tetrassômica; (4) ter necessidade de heterozigosidade elevada para a obtenção de elevado vigor e produtividade; (5) ter esterilidade e auto-incompatibilidade como características comuns, o que reduz as possibilidades de combinações úteis; (6) ter reduzida probabilidade de obter a combinação de caracteres desejados em um único clone, devido ao elevado número de características, sendo a maioria de herança poligênica, a ser considerado simultaneamente durante o processo de seleção; (7) possuir muitos genes sensíveis à influências ambientais, especialmente nos ciclos iniciais de melhoramento; (8) apresentar forte ocorrência de

interação entre clones e sistemas de produção (BUSO et al., 1999; PINTO, 2003).

Das culturas economicamente importantes, a batata destaca-se por apresentar grande diversidade genética nas espécies afins (silvestres) e pela facilidade com que esse germoplasma pode ser incorporado nas espécies cultivadas. Diversos estudos têm demonstrado que há uma vasta gama de diversidade genética em materiais silvestres. Esta diversidade pode ser incorporada na batata cultivada possibilitando a obtenção de híbridos interespecíficos vigorosos. Estes híbridos apresentam pareamento cromossômico e permuta genética normais o que, conseqüentemente, assegura a fertilidade. Essas características são de fundamental importância para o melhoramento da cultura (PINTO, 1999).

A facilidade com que o germoplasma das espécies afins (diplóides) pode ser introduzido nas espécies cultivadas (tetraplóides) deve-se à existência de vários mecanismos genéticos.

O primeiro deles envolve a obtenção de clones dihaplóides de *S. tuberosum* por meio da técnica de cultura de anteras (revisão de PINTO, 1999). Porém o uso dessa técnica é limitado devido à existência de genes recessivos letais e subvitalis presentes no nível tetraplóide e que são revelados no nível diplóide ou, também, devido à sensibilidade do genótipo a componentes do meio de cultura (ORTIZ e PELOQUIN, 1994). Embora dihaplóides possam ser usados no melhoramento, em geral são macho-estéreis e, as poucas exceções, apresentam auto-incompatibilidade. Deste modo, homozigotos, podem ser formados

eliminando aqueles genes letais e subvitalis, a partir de uma espécie tetraplóide, com duas sucessivas reduções cromossômicas, passando do nível  $4x$  para o nível  $2x$  e, finalmente, para o nível  $x$ , também através da partenogênese ou cultura de anteras, segundo revisão de PANDOLFI, (1998).

O segundo mecanismo envolve a indução de dihaplóides com polinizadores como *S. phureja*. Os indutores de dihaplóides apresentam alta frequência de grãos de pólen com dois núcleos reprodutivos fundidos, resultantes de uma endomitose no tubo polínico. Esse núcleo com 24 cromossomos, fertiliza os dois núcleos polares do saco embrionário possibilitando a formação de um endosperma normal (hexaplóide), que garante o desenvolvimento partenogenético da oosfera e a produção de um indivíduo dihaplóide. Se esse núcleo reprodutivo fertilizar a oosfera, o endosperma não se desenvolve o que, conseqüentemente, também impede o desenvolvimento do embrião (PINTO, 1999).

O terceiro mecanismo genético é resultado de anormalidades que podem ocorrer antes, durante e após o processo meiótico. Como conseqüência do processo meiótico anormal, não ocorre a redução do número de cromossomos nos gametas (SCHIFINO-WITTMANN e DALL'AGNOL, 2001) formando-se, portanto, pólen ou óvulo  $2n$ , também denominados pólenes ou óvulos não reduzidos. Há, pelo menos, seis mecanismos diferentes que podem levar à formação de gametas  $2n$ : duplicação pré-meiótica, restituição da primeira divisão, replicação cromossômica durante a interfase, restituição da segunda divisão,

duplicação pós-meiótica e aposporia. Entretanto, na batata, os mecanismos mais comuns são: (1) restituição na primeira divisão (RPD) da meiose, e (2) restituição na segunda divisão (RSD) da meiose (TAI, 1997; ORTIZ, 1998).

Pandolfi (1998), revisando os mecanismos de formação de pólen  $2n$  em batata, relatou que, quando ocorrem fusos paralelos ou fundidos, devido aos genes mutantes *parallel spindles* ou *fused spindles*, respectivamente, os micrósporos  $2n$  são geneticamente equivalentes à restituição da primeira divisão meiótica (RPD), isto é, o conjunto cromossômico total sofre uma divisão idêntica à mitose (equacional), formando gametas RPD idênticos entre si e às células que os originaram, devido à não segregação na anáfase II. Deste modo, as combinações alélicas (heterozigose) ou de locos (epistasia) presentes nos parentais estarão representadas nos gametas. Os micrósporos formados quando ocorrem citocinese prematura-1 e citocinese prematura-2 (devido aos genes recessivos não alelos *premature citocinesis-1* ou *premature citocinesis-2*), são geneticamente idênticos à restituição da segunda divisão (RSD) onde, depois da separação dos cromossomos homólogos, na anáfase I, ocorre a restituição do núcleo, logo após a telófase I ou após a prófase II, respectivamente. Cada conjunto haplóide é dividido mitoticamente, porém sem a separação das cromátides para os pólos, devido à citocinese prematura.

Na RPD, todos os locos heterozigotos entre o centrômero e o primeiro sobre cruzamento, em todos os cromossomos, também são

heterozigotos nos gametas. Dessa forma, aproximadamente 75 a 80% da heterozigose é transmitida dos progenitores à progênie através da RPD e são mantidas interações epistáticas em uma grande proporção.

Na RSD, que ocorre durante a meiose II, há falha na citocinese e restituição de núcleos diplóides, com formação de díades ou tríades. Na RSD, a heterozigose é zero do centrômero até o primeiro sobre cruzamento e somente em torno de 40 a 45% da heterozigose do genitor é transmitida à progênie (PELOQUIN, 1981 revisado por SCHIFINO-WITTMANN e DALL'AGNOL, 2001). Na formação do óvulo  $2n$ , o mecanismo mais comum é a não ocorrência da segunda divisão meiótica, controlada pelo alelo recessivo *os* e, portanto, equivale a RSD (TAI, 1994; ORTIZ, 1998). Em batata, análises citológicas e genéticas têm revelado que o pólen  $2n$  é formado predominantemente através da RPD, pela formação de fusos paralelos, enquanto a formação de óvulo  $2n$  ocorre predominantemente através da RSD (WERNER e PELOQUIN, 1990).

Em batata, a técnica de imunofluorescência dos microtúbulos revelou que os mecanismos que levam a formação de gametas  $2n$  envolvem ausência da maquinaria que constitui o citoesqueleto em diferentes estágios da meiose (CONICELLA et al, 2003).

O citoesqueleto é constituído por uma complexa rede de proteínas filamentosas que se estendem por todo o citoplasma. É uma estrutura altamente dinâmica que se reorganiza continuamente sempre que a célula altera sua forma, se divide, ou responde ao ambiente. Fornece a

maquinaria necessária para movimentos intracelulares e a segregação dos cromossomos durante a divisão celular (ALBERTS et al, 1997).

De acordo com Conicella et al( 2003) na batata, a orientação anormal do fuso na metáfase II e anáfase II, mudam claramente a posição dos núcleos dentro da célula. Neste caso, os fusos fazem convergir os dois grupos de cromossomos para um pólo da célula e são incluídos em um só núcleo.

### 1.3.1 Citogenética no melhoramento

*Citogenética é uma ciência híbrida, uma vez que consiste na fusão da citologia (estudo das células) e da genética (estudo da herança). Esta ciência inclui a manipulação dos cromossomos (técnicas de coloração dos cromossomos), a função e movimento dos cromossomos (divisão celular: mitose, meiose), número e estrutura dos cromossomos (análise do cariótipo) e as numerosas modificações de estrutura e comportamento, assim como o que se refere à recombinação, transmissão e expressão gênica*

SINGH (1993)

Em plantas, análises citogenéticas têm sido amplamente utilizadas em estudos de genética, evolução, filogenia, origem e taxonomia, bem como para determinar estratégias nos programas de melhoramento (CHEN et al., 2004).

A citogenética clássica desenvolveu-se, principalmente, a partir do início do século passado e seu progresso acompanhou o aprimoramento de técnicas e equipamentos de microscopia. Na área vegetal, apresentou grande avanço desde a década de 30 contribuindo

para a compreensão dos mecanismos evolutivos e o mapeamento genético de grande número de espécies cultivadas, principalmente aquelas que apresentam cromossomos possíveis de análise ao microscópio ótico . No melhoramento, vem fornecendo uma contribuição valiosa, tanto em estratégias de transferência de genes de espécies silvestres como na produção de novas variedades. Além disso, a citogenética impulsionou as demais áreas da biotecnologia, associando-se a estas como valiosa ferramenta para pesquisas científicas, tanto básicas como aplicadas.

O melhoramento genético exige a manipulação de genótipos e isto requer técnicas que possibilitem obter informações detalhadas sobre o material genético que está sendo manipulado. A citogenética apresenta as técnicas convencionais, bem como as técnicas mais sofisticadas, que permitem o conhecimento detalhado do genoma, podendo indicar os procedimentos mais adequados para a manipulação genética.

Neste contexto, as técnicas oriundas da citogenética podem ser utilizadas como ferramentas para diversas finalidades, tais como: (1) caracterização mitótica e meiótica do germoplasma; (2) análise do tipo de reprodução; (3) análise da estabilidade do genótipo construído; (4) manipulação da dose gênica, através de alterações cromossômicas; (5) análise genômica em híbridos interespecíficos, o que auxilia na escolha da melhor combinação parental; (6) transferência ou introgressão de genes ou segmentos cromossômicos; (7) mapeamento físico dos cromossomos e (8) análise do padrão de inserção de transgenes nos

cromossomos, com as técnicas de hibridação *in situ* com fluorescência e/ou bandeamento cromossômico (DAVIDE, 2007).

A obtenção de cultivares com características agronômicas desejáveis, através de cruzamentos, pode ser mais rápida e eficiente com a combinação do uso de técnicas citogenéticas e seleção. O melhorista e, o citogeneticista, em conjunto, podem analisar, mediante testes de progênies, a influência do genótipo quanto à ocorrência de anormalidades cromossômicas bem como de anomalias na estrutura dos grãos de pólen. Isso é de fundamental importância, uma vez que anormalidades dessa natureza afetam a fertilidade e são responsáveis pela produção de progênies desuniformes, o que prejudica a adaptação das cultivares (BRAMMER, 2003).

A citogenética e genômica apresentaram grandes avanços nos últimos anos. A técnica de FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*) tornou-se rotina para mapeamento de seqüências com muitas, poucas ou uma única cópia gênica no genoma. No futuro, a possibilidade de integração entre o mapeamento físico e os marcadores de DNA, irá gerar mais conhecimento que servirá de suporte tanto para a pesquisa básica como para o aumento da produção vegetal. O avanço da pesquisa em citogenética e genômica vegetal é de tal ordem que se pode considerar que estas duas áreas começam a se fundir, com o objetivo de aumentar a produção em diversas culturas, entre as quais se destacam os cereais, as brássicas, as leguminosas e algumas espécies de citrus (HOUBEN e SCHUBERT, 2007).



Segundo Davide (2007), a citogenética apresenta técnicas simples e de baixo custo que fornecem informações para a maioria das etapas de um programa de melhoramento genético. Ao mesmo tempo, possui ferramentas sofisticadas, que permitem conhecer detalhadamente o genoma que está sendo estudado e, com isso, indicar os procedimentos mais adequados para a manipulação. Segundo esta pesquisadora: *As ferramentas citogenéticas explicam de forma "elegante" os fenômenos genéticos.*

#### 1.3.1.1 Citogenética no melhoramento e utilização de gametas não reduzidos

A introgressão de genes de espécies silvestres diplóides em germoplasma tetraplóide é uma importante estratégia no melhoramento da batata. Através de cruzamentos, caracteres de interesse podem ser incorporadas nas cultivares comerciais tetraplóides. Os clones híbridos  $2x$ , oriundos desses cruzamentos, são selecionados para a presença de alelos mutantes meióticos que controlam a produção de gametas  $2n$ . Estes gametas  $2n$  têm grande valor em programas de melhoramento pois aumentam a possibilidade de introgressão da variabilidade genética das espécies diplóides para as espécies tetraplóides. Espécies silvestres dotadas de mecanismo formador de pólen não reduzido ( $2n$ ), que são consequência de anormalidades meióticas como fusos fundidos, podem ser utilizadas diretamente como parentais masculinos. Através da

fertilização da oosfera  $2n$  da cultivar tetraplóide com o pólen reduzido, também  $2n$ , da espécie diplóide silvestre, é evitado o abortamento do embrião e superado um dos estágios críticos da introgressão de genes. Este processo, denominado poliploidização sexual permite a transferência de genes desejáveis entre plantas com diferentes níveis de ploidia (PELOQUIN et al., 1999).

Entre as espécies de importância econômica, a batata é singular com relação à abundância de espécies silvestres e à facilidade com que o germoplasma dessas espécies pode ser manipulado e incorporado nas espécies cultivadas. Os métodos de melhoramento de batata podem produzir progênies  $4x$  através de cruzamentos  $4x - 2x$  ou  $2x - 2x$ , com ampla exploração da diversidade genética. Essa diversidade, além de maximizar a heterozigozidade, possibilita a introgressão de caracteres importantes, tais como resistência às doenças, insetos, nematóides e tolerância à geada, nas espécies cultivadas (PELOQUIN et al., 1989; PELOQUIN et al., 1999). Entretanto, o sucesso dos cruzamentos interespecíficos é determinado, primeiramente, por fatores associados ao endosperma os quais, freqüentemente, relacionam-se com o nível de ploidia. A ocorrência de barreiras pós-zigóticas, que impedem cruzamentos interespecíficos e/ou entre materiais de ploidia diferentes, conduzem ao isolamento sexual de um grande número de espécies provocando aborto do endosperma do híbrido e, conseqüentemente, morte do embrião. Esse tipo de barreira tem sido explicado pela hipótese do EBN (*endosperm balance number*), que se refere à necessidade de um

equilíbrio numérico de cromossomos entre o endosperma e o embrião (BUSO e BOTEUX, 2001). O EBN é um valor arbitrário, atribuído ao endosperma de uma espécie. Somente materiais genéticos com EBN idênticos (ploidia efetiva) podem ser cruzados (PINTO, 1999).

Conforme extensa revisão de Tomé (2004), várias hipóteses foram sugeridas na tentativa de explicar as falhas ocorridas em cruzamentos interplóides, devido à incompatibilidades de ploidia dos endospermas envolvidos. Tais hipóteses começaram a surgir a partir de observações de proporções diferentes nos níveis de ploidia dos tecidos que compõem as sementes: tecido materno, endosperma e embrião. Em 1930, Muntzing propôs que a proporção normal de ploidia era de 2:3:2, para o desenvolvimento normal da semente, sendo 2 tecido materno : 3 endosperma : 2 embrião. Em 1932, Watkins propôs apenas a proporção de 3:2, sendo 3 endosperma : 2 embrião, que seria ideal para formação de sementes viáveis. Em 1954, Valentine propôs a proporção de 2:3, sendo 2 tecido materno : 3 endosperma. No entanto, alguns cruzamentos interespecíficos não seguem essas regras gerais para o sucesso no desenvolvimento normal da semente. Em 1966, Nishiyama e Inomata sugeriram que o sucesso no desenvolvimento normal do endosperma depende da proporção 2:1 dos genomas materno e paterno respectivamente, no próprio endosperma, independente do nível de ploidia dos tecidos materno e embrionário.

Em 1984, Lin concluiu, ao estudar cruzamentos interespecíficos em milho, que nem a ploidia do genitor materno e nem

mesmo a ploidia do embrião influenciavam o desenvolvimento do endosperma. Todo o endosperma com desenvolvimento normal tem sua ploidia múltipla de três. Entretanto, a maioria dos endospermas apresentavam ploidia constituída de 2 genomas maternos para 1 genoma paterno. Em algumas amostras foi observado que o endosperma 6x com a proporção de 4 genomas maternos e 2 genomas paterno, era normal ao passo que o endosperma 6x com a proporção de 5 genomas maternos e 1 paterno era abortivo. Em amostras que apresentavam endosperma 4x, sendo 3 genomas materno e 1 paterno, o resultado era a formação de sementes em miniatura. Já amostras com endospermas de ploidia 4x, sendo 2 genomas maternos e 2 genomas paternos, resultavam em sementes abortivas. Estes resultados levaram a conclusão de que o nível de ploidia compatível, que possibilita o desenvolvimento e funcionalidade normal do endosperma, é a proporção de 2:1, sendo 2 genomas materno e 1 genoma paterno.

Para as espécies de *Solanum* o valor do EBN foi atribuído através de cruzamentos com aquelas que tinham padrão de EBN conhecidos. Para algumas espécies diplóides da América do Norte e da América Central, como *S. comersonii*, foi inicialmente atribuído o valor de EBN igual a 1, para algumas espécies tetraplóides, o valor de EBN era igual a 2 e, nas espécies hexaplóides, igual a 4.

Ainda, segundo revisão de Tomé (2004), posteriormente, foram conduzidos novos cruzamentos entre diferentes espécies e aquelas que geravam descendentes férteis e viáveis eram classificadas como

pertencentes a um mesmo grupo de valor de EBN. Este experimento evidenciou que algumas espécies diplóides  $2x$  (2 EBN) eram capazes de hibridizar-se com algumas espécies triplóides  $3x$  (2 EBN) e com algumas tetraplóides  $4x$  (2 EBN), enquanto outras diplóides  $2x$  (1 EBN) eram férteis apenas com elas mesmas. Tais espécies diplóides eram, portanto, reprodutivamente isoladas de outras diplóides. Foi, também, observado que algumas espécies tetraplóides  $4x$  (4 EBN) eram capazes de hibridizar-se com algumas espécies hexaplóides  $6x$  (4 EBN). A partir destes resultados, foi atribuído o número efetivo que pode não refletir diretamente a ploidia da espécie, mas o grau de combinação entre espécies com relação à ploidia do endosperma. Os valores de EBN para as respectivas ploídias foram  $2x$  (1 EBN);  $2x$  (2 EBN);  $3x$  (2 EBN);  $4x$  (4 EBN) e  $6x$  (4 EBN).

Cruzamentos entre espécies relacionadas de diferentes EBN quase nunca têm sucesso. Duas espécies evolutivamente próximas, de mesma ploidia, mas com diferente EBN podem ser totalmente incompatíveis. Por meio do isolamento reprodutivo via EBN, é possível a formação de populações simpátricas. Um exemplo disso é o fato de *Solanum acaule* ( $2n = 4x = 48$ ) não formar híbridos com outras espécies tetraplóides da América do Sul devido à incompatibilidade no endosperma. Entretanto, quando *S. acaule* é cruzada com espécies diplóides ( $2n = 2x = 24$ ) ou com dihaplóides ( $2n = 2x = 24$ ) de *S. tuberosum* ( $2n = 4x = 48$ ), produz sementes férteis e vigorosas com embriões  $3x$  e endosperma normal.

Espécies com ploidia  $2x$  (2 EBN) podem ser cruzadas apenas com outras espécies que possuem 2 EBN. Por exemplo,  $2x$  (2 EBN) ou  $4x$  (2 EBN). Se as espécies diplóides  $2x$  (2 EBN) forem produtoras de gametas não reduzidos em grande quantidade, elas se comportam como se possuíssem 4 EBN, podendo, então, ser cruzadas com uma  $4x$  (4 EBN) ou  $6x$  (4 EBN), conforme Hanneman (1999). Dessa forma, espécies diplóides produtoras de gametas  $2n$  podem ser utilizadas em programas de melhoramento da batata, o que possibilita a transferência de genes de espécies selvagens para as espécies cultivadas. Portanto, é evidente a importância do pólen  $2n$  no aproveitamento da heterose com a utilização de espécies diplóides e conseqüente maximização da heterozigose no melhoramento da batata (PINTO, 1999).

Para a utilização mais eficiente dos gametas  $2n$  no melhoramento genético, três importantes pré-requisitos devem ser observados: (1) os gametas devem ser produzidos em alta freqüência; (2) os clones devem ser estáveis em relação à formação de gametas  $2n$  e (3) as formas como eles se originam devem ser conhecidas (DONGYU et al., 1996).

Em batata, o cruzamento entre um tetraplóide (4 EBN) com um diplóide (2 EBN) não seria viável, pois os dois núcleos polares teriam 4 EBN ( $2n + 2n$ ) e os núcleos reprodutivos do grão de pólen teriam 1 EBN ( $n$ ) cada um, resultando na proporção de 4 EBN (macho) : 1 EBN (fêmea) no endosperma. Endosperma com essa origem é abortado, impedindo o desenvolvimento do embrião triploide, devido à barreira

triplóide. Entretanto, se o genitor masculino diplóide produzir pólen  $2n$ , seus núcleos reprodutivos serão diplóides (2 EBN), formando um endosperma hexaplóide ( $6x$ ) após a fertilização dos núcleos polares, resultando na proporção de 4 EBN (fêmea) : 2 EBN (macho), isto é, 2:1. Nesse caso, o zigoto é tetraplóide, por causa da oosfera diplóide e do núcleo reprodutivo também diplóide (PINTO, 1999).

Mais recentemente, com o objetivo de superar os obstáculos característicos de cruzamentos entre espécies silvestres  $2x$  (1 EBN) e espécies cultivadas  $4x$  (4 EBN), os melhoristas utilizaram uma estratégia de cruzamento denominada de cruzamentos ponte. Trata-se do cruzamento entre um híbrido diplóide, proveniente de um dihaplóide de *S. tuberosum* ( $2x$ , 2 EBN) e *S. phureja* ( $2x$ , 2 EBN), com um material silvestre que teve seu genoma duplicado via poliploidização somática. Esta estratégia foi desenvolvida por CARPUTO et al, (1997) resultando desse cruzamento um híbrido triplóide *ponte*, que é cruzado com a cultivar tetraplóide original, via gametas não reduzidos.

Além dos fatores associados ao endosperma, em algumas espécies existem outros fatores que influenciam a compatibilidade dos cruzamentos, como por exemplo a não germinação do pólen sobre o estigma ou o não crescimento do tubo polínico recém germinado. Esse tipo de incompatibilidade gametofítica deve-se à presença de genes ou complexos gênicos, tanto do pólen doador como da espécie receptora, que controlam as barreiras de penetração muito comuns em famílias que

apresentam espécies auto-compatíveis e auto-incompatíveis, como as solanáceas (TARN, 1991).

#### 1.4 Controle genético da meiose em plantas

A meiose desempenha duas funções importantes relacionadas com a reprodução sexual: a formação de gametas haplóides necessários para a redução do número somático, o que garante a manutenção do número cromossômico da espécie após a fertilização, e a recombinação, que permite a geração de variabilidade genética. A recombinação é fundamental pois gera diversidade genética, o que amplia a possibilidade de adaptação, sobrevivência e evolução das espécies (LEWIS e JOHN, 1964).

Na meiose, cada célula mãe diplóide ( $2n$ ) dá origem a quatro células filhas haplóides ( $n$ ), as quais têm tanto a metade do número cromossômico da célula mãe quanto combinações gênicas e cromossômicas novas, devido à permuta gênica e à segregação ao acaso dos cromossomos homólogos, respectivamente. Esta recombinação genética, ocorrida durante a meiose, associada a fecundação cruzada aumenta a variabilidade da espécie e torna cada indivíduo, originado de reprodução sexuada, geneticamente único. Uma segunda característica do mecanismo meiótico é a redistribuição do material genético em núcleos filhos, que acontece devido aos processos de recombinação gênica e segregação cromossômica. A base para todos os eventos da meiose



depende, em parte, da ação de sistemas de genes específicos, que eles próprios (os cromossomos) contêm. Durante a prófase da primeira divisão da meiose, os cromossomos homólogos comportam-se em conjunto (sinapse ou pareamento dos cromossomos homólogos) e as cromátides homólogas trocam partes e passam a possuir padrões novos (permuta e recombinação gênica) (VIÉGAS, 2006).

A divisão meiótica é um sistema altamente integrado, e caracteriza-se pela ocorrência de complexos fenômenos mecânicos e bioquímicos (BODANESE-ZANETTINI et al., 1979) tais como: duplicação cromossômica, pareamento dos cromossomos homólogos, formação do complexo sinaptonêmico (*SC-synaptonemal complex*), crossing-over ou permuta, formação de quiasmas e disjunção (SINGH, 1993), que se processam ordenadamente e culminam com a redução do número de cromossomos (BODANESE-ZANETTINI et al., 1979). O complexo sinaptonêmico mantém os cromossomos homólogos bivalentes alinhados e unidos, sugerindo que ele desempenha um papel importante na recombinação (ALBERTS et al., 1997). Esse pareamento é o evento chave na meiose, pois ocorre a associação de dois genomas parentais em um número haplóide de bivalentes (BAKER et al., 1976; GOLUBOVSKAYA, 1979, revisados por BODANESE-ZANETTINI, 1982).

Mutações nos genes que controlam a meiose são comuns em plantas, ocorrendo em um grande número de espécies e em uma série de famílias (SINGH, 1993). Quando mutações afetam esses genes, o

processo meiótico também é afetado, podendo ocorrer restituição meiótica, ou seja, a formação de um núcleo com número cromossômico não reduzido no lugar de dois núcleos reduzidos, devido à ausência da primeira divisão – heterotípica – ou da segunda divisão – homeotípica (OLIVEIRA, 1994, revisado por PANDOLFI, 1998). Algumas dessas anormalidades podem ser de interesse, não somente para estudos citológicos, mas por fornecer excelentes materiais para serem estudados e utilizados em programas de melhoramento genético.

Mutantes meióticos têm o comportamento dos cromossomos drasticamente alterado durante a meiose. Predominam mutantes sinápticos e macho-estéreis, enquanto que mutantes pré-meióticos e disjunções são relativamente raros. Mutantes meióticos geralmente exibem herança monogênica recessiva, embora exceções tenham sido relatadas (SINGH, 1993).

A ausência ou falhas no pareamento dos cromossomos homólogos, durante a Prófase I têm sido atribuídas a mutantes assinápticos (antes do pareamento) e dessinápticos (após o pareamento). Mutantes assinápticos exibem pareamento anormal ou ausência de pareamento dos cromossomos homólogos no paquíteno, enquanto que, os mutantes dessinápticos, não mantêm a associação após sinapse. Os mutantes sinápticos têm origem espontânea em populações naturais, mas podem ser induzidos por mutagênicos ou serem derivados de espécies híbridas. Geralmente são identificados nas gerações segregantes, distinguem das plantas normais por apresentarem somente univalentes

presentes na metáfase I e gametas com número de cromossomos não balanceados o que leva a um alto nível de aborto de pólen e óvulo, bem como à redução da frequência de recombinação (SINGH, 1993).

Conforme revisão de Brown (1972), os mutantes assinápticos de acordo com o fator que induz a sua expressão, podem ser classificados em cinco grupos: (1) observados em espécies híbridas; (2) causados por perda de um par de cromossomos; (3) ocorrentes em organismos apomíticos; (4) induzidos por fatores ambientais e (5) devido à ação de gene ou genes mutados.

Em *Nicotiana sylvestris*, altas temperaturas associadas à baixa umidade, elevaram o número de mutantes assinápticos, enquanto que altas temperaturas associadas a alta umidade diminuíram o número de mutantes. Em centeio, baixas temperaturas elevaram o número de mutantes dessinápticos (SINGH, 1993). Em trigo, a umidade relativa do solo e do ar, influenciam o pareamento e o insuficiente suprimento hídrico aumentou o grau de assinapse. Baixas temperaturas diminuíram o número de mutantes dessinápticos (DEL DUCA, 1976). Estudos têm demonstrado que mutantes dessinápticos podem ser resultado da deficiência de certos íons, (potássio e fósforo), requeridos para sinapse normal, que quando adicionados aumentam o pareamento normal (SINGH, 1993).

Segundo revisão de Bodanese-Zanettini (1982), em mutantes dessinápticos, nos quais o pareamento é normal e completo até o paquíteno, mas a co-orientação de homólogos é interrompida durante o

diplóteno, ocorre a não-disjunção cromossômica. Vários estudos têm mostrado a persistência de vestígios ou fragmentos do complexo sinaptonêmico no diplóteno e metáfase I nesse tipo de anormalidade. O complexo sinaptonêmico faz a coesão das cromátides e, desse modo, regula a manutenção do quiasma e a estrutura bivalente necessária até a anáfase I.

Mutantes meióticos têm sido extensivamente estudados em milho. Os principais tipos e os seus respectivos genes determinantes são: (1) ausência de meiose (ameiotico) (*am1*, *am2*); (2) ausência ou interrupção da sinapse: assináptico (*as*), dessináptico (*dy*, *dy1*, *dy2*), e ausência da primeira divisão (*adf*); (3) mudança da estrutura e organização dos cromossomos: alongação (*el*) e encurtamento (*st*); (4) segregação meiótica inadequada e/ou fuso meiótico defeituoso: divergência dos fusos (*dv*, *ms28*, *ms43*, *mei25*); (5) falhas na citocinese e/ou irregularidades na forma da célula, o que resulta em esterilidade variável (*ms8*, *ms9*); (6) divisões extras seguindo a meiose: polymitose (*po*); (7) mutantes com múltiplas anormalidades na meiose (*pam2*, *ms17*) (SINGH, 1993).

Os mutantes meióticos identificados em batata afetam aspectos do núcleo e citoplasma durante os eventos da micro e megasporogênese. Algumas características chave dos mutantes meióticos são: (1) quase todos os fenótipos destes mutantes são controlados por um único locus; (2) as mutações são invariavelmente recessivas; (3) algumas vezes a característica associada com certo genótipo não se manifesta, isto porque a penetrância não é sempre completa (100%); (4) o número de

meiócitos que expressa o genótipo parental pode variar de 1 a 100%, sendo que expressividade variável é uma regra, e não uma exceção nesses mutantes ; (5) a expressão do fenótipo é significativamente modificada por fatores genéticos, ambientais e de desenvolvimento (PELOQUIN et al, 1999).

Mutantes sinápticos têm sido relatados em espécies dihaplóides de *Solanum phureja* e em haplóides extraídos de uma variedade de batata mexicana tetraplóide, denominada “Atzimba”. Mutantes sinápticos, quando associados a mutantes meióticos podem dar origem a pólen  $2n$  fértil, proporcionando um aumento da heterozigose e epistasia entre as espécies (PELOQUIN et al., 1989).

#### 1.4.1 Mutantes meióticos que afetam a micro e macrosporogênese em batata

Em espécies pertencentes ao gênero *Solanum*, na seqüência normal de eventos da microsporogênese, a primeira divisão meiótica não é seguida de citocinese. Assim, na segunda divisão meiótica, os dois fusos são orientados, um em relação ao outro, num ângulo de  $60^\circ$ , para que seus pólos definam os locais dos quatro núcleos filhos e a citocinese divida a célula em um tetraedro clássico denominado de tétrade, constituída por quatro micrósporos haplóides ( $n$ ) conforme MOK e PELOQUIN (1975b).

Em plantas homozigotas para a mutação meiótica (*ps/ps*), que determina a formação de fusos paralelos, alguns esporócitos têm fusos

paralelos na segunda divisão e, depois da citocinese, são formados dois micrósporos  $2n$ , os quais resultam em gametas  $2n$ . Uma modificação desse fenômeno ocorre quando, na segunda divisão, os fusos são tripolares. Neste caso, é formado um micrósporo  $2n$  e dois  $n$ . Outra mutação recessiva, denominada citocinese prematura ( $pc$ ), também afeta a microsporogênese. Neste caso, em muitos esporócitos ocorre a citocinese na primeira divisão e não ocorre na segunda divisão. Conseqüentemente, formam-se uma díade e dois micrósporos  $2n$ .

O significado das mutações dos alelos  $ps$  e  $pc$  está nas suas conseqüências genéticas. O alelo  $ps$  controla um processo que é essencialmente um mecanismo que leva à restituição da primeira divisão. Todos os loci do centrômero até o primeiro sobre cruzamento (crossing-over) que são heterozigotos nos parentais, são passados para os gametas. Metade dos loci heterozigotos, além do primeiro sobre cruzamento, serão heterozigotos nos gametas. Já a mutação do alelo  $pc$  é geneticamente equivalente ao mecanismo de restituição da segunda divisão. Todos os loci do centrômero até o primeiro sobre cruzamento serão homozigotos nos gametas e todos os loci, após o primeiro sobre cruzamento, se forem heterozigotos nos parentais, serão transferidos para os gametas. Portanto, estima-se que na restituição da primeira divisão, aproximadamente 80% da heterozigose seja transmitida para os gametas, enquanto na restituição da segunda divisão seja transmitida menos de 40% (PELOQUIN et al, 1999).

Um outro tipo de mutação meiótica, denominada sináptica-3 (*sy-3*), foi encontrada em uma progênie originada do cruzamento entre dois clones diplóides *ps/ps*. Esta mutação caracterizou-se por apresentar poucos ou nenhum quiasma. E, em alguns clones *sy-3*, um único univalente estava presente na metáfase I, segregando ao acaso nos núcleos da telófase I. Geralmente, esse fenômeno conduzia para a macho-esterilidade total ou parcial. Entretanto, quando a mutação *sy-3* foi combinada com a mutação *ps*, em genótipo duplo homozigoto *sy-3/sy-3; ps/ps*, o resultado foi a formação, em alta frequência de pólen 2n funcional. Foi também observado que não importa como é distribuição de cromossomos univalentes na primeira divisão, o mecanismo de formação de fusos paralelos durante a segunda divisão garante a incorporação de dois conjuntos de 12 cromossomos em cada par de micrósporos 2n. Esta combinação de mutantes meióticos possibilita que o genótipo, quase intacto, do parental 2x, seja incorporado nos gametas 2n formados (PELOQUIN et al, 1999).

Durante a megasporogênese normal, a primeira e a segunda divisão meióticas são seguidas da citocinese. Como resultado, são formados quatro megásporos n. Três desses megásporos degeneram e um torna-se funcional. Esse, depois de passar por três divisões mitóticas torna-se o gameta feminino.

Em batata, duas mutações meióticas resultam em óvulo 2n. Uma denominada omissão da segunda divisão meiótica (*os*), é o mecanismo predominante na formação de óvulo 2n em espécies

pertencentes ao gênero *Solanum*. Uma segunda mutação foi descrita como falha na citocinese (*fc*) e tem como consequência a fusão nuclear. Essas duas mutações são geneticamente equivalentes ao mecanismo de restituição da segunda divisão. Variantes sinápticos tais como *sy-3* são também expressos na megaesporogênese mas raramente resultam em megásporos  $2n$  funcionais (PELOQUIN et al, 1999).

#### 1.5 Processo de microsporogênese

Os grãos de pólen são células haplóides apresentando, portanto, a metade do patrimônio genético da espécie e desenvolvem-se dentro das anteras. Conforme extensa revisão de Pandolfi (1998), essas são constituídas por células denominadas arqueosporais, que se diferenciam para formar células parietais, originando as paredes da antera, as camadas do tapeto e as células do tecido esporogênico. As células do esporângio, após sucessivas divisões mitóticas, dão origem aos microsporócitos, os quais são comumente denominados de células mãe de pólen (CMP) ou meiócitos. Quando formado um certo número de CMP, as divisões mitóticas cessam e tem início a longa interfase pré-meiótica, ocorrendo então a sincronização das células, antes do início da meiose .

A microsporogênese inicia quando as CMP já envolvidas pela primexina entram na prófase meiótica. A primexina é a primeira camada da parede da CMP, a qual persiste até a fase de tétrade. A primexina é constituída de  $\beta$  1:3 glucano e serve para proteger os micrósporos contra a



desidratação. Apesar de ser formada na prófase meiótica, a primexina pode sofrer modificações estruturais mais tarde, ocasionada pelos fusos da anáfase I e II ou por processos determinados pelo citoplasma das CMP. As CMP estão também conectadas por plasmodesmos durante todo o processo meiótico, ou seja, até a telófase II.

A primexina, que envolve as CMP após a meiose e, portanto, após a formação das tétrades, é digerida pela enzima calase ou  $\beta$  1:3 glucanase, que é liberada pelo tapeto. Após a liberação das tétrades, os micrósporos aumentam rapidamente de tamanho e ocorre a formação de um vacúolo. Os micrósporos, então, orientam-se próximos ao poro da antera e começa o acúmulo de reservas e deposição de esporopolenina sobre a parede para formar o micrósporo maduro. Numa etapa seguinte, após o estágio pré-mitótico (G1, S e G2) relativamente curto, os micrósporos entram numa divisão mitótica que pode durar de horas até meses. Esta divisão resulta na formação de duas células diferentes, a vegetativa e a generativa, separadas por uma membrana plasmática e envolvidas pela parede do micrósporo maduro. Segundo Singh (1993), posteriormente, a célula generativa sofre uma segunda divisão mitótica, produzindo dois núcleos. Nesta fase, os micrósporos, já maduros, recebem a denominação de grãos de pólen ou gametófitos masculinos.

Todo processo meiótico é regulado por um grande número de alelos. A seqüência precisa das etapas envolvidas na meiose eventualmente é interrompida pela ação de alguns alelos mutantes. Tais alelos alteram o comportamento normal dos cromossomos e,

conseqüentemente, os produtos finais da meiose. Existe uma diversidade de alelos mutantes que podem interferir desde a etapa de síntese do DNA no estágio pré-meiótico, até o pós meiótico (SINGH, 1993).

#### 1.5.1. Influência da temperatura

##### 1.5.1.1 Na planta

Conforme extensa revisão de Vayda (1994), a batata é especialmente sensível ao calor e à seca. Mesmo períodos curtos de estresse, se repetidos, podem causar uma queda significativa na produção. Além disso, se houver estresses pós-colheita em relação ao tubérculo, posteriormente, poderá haver drástica redução na produção.

A batata comercial *Solanum tuberosum* L. ssp. *tuberosum* encontra condições de campo ideais para crescimento onde há clima frio e dias longos. O crescimento da planta e, conseqüentemente, a produção e a qualidade do tubérculo são afetados por altas temperaturas e déficit hídrico. A temperatura ótima para a maioria das cultivares está entre 17 e 20°C. O aumento de 5°C, acima dos 20°C, leva a uma diminuição de 25% na taxa de fotossíntese. Períodos prolongados em alta temperatura conduzem ao não desenvolvimento do dossel o que, conseqüentemente, afeta o crescimento do tubérculo. Plantas que sofrem estresse devido a altas temperaturas tuberizam pouco e exibem um contínuo desenvolvimento da folhagem. Como conseqüência, há uma baixa

produção de tubérculos, uma vez que os fotoassimilados são desviados para a parte aérea. Temperaturas acima de 29°C paralizam efetivamente a produção de tubérculos e reduzem o acúmulo de matéria seca.

Em vista dessa realidade, é uma necessidade básica que, nos programas de melhoramento, sejam avaliados germoplasmas para duas características distintas: tolerância da folhagem ao calor e habilidade para formar tubérculos de qualidade, em grandes quantidades, em altas temperaturas. Reynolds e Ewing (1989), demonstraram que essas duas características não estão correlacionadas. Numerosos acessos de espécies de *Solanum* apresentaram folhagem resistente ao calor. Entretanto, apenas um único subconjunto foi hábil em formar tubérculos em altas temperaturas.

O estresse causado por baixas temperaturas têm dois efeitos principais: morte do caule devido à formação de geada e acúmulo de açúcar no tubérculo, que podem também congelar quando em temperaturas muito baixas. Esses são dois fenômenos distintos: um afeta o crescimento da folhagem durante a estação, enquanto o outro é um severo problema que afeta, após a colheita, a qualidade do tubérculo para processamento.

As plantas podem sobreviver em temperaturas acima de  $-3^{\circ}\text{C}$ . Em temperatura de  $-4^{\circ}\text{C}$  ocorre formação de cristais de gelo nos espaços extracelulares dos tecidos da planta causando morte celular.

### 1.5.1.2 Na meiose

Segundo revisão de Bodanese-Zanettini (1982), muitos componentes do processo meiótico podem ser alterados por fatores ambientais. Um mesmo fator pode interferir em diferentes aspectos da meiose. Os efeitos dos fatores ambientais podem ser agrupados em três categorias: (1) aqueles que alteram a duração da meiose; (2) aqueles que alteram a frequência de permuta; (3) aqueles que induzem a outras irregularidades na meiose.

Em plantas, a espécie *Endymion nonscriptus*, cultivada em temperatura constante a cada intervalo de 5°C, na faixa de 0°C a 30°C, mostrou um decréscimo na duração da meiose de 36,0 dias a 0°C para 0,83 dias a 30°C. Em *Triticum aestivum*, a cultivar Chinese Spring submetida a 15, 20 e 25°C teve a duração da meiose estimada em 43, 24 e 18 horas respectivamente, ou seja, apresentando diminuição de duração conforme o aumento de temperatura.

Muitos estudos foram realizados com o objetivo de avaliar os efeitos dos fatores ambientais na frequência de permuta, sendo que a temperatura foi o fator mais amplamente estudado. O efeito dos fatores ambientais na permuta têm sido demonstrados, em vários organismos, pela diferença de taxa de recombinação ou na frequência de meiócitos tratados e não tratados.

Em clones da planta *Endymion nonscriptus*, submetida a temperaturas que variaram de 0° a 30°, com intervalos de 5°C, pelo tempo requerido para desenvolvimento de um ciclo completo da meiose, o

aumento da temperatura resultou num consistente, mas gradual, decréscimo na média de quiasmas. O mesmo ocorreu com outras duas espécies de vegetais testadas. Em plantas de duas linhagens de trigo hexaplóides, mantidas em câmara de crescimento com temperatura constante (21 e 32°C), foi observado que a 32°C houve uma forte redução na frequência de permuta.

Em relação a outras irregularidades meióticas, o fator ambiental mais amplamente estudado também é a temperatura. Ficou demonstrado a partir de vários experimentos realizados em trigo por Utkhede e Jain (1970), revisado por Bodanese-Zanettini (1982), que altas temperaturas levam a um consistente aumento na frequência de univalentes em células mãe de pólen (CMP), tanto em relação à frequência de células afetadas como no número de univalentes por célula. Altas temperaturas induziram diferentes tipos de anomalias nas CMP, tais como: degeneração de cromossomos (perda da estrutura organizada), aderências e micronúcleos. A frequência dessas anomalias variou entre espécies e entre variedades. Em *Tradescantia bracteata* foi registrada a ocorrência de desespiralização cromossômica após tratamentos de temperatura acima de 34°C, e acima de 25°C em *Uvularia perfoliata*. Em *Lolium perene* foi observada a ocorrência de assincronia na condensação cromossômica como resultado do tratamento de temperatura. O mesmo tipo de anomalia também foi observado em *Triticum monococcum* à temperatura de 37°C.

### 1.5.1.3 Na formação de gametas $2n$

Segundo Ramsey e Schemske (1998), a variação na frequência de surgimento de gametas  $2n$  pode ser atribuída a variados graus de penetrância e expressividade dos alelos mutantes e a fatores ambientais tais como: herbívora, ferimentos, doenças, estresse hídrico, nutricional e de temperatura. Em relação à temperatura, esses autores apresentaram dois trabalhos importantes, que mostraram a resposta do pólen não reduzido: (1) em alfafa, foi registrada variação na frequência de formação de pólen  $2n$  em diferentes condições ambientais em casa de vegetação, incluindo variação entre diferentes flores do mesmo clone em um determinado ambiente. Alguns clones produziram mais pólen  $2n$  numa temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$  durante o dia e  $20^{\circ}\text{C}$  à noite em casa de vegetação, enquanto outros, produziram frequência mais alta em câmaras de crescimento em temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$  de dia e  $10^{\circ}\text{C}$  à noite. Em trevo-vermelho, a produção de pólen  $2n$  diminuiu quando as temperaturas aumentaram de 12 para  $25^{\circ}\text{C}$ .

McHALE (1983) analisou o efeito da temperatura na produção de pólen  $2n$  em dez clones de *S. phureja*. Com o objetivo de verificar o efeito do ambiente em relação à frequência e estabilidade fenotípica na produção de pólen  $2n$ , durante dois anos consecutivos foram conduzidos dois experimentos. No experimento 1 (E1), foi avaliada a frequência de pólen  $2n$  em plantas cultivadas a campo, com temperatura que variou entre  $8$  a  $22^{\circ}\text{C}$  e, no experimento 2 (E2), em casa de vegetação com temperatura que variou entre  $14$  a  $40^{\circ}\text{C}$ . A frequência total de pólen  $2n$  no

E1 foi bastante alta nos dois anos, resultando numa de média 76 e 80%, enquanto no E2 a média foi de 35 e 27%. A análise citológica dos botões florais revelou que os mecanismos de restituição: (*fs*) *fused spindles*; (*tps*) *tripolar spindles*) ocorreram em ambos os ambientes (E1 e E2), porém foi observado no E1 que em condições favoráveis o mecanismo predominante é o *fs* (75-100%), enquanto que o mecanismo *tps* foi bastante reduzido. Os genes *fs* e *tps* são diferentes manifestações de um único mecanismo, sendo que o *tps* representa uma forma fraca, que ocorre unicamente em condições desfavoráveis (VEILLEUX et al., 1982 revisado por McHALE, 1983).

Mchale (1983), considera, como hipótese, que mutantes expressando *fs* são homozigotos para um alelo defeituoso que causa atraso na formação ou na ação do fuso, sendo que baixas temperaturas aumentariam a expressão desse alelo defeituoso. O autor ressalta a necessidade de pesquisas com o objetivo de elucidar a base genética da expressão do *fs* em ambientes frios. A expressão variável em condições de frio pode ser uma evidência de que diferentes alelos recessivos controlam esse caráter, ou de que há influência de vários genes, devido aos diferentes conjuntos genéticos encontrados.

A pesquisa referida anteriormente oportunizou a distinção entre fenótipos estáveis e variáveis. Segundo o autor, a instabilidade fenotípica em uma variedade de ambientes tem retardado o progresso do uso de gametas  $2n$  como rotina para fins de desenvolvimento de cultivares. Somente a expressão consistente em ambiente a campo, irá

gerar oportunidade de introdução desse gene mutante segregando dentro de uma grande população na busca de plantas agronomicamente superiores produtoras de pólen  $2n$ .

## II MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Origem do material vegetal

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo (UPF), no período de abril de 2004 a maio de 2007.

O material vegetal avaliado constituiu-se de plantas do gênero *Solanum*, sendo dois clones diplóides e um tetraplóide. Os clones diplóides foram DLB1-140 e DLB1-150, ambos resistentes à requeima e fornecidos pelo Prof. Dr. Dilson Bisognin, coordenador do Programa de Melhoramento da Batata do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria. O material tetraplóide foi a cultivar Atlantic, cujos tubérculos foram fornecidos pela Prof<sup>a</sup>. MSc. Lizete Augustin, coordenadora do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da UPF.

Os clones diplóides são oriundos do cruzamento do clone MSA133-57  $\times$  PI595511-5 (BISOGNIN et al., 2005).



## 2.2 Cultivo do material vegetal

Os tubérculos dos clones diplóides e da cultivar Atlantic foram plantados em floreiras (capacidade  $0,012\text{m}^3$ ) contendo substrato comercial Plantmax Floreira® e casca de arroz carbonizada na proporção 1:1. Foram plantados 10 tubérculos de cada clone, sendo 2 em cada floreira.

As plantas foram cultivadas em câmara de crescimento sob condições de temperatura e fotoperíodo controlados e o fornecimento de luz artificial foi propiciado por lâmpadas fluorescentes e incandescentes. Durante a fase vegetativa as plantas cresceram sob temperatura de  $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 16 horas. As plantas receberam tratos culturais de acordo com as recomendações para a cultura.

No momento em que as plantas iniciavam a formação dos primeiros primórdios dos botões florais, sinalizando portanto a passagem para a fase reprodutiva, eram imediatamente transferidas para outra câmara de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e temperaturas de 10, 15, 20, 25, 30 e  $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ , as quais constituíram os tratamentos. Em cada tratamento, foram cultivadas 30 plantas, 10 de cada genótipo, totalizando portanto, 180 plantas.

Tanto na câmara de crescimento a  $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ , quanto na câmara com temperaturas específicas referentes aos tratamentos, as floreiras foram dispostas num delineamento experimental completamente

casualizado, com 10 repetições para cada clone, sendo cada planta uma unidade experimental.

### 2.3 Análise dos grãos de pólen

Para a análise dos grãos de pólen foram coletadas flores completamente abertas. Nas temperaturas em que houve florescimento, o número de flores coletadas por planta foi bastante variável (de uma flor até no máximo 10 flores) na primeira florada. Após a coleta, as flores foram fixadas, em Carnoy (3 álcool absoluto: 1 ácido acético glacial) e mantidas em temperatura ambiente por 2 horas sendo, depois estocadas no congelador. Antes da análise microscópica o material foi transferido para outro recipiente contendo álcool 70% e mantido em refrigerador.

De cada amostra armazenada foi retirada uma flor ao acaso e desta, uma antera para análise microscópica. Para cada tratamento foram retiradas 10 anteras, sendo cada antera considerada uma repetição. Foram analisados 1000 grãos por antera, tanto dos clones diplóides, como do material tetraplóide. Em relação aos clones diplóides foram avaliados: (1) número de grãos normais (corados) e o respectivo tamanho, a fim de quantificar o percentual de pólen  $2n$  presente na amostra e (2) número de grãos vazios (não corados). Na cultivar Atlantic foi avaliado apenas o número de grãos corados e o número de grãos vazios.

A técnica básica para análise e quantificação dos grãos de pólen constou das seguintes etapas: (1) foi escolhida uma flor ao acaso e

uma antera foi retirada com auxílio de pinças; (2) a antera foi colocada sobre uma lâmina e esmagada em gota de carmin acético 2%, para liberação dos grãos de pólen; (3) foi depositada uma lamínula sobre o material e (4) foi feita a vedação da lamínula com luto (cera de abelha e breu em proporção 1:1). A análise em microscópio óptico foi feita em aumento de 400X e realizaram-se registros fotográficos utilizando o programa Pixel View1 de captação de imagens.

Os dados foram submetidos a análise descritiva, incluindo desvio padrão e, aplicado o teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade de erro para comparar diferentes classes de pólen e de temperatura. O teste de Wilcoxon a 5% de probabilidade de erro foi utilizado para comparar clones dentro de uma mesma classe de pólen e de temperatura. Para tanto utilizou-se o programa SPSS versão 10.

## III RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Reação das plantas aos tratamentos

Tanto na temperatura de 10°C quanto na temperatura de 35°C ocorreu abortamento dos botões florais. Na temperatura mais baixa (10°C), as plantas tiveram seu crescimento afetado. Os primórdios dos botões florais existentes foram abortados alguns dias após a transferência das plantas para a câmara a 10°C e não houve formação de novos botões.

O clone DLB1-150 não apresentou nenhum tipo de dano foliar causado pelo frio (Figura 2). Entretanto, nas plantas da cultivar Atlantic ocorreu descoloração (amarelamento), enquanto que nas plantas do clone DLB1-140, além da descoloração ocorreram lesões devido ao estresse por frio (Figura 3). Apesar das reações descritas, as plantas dos três clones formaram tubérculos, porém com formato alongado.

O estresse por frio em plantas leva a uma série de alterações fisiológicas, tais como a redução da absorção de água e nutrientes, translocação mais lenta de carboidratos, inibição da fotossíntese, queda da taxa respiratória, inibição da síntese de proteínas e aumento da degradação das proteínas, fazendo com que o crescimento da planta seja lento (KLUGE, 2007).

Na temperatura de 35°C ocorreu abortamento dos primórdios dos botões florais, alongamento dos internós e maior crescimento da parte aérea. Nos clones DLB1-140 e DLB1-150 (Figura 4) as plantas apresentaram aspecto de desidratação foliar e dossel pouco desenvolvido. Já na cultivar Atlantic, além dos sintomas já mencionados, ocorreu clorose e queima folhar. As plantas de todos os genótipos apresentaram sistema radicular pouco desenvolvido e ausência de tuberização. Estes resultados corroboram com as informações de Vayda (1994), já citadas anteriormente no item 1.5.1.1.

Na temperatura de 30°C, as plantas da cultivar Atlantic apresentaram abortamento dos poucos botões florais formados e sintomas semelhantes aos do tratamento 35°C, exceto clorose e queima folhar (Figura 5). As plantas dos clones DLB1-140 (Figura 6) e DLB1-150 apresentaram desenvolvimento contínuo da folhagem, alongamento dos entrenós e dossel pouco desenvolvido. Apesar disso, houve florescimento, o que possibilitou a análise dos grãos de pólen (Figura 7).

Nas temperaturas de 15, 20 e 25°C, todos os clones floresceram e foi possível a análise dos grãos de pólen (Figuras 8, 9 e 10).



durante  
7.

Figura 3. Clone DLB1-140 submetido a temperatura de 10°C durante a microsporogênese (amarelamento e lesões folhares) – Passo Fundo, FAMV/UPF,2007.



Figura

35°C durante  
2007.

Figura 5. Cultivar Atlantic submetida a temperatura de 30°C durante a microsporogênese, – Passo Fundo, FAMV/UPF, 2007.



Figura 6. Clone DLB1-140 submetido a temperatura de 30°C durante a microsporogênese, – Passo Fundo,



Figura 7. Inflorescência do clone DLB1-140 submetido a temperatura de 30°C durante a microsporogênese – Passo Fundo, FAMV/UPF, 2007.





Figura 8.

submetido a  
Passo Fundo,

Figura 9. Inflorescência da cultivar Atlantic submetida a temperatura de 20°C durante a microsporogênese – Passo Fundo, FAMV/UPF, 2007.



Figura 10. Clones DLB1-140 e DLB1-150 submetidos a temperatura de 25°C durante a microsporogênese – Passo Fundo, FAMV/UPF, 2007.

### 3.2 Tamanhos de grãos de pólen nos clones diplóides DLB1-140 e DLB1-150

Em todos os tratamentos em que houve florescimento (15, 20, 25 e 30°C), foram classificados como normais os pólenes corados cujo diâmetro foi de 20.0 $\mu$ m (Figura 11). Os resultados detalhados, por antera e tratamento, em cada clone, podem ser visualizados nos Apêndices A até H, que mostram as freqüências em porcentagens dos diferentes tipos e tamanhos de pólenes observados. O diâmetro mínimo encontrado nas análises efetuadas foi de 12,5 $\mu$ m, e o diâmetro máximo foi de 30,0 $\mu$ m, tendo também sido encontrados pólenes com diâmetro de 22,5 $\mu$ m, 25,0 $\mu$ m e 27,5 $\mu$ m. O grau de dispersão dos valores observados quanto a freqüências de grãos de pólen com 25.0 $\mu$ m, 27,5 $\mu$ m e 30.0 $\mu$ m de

diâmetro, de cada clone, nos quatro tratamentos podem ser melhor visualizados através das Figuras 12, 13 e 14.

Pólens medindo 25,0 $\mu$ m e 27,5 $\mu$ m ocorreram nas temperaturas 15, 20 e 25° no clone DLB1-140 e nos tratamentos 15 e 20°C no clone DLB1-150 (Tabela 1). O clone DLB1-150 apresentou maior frequência de grãos de pólen com 25,0 $\mu$ m e 27,5 $\mu$ m na temperatura de 15°C. À medida que aumentou a temperatura diminuiu a frequência de grãos de pólen maiores que o normal, principalmente de 25,0 $\mu$ m (Figura 11), sendo que a 30°C, foram encontrados apenas grãos de pólen normais (20,0 $\mu$ m) e vazios. Em geral, o clone DLB1-140 produziu pólen com diâmetro maior que 22,5 $\mu$ m, independente do tratamento. Isto é indicação de que esse clone possui maior aptidão para formar gametas não reduzidos.

Tabela 1. Porcentagem dos tipos e tamanhos de grãos de pólen nos clones diplóides DLB1-140 e DLB1-150, submetidos a diferentes temperaturas durante a microsporogênese – Passo Fundo, FAMV/UPF, 2007.

DLB1-140	Temperaturas °C			
	15	20	25	30
<i>Grãos de pólen</i>				
Normal *	B58,73 ± 7,6 b	A77,35 ± 4,66 a	A69,44 ± 11,32 b	A47,18 ± 12,25c
Vazio	B8,84 ± 7,08a	B12,33 ± 3,52b	B12,01 ± 2,95b	B45,38 ± 11,95c
22,5 mμ	A30,70 ± 5,00a	A8,94 ± 3,48bc	A15,34 ± 10,92b	A6,30 ± 4,62c
25,0 mμ	A1,20 ± 0,89ab	A0,75 ± 0,51b	A2,81 ± 3,18a	A1,14 ± 1,33ab
27,5 mμ	A0,31 ± 0,21a	A0,49 ± 0,55a	A0,27 ± 0,27ab	A0,00 ± 0,00c
30,0 mμ	A0,22 ± 0,35a	A0,14 ± 0,11ab	A0,22 ± 0,23b	A0,00 ± 0,00b
DLB1-150	Temperaturas °C			
	15	20	25	30
<i>Grãos de Pólen</i>				
Normal *	A70,09 ± 10,03a	B69,80 ± 3,43a	B41,52 ± 19,90b	B11,08 ± 8,84c
Vazio	A20,51 ± 3,57a	A25,18 ± 4,88a	A58,48 ± 19,90b	A87,06 ± 7,82c
22,5 mμ	B7,65 ± 6,91a	B4,70 ± 3,03ab	B0,00 ± 0,00c	B1,31 ± 1,38bc
25,0 mμ	A1,72 ± 3,27a	B0,16 ± 0,08bc	B0,00 ± 0,00c	A0,54 ± 1,01b
27,5mμ	B0,03 ± 0,07b	A0,13 ± 0,13a	B0,00 ± 0,00 b	A0,01 ± 0,03b
30,0 mμ	B0,01 ± 0,03a	B0,03 ± 0,07a	B0,00 ± 0,00a	A0,00 ± 0,00a

\* Pólen normal ( 20μm)

- Médias seguidas da mesma letra minúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade.

- Médias antecedidas de mesma letra maiúscula, na coluna, comparam clones dentro de uma mesma classe de pólen e de temperatura, pelo teste de Wilcoxon a 5% de probabilidade.

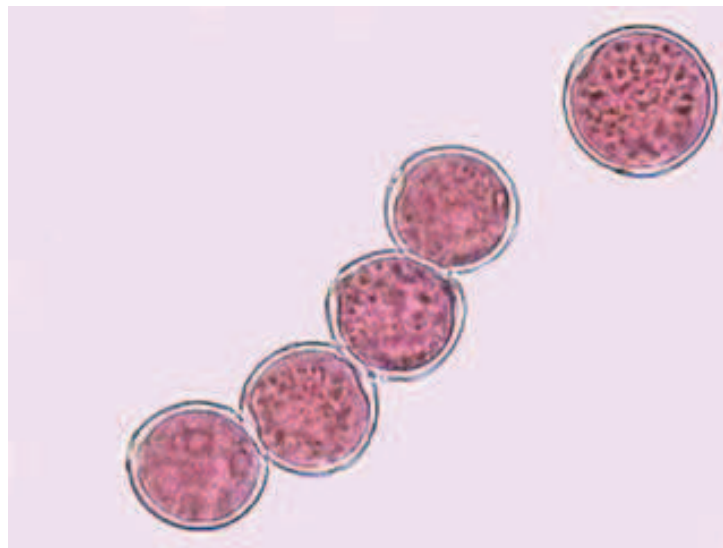


Figura 11. Grãos de pólen normais, considerados viáveis : quatro com  $20,0\mu$  e um com  $25,0\mu$  de  $\varnothing$ (acima à direita), do clone DLB1-140 (400X) – Passo Fundo, FAMV/UPF, 2007.

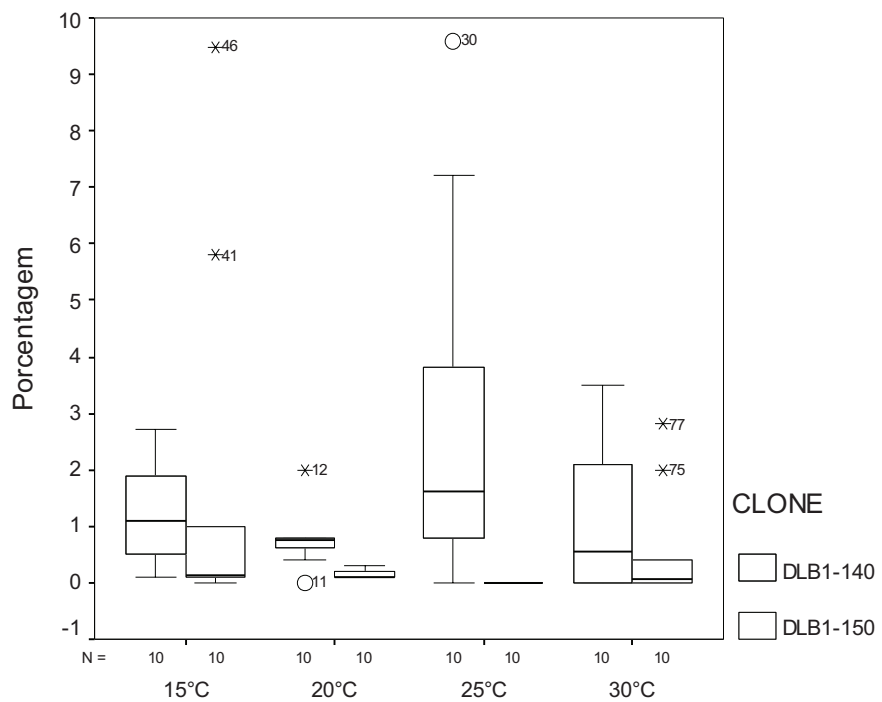


Figura 12. Dispersão dos valores percentuais de grãos de pólen com 25,0μm de Ø nos clones diplóides DLB1-140 e DLB1-150, submetidos a quatro temperaturas durante a microsporogênese – Passo Fundo, FAMV/UPF, 2007.

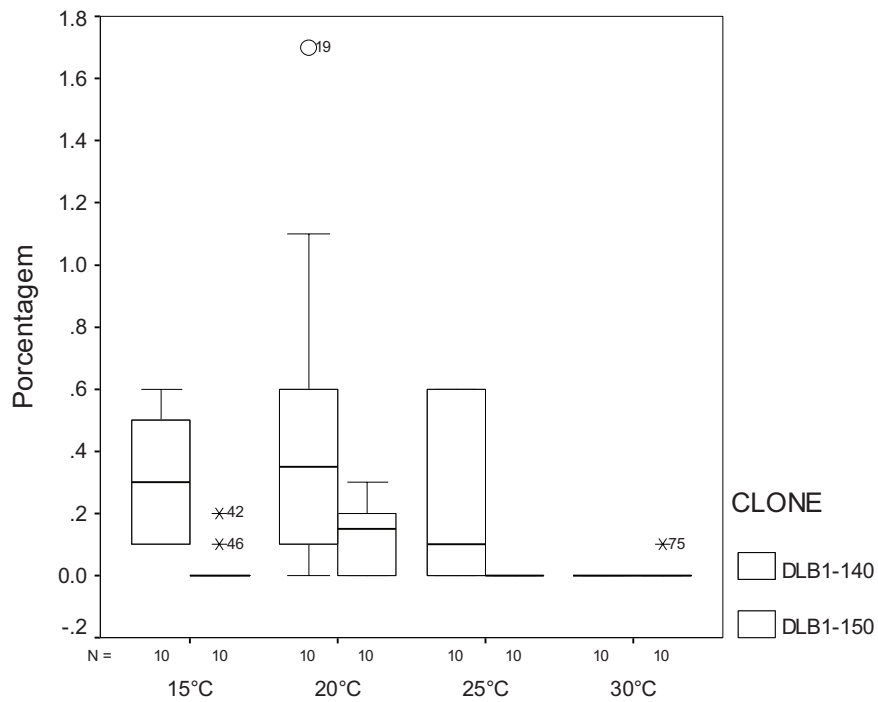


Figura 13. Dispersão dos valores percentuais de grãos de pólen com 27,5µm de Ø nos clones diplóides DLB1-140 e DLB1-150, submetidos a quatro temperaturas durante a microsporogênese – Passo Fundo, FAMV/UPF, 2007.

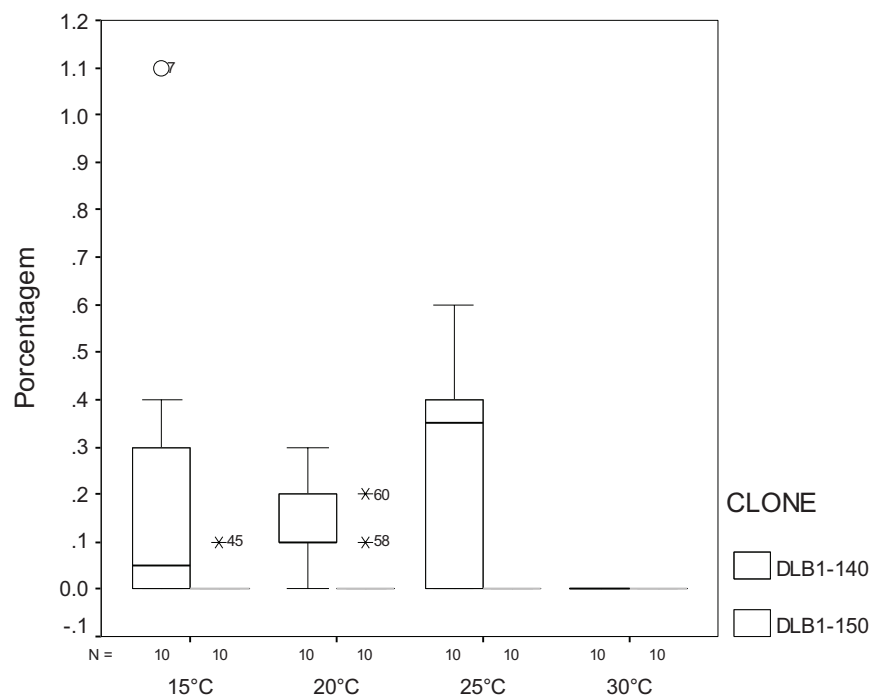


Figura 14. Dispersão dos valores percentuais de grãos de pólen com 30,0 $\mu$ m de  $\varnothing$  nos clones diplóides DLB1-140 e DLB1-150, submetidos a quatro temperaturas durante a microsporogênese – Passo Fundo, FAMV/UPF, 2007.

### 3.2.1 Grãos de pólen normais e vazios nos clones diplóides DLB1-140 e DLB1-150

Com relação à frequência de grãos de pólen normais produzidos pelos clones diplóides em cada tratamento, também houve variação. O clone DLB1-140 apresentou maior frequência de pólen



normais (77,35%) a 20°C e menor (47,18%) a 30°C. O clone DLB1-150 apresentou a maior frequência de pólen normais (70,1%) na temperatura de 15°C e a menor (11,1%) na temperatura de 30°C (Tabela 1). À medida que a temperatura aumentou houve diminuição nas frequências de pólen viáveis e, conseqüentemente, aumento da esterilidade (grãos de pólen vazios) (Figura 17). O grau de dispersão dos valores observados quanto à frequências de grãos de pólen normais e vazios, de cada clone, nas quatro temperaturas podem ser melhor visualizados através das Figuras 15 e 16.

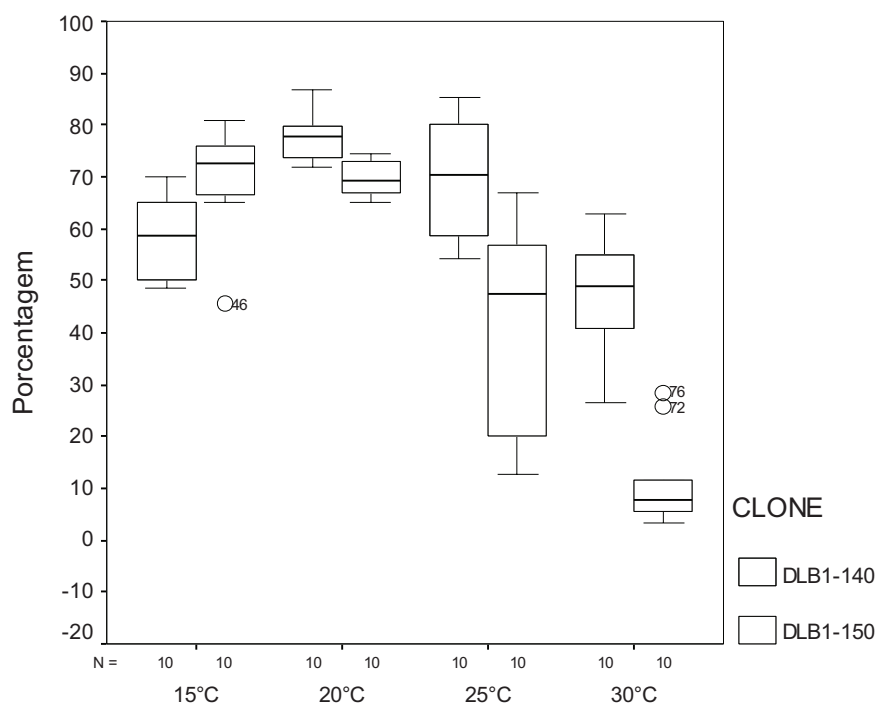


Figura 15. Dispersão dos valores percentuais de grãos de pólen normais nos clones diplóides DLB1-140 e DLB1-150, submetidos a quatro temperaturas durante a microsporogênese – Passo Fundo, FAMV/UPF, 2007.

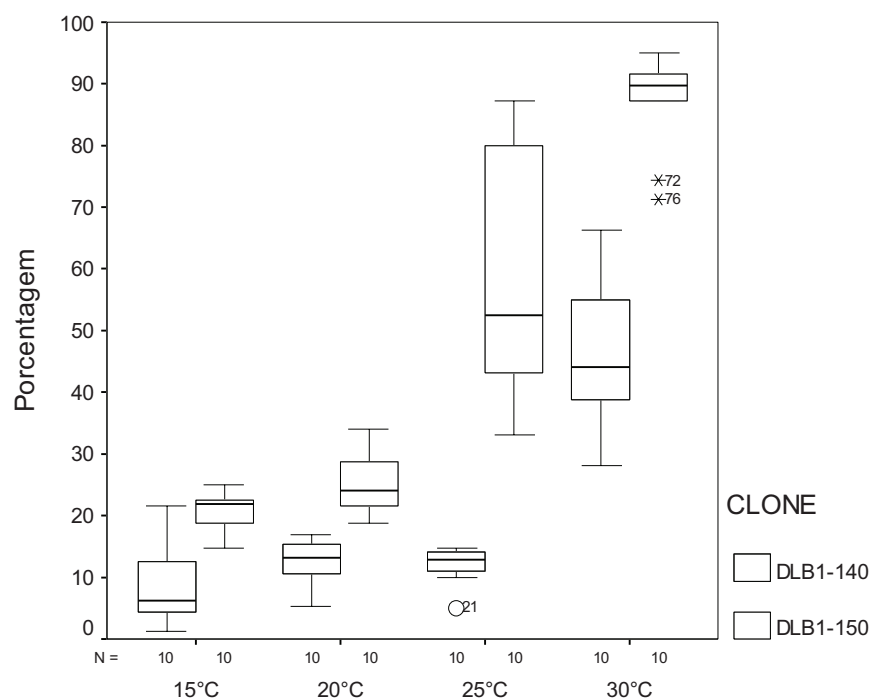


Figura 16. Dispersão dos valores percentuais de grãos vazios nos clones diplóides DLB1-140 e DLB1-150, submetidos a quatro temperaturas durante a microsporogênese – Passo Fundo, FAMV/UPF, 2007.

O clone DLB1-150 parece ser mais suscetível a altas temperaturas em comparação com o clone DLB1-140. A 30°C, o primeiro apresentou 11,08 % de pólen viável e 87,06 % de grãos de pólen vazios, enquanto no segundo ocorreu 47,18 % e 45,38 %, respectivamente. É

sabido que altas temperaturas induzem diferentes tipos de anomalias no processo meiótico. Ficou comprovado, a partir de diversos estudos em plantas, que nas células mães de pólen pode ocorrer degeneração de cromossomos, aderências, formação de micronúcleos, desespiralização cromossômica e assincronia na condensação cromossômica. Embora nesta pesquisa não tenha sido investigado o processo meiótico, é evidente que ocorreu algum tipo ou tipos de anormalidade e, que o grau de tolerância a estresses, no caso da alta temperatura, parece ser dependente do clone.

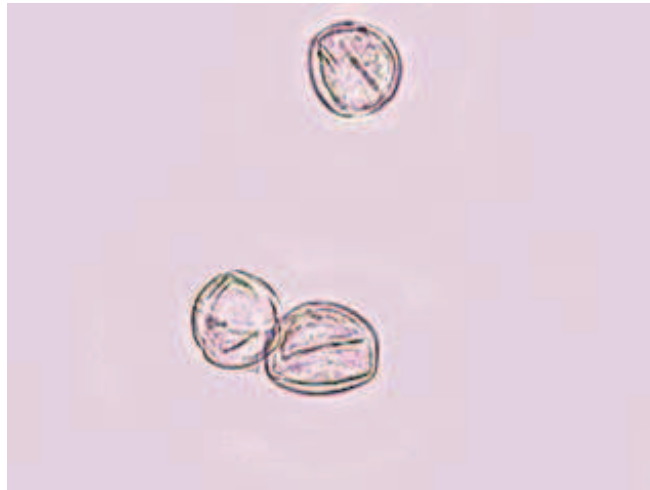


Figura 17. Grãos de pólen vazios do clone DLB1-150 a 30°C (1000X) – Passo Fundo, FAMV/UPF, 2007.

Segundo Pandolfi (1998), em 1994, Mendes fez uma extensa revisão sobre viabilidade dos grãos de pólen de *Solanum* spp, abrangendo 31 trabalhos publicados desde 1953, nos quais são discutidos o diâmetro e a viabilidade do pólen de mais de 100 espécies e híbridos. Com base

nesses trabalhos os diâmetros médios das espécies e híbridos diplóides apresentaram de 17,55 a 30,40 $\mu$ m, os tetraplóides de 22,10 a 32,92  $\mu$ m e os hexaplóides de 22,67 a 30,38 $\mu$ m. Os híbridos de espécies triplóides apresentaram diâmetro semelhante aos diplóides (16,50 a 28,58 $\mu$ m). Pandolfi (1998) e Tomé (2004) citam o trabalho de Tarn & Hawkes (1986), que relatam ser o diâmetro das subespécies *commersoni* e *malmeanum* de 21,30 e 23,20 $\mu$ m respectivamente. Pandolfi (1998), em seu trabalho de pesquisa mediu grãos de pólen de espécies *Solanum* e considerou pequenos os grãos que mediram de 7,50 a 10,00 $\mu$ m, médios os que mediram de 15,00 a 17,50 $\mu$ m e grandes os que mediram de 20,0 a 22,50 $\mu$ m. Erdtman revisado por Fahn (1990), classificou os grãos de pólen de *Solanum* spp de acordo com o seu tamanho em perminuta se o diâmetro fosse inferior a 10,0 $\mu$ m; minuta se o diâmetro fosse de 10,0 a 25 $\mu$ m; média, de 25 a 50 $\mu$ m; magna de 50 a 100 $\mu$ m; permagna de 100 a 200 $\mu$ m e gigante, se o diâmetro fosse maior que 200 $\mu$ m. Mendes (1994), verificou que em espécies diplóides, triplóides, hexaplóides e pentaplóides de *Solanum* spp., os grãos de pólen estão nas classes minuta e média, por apresentarem diâmetro médio de 16,50 a 34,77 $\mu$ m (revisão de TOMÉ,2004).

### 3.2.2 Grãos de pólen com 22,5 $\mu$ m de diâmetro

Nos dois clones avaliados houve uma variação maior na frequência de grãos de pólen medindo 22,5 $\mu$ m de diâmetro quando

comparado com a variação de grãos de pólen com diâmetro maior (25,0; 27,5 e 30,0 $\mu$ ). Houve maior produção de pólen com 22,5 $\mu$ , sendo a média de 30,70% para o clone DLB1-140 e 7,65% para o clone DLB1-150 na temperatura de 15°C (Tabela 2). O grau de dispersão dos valores observados quanto a freqüências de grãos de pólen com 22,5 $\mu$  de diâmetro, de cada clone, nas quatro temperaturas, pode ser melhor visualizado através da Figura 19. Na Figura 18, é possível visualizar a diferença de tamanho entre o pólen normal 20,0 $\mu$  e o pólen com 22,5 $\mu$  de diâmetro.

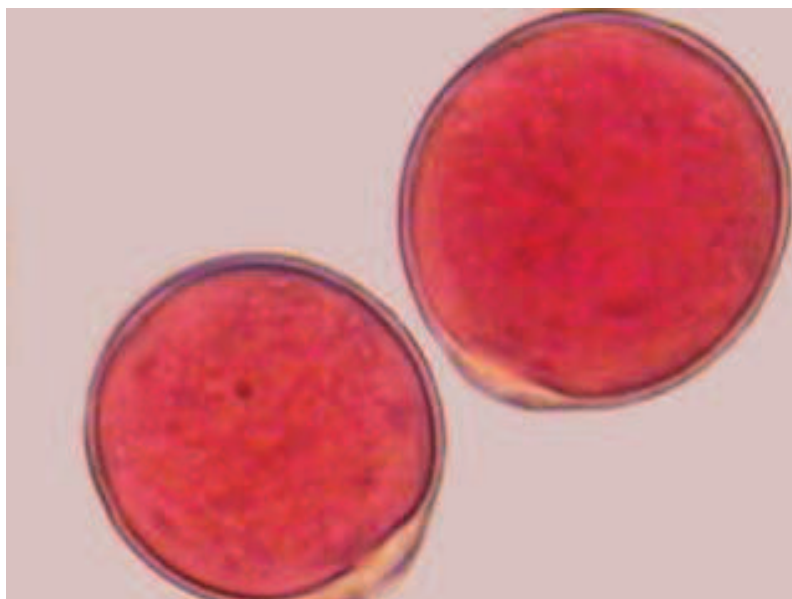


Figura 18. Pólen normal com 20,0 $\mu$  e pólen com 22,5 $\mu$  de  $\varnothing$  ampliados 1000x do clone DLB1-150 a 15°C – Passo Fundo, FAMV/UPF, 2007.

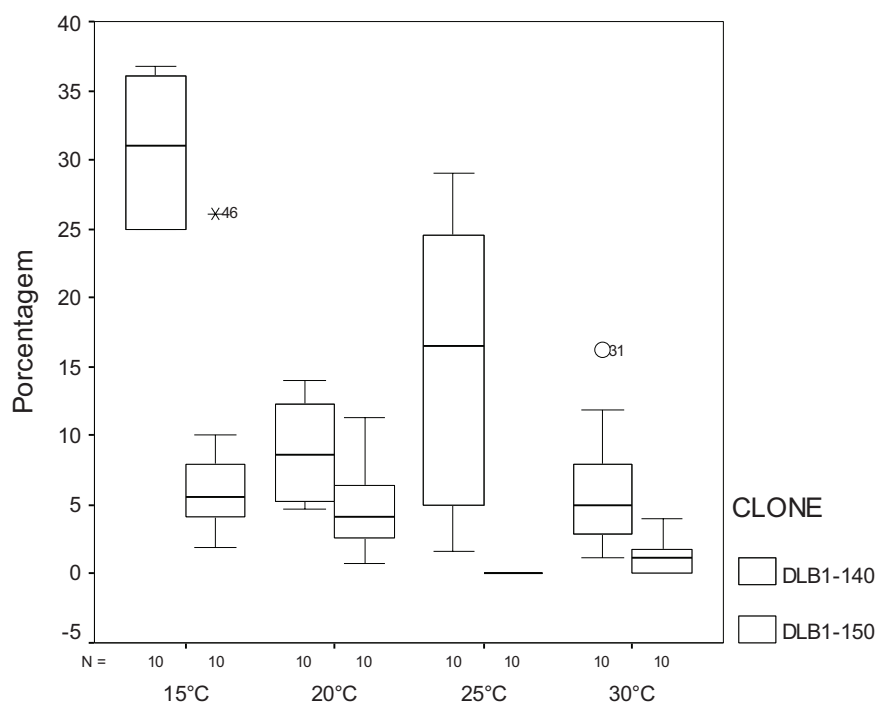


Figura 19. Dispersão dos valores percentuais de grãos de pólen com  $22,5\mu\text{m}$  de  $\emptyset$  nos clones diplóides DLB1-140 e DLB1-150, submetidos a quatro temperaturas durante a microsporogênese – Passo Fundo, FAMV/UPF, 2007.

Embora os grãos de pólen com  $22,5\mu\text{m}$  sejam apenas 12,5% maiores que o pólen normal, que mede  $20,0\mu\text{m}$ , a hipótese de que ele seja não reduzido não pode ser descartada. Segundo o trabalho de Bisognin et al. (2005), o clone DLB1-150 foi utilizado para poliploidização unilateral

com objetivo de introduzir genes de resistência a requeima para a batata cultivada. O cruzamento foi viável, havendo formação de sementes provando que o clone DLB1-150 foi doador de pólen 2n. Portanto, o resultado desse cruzamento indica que o clone DLB1-150 é produtor de pólen 2n. Tendo, ambos os clones, DLB1-140 e DLB1-150, a mesma genealogia, existe, como hipótese, a possibilidade de o clone DLB1-140 também ser produtor de pólen 2n.

Os resultados obtidos por Bisognin et al (2005), reforçam esta hipótese, uma vez que o clone DLB1-150, nesta pesquisa, não produziu pólen com diâmetro superior a 20,0 $\mu$ m quando submetido a temperatura de 25°C. Entretanto, na temperatura de 15°C produziu 7,65% de pólen com 22,5 $\mu$ m, e a 20°C produziu 4,70%. Já o clone DLB1-140 produziu maior quantidade de pólen com diâmetro de 22,5 $\mu$ m em todos os tratamentos quando comparado com o clone DLB1-150 (Tabela 2).

Tabela 2. Frequências dos pólenes com 22,5 $\mu$ m de  $\emptyset$  nos clones diplóides submetidos a quatro temperaturas durante a microesporogênese - Passo Fundo, FAMV/UPF, 2007

Temperatura °C	DLB1-140	DLB1-150
15	30,70 $\pm$ 5,00 a	7,65 $\pm$ 6,91 a
20	8,94 $\pm$ 3,48 bc	4,70 $\pm$ 3,03 ab
25	15,34 $\pm$ 10,92 b	0,00 $\pm$ 0,00 c
30	6,30 $\pm$ 4,62 c	1,31 $\pm$ 1,38 bc

- Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade

Os resultados obtidos coincidem com os de McHALLE (1983), que ao avaliar a influência do ambiente na formação de pólen 2n em *S. phureja*, observou que temperaturas mais baixas favoreceram a formação de pólen 2n. Já em temperaturas mais altas, alguns clones mostraram um abrupto declínio na frequência de eventos citológicos, no caso, fusos fundidos, que levam à formação de pólen 2n.

Segundo revisão de Ramsey e Schemske (1998), os grãos de pólen não reduzidos podem ser identificados pelo tamanho e eles tipicamente apresentam diâmetro 30 – 40% maior que o pólen reduzido. Quinn et al (1974) e Ramanna (1974) revisados por Tomé (2004), estipularam 25,0 $\mu$ m como valor mínimo de corte para determinação de pólen não reduzidos.

Entretanto, segundo Tomé (2004), este valor limite entre grãos de pólen reduzidos e não reduzidos pode ser questionado uma vez que tal limite é incapaz de detectar não redução em espécies cujos grãos de pólen tenham dimensões menores. A autora ainda acrescenta em suas conclusões, que um novo valor limite deve ser proposto para determinação de pólen não reduzidos.

Conicella et al (2003) investigaram a ocorrência de anormalidades no citoesqueleto microtubular e relação com a formação de pólen 2n em batata, através de imunofluorescência e por técnicas citogenéticas tradicionais. Analisaram clones diplóides híbridos produtores de altas frequências de pólen 2n, resultantes de diferentes mecanismos de restituição nuclear (fusos paralelos, fusos fundidos e



citocinese prematura). Baseados na análise efetuada, os autores reinterpretam os mecanismos de restituição que acontecem após as anormalidades do fuso. Segundo eles, no clone em que ocorriam fusos fundidos ocorre a fusão dos núcleos na prófase II; no clone com fusos paralelos o arranjo do citoesqueleto sem fuso na telófase II determina díades e tríades; já no clone com citocinese prematura efetivamente ocorre um fragmoplasto prematuro no final da meiose I. Além disso, clones altamente dessinápticos mostraram alto grau de fertilidade masculina restaurada através de mecanismos de restituição nuclear.

Para a continuidade das pesquisas iniciadas neste trabalho, sugere-se a mesma linha de investigação sobre os mecanismos de não restituição, o que poderá explicar as variações aqui encontradas, quanto à ocorrência de pólenes  $2n$  nas diferentes temperaturas. A alternativa mais adequada para verificar o nível de ploidia dos grãos de pólen de diferentes tamanhos é a citometria de fluxo, que possibilita a quantificação do DNA e, conseqüentemente, o nível de ploidia dos gametas.

### 3.3 Cultivar Atlantic

Os resultados detalhados, por antera e por tratamento, podem ser visualizados no Apêndice I, que mostra as frequências em porcentagens dos pólenes normais e vazios, obtidos de 10 anteras analisadas em cada tratamento, sendo 1.000 grãos por antera.

A cultivar Atlantic se mostrou sensível a altas temperaturas de acordo com os dados obtidos neste experimento (Tabela 3). Quando

submetida a 30°C durante a fase reprodutiva houve abortamento dos botões florais recém formados. A 25°C houve florescimento, mas o grau de esterilidade foi muito alto. Houve um abrupto declínio da frequência de polens normais, todos com diâmetro de 25,0µm e elevado aumento da frequência de polens vazios (Figura 20). O grau de dispersão dos valores observados quanto a frequências de grãos de pólen normais e vazios, nas três temperaturas, pode ser melhor visualizado através da Figura 21.

Tabela 3. Frequência dos pólenes estéreis e viáveis da cultivar Atlantic submetida a três temperaturas durante a microsporogênese conforme o tipo – Passo fundo, FAMV/UPF, 2007

Pólen	15°C	20°C	25°C
Normal *	43,53 ± 11,99 a	50,16 ± 15,95 a	2,11 ± 1,58 b
Vazio	56,47 ± 11,99 a	49,84 ± 15,95 a	97,89 ± 1,58 b

\* Diâmetro do pólen: 25,0µm

Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Kruskal - Wallis a 5% de probabilidade



Figura 20. Pólen vazios da cultivar Atlântic e pólen normal com 25 $\mu$  a 15°C, ampliados 400x – Passo Fundo, FAMV/UPF,2007.

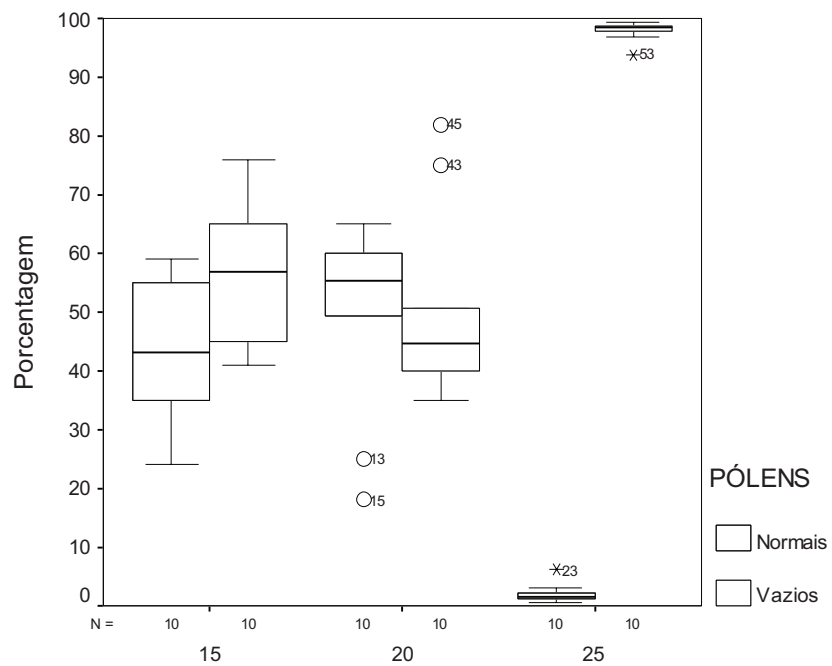


Figura 21. Dispersão dos valores percentuais de grãos normais e vazios da cultivar Atlantic submetida a três temperaturas durante a microsporogênese – Passo Fundo, FAMV/UPF, 2007.

## IV CONCLUSÕES

Neste experimento, temperaturas de 10°C e 35°C durante o florescimento, em condições controladas, levaram ao abortamento dos primórdios dos botões florais nos clones diplóides e a morte das plantas na cultivar Atlantic.

Os clones diplóides diferiram entre si quanto ao grau de esterilidade causado pelo estresse pelas temperaturas mais elevadas. O clone DLB1-150 foi mais sensível às altas temperaturas, enquanto o DLB1-140 mostrou menor grau de esterilidade nos diversos tratamentos.

O clone DLB1-140 produziu maior quantidade de grãos de pólen com diâmetro superior a 20.0 $\mu$ m em todas as temperaturas e tendência a produzir grãos de pólen com diâmetro  $\geq$  a 22.5 $\mu$ m independente do tratamento o que mostra maior aptidão para formar gametas não reduzidos e mais indicado para os cruzamentos visando a poliploidização sexual.

A 25°C a cultivar Atlantic teve seu processo de microsporogênese severamente afetado. Houve um abrupto declínio da frequência de pólenes normais e elevado aumento da frequência de pólenes vazios o que permite a recomendação de utilização de temperaturas mais baixas para a realização dos cruzamentos nos programas de melhoramento da batata cultivada comercialmente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; LEWIS, D. B. J.; ROBERTS, M. R. K.; WATSON, J. D. *Biologia Molecular da Célula*. 3 ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.

BISOGNIN, D. A. Melhoria da batata para resistência às doenças. In: PEREIRA, A. S.; DANIELS, J. O cultivo da batata na região sul do Brasil. *Embrapa Clima Temperado*. – Brasília, D.F.: Embrapa Informação Tecnológica. p. 125 – 142. 2003.

BISOGNIN, D. A.; DOUCHES, D.S.; BUSZKA, L.; BRYAN, G.; WANG, D. Mapping Late Blight Resistance in *Solanum microdontum* Bitter. *Crop Science*, v.45, p.340-345, 2005.

BODANEZE-ZANETTINI, M. H. Comportamento meiótico em cultivares de trigo submetidas a diferentes condições ambientais. Porto Alegre, 213p. (Dissertação: Doutorado em Ciências, UFRGS) Porto Alegre, 1982.

BODANESE-ZANETTI, M. H.; MORAES-FERNANDES, M. I. B.; SALZANO, F. M. Citogenetic studies in two brazilian wheat cultivar under natural and controlled temperature conditions. *Rev. Bras. Bio.* v. 3963 p. 551-557. 1979.

BRAMMER, S. P. A citogenética na caracterização genômica do trigo. Passo Fundo: Embrapa-Trigo. Disponível em:

<[http://cnpt.embrapa.br/biblio/do/p\\_do31\\_1.htm](http://cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do31_1.htm)> Acessado em: 17 de julho de 2007.

BROWN, W. V. Textbook of cytogenetics. The C. V. Mosby Company, Saint Louis, 1972. 346p.

BUSO, J. A., BOITEUX L. S., PELOQUIN, S. J. Multitrait selection system using populations with a small number of interploid ( $4x - 2x$ ) hybrid seedlings in potato: Degree of high – parent heterosis for yield and frequency of clones combining quantitative agronomic traits. *TheorAppl Genet*, v.99, p. 81-91, 1999.

BUSO, J. A., BOITEUX, L. S. A situação atual e perspectivas do melhoramento genético de batata no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 1., 2001, Goiânia. Palestra. Goiânia, 2001. 5p.

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

CHEN, Q.; LYNCH, D. H. W.; PLATT, H. Y.; LI, Y.; SHI, H. J.; LI, H. J.; BEASLEY, D.; RAKOSY-TICAN, L.; THEME, R. Interspecific Crossability and Cytogenetic Analysis of Sexual Progenie of Mexican Wild Diploid 1EBN Species *Solanum pinnatisectum* and *S. cardiophyllum*. *American Journal of Potato Research*, v.81, p. 159-169. 2004.

CHOER, E. Origem e evolução In: Pereira, A. da Silva , Daniels, J. O cultivo da batata na região sul do Brasil. Embrapa Clima Temperado.- Brasília, D.F.: Embrapa Informação Tecnológica. p. 57-68. 2003.

CONICELLA, C.; CAPO, A.; CAMMARERI, M.; ERRICO, A.; SHAMINA, N.; MONTI, L. M. Elucidation of meiotic nuclear restitution mechanisms in potato through analysis of microtubular cytoskeleton. *Euphytica*, v.133, p.107-115, 2003.

DAVIDE, L. C. Ferramentas da citogenética no melhoramento de plantas. Disponível em: <<http://www.ufla.br/eventos/cbmp/>> Acessado em: 15 de julho de 2007

DEL DUCA, L. J. A. Índices meióticos em trigos brasileiros e estudos comparativos entre comportamento citológico, fatores ambientais e componentes da produção. Porto Alegre, 139p. (Dissertação: Mestrado em Agronomia, UFRGS) Porto Alegre, 1976.

DOUCHES, D. S., MAAS, D. JARTZEBSKI, K. R., CHASE, R. W. Assessment of potato breeding progress in the USA over the last century. *Crop Science*, v. 36, p.1544-1552, 1996.

DONGYU, Q., DEWEI, Z., RAMANNA, M. S., JACONSEN, E. A comparison of progeny from diallel crosses of diploid potato with regard to the frequencies of  $2n$  – pollen grains. *Euphytica*, v. 92, p. 313 – 320, 1996.

FORTES, G. R. L.; PEREIRA, J. E. S. Classificação e descrição botânica. In: PEREIRA, A. DANIELS, J. O cultivo da batata na região sul do Brasil. Embrapa Clima Temperado.- Brasília, D.F.: Embrapa Informação Tecnológica. p. 69-104. 2003.



GUERRA, M.; SOUZA, M. J. Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal, e humana. Ribeirão Preto, SP: Fupec, 2002.

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

HAWKES, J. G. Origins of cultivated potatoes and species relationships. In: BRADSAHW, J. E.; MACKAY, G. R. Potato genetics, Cambridge: CAB International, p. 3-42, 1994.

HIJMANS, R. J.; SPOONER D. M.; SALAS, A. R.; GUARINO, L.; LA CRUZ. J. Systematic and ecogeographic studies on crop genepools 10. Atlas of Wild Potatoes. IPGRI. 143p. 2002.

HERMSEN J. G. Th. Introgression of genes from wild species, including molecular and celular approaches. Potato Genetics. In. Bradshaw J. E.; Mackay. G. R. Ed. Cab International, 1994. p. 515-537.

HOUBEN, A.; SCHUBERT, I. The Cytogenetics and genomics of crop plants. Chromosome Research. V 15, p.1-2, 2007.

HUMÁN, Z. B. Botânica sistemática y morfología de la papa. 2 ed, Lima: Centro Internacional de la papa, 1986. 22p.

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

KLUGE, R. A. Estresse de Temperatura. LCB – ESALQ. <[www.ciagri.usp.br/~rakluge](http://www.ciagri.usp.br/~rakluge)> Aessado em: 15 de agosto de 2007.

LEWIS, K. R.; JOHN, B. The matter of mendelian heredity. London. Churchill. 1964. 269.

McHALE, N. A. Environmental induction of high frequency  $2n$  pollen formation in diploid *Solanum*. Can. J. Genet. Cytol. 25: 609-615. 1983.

MOK, D. W. S.; PELOQUIN, S. J. Three mechanisms of  $2n$  pollen formation in diploid potatoes. Canadian Journal of Genetic Cytology. San Francisco, v.17, p.217-225, 1975.

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

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

ORTIZ, R.; PELOQUIN, S. J. Use of 24-chromosome potatoes (diploid and dihaploids) for genetical analysis. In: BRADSAHW, J. E.; MACKAY, G.R. Potato genetics, Cambridge: CAB International, 1994. p.133-154.

ORTIZ, R. Potato Breeding via Ploidy Manipulations. Plant Breeding Reviews, v.16, p.15-85, 1998.

PANDOLFI, V. Microsporogênese em *Solanum commersonii*. Pelotas, Universidade Federal de Pelotas. 82p. Dissertação de mestrado em agronomia, 1998.

PELOQUIN, S. J., YERK, G. L., WERNER, J. E. , DARMO, E. Potato breeding with haploids and  $2n$  gametes. Genome, v. 31, p. 1000 – 1004. 1989.

PELOQUIN, S. J.; JANSKY, S. H.; YERK, G. L. Potato cytogenetics and germoplasm utilization. *American Potato Journal*, Orono, v.66. n 10, p. 629-638. 1989.

PELOQUIN, S. J., BOITEUX, L. S., CARPUTO, D. Meiotic mutants in potato: valuable variants. *Genetics*, v. 153, p.1493-1499, 1999.

PEREIRA, A.; DANIELS, J. O cultivo da batata na região sul do Brasil. Embrapa Clima Temperado.- Brasília, D.F.: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. 567p.

PEREIRA, A. S. Melhoramento genético. In: PEREIRA, A S.; DANIELS, J. O cultivo da batata na região sul do Brasil. Embrapa Clima Temperado.- Brasília, D.F.: Embrapa Informação Tecnológica, p. 105-123. 2003.

PINTO, C. A. B. P. Hibridação em batata. In: BORÉM, A. Hibridação artificial de plantas. Editora UFV, Viçosa. 1999. p. 139 – 152.

RAMANNA, M. S. A re-examination of the mechanisms of  $2n$  gamete formation in potato and its implication for breeding. *Euphytica* , v.28, p. 537-561, 1979.

RAMSEY, J.; SCHEMSKE, D. W. Pathways, mechanisms, and rates of polyploidy formation in flowering plants. *Annu. Rev. Syst.* 29:467-501, 1998.

SIMIONI, C. Seleção para aumento da produção de gametas não reduzidos e poliploidização sexual em trevo vermelho *Trifolium pratense* L. Porto Alegre, 211p.(Dissertação: Doutorado em Zootecnia, UFRGS). Porto Alegre, 2004.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; DALL'AGNOL, M. Gametas não reduzidos no melhoramento de plantas. *Ciência Rural*. Santa Maria, v.31, n.1, p.169-175, 2001.

SIMMONDS, N. W. Potatoes. In: *Evolution of crop plants*. London: Longman, London. 1976. p. 279 – 2 Projeto Batata.

SINGH, R. J. *Plant Cytogenetics*. London: CRC. 1993. 391p.

Statistical Package for the Social Sciences (SPSS for Windows) versão 10.0.5 (nov 1999). SPSS Inc. 1989-1999. Chicago.

TAI, G. C. C. Use of 2n gametes. In: BRADSAHW, J. E.; MACKAY, G. R. *Potato genetics*. Cambridge: CAB International. p. 109-132. 1994.

TARN, T. R. The potato germoplasm resource. In: DE JONG, H.; MURPHY, A. M.; TAI, G. C. C.; TARN, T. R. *Potato Breeding and Genetics Seminars*, Fredericson Resource Station, Canadá. p. 38-43. 1991.

TAI, G. C. C.; De JONG, H. A Comparison of performance of tetraploid progenies produced by diploid and their vegetatively doubled (tetraploid) counterpart parents. *Theor. Appl Genet.* 94: 303-308. 1997.

TOMÉ, L. G. O. Meiose e viabilidade do pólen de *Solanum commersonii* ssp. e *Solanum tuberosum* L. Lavras, 2004. 73p. (Dissertação: Mestrado em Agronomia/Genética e melhoramento de plantas, UFLA) Lavras, 2004.

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

VAYDA, M. E. Environmental stress and its impact on potato yield. In: BRADSAHW, J. E.; MACKAY, G. R. *Potato genetics*, Cambridge: CAB International, 1994. p. 239 - 261.

VIÉGAS, J.; Meiose, Gametogênese e Fertilização em Animais e Vegetais, Texto Didático, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS. 14 p., 2006.

WERNER, J. E.; PELOQUIN, S. J. Inheritance of two mechanisms of 2n egg formation in diploid potatoes. *Journal of Heredity*, 81: 371-374. 1990.

ZINN, D. M. Influência da aplicação de calcário e de fósforo no polimorfismo dos grãos de pólen binucleados de duas cultivares de trigo *Triticum aestivum* L. Porto Alegre, 103p. (Dissertação: Mestrado em Genética e Biologia Molecular, UFRGS) Porto Alegre, 1992.

## APÊNDICES

APÊNDICE A - Frequências em porcentagens, das diferentes categorias observadas conforme tipo e tamanho, obtidos de 10 anteras analisadas, sendo 1000 pólenes por antera no clone DLB1-140 submetido a 15°C durante a microsporogênese – Passo Fundo, FAMV/UPF, 2007.

Antera	Normal ( $20.0\mu\text{m}$ )	Vazio	$22.5\mu\text{m}$	$25.0\mu\text{m}$	$27.5\mu\text{m}$	$30.0\mu\text{m}$
1	57,0	5,5	36,7	0,1	0,4	0,3
2	60,3	3,0	36,0	0,5	0,1	0,1
3	48,7	12,6	36,6	2,0	0,1	0,0
4	50,2	21,6	25,0	2,7	0,5	0,0
5	50,1	20,4	26,7	1,8	0,6	0,4
6	55,6	7,6	34,0	1,9	0,6	0,3
7	65,1	6,9	25,0	1,5	0,4	1,1
8	70,1	4,4	25,0	0,3	0,2	0,0
9	64,2	5,0	30,0	0,7	0,1	0,0
10	66,0	1,4	32,0	0,5	0,1	0,0
Total	58,73	88,4	30,70	12,0	3,1	2,2

APÊNDICE B - Frequências em porcentagens, das diferentes categorias observadas conforme tipo e tamanho, obtidos de 10 anteras analisadas, sendo 1000 pólenes por antera no clone DLB1-140 submetido a 20°C durante a microsporogênese – Passo Fundo, FAMV/UPF, 2007.

Antera	Normais ( 20.0µm)	Vazios	22.5µm	25.0µm	27.5µm	30.0µm
1	86,8	5,4	7,3	0,0	0,5	0,0
2	71,9	13,5	12,3	2,0	0,0	0,3
3	73,8	11,3	14,0	0,8	0,0	0,1
4	77,6	15,2	5,2	0,8	1,1	0,1
5	71,7	13,8	13,3	0,8	0,2	0,2
6	74,0	16,9	7,7	0,6	0,6	0,2
7	78,2	15,4	5,1	0,6	0,6	0,1
8	80,9	8,2	10,1	0,7	0,1	0,0
9	79,9	13,0	4,7	0,4	1,7	0,3
10	78,7	10,6	9,7	0,8	0,1	0,1
Total	77,35	12,33	89,4	7,5	4,9	1,4



APÊNDICE C - Frequências em porcentagens, das diferentes categorias observadas conforme tipo e tamanho, obtidos de 10 anteras analisadas, sendo 1000 pólenes por antera no clone DLB1-140 submetido a 25°C durante a microsporogênese – Passo Fundo, FAMV/UPF, 2007.

Antera	Normal ( 20.0µm)	Vazio	22.5µm	25.0µm	27.5µm	30.0µm
1	65,0	5,1	28,0	1,4	0,1	0,4
2	80,0	14,0	6,0	0,0	0,0	0,0
3	61,4	12,6	21,0	3,8	0,6	0,6
4	82,8	13,0	1,6	1,6	0,6	0,4
5	76,5	10,0	12,0	0,8	0,6	0,1
6	58,0	11,0	29,0	2,0	0,0	0,0
7	54,1	14,7	23,3	7,2	0,4	0,3
8	58,7	14,7	24,5	1,6	0,1	0,4
9	80,8	14,1	5,0	0,1	0,0	0,0
10	75,9	10,9	3,0	9,6	0,1	0,5
Total	69,32	12,01	15,34	2,81	0,25	0,27

APÊNDICE D - Frequências em porcentagens, das diferentes categorias observadas conforme tipo e tamanho, obtidos de 10 anteras analisadas, sendo 1000 pólenes por antera no clone DLB1-140 submetido a 30°C durante a microsporogênese – Passo Fundo, FAMV/UPF, 2007.

Antera	Normal ( 20.0µm)	Vazio	22.5µm	25.0µm	27.5µm	30.0µm
1	31,3	49,0	16,2	3,5	0,0	0,0
2	63,0	30,6	5,9	0,5	0,0	0,0
3	52,0	43,4	4,6	0,0	0,0	0,0
4	42,5	55,1	2,3	0,1	0,0	0,0
5	55,0	40,0	4,7	0,3	0,0	0,0
6	40,9	57,9	1,2	0,0	0,0	0,0
7	46,0	38,9	11,9	3,2	0,0	0,0
8	51,8	44,7	2,9	0,6	0,0	0,0
9	26,4	66,1	5,4	2,1	0,0	0,0
10	62,9	28,1	7,9	1,1	0,0	0,0
Total	47,18	45,38	6,30	1,14	0,0	0,0

APÊNDICE E - Frequências em porcentagens, das diferentes categorias observadas conforme tipo e tamanho, obtidos de 10 anteras analisadas, sendo 1000 pólenes por antera no clone DLB1-150 submetido a 15°C durante a microsporogênese – Passo Fundo, FAMV/UPF, 2007.

Antera	Normal ( 20.0µm)	Vazio	22.5µm	25.0µm	27.5µm	30.0µm
1	66,7	22,4	5,1	5,8	0,0	0,0
2	72,6	22,5	4,3	0,4	0,2	0,0
3	72,7	18,8	7,5	1,0	0,0	0,0
4	76,0	22,0	1,9	0,1	0,0	0,0
5	80,8	15,0	4,1	0,2	0,0	0,0
6	45,6	18,7	26,1	9,5	0,1	0,0
7	67,9	24,0	8,0	0,1	0,0	0,0
8	65,0	25,0	10,0	0,0	0,0	0,0
9	74,5	22,0	3,4	0,1	0,0	0,0
10	79,2	14,7	6,1	0,0	0,0	0,0
Total	70,09	20,51	7,65	1,72	0,03	0,0

APÊNDICE F - Frequências em porcentagens, das diferentes categorias observadas conforme tipo e tamanho, obtidos de 10 anteras analisadas, sendo 1000 pólenes por antera no clone DLB1-150 submetido a 20°C durante a microsporogênese – Passo Fundo, FAMV/UPF, 2007.

Antera	Normal ( 20.0µm)	Vazio	22.5µm	25.0µm	27.5µm	30.0µm
1	72,0	21,7	6,0	0,2	0,1	0,0
2	73,0	22,9	4,0	0,1	0,0	0,0
3	68,1	25,2	6,4	0,3	0,0	0,0
4	65,9	30,0	3,7	0,1	0,3	0,0
5	68,5	19,9	11,3	0,1	0,2	0,0
6	67,0	28,6	4,3	0,1	0,0	0,0
7	74,0	23,0	2,6	0,1	0,3	0,0
8	70,0	27,8	1,6	0,3	0,2	0,1
9	65,0	34,1	0,7	0,2	0,0	0,0
10	74,5	18,6	6,4	0,1	0,2	0,2
Total	69,80	25,18	4,70	0,16	0,13	0,03

APÊNDICE G - Frequências em porcentagens, das diferentes categorias observadas conforme tipo e tamanho, obtidos de 10 anteras analisadas, sendo 1000 pólenes por antera no clone DLB1-150 submetido a 25°C durante a microsporogênese – Passo Fundo, FAMV/UPF, 2007.

Antera	Normal ( 20.0µm)	Vazio	22.5µm	25.0µm	27.5µm	30.0µm
1	49,0	51,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	36,0	64,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3	12,8	87,2	0,0	0,0	0,0	0,0
4	60,0	40,0	0,0	0,0	0,0	0,0
5	13,5	86,5	0,0	0,0	0,0	0,0
6	67,0	33,0	0,0	0,0	0,0	0,0
7	53,9	46,1	0,0	0,0	0,0	0,0
8	57,0	43,0	0,0	0,0	0,0	0,0
9	20,0	80,0	0,0	0,0	0,0	0,0
10	46,0	54,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Total	41,52	58,48	0,0	0,0	0,0	0,0

APÊNDICE H - Freqüências em porcentagens, das diferentes categorias observadas conforme tipo e tamanho, obtidos de 10 anteras analisadas, sendo 1000 pólenes por antera no clone DLB1-150 submetido a 30°C durante a microsporogênese – Passo Fundo, FAMV/UPF, 2007.

Antera	Normal ( 20.0µm)	Vazio	22.5µm	25.0µm	27.5µm	30.0µm
1	9,7	90,3	0,0	0,0	0,0	0,0
2	25,7	74,3	0,0	0,0	0,0	0,0
3	7,4	89,1	3,1	0,4	0,0	0,0
4	8,4	91,4	0,1	0,1	0,0	0,0
5	5,5	88,5	4,0	2,0	0,0	0,0
6	28,5	71,4	0,1	0,0	0,0	0,0
7	3,6	91,8	1,8	2,8	0,0	0,0
8	7,0	91,5	1,5	0,0	0,0	0,0
9	11,6	87,3	1,1	0,0	0,0	0,0
10	3,4	95,1	1,4	0,1	0,0	0,0
Total	11,08	87,07	1,31	0,54	0,0	0,0

APÊNDICE I - Freqüências em porcentagens, das duas categorias observadas, normais e vazios, obtidos de 10 anteras analisadas, sendo 1000 pólenes por antera, na cultivar Atlantic submetida a três temperaturas durante a microesporogênese – Passo Fundo, FAMV/UPF, 2007.

Antera	15°C		20°C		25°C	
	normal ( 25.0µm)	Vazio	normal 25.0µm)	Vazio	normal ( 25.0µm)	Vazio
1	38,0	62,0	62,5	37,5	1,5	98,5
2	35,0	65,0	49,3	50,7	1,6	98,4
3	36,0	64,0	25,0	75,0	6,2	93,8
4	32,0	68,0	54,6	45,4	2,1	97,9
5	25,0	76,0	18,0	82,0	0,9	99,1
6	48,3	51,7	60,0	40,0	2,0	98,0
7	56,0	44,0	60,0	40,0	1,8	98,2
8	59,0	41,0	65,0	35,0	1,3	98,7
9	52,0	48,0	56,0	44,0	0,7	99,3
10	55,0	45,0	51,2	48,8	3,0	97,0
Total	43,53	56,47	50,16	49,84	2,11	97,89