CULTURA E FUSÃO DE PROTOPLASTOS **DE *Passiflora* spp.**

MARCELO CARNIER DORNELAS

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Profa. Dra. MARIA LÚCIA C. VIEIRA

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de
São Paulo, para a obtenção do título de Mestre
em Agronomia, Área de Concentração: Genética
e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Fevereiro - 1995

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - FCLQ/USP

Dornelas, Marcelo Carnier
D713c Cultura e fusão de protoplastos de *Passiflora* spp.
Piracicaba, 1995.
182p. ilus.

Diss. (Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Maracujá - Melhoramento 2. Protoplasto de maracujá
I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz,
Piracicaba

CDD 634.425

CULTURA E FUSÃO DE PROTOPLASTOS DE *Passiflora* spp.

MARCELO CARNIER DORNELAS

Aprovada em: 04/04/1995

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Maria Lúcia Carneiro Vieira

ESALQ/USP

Prof. Dr. Flávio César Almeida Tavares

ESALQ/USP

Profa. Dra. Simone L. K. Shepherd

UNICAMP

Maria Lúcia Carneiro Vieira

Profa. Dra. Maria Lúcia Carneiro Vieira

Orientador

À memória do Engenheiro Agrônomo
Dr. Werner Carnier,
dedico

AGRADECIMENTOS

À ESALQ/USP, através do Departamento de Genética, pela possibilidade de realizar o curso de mestrado.

À Dra. Maria Lúcia Carneiro Vieira, pela orientação, amizade, apoio e confiança constantes.

Ao Dr. João Carlos de Oliveira, do Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, FCAV/UNESP, pelas sementes das espécies de *Passiflora*, pelos conselhos e estímulo.

Ao Dr. Flávio C. Almeida Tavares, do Departamento de Genética da ESALQ/USP, pelas facilidades concedidas em seu laboratório durante as análises de PAGE, pelos conselhos e apoio.

À Dra. Aline A. Pizzirani-Kleiner, do Departamento de Genética da ESALQ/USP, pelas facilidades concedidas em seu laboratório, durante o início dos trabalhos com protoplastos de maracujá e pela permissão de uso do microscópio de fluorescência.

Ao Dr. Armando Carlos Cervi, do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná, pela identificação das espécies de *Passiflora* coletadas em Munhoz, MG.

Ao Dr. Akihiko Ando, do Setor de Radiogenética, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, pela permissão de utilização do aparato fotográfico acoplado à lupa.

À Dra. Beatriz Appezzato da Glória, do Departamento de Botânica da ESALQ/USP, pelas discussões, apoio e amizade.

A Carlos Alberto de Oliveira, pelo excelente e valioso auxílio durante a execução da parte experimental.

A Luiz Humberto Gomes e Keila M. Roncato Duarte, pelo auxílio durante a execução das análises de PAGE, pelo apoio e amizade inestimáveis.

Aos colegas de laboratório: Benê, Miguel, Eduardo, Roseli, Luciano Cônsoli, Wagner, Gustavo Maia, Sandro, Lúcia Mayeda, Edna, Víctor, Luciana Carlini, Cássio, Edson, Lúcia Hoffman, Luciana Barbosa, Gustavo Vieira e Luciano Shozo pelo auxílio, amizade e convivência durante todos estes anos.

Aos meus colegas do Curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas.

À FAPESP, pela bolsa de mestrado.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS	xvi
RESUMO	xviii
SUMMARY	xx
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Protoplastos vegetais: conceito, isolamento, cultura e regeneração de plantas	3
2.2. Técnicas de fusão de protoplastos vegetais, regeneração e seleção de híbridos somáticos	7
2.3. A obtenção de híbridos somáticos como recurso auxiliar ao melhoramento genético vegetal	12
2.3.1. A fusão de protoplastos e o melhoramento genético no gênero <i>Nicotiana</i>	14
2.3.2. A fusão de protoplastos e o melhoramento genético no gênero <i>Brassica</i>	17
2.3.3. A fusão de protoplastos e o melhoramento genético no gênero <i>Citrus</i>	20
2.3.4. A fusão de protoplastos e o melhoramento genético no gênero <i>Solanum</i>	25
2.4. Limitações das técnicas de hibridação somática no melhoramento genético de plantas cultivadas	30

2.5. A cultura e fusão de protoplastos e o melhoramento do maracujazeiro	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1. Material vegetal	41
3.2. Regeneração de plantas inteiras a partir da cultura de protoplastos isolados de tecido foliar de <i>Passiflora</i> spp.	44
3.2.1. Isolamento e cultura de protoplastos	44
3.2.2. Cultura de calos e regeneração de plantas	46
3.2.3. Análises citológicas de plantas regeneradas a partir da cultura de protoplastos de <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> e <i>P. cincinnata</i>	47
3.2.4. Análise histológica da epiderme de plantas regeneradas a partir da cultura de protoplastos de <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> e <i>P. cincinnata</i>	47
3.3. Regeneração de híbridos somáticos a partir da cultura de produtos de fusão de protoplastos de <i>Passiflora</i> spp.	48
3.3.1. Obtenção de suspensões celulares	48
3.3.2. Isolamento de protoplastos a partir de suspensões celulares de <i>Passiflora</i> spp.	50
3.3.3. Fusão química de protoplastos: otimização da técnica	51
3.3.4. Fusão de protoplastos isolados de tecido foliar de <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> e protoplastos de suspensões celulares de <i>Passiflora</i> spp.	52
3.3.5. Cultura dos produtos de fusão	55

3.4. Identificação e caracterização dos híbridos somáticos entre espécies de <i>Passiflora</i>	55
3.4.1. Análise do padrão eletroforético de proteínas solúveis separadas por SDS-PAGE	55
3.4.2. Análise do padrão eletroforético de isoenzimas separadas por PAGE	57
3.4.3. Análises citológicas dos produtos de fusão.	57
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1. Regeneração de plantas inteiras a partir da cultura de protoplastos isolados de tecido foliar de <i>Passiflora</i> spp.	59
4.2. Análises citológicas e histológicas de plantas regeneradas a partir da cultura de protoplastos de <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> e <i>P. cincinnata</i>	68
4.3. Regeneração de híbridos somáticos a partir da cultura de produtos de fusão de protoplastos de <i>Passiflora</i> spp.	74
4.3.1. Obtenção de suspensões celulares de <i>Passiflora</i> spp	74
4.3.2. Isolamento de protoplastos a partir de suspensões celulares de <i>Passiflora</i> spp.	84
4.3.3. Otimização das condições de fusão	86
4.3.4. Fusão de protoplastos de <i>Passiflora</i> spp.	89
3.4. Identificação e caracterização dos híbridos somáticos entre espécies de <i>Passiflora</i>	96
4.4.1. Análise do padrão eletroforético de proteínas solúveis separadas por SDS-PAGE	96

4.4.2. Análise do padrão eletroforético de isoenzimas separadas por PAGE	104
5. CONCLUSÕES	116
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118
APÊNDICES	163

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Flores de <i>Passiflora</i> spp.	43
2. Início da liberação de protoplastos e protoplastos isolados de <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i>	60
2. Primeira e segunda divisões, em células derivadas da cultura da cultura de protoplastos de <i>P. amethystina</i> e colônias originadas da cultura de protoplastos de <i>P. cincinnata</i>	62
4. Gráfico da "Plating Efficiency" (PE) de protoplastos de <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> , <i>P. alata</i> , <i>P. amethystina</i> , <i>P. cincinnata</i> e <i>P. giberti</i> , após 14 dias de cultura	63
5. Regeneração de brotos a partir de calo oriundo de protoplastos de <i>P. cincinnata</i> e plantas regeneradas a partir da cultura de protoplastos de <i>P. cincinnata</i> , <i>P. amethystina</i> , <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> e <i>P. giberti</i>	66
6. Plantas regeneradas a partir da cultura de protoplastos de <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> e <i>P. cincinnata</i>	69
7. Cromossomos metafásicos de plantas tetraplóides de <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> e <i>P. cincinnata</i> regeneradas a partir da cultura de protoplastos. Epidermes foliares inferior e superior de plantas diplóides e tetraplóides de <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> regeneradas a partir da cultura de protoplastos	70

Figura	Página
8. Gráfico do peso de matéria fresca e do PCV (<i>Packed Cell Volume</i>) das suspensões celulares de <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> , em relação ao tempo em cultura	75
9. Gráfico do peso de matéria fresca e do PCV (<i>Packed Cell Volume</i>) das suspensões celulares de <i>P. amethystina</i> , em relação ao tempo em cultura	76
10. Gráfico do peso de matéria fresca e do PCV (<i>Packed Cell Volume</i>) das suspensões celulares de <i>P. cincinnata</i> , em relação ao tempo em cultura	77
11. Gráfico do peso de matéria fresca e do PCV (<i>Packed Cell Volume</i>) das suspensões celulares de <i>P. giberti</i> , em relação ao tempo em cultura	78
12. Aspecto das suspensões celulares de <i>Passiflora</i> spp. Massas celulares de <i>P. cincinnata</i> , após 15 dias em cultura	83
13. Processo de aglutinação e fusão de protoplastos de <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> e <i>P. coccinea</i>	88
14. Processo de fusão entre protoplastos isolados de tecido foliar de <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> e de suspensões celulares de <i>P. amethystina</i> e <i>P. giberti</i>	91

Figura	Página
15. Célula contendo dois núcleos, oriunda da cultura de produtos de fusão entre protoplastos de <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> e <i>P. cincinnata</i> . Microcolônias originadas dos produtos de fusão entre protoplastos de <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> e <i>P. giberti</i> ou <i>P. alata</i>	93
16. Calos originados da cultura de produtos de fusão de protoplastos de <i>Passiflora</i> spp.	97
17. Regeneração de brotos a partir de calos originados da cultura de produtos de fusão de protoplastos de <i>Passiflora</i> spp.	98
18. Calo de <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> (+) <i>P. cincinnata</i> regenerando brotos. Plântulas regeneradas de <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> (+) <i>P. cincinnata</i> e <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> (+) <i>P. alata</i>	99
19. Gel de SDS-PAGE de proteínas solúveis de calos de <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> , <i>P. alata</i> , <i>P. amethystina</i> , da mistura física das amostras parentais e dos híbridos somáticos	101
20. Gel de SDS-PAGE de proteínas solúveis de calos de <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> , <i>P. cincinnata</i> , <i>P. coccinea</i> , da mistura física das amostras parentais e dos híbridos somáticos	102
21. Gel de SDS-PAGE de proteínas solúveis de calos de <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> , <i>P. giberti</i> , da mistura física das amostras parentais e dos híbridos somáticos	103

Figura	Página
22. Géis de PAGE corados para os sistemas α -EST , PO e MDH de amostras de calos de <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> <i>P. alata</i> , da mistura física das amostras parentais e de alguns dos produtos de fusão	105
23. Géis de PAGE corados para os sistemas α -EST , PO e MDH de amostras de calos de <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> <i>P. amethystina</i> , da mistura física das amostras parentais e de alguns dos produtos de fusão	106
24. Géis de PAGE corados para os sistemas α -EST , PO e MDH de amostras de calos de <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> <i>P. cincinnata</i> , da mistura física das amostras parentais e de alguns dos produtos de fusão	107
25. Géis de PAGE corados para os sistemas α -EST , PO e MDH de amostras de calos de <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> <i>P. coccinea</i> , da mistura física das amostras parentais e de alguns dos produtos de fusão	108
26. Géis de PAGE corados para os sistemas α -EST , PO e MDH de amostras de calos de <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> <i>P. giberti</i> , da mistura física das amostras parentais e de alguns dos produtos de fusão	109
27. Metáfase mitótica do meristema radicular dos híbridos somáticos <i>P. edulis</i> (+) <i>P. alata</i> , <i>P. edulis</i> (+) <i>P. amethystina</i> , <i>P. edulis</i> (+) <i>P. cincinnata</i> e <i>P. edulis</i> (+) <i>P. giberti</i>	111

Figura	Página
28. Folhas destacadas de plantas de <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> , <i>P. alata</i> , <i>P. amethystina</i> , <i>P. cincinnata</i> , <i>P. giberti</i> e dos híbridos somáticos entre estas espécies	112
29. Híbridos somáticos de <i>Passiflora</i> spp., transferidos para condições de casa de vegetação	114

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1. Meios de cultura utilizados para a obtenção de suspensões celulares de <i>Passiflora</i> spp	50
2. Misturas enzimáticas utilizadas para o isolamento de protoplastos de suspensões celulares de <i>Passiflora</i> spp.	53
3. Tratamentos utilizados para a fusão de protoplastos de <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> e <i>P. coccinea</i>	54
4. Diâmetro médio dos protoplastos de <i>Passiflora</i> spp.	61
5. Produção total e viabilidade dos protoplastos isolados a partir tecido foliar de <i>Passiflora</i> spp.	61
6. Porcentagens de divisão em culturas de protoplastos isolados de explantes foliares de <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> , <i>P. alata</i> <i>P. amethystina</i> , <i>P. cincinnata</i> e <i>P. giberti</i>	62
7. Frequência de regeneração e número médio de brotos por calo oriundo da cultura de protoplastos de <i>Passiflora</i> spp .	67
8. Quadros das análises de variância e teste de Tukey dos dados de comprimento das células guarda e de número de estômatos da epiderme inferior de plantas diplóides de <i>P. edulis</i>	71
9. Taxa de crescimento de culturas de células em suspensão de <i>Passiflora</i> spp	79

Tabela	Página
10. Diâmetro das massas celulares de culturas de células em suspensão de <i>Passiflora</i> spp	80
11. Quadro da análise de variância e Teste de Tukey dos dados de diâmetro das massas celulares de culturas de células em suspensão de <i>Passiflora</i> spp.	81
12. Produção de protoplastos a partir de suspensões celulares de <i>Passiflora</i> spp.	84
13. Dados relativos aos experimentos de fusão entre protoplastos de <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> e <i>P. coccinea</i>	87
14. Formação de heterodímeros nos experimentos de fusão de protoplastos de <i>Passiflora</i> spp.	90
15. Frequências de células binucleadas e multinucleadas nos experimentos de fusão de protoplastos de <i>Passiflora</i> spp .	94
16. "Plating efficiency" dos experimentos de fusão de protoplastos de <i>Passiflora</i> spp.	95

LISTA DE ABREVIATURAS

α -EST - alfa-esterase

AIA - Ácido 3-indolacético

BAP - 6-benzilaminopurina

Bis - N,N'-Metileno-bis-acrilamida

CMS - Macho-esterilidade citoplasmática

CPW - Solução de lavagem de protoplastos descrita por FREARSON et al. (1973)

2,4-D - Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

EDTA - Etilenodiaminotetracetato

GOT - Glutamato-oxaloacetato transaminase

IDH - Isocitrato desidrogenase

KIN - Cinetina

KM8 - Meio para cultura de protoplastos descrito por KAO & MICHAYLUK (1975)
e modificado por GILMOUR et al. (1989)

KM8P - Meio para cultura de células descrito por KAO & MICHAYLUK (1975) e
modificado por GILMOUR et al. (1989)

MD - Meio de cultura descrito por MOURAD-AGHA & DEXHEIMER (1979)

MDH - Malato-desidrogenase

MES - Ácido 2-[N-morfolino] etanossulfônico

MS - Meio de cultura basal descrito por MURASHIGE & SKOOG (1962)

MS/2 - Meio de cultura basal descrito por MURASHIGE & SKOOG (1962), com
metade de sua concentração original de sais e vitaminas

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

NAA - Ácido naftalenoacético

NAD - Sulfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo

PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida.

PE - Eficiência de formação de colônias, expressa pela porcentagem do número de colônias formadas, em relação ao número total de protoplastos cultivados

PEG - Polietileno glicol (peso molecular = 6000)

PGI - Fosfoglucoase isomerase

PGM - Fosfoglucomutase

PM - Peso molecular

PMS - Fenazina metosulfato

PMSF - Fluoreto de fenazilmetanosulfato

PO - Peroxidase

q.s.p. - Quantidade suficiente para

RAPD - Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso

RFLP - Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição

SDS - Dodecil sulfato de sódio (lauril sulfato)

SDS-PAGE - Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida

TEMED - N, N, N', N'-Tetrametiletilenodiamina

TRIS - Tris (hidroximetil)aminometano

CULTURA E FUSÃO DE PROTOPLASTOS DE *Passiflora* spp.

Autor: MARCELO CARNIER DORNELAS

Orientador: Profa. Dra. MARIA LÚCIA CARNEIRO VIEIRA

RESUMO

Programas de melhoramento genético de maracujá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg.) têm sido conduzidos no Brasil visando a seleção de variedades mais produtivas. Híbridos interespecíficos entre a espécie cultivada e espécies selvagens relacionadas têm sido obtidos, usando técnicas de hibridação sexual, na tentativa de transferir genes de resistência à doenças para o híbrido. Entretanto estes híbridos interespecíficos possuem problemas de fertilidade. Isto dificulta seu aproveitamento em programas de melhoramento e justifica o uso da técnica de hibridação somática.

Esta dissertação descreve o desenvolvimento de protocolos para o isolamento e a cultura de protoplastos de espécies de *Passiflora*. O procedimento resulta na regeneração de plantas inteiras, bem como na obtenção de híbridos somáticos resultantes da fusão de protoplastos isolados da espécie comercial e de espécies selvagens de *Passiflora*.

Protoplastos foram isolados de explantes foliares de *P. alata* Ait., *P. amethystina* Mikan, *P. cincinnata* Mast., *P. coccinea* Aubl., *P. edulis* var. *flavicarpa* Deg. e *P. giberti* N.E.Brown, mediante tratamento enzimático. Os protoplastos mostraram-se capazes de regenerar a parede celular, sofrer divisões e formar colônias. Em condições apropriadas, as colônias desenvolveram calos e regeneraram brotos. Plantas inteiras puderam ser obtidas de todas as espécies estudadas, com exceção de *P. coccinea*.

Protoplastos isolados de tecido foliar de *P. edulis* var. *flavicarpa* e de suspensões celulares das espécies selvagens, foram fundidos com o uso de uma solução contendo 30% (p/v) de PEG. O cultivo dos produtos de fusão resultou em 3 a 5% de calos híbridos. Estes foram selecionados pelo padrão eletroforético de bandas de proteínas solúveis e de isoenzimas.

Os híbridos somáticos de *P. edulis* var. *flavicarpa* (+) *P. alata*, *P. edulis* var. *flavicarpa* (+) *P. amethystina*, *P. edulis* var. *flavicarpa* (+) *P. cincinnata* e *P. edulis* var. *flavicarpa* (+) *P. giberti*, foram regenerados e desenvolveram-se em plantas inteiras, que apresentaram $4n=36$ cromossomos.

CULTURE AND FUSION OF *Passiflora* spp. PROTOPLASTS

Author: MARCELO CARNIER DORNELAS

Adviser: Profa. Dra. MARIA LÚCIA CARNEIRO VIEIRA

SUMMARY

Passion fruit (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg.) breeding programs are being conducted in Brazil, aiming to select more productive varieties. Interspecific hybrids among the cultivated passion fruit and wild, related species have been obtained using standard sexual hybridization techniques, in an attempt to transfer disease resistance genes to the hybrid. However, the interspecific hybrids have some fertility problems. This difficulty makes them harder to use in breeding programs and justifies the use of the somatic hybridization technique.

This dissertation describes the development of protocols for isolation and culture of *Passiflora* species protoplasts. The procedure results in the regeneration of whole plants, as well as formation of somatic hybrids from the fusion of protoplasts isolated from cultivated and wild species of *Passiflora*.

Protoplasts were isolated from leaf explants of *P. alata* Ait., *P. amethystina* Mikan, *P. cincinnata* Mast., *P. coccinea* Aubl., *P. edulis* var. *flavicarpa* Deg. and *P. giberti* N.E.Brown, after enzymatic treatment. The protoplasts were

able to regenerate the cell wall, divide and form colonies. Under proper conditions, the colonies developed into calli and regenerated buds. Whole plants could be obtained from all species studied, except *P. coccinea*.

P. edulis protoplasts, isolated from leaf tissue, and wild species protoplasts, isolated from cell suspensions, were fused with the use of a solution containing 30% (w/v) of PEG. The cultivation of fusion products resulted in 3 to 5% of hybrid calli. These were then selected by the electrophoretic band pattern of their soluble proteins and isozymes.

The somatic hybrids of *P. edulis* var. *flavicarpa* (+) *P. alata*, *P. edulis* var. *flavicarpa* (+) *P. amethystina*, *P. edulis* var. *flavicarpa* (+) *P. cincinnata* and *P. edulis* var. *flavicarpa* (+) *P. giberti*, were regenerated and developed into whole plants that showed $4n=36$ chromosomes.

1. INTRODUÇÃO

A cultura de protoplastos de plantas constitui-se no ponto de partida para técnicas de manipulação celular e melhoramento genético vegetal (POTRIKUS & SHILLITO, 1988), entre as quais, a produção de híbridos somáticos, através da fusão de protoplastos (BAJAJ, 1991). Entretanto, para que este importante recurso experimental seja utilizado, é necessário isolar grandes quantidades de protoplastos (da ordem de 10^6 protoplastos por grama de tecido vegetal), que estes possam regenerar a parede celular, sofrer divisões e regenerar plantas inteiras quando cultivados em meio de cultura apropriado. No que diz respeito à formação de híbridos, a metodologia de fusão deve estar bem estabelecida (veja a revisão de FUNGARO & VIEIRA, 1989).

O presente trabalho teve por objetivo a obtenção de híbridos somáticos entre plantas do gênero *Passiflora*, com ênfase para as espécies cultivadas de maracujá, isto é, *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg. e *P. alata* Ait. e para as espécies selvagens *P. amethystina* Mikan., *P. cincinnata* Mast. *P. coccinea* Aubl. e *P. giberti* N.E. Brown. Para tal, protocolos de isolamento e cultura de protoplastos de *Passiflora* foram estabelecidos. Estas espécies, que à exceção de *P. amethystina*, têm sido utilizadas em programas de melhoramento do maracujazeiro, visando a obtenção de híbridos interespecíficos, foram também selecionadas para a condução dos experimentos de fusão de protoplastos, outro objetivo a que se propôs este trabalho. A hibridação somática é uma alternativa

para a produção de híbridos de maracujá e que visa contornar problemas de incompatibilidade, barreiras de cruzamento e de fertilidade, observados no processo de obtenção dos híbridos sexuais já divulgados na literatura (OLIVEIRA, 1987; OLIVEIRA et al., 1988).

2. REVISÃO DE LITERATURA

Estão disponíveis na literatura, várias revisões bastante completas e atuais sobre o isolamento e cultura de protoplastos vegetais (veja POTRYKUS & SHILLITO, 1988; FUNGARO & VIEIRA, 1989; BAJAJ, 1991; EVANS, 1991). Portanto, nesta revisão serão abordados apenas alguns dos aspectos sobre isolamento e cultura de protoplastos e será dada uma ênfase maior sobre a aplicação das técnicas de hibridação somática no melhoramento de plantas.

2.1. Protoplastos vegetais: conceito, isolamento, cultura e regeneração de plantas

O termo "protoplasto" é normalmente usado para descrever células livres de parede celular. A ausência de parede celular faz dos protoplastos um sistema útil para uma variedade de manipulações experimentais que não são possíveis de serem realizadas com células intactas (FUNGARO & VIEIRA, 1989).

Tentativas de se isolar protoplastos vegetais viáveis datam do final do século passado. A técnica utilizada baseava-se na retirada mecânica da parede celular de células parcialmente plasmolisadas (EVANS & COCKING, 1977). Isto restringia a aplicação da metodologia às células parenquimatosas de

tecidos de reserva e mesmo assim, com uma produção muito baixa de protoplastos viáveis.

Após 1960, com o aperfeiçoamento da técnica de digestão enzimática da parede celular (COCKING, 1960), tornou-se possível o isolamento de protoplastos viáveis de, virtualmente, qualquer tecido vegetal. Entretanto, somente 10 anos depois da publicação do trabalho de Cocking, foram descritas a regeneração da parede celular e as primeiras divisões de células derivadas de protoplastos em cultura (NAGATA & TAKEBE, 1970). A regeneração de plantas inteiras foi obtida logo em seguida (TAKEBE et al., 1971). Desde então, os relatos de regeneração de plantas inteiras a partir da cultura *in vitro* de protoplastos de várias espécies de plantas multiplicaram-se. Atualmente, algumas centenas de espécies e a maioria das plantas de interesse agrônômico podem ser regeneradas a partir de protoplastos, inclusive algumas leguminosas e gramíneas consideradas recalcitrantes à cultura *in vitro* (veja a revisão de EVANS, 1991).

Os requisitos nutricionais para o cultivo de protoplastos são muito similares aos exigidos para a cultura de células em suspensão, no entanto os meios de cultura de protoplastos tendem a conter níveis reduzidos de substâncias inorgânicas e elevados de substâncias orgânicas (FUNGARO & VIEIRA, 1991).

A estabilidade e a viabilidade dos protoplastos em cultura estão relacionados à manutenção das propriedades osmóticas do meio. A concentração de substâncias como glicose, manitol ou sorbitol, é de extrema importância para a manutenção da osmolaridade ideal do meio e varia conforme a espécie vegetal e o tipo de tecido do qual os protoplastos foram obtidos (POTRIKUS & SHILLITO, 1988). A concentração osmótica do meio simula, portanto, a osmolaridade do

citoplasma das células do tecido do qual os protoplastos foram isolados (EVANS & COCKING, 1977).

A regeneração da parede celular é um passo essencial para o progresso da cultura. Protoplastos cuja parede não foi reestabelecida, não podem sofrer divisões celulares (EVANS, & COCKING, 1977). A deposição de celulose e outras substâncias, na superfície exterior da membrana plasmática, para a formação da parede celular, inicia-se poucas horas após os protoplastos terem sido transferidos para o meio de cultura (NAGATA & TAKEBE, 1970). Esta deposição de celulose pode ser monitorada com o auxílio de corantes específicos.

A capacidade de divisão das células derivadas de protoplastos também é influenciada pela densidade dos protoplastos e pelo sistema de cultura (FUNGARO & VIEIRA, 1989; EVANS, 1991). As densidades mais comumente usadas variam de 2×10^4 a 2×10^5 protoplastos/ml de meio de cultura (POTRYKUS & SHILLITO, 1988).

Existem vários métodos pelos quais os protoplastos podem ser cultivados, entretanto dois grupos principais podem ser distinguidos: sistemas de cultura em meio líquido e cultura de protoplastos imobilizados em meio semi-sólido. Entre os métodos de cultura em meio líquido, encontram-se: cultura em suspensão, cultura em gota pendente e em câmaras de microcultura. Entre os sistemas de cultura de protoplastos imobilizados estão: a cultura em "droplets" e fatias de agarose, em camadas delgadas de agarose e em camadas de alginato de sódio e de cálcio (ver revisões de FUNGARO & VIEIRA, 1989; EVANS, 1991).

Segundo LORTZ et al. (1983) e SHILLITO et al. (1983), o cultivo de protoplastos imobilizados é muito mais eficiente que o cultivo em meio líquido para várias espécies de plantas. COLIJN-HOOYMANS et al. (1988) observaram

que o sistema de cultura de protoplastos imobilizados é mais eficiente que o sistema de cultivo em meio líquido, pois evitam a aglutinação dos mesmos e portanto, são menos propensos a sofrerem alterações na densidade dos protoplastos em cultura. Uma vez que os protoplastos cultivados em sistemas de imobilização se encontram em uma posição fixa, é possível acompanhar o desenvolvimento e comportamento de protoplastos individuais (FUNGARO & VIEIRA, 1989). De acordo com BINDING et al. (1988) o uso de sistemas de cultivo de protoplastos imobilizados em "droplets" é preferível ao uso da cultura em fatias ou camadas, pois o primeiro permite um melhor intercâmbio de nutrientes entre a fase sólida e a fase líquida do meio.

POTRYKUS & SHILLITO (1988) afirmaram que a regeneração de plantas a partir da cultura de protoplastos representa um problema bastante diferente da regeneração de plantas a partir da cultura de tecidos. Neste último caso, os explantes podem conter conjuntos de células meristemáticas pré-existent, que proliferam em cultura. Células derivadas de protoplastos têm que possuir a capacidade inerente de desenvolver um conjunto de células não-diferenciadas e entre elas, algumas que se comportem como um meristema. Ainda segundo estes autores, caso isto ocorra, não há garantias de que a regeneração de plantas seja possível, sendo também necessário que este grupo de células sejam competentes, ou seja, capazes de se diferenciarem *de novo* nos vários tecidos que compõem o corpo vegetal.

A redução gradual da osmolaridade do meio de cultura e a transferência das colônias formadas para meio sólido, favorecem, respectivamente, a manutenção da proliferação celular e o desenvolvimento de microcalos. O aumento da concentração de citocininas no meio de cultura e a

transferência dos calos para condições de luminosidade induzem a regeneração de plantas (POTRYKUS & SHILLITO, 1988; FUNGARO & VIEIRA, 1989; EVANS, 1991).

2.2. Técnicas de fusão de protoplastos vegetais, regeneração e seleção de híbridos somáticos

Protoplastos recém-isolados de diferentes espécies podem ser induzidos a fundirem-se para dar origem a células híbridas. O primeiro relato da fusão de protoplastos vegetais foi feito por POWER et al. (1970), utilizando-se nitrato de sódio como substância indutora de fusão. Apesar desta técnica ter sido aprimorada por manipulações do pH da solução salina e da adição de íons de cálcio para melhorar a estabilidade da membrana plasmática, a proporção de protoplastos fundidos era sempre baixa (EVANS & COCKING, 1977). Apenas depois que KAO & MICHAYLUK (1974) descreveram o uso do polietileno glicol (PEG) como agente aglutinante e indutor, foi obtida uma porcentagem de protoplastos envolvidos em processo de fusão maior que 25%.

No final da década de 70, SENDA et al. (1979) descreveram a técnica de eletrofusão de protoplastos, aprimorada posteriormente por ZIMMERMANN & SCHEURICH (1981). A técnica consiste na agregação dos protoplastos através de dieletroforese, gerada por corrente alternada de baixa voltagem e a subsequente aplicação de um ou mais pulsos de corrente contínua de alta intensidade, que causa a formação momentânea de poros na membrana plasmática, permitindo a fusão dos protoplastos que estiverem próximos. A técnica de eletrofusão permite a obtenção de uma porcentagem de protolastos

envolvidos em fusão maior que a induzida por PEG, entretanto demanda a disponibilidade de um aparato de custo alto. Além disso, o volume de protoplastos manipulado em cada experimento deve ser pequeno, se comparado com a técnica de fusão com PEG (EVANS, 1991), além de requerer a otimização de um número maior de parâmetros experimentais como a duração e intensidade dos pulsos elétricos, o que nem sempre é uma tarefa simples (VAN WERT & SAUNDERS (1992). A técnica de fusão com PEG é ainda hoje a mais disseminada (EVANS, 1991).

A combinação da habilidade de se isolar protoplastos viáveis e fundi-los de maneira eficiente, com regeneração de plantas inteiras, oferece a possibilidade de obtenção de plantas híbridas (EVANS & COCKING, 1977).

Assim, as técnicas de cultura e regeneração de plantas inteiras, a partir de protoplastos, devem estar otimizadas para as espécies envolvidas em experimentos de fusão. Tanto o primeiro híbrido somático vegetal obtido através da fusão induzida quimicamente (CARLSON et al., 1972), quanto o obtido através da eletrofusão (BATES & HASENKAMPF, 1985), envolveram protoplastos de espécies de *Nicotiana*, geralmente usadas como modelos em técnicas de manipulação celular *in vitro*. A família Solanaceae possui o maior número de espécies para as quais a técnica de isolamento, cultura e fusão de protoplastos, com regeneração de plantas inteiras, está bem estabelecida. Atualmente mais de 20 híbridos somáticos interespecíficos foram descritos apenas para o gênero *Nicotiana* e este número pode passar de uma centena se considerarmos os híbridos intergenéricos e os casos onde não se observou a formação de plantas (veja revisão de EVANS, 1991). As outras famílias nas quais as técnicas de manipulação de protoplastos estão bem estabelecidas são: a família Cruciferae,

na qual híbridos interespecíficos, intergenéricos, intertribais e, recentemente, interfamiliares, já foram obtidos; Leguminosae, na qual várias forrageiras de clima temperado, como *Medicago*, *Trifolium* e *Lotus* têm sido utilizadas em experimentos de hibridação com espécies relacionadas; Rutaceae, na qual várias combinações entre o gênero *Citrus* e outros gêneros da família foram descritas e a família Umbelliferae, particularmente no que diz respeito à cenoura e espécies correlacionadas (ver a revisão de GLIMELIUS et al., 1991).

As células de híbridos zigóticos possuem, geralmente, um núcleo híbrido e o citoplasma composto apenas de organelas maternas. Os híbridos somáticos possuem a vantagem de apresentarem núcleo e citoplasma híbridos (EVANS & COCKING, 1977). Segundo KUMAR & COCKING (1987), a fusão de protoplastos pode ainda originar "cíbridos" que possuem núcleo de um parental e citoplasma do outro, ou um citoplasma híbrido.

Cíbridos podem ser obtidos pela técnica de fusão de protoplastos "doadores", também denominados "citoplastos" com protoplastos "receptores". Esta metodologia, desenvolvida por ZELCER et al. (1978) e modificada posteriormente por SIDOROV et al. (1981) permite, teoricamente, qualquer combinação núcleo-citoplasma, como previsto por KUMAR & COCKING (1987). A técnica consiste em tratar o protoplasto "doador" com radiação gama ou raios-x, para desestruturar o material nuclear, e fundi-lo com o protoplasto "receptor". A célula híbrida terá o núcleo do material "receptor" e o citoplasma híbrido. Uma variação desta técnica foi desenvolvida por MALIGA et al. (1982), na qual os protoplastos "doadores" são enucleados por centrifugação em um gradiente de densidade e não através da exposição à radiação.

A obtenção de cíbridos com núcleo de um parental e mitocôndrias e cloroplastos de outro, também é possível. Inativa-se o núcleo dos protoplastos de um parental através do tratamento com radiação gama ou raios-x e a inativação do material genético citoplasmático do outro parental é obtida pelo tratamento dos protoplastos com iodacetamida (SIDOROV et al., 1981; BONNEMA et al., 1991; MELCHERS et al., 1992).

De acordo com BAJAJ (1991), a obtenção de cíbridos oferece a probabilidade de se obter heterozigosidade de material genético extra-cromossômico e a oportunidade de se transferir e manipular características agronomicamente interessantes. Características como a macho-esterilidade citoplasmática, produção de enzimas responsáveis pelo ciclo do carbono e do aparato fotossintético, além de alguns tipos de resistência às drogas, inclusive a herbicidas, já foram transferidas de uma espécie à outra, através da hibridação somática (KUMAR & COCKING, 1987; MATIBIRI & MANTEL, 1994).

A variação na dose de radiação empregada no tratamento de protoplastos "doadores", pode permitir a inativação de apenas parte do genoma nuclear, com fragmentação dos cromossomos. Partindo deste princípio, GUPTA et al. (1984) desenvolveram a técnica de "fusão assimétrica", também chamada "fusão gama" devido ao fato de a radiação gama ser usada com mais frequência que os raios-x. Com a utilização da fusão assimétrica podem ser obtidos híbridos somáticos que possuem apenas alguns cromossomos (ou fragmentos cromossômicos) de um dos parentais, associados ao "background" genômico do outro parental. A fusão assimétrica tem sido muito utilizada atualmente, sobretudo em fusões que envolvam espécies muito distanciadas filogeneticamente e nos

casos em que se deseja uma rápida introgressão dos genes a serem transmitidos (GLIMELIUS et al., 1991).

A seleção dos produtos de fusão entre protoplastos com genomas diferentes (heterocários) e de genomas iguais (homocários) é um fator importante para o sucesso da técnica de hibridação somática (POWER et al. 1988). Existem vários métodos de seleção de heterocários, entre os quais a inabilidade dos homocários de se desenvolver em cultura. Assim, apenas híbridos somáticos entre espécies parentais resistentes a herbicidas ou antibióticos diferentes, são capazes de se desenvolver em meios de cultura contendo ambos os antibióticos ou herbicidas (BOURGIN et al., 1986; POWER et al., 1976; MOLL et al., 1990; PLA et al., 1991). Exigências culturais diferentes, como quanto a fonte de nitrogênio utilizada, também são empregadas na seleção de heterocários (HEIN et al., 1983; AUSTIN et al., 1986; NEGRUTIU et al., 1986).

A seleção mecânica dos heterocários é possível por micromanipulação e utilização de marcadores fenotípicos, como protoplastos de coloração diferente, ou através de citofotometria de fluxo (JONES et al., 1990; BROMOVA et al., 1991).

Quando altas frequências de formação de heterodímeros são obtidas, particularmente nos experimentos de eletrofusão, pode-se não aplicar qualquer seleção no início da cultura. Os híbridos somáticos putativos podem ser selecionados e terem sua natureza híbrida confirmada, na fase de calo ou após a regeneração de plantas. Para tal são empregadas técnicas que permitam o "screening " de um grande número de amostras, como análises isoenzimáticas (TUSA et al., 1990; GURI et al., 1991; KIRTI et al., 1991; SERRAF et al., 1991); análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição, RFLP (PEHU et al., 1990b;

XU & PEHU, 1993; XU et al., 1993b); análise do polimorfismo de DNA amplificado ao acaso, RAPD (XU et al., 1993a); análise dos padrões de restrição dos genomas plastidiais (GLIMELIUS & BONNETT, 1986; BONNETT & GLIMELIUS, 1990; SPROULE et al., 1991), análises citológicas (KAO, 1977; KRUMBIEGEL & SCHIEDER, 1979) e características morfológicas (BINDING, 1976; POWER et al., 1976; RATUSHNYAK et al., 1991).

2.3. A obtenção de híbridos somáticos como recurso auxiliar ao melhoramento genético vegetal

Segundo EVANS & COCKING (1977), mesmo antes que qualquer protocolo eficiente de isolamento e cultura de protoplastos estivesse disponível, já se reconhecia a importância potencial que a hibridação de células somáticas, via fusão de protoplastos, poderia oferecer em termos de transferência de material genético em vegetais superiores.

De acordo com KUMAR & COCKING (1987), o maior problema enfrentado pelos pesquisadores envolvidos com as técnicas de manipulação celular vegetal seria a imposição prematura e irreal da necessidade da aplicação de métodos biotecnológicos na resolução de problemas do melhoramento de plantas. Assim, após 22 anos desde a publicação sobre a regeneração de um híbrido somático vegetal por CARLSON et al. (1972), são raros os relatos de híbridos somáticos que realmente passaram a fazer parte de programas de melhoramento genético. A maior parte desses trabalhos está nos gêneros *Brassica*, *Nicotiana* e *Solanum*. Entre as frutíferas, o gênero *Citrus* merece destaque.

Quando os primeiros experimentos de fusão de protoplastos começaram a obter êxito, pensava-se que a fusão de protoplastos poderia sobrepor qualquer barreira de isolamento reprodutivo (EVANS, 1983) e as mais improváveis combinações foram realizadas. Durante a década de 70 e meados da década de 80, tentativas de hibridação intergenéricas e muitas vezes entre plantas de famílias diferentes foram relatadas. Experimentos de fusão envolvendo protoplastos de tabaco e soja (KAO, 1977), batata e tomate (MELCHERS et al., 1978), espinafre e cenoura (HODDSON & ROSE, 1984), tabaco e cenoura (GUPTA et al., 1984), arroz e cenoura (SALA et al., 1985), tomate e petúnia (TABAEIZADEL et al., 1985), tabaco e batata (DE VRIES et al., 1987) e até mesmo hibridações envolvendo reinos diferentes, como plantas e animais (SALHANI et al., 1985), plantas e protozoários (CHATTERJEE & RAJASEKHAR, 1983), além de plantas e fungos (LYNCH et al., 1989), foram relatados. Obviamente, na grande maioria dos casos, as células híbridas sofriam algumas divisões e morriam após pouco tempo de cultura. Em outros, regeneravam plantas malformadas e completamente estéreis. Segundo EVANS (1991), havia uma preocupação de se documentar a produção de novos híbridos e não de se produzir plantas com características desejáveis em programas de melhoramento.

Durante a segunda metade da década de 80, até muito recentemente, muitos trabalhos foram realizados para caracterizar, da forma mais completa possível, os híbridos somáticos obtidos até então, sobretudo com o emprego de técnicas moleculares recém-surgidas, como a análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição, RFLP, (PEHU et al., 1990b; BENNETT & SMITH, 1991; SPROULE et al., 1991; PUITE & SCHAART, 1993; XU & PEHU, 1993; XU et al., 1993b), hibridização *in situ* (PAROKONNY, 1992), análise do

polimorfismo de DNA amplificado ao acaso, RAPD (XU et al., 1993a), análise do polimorfismo de minissatélites (KOVTON et al., 1993; POULSEN et al., 1993; FAHLESON et al., 1994), entre outras. Segundo EVANS (1991) durante este mesmo período, o objetivo dos trabalhos de hibridação somática foi obter a transferência de características agronomicamente desejáveis de espécies selvagens para espécies cultivadas com importância comercial.

Apenas nos últimos anos os primeiros ensaios de comportamento dos híbridos a campo e a real incorporação destes em programas de melhoramento genético têm se concretizado e os exemplos limitam-se a *Brassica* (GLIMELIUS et al., 1991; FAHLESON et al., 1994), *Citrus* (GROSSER & GMITTER, 1990; LOUSADA et al., 1992), *Nicotiana* (PANDEYA et al., 1986; ATANASSOV et al., 1991) e *Solanum* (AUSTIN et al., 1986; MATTHEIJ & PUITE, 1992; DAUNAY et al., 1993; MÖLLERS et al., 1994).

2.3.1. A fusão de protoplastos e o melhoramento genético no gênero *Nicotiana*

Espécies selvagens de *Nicotiana* ainda são usadas, atualmente, como modelo em vários trabalhos de fusão de protoplastos, os quais não possuem aplicação imediata para o melhoramento da cultura (HUNG et al., 1993; KOVTUN et al., 1993; KISAKA & KAMEYA, 1994). Entretanto, a transferência de várias características de interesse agrônomo de espécies selvagens para a espécie cultivada, através da hibridação somática, tem sido relatada.

EVANS et al. (1981) descrevem, pela primeira vez, a transferência da resistência ao vírus do mosaico do tabaco (TMV) de *N. nesophila* para *N.*

tabacum. MILLER et al. (1984) realizaram retrocruzamentos deste híbrido somático com *N. tabacum* e obtiveram progênies férteis e resistentes ao vírus, recomendando sua utilização em programas de melhoramento.

Outros experimentos de hibridação somática, visando a transferência da resistência ao TMV de espécies selvagens para a espécie comercial de tabaco foram realizados por BATES (1990) e BUI et al. (1992),

ATANASSOV et al. (1991) descreveram a transferência da resistência ao vírus TSWV ("tomato spotted wilt virus") de *N. alata* para *N. tabacum*, realizando experimentos de fusão assimétrica. Os híbridos somáticos obtidos e as progênies do primeiro retrocruzamento com *N. tabacum* mostraram resistência ao vírus, o que foi confirmado pelo teste de ELISA e testes a campo. Estes autores também detectaram a associação de locos isoenzimáticos à resistência, facilitando o processo de identificação de plantas resistentes.

Plantas de tabaco resistentes às doenças causadas por *Peronospora tabacina* e *Thielaviopsis basicola*, foram obtidas por PANDEYA et al. (1986), através da hibridação somática entre *N. tabacum* e *N. rustica* var, *chlorotica*. Estas plantas mostravam, também, teores de nicotina que chegaram a 4%, bastante superiores aos 0,8 a 2%, apresentados pelas variedades comuns de tabaco. Três gerações de retrocruzamento com *N. tabacum* levaram à produção da cultivar denominada Delgold.

Objetivando a introdução de resistência ao afídio *Myzus persicae* da espécie *N. benthamiana* em *N. tabacum*, HAGIMORI et al. (1993) obtiveram híbridos somáticos entre estas duas espécies. Os híbridos mostraram um padrão de RFLP intermediário ao dos pais, eram férteis e possuíam resistência ao afídio, caracterizada pela presença de um determinado lipídio na epiderme foliar.

A transferência de macho-esterilidade citoplasmática (CMS) em cíbridos, foi obtida primeiramente por AVIV & GALUN (1980) através da fusão de protoplastos de *N. tabacum* e *N. sylvestris*. Posteriormente, estes mesmos autores (AVIV & GALUN, 1986), utilizando-se da técnica de fusão "doador-receptor", obtiveram linhagens de cíbridos de *N. tabacum* com *N. sylvestris*, *N. undulata* e *N. bigelovii*. No trabalho, os autores recomendam o uso destas linhas aloplásmicas, portadoras de CMS, em hibridações sexuais envolvendo o tabaco comercial.

KOFER et al. (1990) e SPANGENBERG (1990) caracterizaram, morfológica, genética e molecularmente linhagens de cíbridos de *N. tabacum*, portadoras de CMS dos citoplasmas de *N. bigelovii*, *N. suaveolens* e *N. undulata*. Cada uma das linhagens possuía características particulares quanto à morfologia floral e composição de DNA mitocondrial. Em algumas linhagens, toda a flor era malformada, enquanto em outras a estrutura floral era perfeita, mas os grãos de pólen eram inviáveis. Estas características eram uniformes dentro de uma mesma progênie e perduraram por várias gerações. Entretanto, em algumas linhagens, a macho-fertilidade foi restaurada. Segundo KOFER et al. (1990), isto se deve a recombinações e rearranjos no DNA mitocondrial, o que já havia sido relatado por AVIV & GALUN (1986).

Da mesma maneira que a macho-esterilidade citoplasmática pode ser transferida de um genótipo para outro, através da fusão de protoplastos, a restauração da fertilidade também pode ser conseguida da mesma forma. RAINERI et al. (1992) obteve cíbridos, utilizando como "receptora" uma linhagem aloplásmica de *N. tabacum*, que possui citoplasma de *N. bigelovii*, e como "doadora", a variedade SR1 de *N. tabacum*. A análise molecular do DNA mostrou

a ocorrência de recombinação entre os DNAs mitocondriais parentais e a eliminação preferencial dos cloroplastos de *N. bigelovii*, com conseqüente restauração da fertilidade masculina, em 9 das 11 plantas regeneradas.

2.3.2. A fusão de protoplastos e o melhoramento genético no gênero *Brassica*

A regeneração de plantas inteiras a partir de protoplastos de colza foi descrita por KARTHA et al. (1974). A partir de então, protocolos para a cultura de protoplastos isolados de praticamente qualquer tecido e de grande parte das espécies do gênero têm sido descritos (veja a revisão de GLIMELIUS et al., 1991).

Os primeiros experimentos de fusão de protoplastos de *Brassica*, foram tentativas de ressíntese das espécies conhecidas, a partir da hibridação de espécies consideradas ancestrais. Na maior parte das vezes, sem sucesso.

Atualmente a hibridação somática tornou-se uma técnica promissora para a introdução de genes de interesse agrônômico em espécies de *Brassica* com interesse comercial. Uma grande quantidade de híbridos somáticos têm sido produzidos entre espécies pertencentes ao mesmo gênero (SCHENK & RÖBBELEN, 1982; SUNDBERG & GLIMELIUS, 1986; SUNDBERG et al., 1987; ROSÉN et al., 1988; JOURDAN et al., 1989a,b; SJÖDIN & GLIMELIUS, 1989a,b; KIRTI et al., 1991), a gêneros diferentes (TORIYAMA et al., 1987a,b; CHATTERJEE et al., 1988; FAHLESON et al., 1988 a,b; KLIMASZEWSKA & KELLER, 1988; PRIMARD et al., 1988; SIKDAR et al., 1990; HAGIMORI et al., 1992) e, recentemente, até mesmo híbridos intertribais têm sido obtidos

(FAHLESON et al., 1994; FORSBERG et al., 1994). A grande maioria destes híbridos mostrou-se fértil, o que possibilitou a realização de retrocruzamentos e a utilização de alguns deles em programas de melhoramento (FAHLESON et al., 1994).

A maior parte dos trabalhos de fusão de protoplastos visando a transferência de características agronomicamente desejáveis em *Brassica*, tem se concentrado em caracteres de herança citoplasmática, como a CMS e a resistência a herbicidas.

A macho-esterilidade citoplasmática, introduzida em *B. napus* por hibridação sexual, via cruzamentos com *Raphanus sativus*, resultou em plantas com deficiência de clorofila, particularmente quando submetidas à baixas temperaturas, e com baixa produção de néctar, o que dificultaria o processo de produção, pois a colza é polinizada por abelhas. PELLETIER et al. (1983) usaram a mesma linhagem portadora de CMS de *Raphanus* em um experimento de fusão com protoplastos de *B. napus*. Plantas macho-estéreis, com níveis normais de clorofila e produtoras de néctar foram produzidas. Análises subsequentes mostraram que estes híbridos somáticos possuíam cloroplastos apenas de *B. napus*, responsáveis pela produção normal de clorofila, e mitocôndrias recombinantes de *B. napus* e *R. sativus* (CHETRIT et al., 1985). Este mesmo híbrido somático era também resistente ao herbicida atrazina, uma característica cloroplastidial da linhagem de *B. napus* utilizada por PELLETIER et al. (1983). As plantas obtidas tornaram-se uma linhagem utilizada em programas de melhoramento de colza e de repolho, principalmente para a produção comercial de sementes híbridas (KUMAR & COCKING, 1987).

A transferência de CMS e resistência aos herbicidas atrazina e triazina de espécies selvagens de *Brassica* para espécies de interesse comercial foi relatada também por CHUONG et al. (1988), CHRISTEY et al. (1991) e KAO et al. (1991, 1992).

Cíbridos de repolho (*Brassica oleracea*) tolerantes ao frio e portadores de CMS foram obtidos por WALTERS et al. (1991) pela técnica de "fusão gama". Estes autores utilizaram protoplastos irradiados da linhagem NY7642A, portadora de CMS e protoplastos da linhagem NY3317, tolerante ao frio, tratados com iodacetamida. Os produtos de fusão, isolados por micromanipulação ou utilizando-se da citometria de fluxo, foram cultivados e regeneraram plantas diplóides inteiras.

A transferência de resistência à doença causada por *Phoma lingam* para a colza foi obtida por SJÖDIN & GLIMELIUS (1989a,b) pela fusão assimétrica de protoplastos de *B. napus* com diferentes acessos de *B. juncea*, *B. nigra* e *B. carinata*.

SIKDAR et al. (1990) obtiveram híbridos somáticos intergenéricos férteis entre *B. juncea* e *Eruca sativa*, visando a transferência de tolerância a afídios e à seca. Foram isolados protoplastos de duas cultivares de *B. juncea*, que foram fundidos com protoplastos irradiados ou não de *E. sativa*. Onze híbridos simétricos ($4n=58$) e 10 assimétricos, com número de cromossomos variando entre 50 e 56, foram obtidos.

Híbridos somáticos interespecíficos entre *B. juncea* e *B. spinescens* foram obtidos por KIRTI et al. (1991), visando o aumento da eficiência fotossintética de *B. juncea* e a transferência de resistência à ferrugem, causada

por *Albugo candida*, além de tolerância à salinidade. Os híbridos somáticos, retrocruzados com *B. juncea*, produziram progênes férteis.

LELIVELT & KRENS (1992) obtiveram híbridos somáticos intergenéricos, objetivando a transferência da resistência ao nematóide do cisto, *Heterodera schachtii* Schm., de *Raphanus sativus* para *B. napus*. Posteriormente, LELIVELT et al. (1993) produziram outro híbrido somático intergenérico, entre *B. napus* e *Sinapis alba*, novamente visando a transferência da resistência ao nematóide do cisto. Entretanto, as plantas obtidas eram mitoticamente instáveis e possuíam de 56 a mais de 90 cromossomos. O retrocruzamento destas quimeras com *B. napus* não foi possível.

Recentemente, FAHLESON et al. (1994) obtiveram híbridos somáticos intertribais, entre *B. napus* e *Thlaspi perfoliatum*, visando o incremento no teor de ácido nervônico no óleo das sementes de *B. napus*. Amostras de óleo extraído das sementes obtidas dos 15 híbridos somáticos regenerados foram analisadas e uma quantidade significativamente maior de ácido nervônico, quando comparada com *B. napus*, foi encontrada.

2.3.3. A fusão de protoplastos e o melhoramento genético no gênero *Citrus*

O melhoramento genético de espécies lenhosas perenes é extremamente dificultado pelo longo período entre as gerações, desencorajando cruzamentos entre genótipos não relacionados, que demandam vários retrocruzamentos. Em *Citrus*, a poliembrionia das sementes dificulta a identificação dos embriões zigóticos. Desta forma, a transferência de genes

através de métodos biotecnológicos é uma opção ao melhorista (GROSSER & GMITTER, 1990).

Plantações comerciais de *Citrus* raramente possuem plantas com copa e sistema radicular de mesmo genótipo. Normalmente, utilizam-se porta-enxertos melhor adaptados a um determinado ambiente ou tolerantes a uma determinada praga ou doença, o que se reflete em uma melhor produção da variedade-copa. Segundo GROSSER & GMITTER (1990), este recurso oferece a vantagem única de se empregar métodos alternativos de transferência de genes, como a fusão de protoplastos, em programas de melhoramento de variedades porta-enxerto, uma vez que a introgressão de genes de espécies selvagens não interfere nas características comerciais dos frutos produzidos pela variedade copa.

O primeiro exemplo de hibridação somática em *Citrus* foi relatado por OHGAWARA et al. (1985). O híbrido intergenérico foi obtido pela fusão de protoplastos isolados de tecido foliar de *Poncirus trifoliata* com protoplastos isolados de calos embriogênicos de *Citrus sinensis* cv. Trovita. GROSSER et al. (1988) produziram um híbrido semelhante, utilizando protoplastos de *P. trifoliata* cv. Flying Dragon e *C. sinensis* cv. Hamlin. De acordo com GROSSER & GMITTER (1990), estes híbridos foram avaliados a campo quanto a possibilidade de sua utilização em programas de melhoramento de porta-enxertos. Recentemente, KOBAYASHI et al. (1991) relataram que os híbridos somáticos produzidos por OHGAWARA et al. (1985) eram férteis, produziram frutos e sementes viáveis, sendo possível o seu retrocruzamento com qualquer um dos parentais. Uma nova combinação entre *Citrus* e *Poncirus* foi relatada por

OHGAWARA et al. (1991) que produziram híbridos somáticos entre *C. sinensis* e um o híbrido zigótico *C. sinensis* x *P. trifoliata*.

GROSSER & GMITTER (1988) produziram híbridos somáticos entre *Severinia disticha* e *C. sinensis* cv. Hamlin. Os gêneros aos quais pertencem estas espécies, são sexualmente incompatíveis e pertencem a subtribos distintas. *S. disticha* é resistente a várias doenças que atacam *Citrus*, mas sua utilização como porta-enxertos não é explorada, devido à falta de compatibilidade com as variedades-copa. Os híbridos somáticos, por possuírem o genoma de *Citrus*, superaram esta incompatibilidade.

A espécie *Citropsis gilletiana*, é distante geneticamente de *Citrus*, porém mostra resistência a um tipo severo de podridão do colo, causada por *Phytophthora citrophthora* e ao nematóide *Radopholus citrophilus*. GROSSER & GMITTER (1990) fundiram protoplastos isolados a partir de calos de *C. gilletiana* e de suspensões celulares de *C. sinensis* cv. Hamlin. Híbridos somáticos foram obtidos e mostraram características de morfologia foliar intermediárias à das espécies parentais.

Segundo GROSSER et al. (1990), a tangerina Cleópatra (*Citrus reticulata*) é um porta-enxerto de grande importância na Flórida, pois é tolerante à tristeza, exocorte, xiloporose e ao stress causado por frio e solos salinos. Entretanto, fatores como a susceptibilidade a nematóides e à podridão do colo, limitam o seu uso. Como comentado anteriormente, a espécie *Citropsis gilletiana* é resistente à podridão do colo e ao nematóide *R. citrophilus*. Visando obter um porta-enxerto com características complementares, GROSSER et al. (1990) regeneraram híbridos somáticos a partir da cultura dos produtos de fusão entre

protoplastos isolados de suspensões celulares de *C. reticulata* e de tecido foliar jovem de *Citropsis gilletiana*.

Plantas do gênero *Fortunella*, também são utilizadas como porta-enxertos, porém apresentam características indesejáveis. DENG et al. (1992) obtiveram 7 híbridos somáticos a partir de 27 calos produzidos por fusão de protoplastos isolados de *F. crassifolia* cv. Meiwa e *C. sinensis* cv. Valencia e identificados pelo padrão de bandas de peroxidase. Segundo os autores, as plantas aclimatadas estão sendo avaliadas em relação ao seu aproveitamento como porta-enxertos.

LOUSADA et al. (1992, 1993) relataram a obtenção de híbridos somáticos interespecíficos, a partir de 8 combinações diferentes de espécies portadoras de características agronomicamente complementares de tolerância ao *stress* ambiental e resistência a pragas e doenças, importantes para o melhoramento de porta-enxertos.

GROSSER et al. (1989) afirmam que a hibridação somática, através da fusão de protoplastos, possui importância potencial para o melhoramento genético de variedades-copa. Sua finalidade seria combinar características de interesse de cultivares já melhoradas. Estas poderiam ser diretamente utilizadas para a produção de frutos, ou como parentais para a produção de cultivares triplóides. Tais cultivares possuem importância econômica para a produção de frutos sem sementes.

Com o objetivo de produzir variedades-copa com características complementares, GROSSER et al. (1989) regeneraram híbridos somáticos a partir da cultura de protoplastos isolados de lima (*C. aurantifolia* cv. Key) e de laranja Valência (*C. sinensis* cv. Valencia). A lima possui um dos mais curtos períodos

juvenis entre as espécies de *Citrus*, apenas 18 meses, e é susceptível ao vírus da tristeza, à antracnose causada por *Gloesporium limetticolum*, além de ser sensível ao frio. Já a laranja Valência, é mais tolerante ao frio, tolerante à tristeza e resistente à antracnose, porém possui um período juvenil de 8 a 10 anos (GROSSER et al., 1989). De acordo com os resultados obtidos, os autores afirmam que a obtenção de variedades tetraplóides, que associam características de interesse, é possível e que essas possuem grande potencial de utilização em programas de melhoramento.

OHGAWARA et al. (1989) também objetivaram a redução do período juvenil, pela produção de híbridos somáticos entre *C. sinensis* e *C. paradisi*.

TUSA et al. (1990) obtiveram híbridos somáticos entre a laranja Valência (*C. sinensis* cv. Valencia) e o limão Femminello (*C. lemon* cv. Femminello) visando a transferência ao mal-seco. A partir da cultura dos produtos de fusão dos protoplastos de ambas espécies, foram regeneradas plantas vigorosas e com morfologia foliar intermediária à dos pais. Plantas tetraplóides de limão também foram regeneradas e estão sendo avaliadas quanto à possibilidade de serem incluídas em programas de melhoramento de limão sem sementes.

SAITO et al. (1991) realizaram eletrofusão de protoplastos de *C. sudachi* e lima (*C. aurantifolia*). A partir de 40 calos embriogênicos, 8 híbridos somáticos e 4 plantas de lima tetraplóides foram obtidos. Tanto as plantas de lima quanto os híbridos somáticos possuem características agronomicamente desejáveis e estão sendo avaliados.

A transferência de macho-esterilidade citoplasmática, que ocorre em plantas do gênero *Microcitrus*, foi transferida para genótipos de laranja-azeda

(*C. aurantium*) e limão rugoso (*C. jambhiri*) por VARDI et al. (1989). Segundo estes autores, cultivares de *Citrus* portadores de macho-esterilidade podem ter alto valor econômico, se esta característica também estiver associada à partenocarpia, para a produção de frutos sem sementes. Recentemente, SAITO et al. (1993) relataram a obtenção de híbridos de lima (*C. aurantifolia*) e limão (*C. limon*), portadores de citoplasma de *C. sudachi* e verificaram a recombinação do DNA mitocondrial das espécies envolvidas na fusão, além da eliminação preferencial dos cloroplastos de lima ou de limão.

2.3.4. A fusão de protoplastos e o melhoramento genético no gênero *Solanum*

A batata, provavelmente, é a planta cultivada na qual a técnica de fusão de protoplastos tenha sido aplicada mais diretamente ao melhoramento genético. Antes mesmo que a regeneração de plantas a partir da hibridação somática tivesse sido descrita no gênero, WENZEL et al. (1979) propuseram um modelo de programa de melhoramento, baseado na utilização da fusão de protoplastos. Embora as cultivares comerciais de batata sejam, em geral, tetraplóides, o melhoramento de linhagens diplóides acelera, consideravelmente, o processo de seleção. Ora, a hibridação somática de duas linhagens melhoradas, com características complementares e diplóides, originaria, imediatamente, uma linhagem tetraplóide potencialmente superior.

BARSBY et al. (1984) fizeram o primeiro relato da regeneração de plantas a partir da fusão de protoplastos de duas espécies de batata. Protoplastos de mesofilo de um cultivar di-haplóide de batata (*Solanum tuberosum* cv. Russet

Burbank) foram fundidos com protoplastos de *S. brevidens*. A espécie *S. brevidens* não produz tubérculos, é diploide e resistente às principais viroses que atacam a batata, causadas pelos vírus X e Y da batata (PVX e PVY) e pelo vírus do enrolamento das folhas (PLRV). Posteriormente, híbridos somáticos envolvendo *S. brevidens* e outras linhagens di-haplóides de *S. tuberosum* foram descritos (AUSTIN et al., 1985a; FISH et al., 1988). Híbridos interespecíficos entre *S. tuberosum* e a espécie selvagem *S. phureja* também foram relatados (PUITE et al., 1986).

AUSTIN et al. (1986), utilizando as plantas regeneradas anteriormente (AUSTIN et al., 1985a) realizaram a primeira avaliação a campo de um híbrido somático. Foi conduzida uma análise detalhada, envolvendo período de florescimento, coloração das flores, produção de pólen, produção por área, forma, tamanho e número de tubérculos, etc.

Os genótipos de *S. brevidens* e *S. tuberosum* empregados por AUSTIN et al. (1985a) exibiam, além da resistência a PVX, PVY e a PLRV, resistência às raças 0 (*S. brevidens*) e 4 (*S. tuberosum*) de *Phytophthora infestans*, causadoras da murcha. Desta forma, HELGESON et al. (1986) foram capazes de caracterizar a resistência dos híbridos somáticos às viroses e a resistência dupla à murcha. EHLENFELDT & HELGESON (1987) realizaram, então, um estudo minucioso da fertilidade destas mesmas plantas e concluíram que elas poderiam ser eficientemente selecionadas e dar origem a uma nova cultivar. AUSTIN et al. (1988) ainda trabalharam com as linhagens originadas dos híbridos somáticos produzidos por AUSTIN et al. (1985a) e observaram que as plantas híbridas eram resistentes às podridões causadas por *Erwinia carotovora* f. sp. *atroseptica*, *Erwinia carotovora* f. sp. *carotovora* e *Erwinia chrysanthemi*. Os

híbridos somáticos resistentes às podridões, foram cruzados com a cultivar Katahdin de batata, que é tetraplóide. Seleções feitas nas progênies originadas deste cruzamento, podem dar origem a uma nova cultivar (HELGESON, 1989).

Os híbridos somáticos entre *S. tuberosum* e *S. brevidens* produzidos por FISH et al. (1988) foram exaustivamente estudados. Foram realizadas caracterizações molecular, citogenética e morfológica, por PEHU et al. (1989, 1990a,b,).

Entre os híbridos somáticos aneuplóides, a expressão da resistência a PVX, PVX e a PLRV variava à medida em que os híbridos tivessem mais ou menos cromossomos de *S. brevidens*. Genótipos morfológicamente mais semelhantes a *S. brevidens* eram também menos sensíveis às viroses (PEHU et al., 1990c; XU et al., 1991). Isto levou a que este mesmo grupo de autores produzisse, recentemente, híbridos assimétricos entre *S. tuberosum* e *S. brevidens* (XU et al., 1993a,b). Foram obtidas plantas com morfologia intermediária entre *S. tuberosum* e *S. brevidens* e com número de cromossomos variando de 31 a 64. A análise de RFLP revelou que estes híbridos somáticos possuíam um ou dois genomas completos de *S. tuberosum* (ou seja, 24 ou 48 cromossomos) e 7 a 22 cromossomos de *S. brevidens*. A susceptibilidade destas plantas a PVX, PVX e PLRV está sendo analisada (XU et al., 1993a,b).

PREISZNER et al. (1991) avaliaram a tolerância ao frio de híbridos somáticos entre *S. tuberosum* e *S. brevidens*. Entre os aneuplóides havia um gradiente de tolerância. Novamente, as plantas aneuplóides fenotipicamente semelhantes a *S. brevidens*, bem como os híbridos somáticos hexaplóides contendo 2 genomas desta espécie, eram mais tolerantes. Híbridos somáticos tolerantes ao frio também foram obtidos por CARDI et al. (1993) pela

fusão de protoplastos de uma linhagem di-haplóide de *S. tuberosum* e protoplastos de *S. commersonii*.

Seguindo o modelo sugerido na literatura (WENZEL et al., 1979), AUSTIN et al. (1985b) produziram híbridos somáticos entre as linhagens melhoradas e di-haplóides US-W9545.99 e US-W9310.3, que possuíam resistência a várias doenças. Os híbridos tetraplóides obtidos eram vigorosos e produtivos.

CHAPUT et al. (1990) e WAARA et al. (1991) produziram híbridos intra-específicos, através da eletrofusão de protoplastos de cultivares di-haplóides melhoradas. Posteriormente, SERRAF et al. (1991) e SIHACHAKR et al. (1991) analisaram os híbridos intra-específicos produzidos por CHAPUT et al. (1990), além de híbridos interespecíficos entre a cultivar BF15 de *S. tuberosum* e a espécie *S. berthaultii*. Os híbridos intra-específicos mostraram-se resistentes a nematóides, a PVX e PVY e exibiram uma produção de tubérculos comparável à de cultivares comerciais. Os híbridos interespecíficos mostraram resistência a insetos, característica de *S. berthaultii*, avaliada através da atividade de uma enzima presente nos pêlos da epiderme das folhas. A maioria dos híbridos somáticos intra e interespecíficos era fértil.

A obtenção de híbridos intra-específicos, objetivando a transferência de macho-esterilidade citoplasmática tem sido relatada. PERL et al. (1990) trataram protoplastos das cultivares de batata Atzimba e Atlantic com iodoacetamida e os fundiram com protoplastos irradiados da linhagem Y 245.7. Foram produzidas 24 plantas híbridas, macho-estéreis, que possuíam um padrão de restrição do DNA mitocondrial diferente do dos parentais, evidenciando a ocorrência de recombinação.

A transferência da resistência a *Phytophthora infestans* e a *Verticillium dahliae*, via hibridação somática interespecífica, para genótipos de *S. tuberosum*, também foi obtida por SCHUMANN & GOTZ (1991) e JADARI et al. (1992).

A fusão de protoplastos de espécies dos gêneros *Solanum* e *Lycopersicon*, descrita há mais de 15 anos (MELCHERS et al., 1978) tem, recentemente, despertado interesse, pois híbridos somáticos simétricos e assimétricos, além de cíbridos, com graus variados de fertilidade, têm sido obtidos (GURI et al., 1991; JACOBSEN et al., 1992; MELCHERS et al., 1992; SCHOENMAKERS et al., 1994). A transferência de macho-esterilidade citoplasmática e de genes de interesse, que conferem tolerância ao frio e resistência a várias doenças, foi avaliada por JACOBSEN et al., (1994) e os resultados obtidos permitiram aos autores recomendar o aproveitamento de algumas linhagens de híbridos somáticos em programas de melhoramento genético da batata.

Vários ensaios a campo têm sido realizados visando a avaliação dos híbridos somáticos intra e interespecíficos de batata produzidos nos últimos anos (MATTHEIJ & PUIE, 1992; JACOBSEN et al., 1994; MÖLLERS et al., 1994). Alguns dos materiais analisados produziram até três vezes mais que as cultivares comerciais, mantendo o tamanho e forma dos tubérculos (MATTHEIJ & PUIE, 1992). Outros possuíam 15 a 20% mais amido que os controles e características, como tubérculo oval com epiderme avermelhada, eram comuns (MÖLLERS et al., 1994).

2.4. Limitações das técnicas de hibridação somática no melhoramento genético de plantas cultivadas

Segundo EVANS (1991) a maior restrição à aplicação das técnicas de hibridação somática visando a transferência de características agronomicamente desejáveis, de espécies selvagens para espécies cultivadas, ainda reside na incapacidade de se regenerar plantas inteiras a partir dos produtos de fusão. Existem vários relatos na literatura a respeito de problemas de eliminação de cromossomos em cultura de células híbridas (EVANS, 1991; SUNDBERG & GLIMELIUS, 1991; BABIYCHUK et al., 1992; GILISSEN et al., 1992a,b; WANG et al., 1993). Este processo de eliminação de material genético não permite, ou limita, a regeneração de plantas inteiras (WOLTERS et al., 1993) ou de plantas que possuam as características desejadas (BONNEMA et al., 1992; PUITE & SCHAART, 1993).

A segregação e eliminação preferencial de cloroplastos, bem como a recombinação do DNA mitocondrial em híbridos somáticos ou cíbridos, pode frustrar o sucesso de transferência de características agronomicamente desejáveis, como a macho-esterilidade citoplasmática (KOFER et al., 1990; SPANGENBERG 1990). Entretanto, o mecanismo que direciona esta eliminação preferencial de organelas ainda não foi esclarecido (KUMAR & COCKING, 1987).

Estudos a respeito do comportamento fenotípico e genético de híbridos somáticos são raros e limitam-se a poucas gerações (IMAI et al., 1992).

Na maior parte dos casos descritos, os híbridos somáticos possuem ploidia superior à das espécies de interesse econômico. Estudos de retrocruzamento envolvendo os híbridos somáticos e seus parentais, da

expressão de genes de interesse e ensaios a campo visando estudos de fertilidade, produtividade e adaptabilidade das progênes, são escassos na literatura. Foram relatados apenas em batata (MATTHEIJ & PUITE, 1992; DAUNAY et al., 1993; MÖLLERS et al., 1994).

Por outro lado, a incorporação de híbridos somáticos em programas de melhoramento já foi descrita para *Brassica* (FAHLESON et al., 1994), *Citrus* (GROSSER & GMITTER, 1990; LOUSADA et al., 1992), *Nicotiana* (PANDEYA et al., 1986; ATANASSOV et al., 1991) e *Solanum* (AUSTIN et al., 1986; MATTHEIJ & PUITE, 1992; DAUNAY et al., 1993; MÖLLERS et al., 1994).

Apesar de as técnicas estarem disponíveis há mais de 20 anos, a regeneração de plantas a partir da cultura de protoplastos e a obtenção de híbridos somáticos em várias espécies agrícolas de importância, foram descritas há pouco tempo. Somente nos últimos anos relatou-se a incorporação de híbridos somáticos nos programas de melhoramento de plantas cultivadas. Embora existam restrições, o emprego da hibridação somática, como um recurso auxiliar na transferência de genes, deve ser considerado. Sobretudo nos casos em que as características de interesse são herdadas citoplasmaticamente e na impossibilidade ou dificuldade de obtenção de híbridos sexuais.

2.5. A cultura e fusão de protoplastos e o melhoramento do maracujazeiro

Entre as aproximadamente 350 espécies do gênero *Passiflora* descritas, menos de 20 são originárias do Velho Mundo (Malásia, China e Austrália). Das espécies nativas do Continente Americano, a maioria é

proveniente da zona intertropical, principalmente do Brasil (KILLIP, 1938; FOUQUÉ, 1972).

A espécie *Passiflora edulis* é largamente cultivada, quer para a extração do suco de seus frutos para processamento industrial, quer para o seu consumo *in natura*. No Brasil, que é o maior produtor mundial de frutos de maracujá, a variedade *flavicarpa* de *P. edulis* (maracujá amarelo) ocupa a maior área plantada. Na década de 80, essa área era de cerca de 10 mil hectares, apenas na região nordeste do Brasil (LANDGRAFF, 1991). O suco de maracujá concentrado e congelado possui uma grande demanda interna e externa, sendo o responsável pelo segundo maior volume de suco exportado pelo país, superado apenas pelo suco de laranja (RUGGIERO, 1987). Segundo LANDGRAFF (1991), há uma tendência de aumento na demanda do mercado internacional de sucos em geral, sobretudo dos sucos "exóticos", entre os quais o de maior expressão é o de maracujá puro ou em misturas com outros sucos.

OLIVEIRA & FERREIRA (1991) afirmaram que apesar da grande importância da cultura, as variedades de maracujá comercial existentes no Brasil são, em sua maioria, susceptíveis a um grande número de pragas e doenças, além de pouco produtivas, se comparadas com variedades cultivadas em outras regiões, como no Havaí. Isto se deve ao fato de que a aplicação das técnicas de melhoramento genético do maracujazeiro é bastante problemática devido à ocorrência dos fenômenos de protandria, autoincompatibilidade e variações na morfologia floral.

De acordo com OLIVEIRA & FERREIRA (1991), das doenças de parte aérea, a bacteriose (*Xanthomonas passiflorae* Per.) e a antracnose (*Colletotrichum gloesporioides* Pens.) são as principais causadoras de sintomas

do tipo desfolhamento precoce e morte de ramos e, se não controladas a tempo, podem levar a planta atacada à morte. A doença denominada morte súbita ou precoce, de causa ainda não esclarecida, a murcha de fusarium (*Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*), e a morte devido à fitofora (*Phytophthora cinnamoni* Rands.) só são passíveis de controle, atualmente, pelo uso de porta-enxertos resistentes. A morte súbita e a murcha de fusarium são os principais fatores limitantes da expansão da cultura, principalmente no estado de São Paulo.

Apesar das dificuldades existentes para a obtenção de cruzamentos, alguns híbridos sexuais interespecíficos têm sido produzidos, uma vez que muitas espécies do gênero *Passiflora* possuem características desejáveis a serem transferidas para a espécie *P. edulis* var. *flavicarpa* (OLIVEIRA, 1987).

YAMASHIRO & LANDGRAFF (1979) relataram que as espécies *P. alata* Ait., *P. quadrangularis* L. e *P. macrocarpa* Mast. apresentaram resistência ao *Fusarium oxysporum* f.sp. *passiflorae*.

Com relação à morte súbita de plantas, OLIVEIRA et al. (1982, 1983, 1986) constataram que populações de *P. caerulea* L. e de *P. serrato-digitata* L. mostraram indivíduos tolerantes, enquanto as espécies *P. giberti* N.E. Brown, *Passiflora* sp (maracujá-de-cobra) e *P. alata* Ait. mostraram-se resistentes. No entanto, no Brasil todos os acessos de *P. edulis* avaliados, mostraram-se susceptíveis à morte súbita de plantas (OLIVEIRA et al., 1986) e à murcha causada por *Fusarium* (CARVALHO & CARVALHO, 1968; YAMASHIRO, 1987; OLIVEIRA & FERREIRA, 1991).

Uma prática agrícola geralmente recomendada para contornar problemas causados por doenças do sistema radicular, é a enxertia.

Entretanto, as espécies *P. alata* e *P. giberti*, recomendadas como porta-enxertos para o maracujá amarelo, visando o controle da murcha de *Fusarium* e da morte súbita, são altamente susceptíveis ao ataque de nematóides. Portanto, programas de melhoramento genético, visando o controle da murcha de *Fusarium* e/ou da morte súbita de plantas, devem ser conduzidos associados à resistência à nematóides, que é uma característica pertinente ao *P. edulis* var. *flavicarpa* (KLEIN et al., 1984; SILVA JÚNIOR et al., 1988; OLIVEIRA & FERREIRA, 1991).

No que se refere às doenças da parte aérea, NETO et al. (1984) trabalhando com *Xanthomonas campestris* f. sp. *passiflorae*, mostraram que as espécies *P. mollissima* Bailey, *P. cincinnata* Mast. e *P. foetida* L. são resistentes à esta bactéria. OLIVEIRA & FERREIRA (1991), relataram que alguns genótipos de *P. maliformis* L., *P. giberti* N. E. Brown, *P. coccinea* Aub. e populações de híbridos sexuais entre espécies e *P. edulis* var. *flavicarpa* possuem plantas tolerantes à bacteriose.

MARTIN & NAKASONE (1970) sugeriram que as barreiras reprodutivas devem ser muito fortes entre as espécies de *Passiflora*, embora, no grupo que possui o número de cromossomos $2n=18$, estas barreiras sejam atenuadas.

TORRES & MARTIN (1974) realizaram a hibridação entre sete espécies de *Passiflora*, obtendo seis híbridos interespecíficos, sendo em sua maioria vigorosos, de características morfológicas intermediárias aos progenitores, variando quanto ao grau de viabilidade dos grãos de pólen e ao sucesso de autofecundação e retrocruzamentos posteriores.

Por outro lado, PAYAN & MARTIN (1975) precisaram recorrer à aplicação de fitorreguladores na base do ovário do progenitor feminino para contornar barreiras de incompatibilidade entre as espécies de maracujazeiros, para obter sete novas combinações de híbridos interespecíficos.

OLIVEIRA (1987) e OLIVEIRA et al. (1988) relataram a obtenção de híbridos interespecíficos entre *P. edulis* e as seguintes espécies: *P. incarnata* L., *P. alata* Ait., *P. caerulea* L., *P. coccinea* Aub., *P. giberti* N. E. Brown, *P. cincinnata* Mast., *Passiflora* sp. (maracujá-de-cobra) e *Passiflora* sp. (FRF 350). Observou-se que os híbridos interespecíficos comportaram-se da mesma forma como descreveram anteriormente TORRES & MARTIN (1974), inclusive no que se refere à baixa fertilidade dos mesmos.

OLIVEIRA & FERREIRA (1991) mostraram que os híbridos entre *P. edulis* com *P. alata*, *P. giberti*, *P. coccinea*, *P. incarnata*, *P. caerulea* e *Passiflora* sp (maracujá-de-cobra) foram susceptíveis à morte súbita de plantas, sugerindo que a tolerância a esta doença seria controlada por genes recessivos.

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

Para que seja possível a produção eficiente de híbridos somáticos, é necessário que técnicas de isolamento e cultura de protoplastos, com regeneração de plantas inteiras estejam otimizadas para as espécies em questão. Existem na literatura, vários trabalhos relatando a regeneração de plantas inteiras a partir da cultura de tecidos de várias espécies de *Passiflora* (NAKAYAMA (1966), MORAN-ROBLES (1978,1979), MOURAD-AGHA &

DEXHEIMER (1979), SCORZA & JANICK (1980), BACCARIN (1988) e KANTHARAJAH & DODD (1990), DREW (1991) e DORNELAS & VIEIRA (1994).

Testes preliminares, realizados no Departamento de Genética da ESALQ/USP, mostraram que é possível o isolamento e cultura de protoplastos de espécies de *Passiflora*, através da adaptação de protocolos otimizados para outras espécies de plantas (DORNELAS & VIEIRA, 1990). A partir daí, os relatos de MANDERS et al. (1991), DORNELAS & VIEIRA (1993) e D'UTRA VAZ et al. (1993) mostraram que é possível a regeneração de plantas inteiras a partir da cultura de protoplastos de *Passiflora* spp.

MANDERS et al. (1991) e D'UTRA VAZ et al. (1993) isolaram protoplastos de mesofilo a partir de explantes foliares excisados de plântulas de *P. edulis* var. *flavicarpa* germinadas em casa de vegetação, com 14 a 21 dias de idade. MANDERS et al. (1991) utilizaram uma mistura enzimática contendo 1,0% de Cellulase R10 e 0,1 % de Pectolyase Y-23. D'UTRA VAZ et al. (1993) utilizaram a mistura de enzimas, recomendada por OCHATT et al. (1987) para o isolamento de protoplastos de cereja (*Prunus avium* x *P. pseudocerasus*) e que consistia de 0,2% de Macerozyme R10; 1,0 % de Cellulase R10 e 0,1% de Driselase. Ambas as misturas enzimáticas continham 5,0 mM de MES e 250µg.l⁻¹ do antibiótico cefatoxime, em solução de CPW (descrita por FREARSON et al., 1973), suplementada com 13% de manitol (CPW13). A digestão enzimática foi realizada sob agitação constante de 40 rpm. Foi observada a produção de $12,3 \pm 2,1 \times 10^6$ protoplastos por grama de tecido foliar.

D'UTRA VAZ et al. (1993) observaram uma queda na produção de protoplastos a partir de explantes excisados de plantas que já apresentavam a formação de gavinhas.

Segundo D'UTRA VAZ et al. (1993), a densidade de $1,5 \times 10^5$ protoplastos/ml de meio KM8P e o sistema de cultura em "droplets" (gotas) de agarose, promoveram a maior frequência de células em divisão e a maior eficiência de formação de colônias ("plating efficiency", PE).

MANDERS et al. (1991) e D'UTRA VAZ et al. (1993) relataram que a adição de 250 mg.l^{-1} do antibiótico cefatoxime ao meio de cultura, foi essencial para a manutenção da divisão celular e a formação de colônias a partir da cultura de protoplastos de mesofilo de *P. edulis* var. *flavicarpa*. Estes autores transferiram as colônias formadas para meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementado com $5,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de NAA e $0,25 \text{ mg.l}^{-1}$ de BAP, no escuro, para a produção de calos. Os calos foram transferidos para meio de regeneração, que consistiu de meio basal MS suplementado com $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de BAP, sob condições de luminosidade. A regeneração de 2 a 3 brotos por calo foi observada em 40% dos calos derivados da cultura de protoplastos, após 90 dias de cultura no meio suplementado com BAP.

DORNELAS & VIEIRA (1993) isolaram protoplastos a partir de tecido cotiledonar de plantas de *P. edulis* var. *flavicarpa*, *P. amethystina* e *P. cincinnata* germinadas *in vitro*. Para tal utilizaram uma mistura enzimática que consistiu em 2,0% de Cellulase R10 e 0,4% de Macerozyme R10, diluída em CPW13. Cerca de $3,6$ a $6,9 \times 10^6$ protoplastos foram isolados, a partir de 500 mg de tecido cotiledonar das espécies estudadas. Estes protoplastos foram cultivados, em três densidades diferentes, em meio KM8P líquido ou solidificado com agarose. Foram observados resultados semelhantes aos relatados por D'UTRA VAZ et al. (1993): o sistema de cultura em "droplets" de agarose e a

densidade de 1×10^5 protoplastos/ml de meio proporcionaram as maiores porcentagens de células em divisão e as maiores "plating efficiencies".

DORNELAS & VIEIRA (1993) observaram que o meio KM8P foi suficiente para a manutenção das divisões celulares e para a formação de microcolônias, sem a necessidade da adição de antibióticos, relatada por MANDERS et al. (1991) e D'UTRA VAZ et al. (1993). As colônias com mais de 1 mm de diâmetro foram transferidas para o meio recomendado por MANDERS et al. (1991), no escuro, para o desenvolvimento de calos. Plantas inteiras puderam ser regeneradas para as três espécies estudadas, mediante a transferência destes calos para meio MS suplementado com $2,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de BAP e 10% de água de coco, sob condições de luminosidade.

Estes trabalhos mostram, portanto, que é possível a utilização de técnicas de manipulação celular, como a fusão de protoplastos, visando a transferência de genes de espécies selvagens de *Passiflora* para a espécie comercial, uma vez que metodologias de cultura *in vitro* estão disponíveis para várias espécies do gênero, incluindo a regeneração de plantas inteiras a partir de protoplastos. Híbridos zigóticos interespecíficos são importantes para programas de melhoramento genético do maracujazeiro e têm sido obtidos. Entretanto, tais híbridos são de difícil obtenção e possuem graus variados de fertilidade, justificando a aplicação da técnica de hibridação somática.

Os híbridos somáticos, por serem tetraplóides, também podem apresentar baixa fertilidade e/ou progênies estéreis, sobretudo quando retrocruzados com as espécies parentais diplóides (EVANS, 1991).

A ploidia dos híbridos somáticos pode ser reduzida, pela obtenção de plantas di-haplóides, via cultura de anteras, ou os mesmos híbridos podem ser

incorporados em programas de melhoramento de variedades tetraplóides (BAJAJ, 1991).

Não há na literatura, até o momento, protocolos disponíveis para a obtenção de plantas di-haplóides de *Passiflora*. TSAY et al. (1984), trabalhando com anteras do híbrido zigótico (*P. edulis* x *P. edulis* var. *flavicarpa*) x *P. edulis* var. *flavicarpa*, avaliaram vários meios e condições de cultura, mas não obtiveram a regeneração de plantas inteiras. Apenas calos e algumas protusões, semelhantes à gemas, foram produzidos.

Entretanto, o aproveitamento de híbridos somáticos tetraplóides em programas de melhoramento genético de *Passiflora* não deve ser descartado. Plantas tetraplóides de *P. edulis* var. *flavicarpa* e de *P. cincinnata*, produzidas a partir da cultura de protoplastos, mostraram-se férteis, segundo informações de OLIVEIRA¹.

KNIGHT (1991) produziu e avaliou híbridos zigóticos tetraplóides interespecíficos de *Passiflora*, portadores de características desejáveis para o clima temperado, como tolerância ao clima frio. Quando plantas de *P. incarnata* L. foram cruzadas com plantas de *P. edulis* var. *flavicarpa*, todos os híbridos interespecíficos produzidos mostraram-se estéreis e não produziram frutos. No entanto "seedlings" deste cruzamento foram tratados com uma solução de 0,2% de colchicina e as plantas emergentes foram tetraploidizadas. A fertilidade foi restaurada e progênies puderam ser obtidas dos cruzamentos entre as plantas híbridas. Clones destas progênies foram avaliados a campo para várias características de interesse agrônomo, como cor, acidez e teor de sólidos solúveis do suco dos frutos e tolerância ao frio. O desempenho das plantas

¹ OLIVEIRA, J.C. de (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, FCAV/UNESP) Comunicação pessoal.

•

tetraplóides nestas avaliações, foi semelhante ou superior ao desempenho das plantas diplóides e permitiu ao autor recomendar o uso destes híbridos zigóticos para a produção de uma cultivar tetraplóide de maracujá.

Da mesma maneira, híbridos somáticos de *Passiflora*, portando características de interesse agrônomo para as regiões tropicais, poderiam ser utilizados em programas de melhoramento de cultivares tetraplóides, ou em programas de melhoramento de cultivares diplóides, desde que acompanhados de seleção para fertilidade.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Os tecidos vegetais utilizados para o isolamento de protoplastos foram retirados das espécies *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg., *P. alata* Ait., *P. amethystina* Mikan., *P. cincinnata* Mast., *P. coccinea* Aubl. e *P. giberti* N. E. Brown. Estas espécies fazem parte das coleções de plantas de *Passiflora*, mantidas *in vitro* e no campo experimental do Departamento de Genética da ESALQ/USP. As plantas mantidas *in vitro* são oriundas de culturas de ápices caulinares, obtidas segundo o protocolo de DORNELAS & VIEIRA (1994). As plantas mantidas a campo são oriundas de sementes cedidas pelo Prof. João Carlos de Oliveira, da FCAV/UNESP em Jaboticabal SP e de material coletado na região da Serra da Mantiqueira, no Município de Munhoz, MG. Os materiais coletados foram identificados pelo Prof. Armando Carlos Cervi, da Universidade Federal do Paraná, em Curitiba, PR.

P. edulis var. *flavicarpa* (Figura 1.a), o maracujá-azedo ou maracujá-amarelo, pertence ao subgênero *Granadilla*, série *Incarnatae* (KILLIP, 1938). É a espécie economicamente mais importante para o Brasil, sendo cultivado para a produção de frutos para consumo *in natura* ou para a extração de suco para processamento industrial (OLIVEIRA & FERREIRA, 1991).

P. alata (Figura 1.b), o maracujá-doce ou maracujá-de-comer, pertence ao subgênero *Granadilla*, série *Quadrangulares* (KILLIP, 1938). Esta espécie também possui frutos comestíveis e é a segunda em importância econômica para o Brasil. *P. alata* é também tolerante à murcha causada por *Fusarium* e à morte prematura (YAMASHIRO & LANDGRAFF, 1979; OLIVEIRA et al., 1982, 1983, 1986).

P. amethystina (Figura 1.c), do subgênero *Granadilla*, série *Lobatae*, é uma espécie selvagem, de distribuição restrita à região da Serra do Mar, no Brasil. Possui flores roxas muito aromáticas e pertence ao subgênero *Granadilla*, série *Lobatae* (KILLIP, 1938; FOUQUÉ, 1972).

P. cincinnata (Figura 1.d) pertence ao subgênero *Granadilla*, série *Incarnatae*, podendo ser encontrada do leste do Brasil até no Paraguai e Argentina (KILLIP, 1938; FOUQUÉ, 1972). É tolerante à bacteriose, causada por *Xanthomonas*, uma doença de parte aérea, limitante em alguns pomares brasileiros (YAMASHIRO, 1991).

P. coccinea (Figura 1.e), do subgênero *Distephana*, é uma espécie nativa da bacia amazônica, possui flores de coloração vermelho-intenso (FOUQUÉ, 1972) e também é resistente à bacteriose (OLIVEIRA & FERREIRA, 1991).

P. giberti (Figura 1.f) pertence ao mesmo subgênero e série de *P. amethystina* (KILLIP, 1938) e é tolerante à murcha causada por *Fusarium* e à morte prematura (YAMASHIRO & LANDGRAFF, 1979; OLIVEIRA et al., 1982, 1983, 1986).

Figura 1. Flores de *P. edulis* var. *flavicarpa* (a.), *P. alata* (b.), *P. amethystina* (c.), *P. cincinnata* (d.), *P. coccinea* (e.) e *P. giberti* (f.). Barras = 2cm.

3.2. Regeneração de plantas inteiras a partir da cultura de protoplastos isolados de tecido foliar de *Passiflora* spp.

3.2.1. Isolamento e cultura de protoplastos

O tecido foliar, utilizado como fonte de protoplastos, foi excisado de plantas das espécies *P. edulis* var. *flavicarpa*, *P. alata*, *P. amethystina*, *P. cincinnata* e *P. giberti*, mantidas *in vitro* na forma de culturas de ápices caulinares como descrito por DORNELAS & VIEIRA (1994).

Cortou-se transversalmente, com auxílio de bisturi, cerca de 0,5g de tecido foliar procedendo-se, em seguida, a uma pré-plasmólise deste tecido em solução salina CPW 13 (FREARSON et al., 1973; Apêndice 2), em placas de Petri de 5,0 cm de diâmetro. Após 5 min, a solução de CPW foi substituída por uma mistura enzimática contendo Cellulase R10 e Macerozyme R10 (Apêndice 3). As placas de Petri, contendo os explantes foliares na mistura enzimática foram mantidas no escuro, sob 60 rpm de agitação (mesa agitadora orbital TE-140, Tecnal), por 16 h.

A mistura enzimática, contendo os protoplastos e restos de tecido não digerido foi filtrada em malha de nylon de 64 μm e centrifugada por 7 minutos a 1500 rpm (centrífuga Fahren, modelo Baby II, passo 1). Os protoplastos foram ressuspensos em solução de lavagem CPW 13 e centrifugados novamente.

O "pellet" obtido foi ressuspensado em 1 ml de meio líquido KM8P (KAO & MICHAYLUK, 1975, modificado por GILMOUR et al., 1989; Apêndice 4) e procedeu-se à contagem dos protoplastos, em um hemocitômetro. A viabilidade dos protoplastos foi verificada mediante a observação ao microscópio de

fluorescência, da mistura de uma suspensão de protoplastos com uma solução de 0,1% (p/v) FDA (Apêndice 5). A viabilidade média, em porcentagem, foi calculada pela relação entre o número de protoplastos com fluorescência verde e o número total de protoplastos por campo visual, utilizando-se objetiva de 20x. Foram observados 100 campos em 3 experimentos independentes, para cada espécie estudada.

Foram usadas 3 densidades de cultura: 5×10^4 , 1×10^5 e 2×10^5 protoplastos por ml de meio. Os protoplastos foram cultivados em meio líquido, ou imobilizados em meio solidificado com agarose (Apêndice 6). Foram utilizadas placas de Petri de 5,0 cm de diâmetro, contendo 4 ml de meio KM8P, perfazendo 3 repetições para cada densidade. As culturas foram mantidas no escuro, a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, até haver a formação das primeiras colônias.

Foram avaliadas:

- a. A frequência de divisão celular das culturas, expressa pela porcentagem de protoplastos sobreviventes que formaram pelo menos uma lamela transversal, em relação ao número inicial de protoplastos.
- b. A eficiência de formação de colônias, ou "plating efficiency" (PE) que é definida pela porcentagem de colônias formadas, após 14 dias de cultura, em relação ao número inicial de protoplastos.

Todos os experimentos de isolamento e cultura de protoplastos foram repetidos 3 vezes.

3.2.2. Cultura de calos e regeneração de plantas

Após 28 dias de cultura, microcolônias com mais de 1mm de diâmetro foram transferidas para meio MD completo (MOURAD-AGHA & DEXHEIMER, 1979; Apêndice 7) ou meio MS basal (MURASHIGE & SKOOG, 1962; Apêndice 8.), solidificado com 1,5% de Phytigel (Sigma), suplementado com 5,0 mg.l⁻¹ de NAA + 0,5 mg.l⁻¹ de BAP, conforme sugerido por MANDERS et al. (1991), mantendo-se a condição de escuro e a temperatura de 25± 2°C.

Os calos derivados foram transferidos para meio MS + 2,0 mg.l⁻¹ de BAP + 10% de água de coco, sob 23 µE.m⁻².s⁻¹ de radiação luminosa, para indução de brotos.

As plantas regeneradas foram individualizadas e transferidas para meio MS basal, com metade de sua concentração original de sais e vitaminas (MS/2), para promover o enraizamento. Após enraizadas, as plantas foram transferidas para a casa de vegetação, mediante um tratamento de aclimação. Para tal, as plantas foram retiradas do meio de cultura e transferidas para copos plásticos de 300 ml de capacidade, contendo uma mistura 1:1:1 de terra, areia e composto orgânico. As plantas foram regadas e borrifadas com água. Os copos foram cobertos com sacos plásticos transparentes perfurados e mantidos em telado. Após 3 dias, os sacos plásticos foram retirados.

3.2.3. Análises citológicas de plantas regeneradas a partir da cultura de protoplastos de *P. edulis* var. *flavicarpa* e *P. cinnata*

Para a contagem do número de cromossomos, raízes com cerca de 3 cm de comprimento foram coletadas de plantas regeneradas a partir de calos oriundos da cultura de protoplastos de *P. edulis* var. *flavicarpa* e *P. cinnata*. Os calos foram cultivados em meio MD por 28 dias, ou em meio MS + 5,0 mg.l⁻¹ NAA + 0,5 mg.l⁻¹ BAP (MANDERS et al., 1991), por 56 dias.

As raízes coletadas foram pré-tratadas com uma solução de 8-hidroxiquinolina 0,3% (p/v) durante aproximadamente 3h. Em seguida foram fixadas em etanol : ácido acético (3:1) por 18h e mantidas em etanol 70%, em refrigerador. As raízes foram submetidas à hidrólise em HCl 1N a 60°C por 8 min. e em seguida coradas em Reativo de Schiff por 45 min. As preparações foram feitas em carmim acético 2%.

Avaliaram-se 20 plantas de *P. edulis* e *P. cinnata* regeneradas a partir de calos cultivados em cada um dos meios especificados. Pelo menos 30 metáfases por planta foram avaliadas.

3.2.4. Análise histológica da epiderme de plantas regeneradas a partir da cultura de protoplastos de *P. edulis* var. *flavicarpa* e *P. cinnata*

Visando estudar as células da epiderme foliar das plantas derivadas da cultura de protoplastos, coletaram-se folhas jovens, localizadas no segundo nó das plantas mantidas em casa de vegetação. As folhas foram cortadas em fragmentos com cerca de 1cm² e tratadas com solução de Jeffrey

(ácido nítrico-brômico, 1:1 a 10% v/v) à 60°C por 5h. Em seguida, as epidermes inferior e superior foram separadas, limpas com o auxílio de um pincel macio e fixadas em uma mistura de etanol-ácido acético 3:1 (v/v) por 30 min. Procedeu-se a coloração com safranina 0,5% (p/v) em etanol-xilol 1:1 (v/v). Para observação ao microscópio óptico, as amostras foram colocadas em lâminas contendo uma gota de água. Lâminas permanentes foram montadas usando-se bálsamo do Canadá.

Com o auxílio de uma ocular micrométrica, mediu-se o comprimento de 34 células-guarda dos estômatos da epiderme inferior de plantas diplóides e tetraplóides. Procedeu-se ainda a contagem do número de estômatos por campo, utilizando-se a objetiva de 40x. Cem campos foram examinados para plantas diplóides e tetraplóides, derivadas da cultura de protoplastos. O grau de ploidia destas plantas foi determinado pela análise cromossômica.

3.3. Regeneração de híbridos somáticos a partir da cultura de produtos de fusão de protoplastos de *Passiflora* spp.

3.3.1. Obtenção de suspensões celulares

A identificação dos heterodímeros durante o processo de fusão é facilitada quando se dispõe de algum marcador morfológico que permita a rápida distinção entre protoplastos de uma espécie dos de outra. É descrito comumente na literatura a fusão de protoplastos isolados de suspensões celulares, pois esta é uma fonte abundante de células sem plastos verdes, com protoplastos isolados

de mesofilo foliar, que contêm cloroplastos (MYERS et al., 1989a,b; PUPILLI et al., 1989; GROSSER & GMITTER, 1990).

Com o objetivo de se obter protoplastos sem plastos verdes, de algumas espécies de *Passiflora*, iniciaram-se suspensões celulares a partir de calos de *P. edulis* var. *flavicarpa*, *P. cincinnata*, *P. amethystina*, *P. coccinea* e *P. giberti*, induzidos a partir de explantes foliares cultivados por 28 dias, no escuro, em meio MD (MOURAD-AGHA & DEXHEIMER, 1979) e meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), modificados como especificado na Tabela 1.

Colocou-se cerca de 1g de tecido de calos friáveis das espécies mencionadas acima, em 25 ml de meio líquido autoclavado (120°C, 1atm, 20 min) em erlenmeyers de 125 ml de capacidade. Os erlenmeyers foram tampados com papel alumínio (Rochedo) e mantidos sob agitação (mesa agitadora TE-140, Tecnal, 130 rpm), no escuro, a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Avaliou-se o peso de matéria fresca e o PCV ("Packed Cell Volume", calculado de acordo com REINERT & YEOMAN, 1982) das culturas, visando a determinação das curvas de crescimento das suspensões celulares. Para tal, amostras foram coletadas a cada 5 dias, de 5 repetições para cada espécie estudada.

Uma vez determinada a curva de crescimento, o meio de cultura foi substituído a cada 15 dias, mediante a filtragem das culturas em malha de nylon de 100 μm .

Tabela 1. Meios de cultura utilizados para a obtenção de suspensões celulares de *Passiflora spp.* Todos os meios de cultura tiveram seu pH acertado para 5,8.

Trat. nº.	Meio basal	Alteração
1	MD ^a	meio completo
2	MD	sem água de coco
3	MD	sem extrato de levedura
4	MD	sem água de coco e extrato de levedura
5	MS ^b	com compostos orgânicos do MD
6	MS	sem água de coco
7	MS	sem extrato de levedura
8	MS	sem água de coco e extrato de levedura

a - MOURAD-AGHA & DEXHEIMER (1979);

b- MURASHIGE & SKOOG (1962).

3.3.2. Isolamento de protoplastos a partir de suspensões celulares de *Passiflora spp.*

Para a realização dos experimentos de fusão, protoplastos de tecido foliar de *P. edulis* var. *flavicarpa* foram isolados como descrito no item 3.2.1.

Protoplastos de suspensões celulares de *P. alata*, *P. amethystina*, *P. cincinnata*, *P. coccinea* e *P. giberti*, foram isolados 3 a 4 dias após a repicagem para meio fresco, usando o seguinte procedimento:

Coletou-se cerca de 0,5g da cultura celular, com o auxílio de uma malha de nylon (45 μ m) e procedeu-se a plasmólise destas células em solução salina CPW 13, de maneira semelhante à descrita no item 3.2.1.

As células foram submetidas aos tratamentos enzimáticos mostrados na Tabela 2., por 16 h, sob agitação de 60 rpm (mesa agitadora orbital TE-140, Tecnal), no escuro, a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Após a digestão enzimática, a mistura foi filtrada em malha de nylon de 64 μ m e centrifugada por 7 minutos a 1500 rpm.

O "pellet" de protoplastos foi ressuspensionado em solução de sacarose 21% (p/v) e centrifugado novamente.

A banda sobrenadante, contendo os protoplastos, foi ressuspensionada em solução de lavagem CPW 13 e centrifugada novamente.

O "pellet" obtido nesta última centrifugação foi ressuspensionado em 1 ml de CPW13 e procedeu-se à contagem dos protoplastos em hemocítômetro.

3.3.3. Fusão química de protoplastos: otimização da técnica

Visando a otimização da metodologia de fusão, soluções contendo várias concentrações de polietileno glicol (PEG) foram avaliadas com respeito à eficiência na aglutinação de protoplastos de *Passiflora*.

Utilizou-se como modelo, a fusão de protoplastos isolados de explantes foliares de plantas de *P. edulis* var. *flavicarpa* mantidas *in vitro* e explantes de pétala de flores de *P. coccinea*. Desta forma, conseguiu-se

protoplastos verdes (*P. edulis* var. *flavicarpa*) e protoplastos vermelhos (*P. coccinea*), facilitando a identificação e contagem de heterodímeros.

Para o isolamento de protoplastos de *P. edulis* foi adotada a metodologia descrita no item 3.2.1. Para a obtenção de protoplastos de *P. coccinea*, a mesma técnica foi aplicada, porém os botões florais (coletados um dia antes da antese) de plantas desta espécie foram previamente esterilizados com etanol 70% (v/v), por 40 seg., seguido de tratamento com NaOCl 2% (v/v) por 20 min. Nos métodos de fusão avaliados (Tabela 3) utilizou-se PEG, PM 6000, como agente aglutinante.

Foram avaliadas a frequência de fusão e de formação de heterodímeros.

3.3.4. Fusão de protoplastos isolados de tecido foliar de *P. edulis* var. *flavicarpa* e protoplastos de suspensões celulares de *Passiflora* spp.

Protoplastos de tecido foliar de *P. edulis* var. *flavicarpa*, isolados como descrito no item 3.2.1, foram fundidos com protoplastos de *P. alata*, *P. amethystina*, *P. cincinnata*, *P. coccinea* e *P. giberti*, isolados de suspensões celulares como descrito no item 3.2.2.

A metodologia de fusão utilizada foi a descrita por POWER & CHAPMAN (1985), com modificações, conforme descrito no Apêndice 9 e empregando-se a mistura enzimática descrita pelos mesmos autores (ver Apêndice 10). Foram avaliadas a frequência de fusão e de formação de heterodímeros.

Tabela 2. Misturas enzimáticas utilizadas para o isolamento de protoplastos de suspensões celulares de *Passiflora* spp. As quantidades das enzimas estão expressas em porcentagem. As misturas foram preparadas como descrito no Apêndice 3.

Mist. nº.	Hemicelulases		Pectinases		Celulases			
	H	R	P	Ma	Me	C	D	Ce
01 ^a	2,0	-	-	0,03	2,0	-	-	-
02 ^b	1,0	-	-	-	-	0,1	1,0	-
03 ^c	0,2	0,1	-	-	-	1,0	0,2	-
04 ^c	0,2	0,1	0,2	-	-	1,0	0,2	-
05	2,0	-	-	0,2	2,0	-	-	-
06	2,0	-	-	2,0	2,0	-	-	-
07	0,2	-	-	0,2	-	1,0	0,2	-
08	0,2	-	-	2,0	-	1,0	0,2	-
09	-	-	0,2	-	-	-	-	1,0
10	-	-	-	0,8	-	4,0	-	-
11	-	-	-	2,0	-	-	-	1,0
12	-	-	0,4	-	-	-	-	2,0
13	-	-	-	2,0	-	-	-	2,0
14	-	-	0,4	-	-	1,0	-	-
15	-	-	0,4	-	-	2,0	-	-
16	-	-	0,4	-	-	3,0	-	-
17	-	-	0,4	-	-	4,0	-	-

H = Hemicellulase; R = Rhozyme; P = Pectolyase Y-23; Ma = Macerozyme R10;

Me = Meicelase; C = Celulase R10; D = Driselase; Ce = Cellulysin

^aPOWER & CHAPMAN (1985)

^bPUPILLI et al. (1989)

^cMYERS et al. (1989a).

Tabela 3. Tratamentos utilizados para a fusão de protoplastos de *P. edulis* var. *flavicarpa* e *P. coccinea*. Todos os tratamentos foram realizados em tubos de centrífuga com 8 ml de capacidade, à exceção do tratamento 5, realizado sobre lâminulas de vidro. Em todos os tratamentos, utilizou-se a concentração de 1×10^6 protoplastos/ml.

Solução de lavagem e pré-incubação	Tempo de sedimentação	Solução de PEG e CaCl_2	Tratamento / referência bibliográfica
7,40% (p/v) CaCl_2 3,75% (p/v) glicina 11% (p/v) sacarose	20 min.	22,5% 1,54% CaCl_2	1/a
CPW13	20 min.	12,5% 10 mM CaCl_2	2/b
CPW13	20 min.	25,0% 66 mM CaCl_2	3/c
CPW13	20 min.	30,0% 10 mM CaCl_2	4/a
0,4M manitol 15mM CaCl_2	10min.	50,0% 0,1M CaCl_2	5/d

a - POWER & CHAPMAN (1985)

b - POWER et al. (1976)

c - MENCZEL et al. (1989)

d - KAO (1982)

3.3.5. Cultura dos produtos de fusão

Os produtos de fusão foram cultivados em meio KM8P, no sistema de "droplets" de agarose (Apêndice 6) por 28 dias. Após este período, as colônias com mais de 1mm de diâmetro foram transferidas para meio MD sólido (0,15%, p/v, de Phytigel), onde permaneceram por mais 28 dias, no escuro.

Os calos híbridos, identificados pela análise do padrão eletroforético de proteínas solúveis e de isoenzimas, foram transferidos para meio de regeneração e cultivados como descrito no item 3.2.2 para a obtenção de plantas inteiras. Todos os experimentos foram repetidos pelo menos 3 vezes.

3.4. Identificação e caracterização dos híbridos somáticos entre espécies de *Passiflora*.

3.4.1. Análise do padrão eletroforético de proteínas solúveis separadas por SDS-PAGE

A análise do padrão eletroforético das proteínas solúveis de calos híbridos putativos de *Passiflora* spp. foi realizada de acordo com os protocolos descritos por LAEMMLI (1970, ver Apêndice 11).

Amostras proteicas foram extraídas de 1,0 g de tecido de calo congelado por, pelo menos, 24 horas a -18°C. A maceração foi feita em almofariz, previamente resfriado a -18°C, na presença de 500 µl de solução de PMSF 5µM. Adicionou-se o tampão da amostra (Apêndice 11) na proporção de 1:1. As amostras foram centrifugadas (12000 rpm, 5min., Microcentrifuga Eppendorff) e o

sobrenadante fervido em banho-maria a 100°C por 5 min. Conservou-se as amostras a -18°C, até o momento da eletroforese.

Preparou-se o gel carreador desnaturante (12% p/v de acrilamida em tampão TRIS-HCl 0,75M, pH 8,8) e o gel acumulador (4% p/v de acrilamida em tampão TRIS-HCl 0,25M, pH 6,8) conforme descrito por LAEMMLI (1970). As canaletas foram abastecidas com 60 µl de amostra.

A eletroforese foi realizada em tampão TRIS-glicina-SDS (0,025M TRIS; 0,192M glicina; 0,2% p/v SDS, pH 8,3), sob amperagem constante de 60 mA, a 4± 2°C.

Após a eletroforese, os géis acumuladores foram descartados e os géis carreadores foram corados com 0,05% (p/v) de Coomassie Brilliant Blue R-250 preparado em solução descorante (metanol:ácido acético:água, 4:1:8). O excesso de corante foi retirado com solução descorante, onde os géis foram mantidos.

A leitura dos géis foi feita em densitômetro (GS-300, Hoefer Scientific Instruments, U.S.A.), acoplado a um microcomputador PC/AT 386 (IBM, U.S.A.), usando-se o programa GS-365 Data System (Hoefer Scientific Instruments, U.S.A.) visando a determinação dos pesos moleculares e coeficiente de migração (Rf) das bandas de polipeptídeos.

3.4.2. Análise do padrão eletroforético de isoenzimas separadas por PAGE

A análise do padrão eletroforético das proteínas solúveis de calos híbridos putativos de *Passiflora* spp. foi realizada de acordo com os protocolos descritos por ALFENAS et al. (1991) (ver Apêndice 12).

As amostras foram extraídas como descrito no item 3.4.1, centrifugadas e conservadas a -18°C até o momento da eletroforese.

Preparou-se o gel carreador não-desnaturante (8% p/v de acrilamida em tampão TRIS-HCl 0,75M, pH 8,8) e o gel acumulador (4% p/v de acrilamida em tampão TRIS-HCl 0,25M, pH 6,8) conforme descrito por ALFENAS et al. (1991).

Procedeu-se a eletroforese em tampão TRIS-glicina (0,025M TRIS; 0,192M glicina; pH 8,3), sob amperagem constante de 60 mA, a $4 \pm 2^\circ\text{C}$.

Após a eletroforese os géis acumuladores foram descartados e os géis carreadores foram corados para as sistemas isoenzimáticos de α -esterase (α -EST), peroxidase (PO) e malato-desidrogenase (MDH), de acordo com ALFENAS et al. (1991, ver Apêndice 12).

3.4.3. Análises citológicas dos produtos de fusão

Após 24 h de cultura dos produtos de fusão, amostras dos "droplets" de agarose foram assepticamente removidas das placas de Petri e fixadas em etanol:ácido acético (3:1, v:v). Em seguida procedeu-se a coloração com carmim acético 2% (p/v). As lâminas foram montadas de acordo com o

descrito por WANG & BINDING (1993), visando a contagem do número de núcleos presentes por célula. Cem células foram examinadas por experimento de fusão.

Raízes com cerca de 3cm de comprimento foram coletadas de híbridos somáticos putativos entre *P. edulis* var. *flavicarpa* e as espécies *P. alata*, *P. amethystina*, *P. cincinnata* e *P. giberti*. Para o preparo das lâminas utilizou-se a metodologia descrita no item 3.2.3.

Pelo menos 3 plantas provenientes de cada experimento de fusão foram avaliadas. A contagem do número de cromossomos foi realizada em pelo menos 20 metáfases por planta analisada.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Regeneração de plantas inteiras a partir da cultura de protoplastos isolados de tecido foliar de *Passiflora* spp.

O tecido foliar das espécies de *Passiflora* estudadas, quando submetido ao tratamento enzimático, liberou protoplastos com diâmetros médios entre 21,9 e 38,8 μm (Figura 2 e Tabela 4). Os dados de produção e viabilidade dos protoplastos de *Passiflora* spp. bem como a frequência de divisão celular, em cada sistema de cultura, estão apresentados nas Tabelas 5 e 6.

Após 24h em cultura, observou-se que apenas os protoplastos que não apresentavam cloroplastos ainda não haviam regenerado a parede celular. Foi possível observar ainda, após 72h, as primeiras divisões (Figura 3) em células cultivadas nos sistemas de "droplets" e fatias de agarose, que se mostraram mais adequados à cultura de protoplastos das espécies de *Passiflora* estudadas, apresentando as maiores porcentagens de células em divisão (Tabela 6) e as maiores "plating efficiencies" (Figura 4).

D'UTRA VAZ et al. (1993) isolaram protoplastos de mesofilo de *P. edulis* var. *flavicarpa* utilizando uma mistura enzimática recomendada por OCHATT et al. (1987) para o isolamento de protoplastos de folhas de cereja (*Prunus avium* x *P. pseudocerasus*). Foram produzidos $12,3 \pm 2,1 \times 10^6$ protoplastos por grama de tecido foliar, que mediam de 15 a 35 μm de diâmetro.

Figura 2. a. Início da liberação de protoplastos de *P. edulis* var. *flavicarpa*, a partir da digestão enzimática de tecido foliar. b. Protoplastos recém isolados de *P. edulis* var. *flavicarpa*. Barras=50 μ m.

Tabela 4. Diâmetro médio, em μm , dos protoplastos de *Passiflora* spp (média $\pm$ desvio padrão).

Espécie	Diâmetro médio ^a
<i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i>	36,3 $\pm$ 7,3
<i>P. alata</i>	36,6 $\pm$ 2,8
<i>P. amethystina</i>	34,4 $\pm$ 6,2
<i>P. cincinnata</i>	38,8 $\pm$ 6,9
<i>P. giberti</i>	21,9 $\pm$ 3,6

^a Média de 100 repetições de 3 experimentos.

Tabela 5. Produção total e viabilidade dos protoplastos isolados a partir de tecido foliar de *Passiflora* spp (média $\pm$ desvio padrão).

Espécie	Produção ^a	Viabilidade ^b
<i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i>	8,4x10 ⁶ $\pm$ 5,3x10 ⁵	92,6 $\pm$ 2,7
<i>P. alata</i>	5,3x10 ⁶ $\pm$ 6,8x10 ⁵	96,3 $\pm$ 3,5
<i>P. amethystina</i>	6,8x10 ⁶ $\pm$ 8,3x10 ⁵	91,6 $\pm$ 1,3
<i>P. cincinnata</i>	7,6x10 ⁶ $\pm$ 5,1x10 ⁵	95,7 $\pm$ 2,1
<i>P. giberti</i>	4,6x10 ⁶ $\pm$ 3,9x10 ⁵	96,4 $\pm$ 0,9

^a Número de protoplastos produzidos a partir da digestão enzimática de 500 mg de tecido foliar. Média de 3 experimentos.

^b Porcentagem de protoplastos com fluorescência verde, em relação ao número de protoplastos total em um campo de 40x, sob microscopia de fluorescência. Média da observação de 100 campos, de 3 experimentos.

Tabela 6. Porcentagens de divisão (média $\pm$ desvio) em culturas de protoplastos isolados de explantes foliares de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*, *P. alata*, *P. amethystina*, *P. cincinnata* e *P. giberti*, em diferentes densidades, após 7 dias em cultura em meio líquido, ou imobilizados em "droplets" ou fatias de agarose.

Densidade inicial ^a	<i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i>	<i>P. alata</i>	<i>P. amethystina</i>	<i>P. cincinnata</i>	<i>P. giberti</i>
5,0 x 10 ⁴	3,2 $\pm$ 0,7 (LC) 21,8 $\pm$ 2,9 (DC) 16,4 $\pm$ 4,8 (QC)	2,1 $\pm$ 0,6 (LC) 20,7 $\pm$ 9,3 (DC) 19,9 $\pm$ 3,0 (QC)	2,3 $\pm$ 0,5 (LC) 18,8 $\pm$ 6,2 (DC) 12,7 $\pm$ 4,8 (QC)	3,8 $\pm$ 0,4 (LC) 12,4 $\pm$ 5,7 (DC) 9,5 $\pm$ 3,1 (QC)	3,8 $\pm$ 1,9 (LC) 21,3 $\pm$ 8,4 (DC) 12,7 $\pm$ 4,6 (QC)
1,0 x 10 ⁵	4,3 $\pm$ 0,8 (LC) 39,1 $\pm$ 4,6 (DC) 31,2 $\pm$ 4,8 (QC)	1,2 $\pm$ 0,3 (LC) 29,7 $\pm$ 4,5 (DC) 28,7 $\pm$ 6,4 (QC)	2,1 $\pm$ 0,6 (LC) 29,5 $\pm$ 5,1 (DC) 26,6 $\pm$ 6,1 (QC)	4,2 $\pm$ 0,9 (LC) 36,1 $\pm$ 4,8 (DC) 28,6 $\pm$ 3,2 (QC)	2,1 $\pm$ 1,3 (LC) 18,3 $\pm$ 3,9 (DC) 20,1 $\pm$ 2,7 (QC)
2,0 x 10 ⁵	1,5 $\pm$ 0,5 (LC) 11,2 $\pm$ 6,4 (DC) 15,6 $\pm$ 7,3 (QC)	1,3 $\pm$ 0,4 (LC) 12,6 $\pm$ 3,1 (DC) 12,8 $\pm$ 4,2 (QC)	1,2 $\pm$ 0,7 (LC) 20,7 $\pm$ 6,4 (DC) 16,3 $\pm$ 5,6 (QC)	1,6 $\pm$ 0,3 (LC) 17,3 $\pm$ 5,2 (DC) 18,9 $\pm$ 4,6 (QC)	1,5 $\pm$ 0,4 (LC) 22,6 $\pm$ 7,8 (DC) 17,2 $\pm$ 4,5 (QC)

^a Número de protoplastos por ml de meio KM8P, no início da cultura.

LC: Cultura em meio líquido

DC: Cultura em "droplets" de agarose

QC: Cultura em fatias de agarose

Figura 3. Primeira (a.) e segunda (b.) divisões, em células derivadas da cultura de protoplastos de *P. amethystina* em "droplets" de agarose. c. Colônias originadas da cultura de protoplastos de *P. cincinnata* em "droplets" de agarose. Barras: a. e b., 10 μ m; c., 100 μ m.

Figura 4. Gráfico da "Plating efficiency" (PE) de protoplastos de *P. edulis* var. *flavicarpa*, *P. alata*, *P. amethystina*, *P. cincinnata* e *P. giberti*, após 14 dias de cultura em meio líquido, em "droplets" ou em fatias de agarose.

Os protoplastos oriundos de tecido foliar são ligeiramente menores que os isolados a partir de tecido cotiledonar (DORNELAS & VIEIRA, 1993), no entanto as frequências de divisão celular e as "plating efficiencies" são bastante semelhantes e são igualmente influenciadas pela densidade dos protoplastos e pelo sistema de cultura. A densidade de 1×10^5 protoplastos/ml de meio e o cultivo em "droplets" de agarose, condições consideradas mais adequadas para o cultivo de protoplastos isolados de tecido cotiledonar (DORNELAS & VIEIRA, 1993), são também as mais adequadas para o cultivo de protoplastos isolados de tecido foliar (Tabela 6 e Figura 4).

Os dados apresentados na Tabela 6 e na Figura 4 concordam também com as observações de D'UTRA VAZ et al. (1993), que relataram que o sistema de cultura de protoplastos de *P. edulis* var. *flavicarpa* em "droplets" de agarose produziu uma porcentagem de células em divisão e uma "plating efficiency" superiores às observadas em culturas em meio líquido.

LORTZ et al. (1983) e SHILLITO et al. (1983) relataram que o cultivo de protoplastos imobilizados em agarose é muito mais eficiente que o cultivo em meio líquido para muitas espécies de plantas. COLIJN-HOOYMANS et al. (1988) observaram que o sistema de fatias de agarose é mais eficiente que o sistema de cultivo em meio líquido. Entretanto, segundo BINDING et al. (1988) o uso de "droplets" é preferível ao uso de fatias, pois o primeiro permite um melhor intercâmbio de nutrientes entre a fase sólida e a fase líquida do meio.

MANDERS et al. (1991) e D'UTRA VAZ et al. (1993) relataram que a divisão das células oriundas da cultura de protoplastos de *P. edulis* var. *flavicarpa* só poderia ser sustentada mediante a adição, ao meio de cultura, de 250 mg.l^{-1} do antibiótico cefatoxime. Entretanto, DORNELAS & VIEIRA (1993)

obtiveram a regeneração de plantas inteiras a partir da cultura de protoplastos de *P. edulis* var. *flavicarpa*, *P. amethystina* e *P. cincinnata* sem a adição de qualquer antibiótico ao meio de cultura.

Pelos dados apresentados na Tabela 6 e na Figura 4, podemos observar que o meio KM8P foi adequado para a indução e manutenção das divisões de células oriundas de protoplastos isolados de tecido foliar de *Passiflora* spp., concordando com o relatado para protoplastos isolados de tecido cotiledonar (DORNELAS & VIEIRA, 1993).

Os microcalos oriundos da cultura de protoplastos desenvolveram-se em meio MS suplementado com NAA e BAP e em meio MD, regenerando plântulas por organogênese quando transferidos para meio de regeneração. Estas plântulas alongaram-se e enraizaram-se em meio MS/2 (Figura 5)

A freqüência de calos apresentando regeneração de parte aérea, foi de apenas 25% para *P. alata* e 48% para *P. edulis* (Tabela 7), que apresentou 52% de calos não-organogênicos. Esta perda de capacidade regenerativa de calos oriundos de cultura de protoplastos, já foi relatada por outros autores (POTRYKUS & SHILLITO, 1988; WEBB, 1988). Entretanto, estas freqüências de regeneração podem ser consideradas altas se comparadas com as de outras espécies vegetais (JONES et al. 1989; SUN, 1989; GUPTA et al., 1990; VIEIRA et al., 1990).

A freqüência observada de regeneração de brotos a partir de calos oriundos de protoplastos de *P. edulis* var. *flavicarpa* concorda com a relatada por D'UTRA VAZ et al. (1993), que mencionaram uma freqüência de regeneração de 40% para esta espécie.

Figura 5. a. Regeneração de brotos a partir de calo oriundo de protoplastos de *P. cincinnata*, após subcultura em meio MS + 2,0 mg.l⁻¹ de BAP + 10% (v/v) de água de coco. b. - e. Plantas regeneradas a partir da cultura de protoplastos de *P. cincinnata* (b.), *P. amethystina* (c.), *P. edulis* var. *flavicarpa* (d.) e *P. giberti* (e.), em processo de alongamento e enraizamento em meio MS/2. Barras: a., 0,5 cm; b. - e., 1,0 cm.

Tabela 7. Frequências médias de regeneração, em porcentagem, e número médio de brotos por calo oriundo da cultura de protoplastos de *Passiflora* spp. (média $\pm$ desvio padrão).

Espécie	Frequência de regeneração ^a	Número médio de brotos por calo ^b
<i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i>	48,0 $\pm$ 5,0	16,7 $\pm$ 2,8
<i>P. alata</i>	25,0 $\pm$ 2,0	6,2 $\pm$ 1,6
<i>P. amethystina</i>	75,0 $\pm$ 6,0	18,3 $\pm$ 2,1
<i>P. cincinnata</i>	93,0 $\pm$ 4,0	30,5 $\pm$ 7,5
<i>P. giberti</i>	83,0 $\pm$ 3,0	6,8 $\pm$ 2,4

^a Porcentagem de calos apresentando regeneração de brotos, em relação ao número total de calos. Média de três experimentos.

^b Média de 10 repetições, de três experimentos.

A frequência de regeneração de brotos para calos oriundos da cultura de protoplastos de *P. amethystina*, *P. cincinnata* e *P. giberti* são bastante superiores aos de *P. edulis* e *P. alata*, nas mesmas condições de cultura, evidenciado a influência do genótipo na capacidade de regeneração.

4.2. Análises citológicas e histológicas de plantas regeneradas a partir da cultura de protoplastos de *P. edulis* var. *flavicarpa* e *P. cincinnata*

A análise das metáfases de 20 plantas regeneradas a partir de calos oriundos da cultura de protoplastos de *P. edulis* var. *flavicarpa* e *P. cincinnata*, cultivados em meio MS suplementado com NAA e BAP, revelou a ocorrência de 35 e 30% de plantas tetraplóides, respectivamente. Entre as regeneradas dos calos cultivados em meio MD, 5 e 10%, respectivamente, eram tetraplóides. As plantas tetraplóides possuíam folhas coriáceas, provavelmente devido ao maior espessamento das paredes celulares, e desenvolviam-se mais lentamente que as plantas diplóides (Figuras 6 e 7).

Até um certo limite, o incremento no nível de ploidia de uma planta, se reflete no aumento do tamanho de seus tecidos, devido ao aumento do volume celular. Este fato foi observado em tabaco e em boca-de-leão, particularmente para tecidos de fácil observação microscópica, como a epiderme foliar. O número de estômatos observados por campo visual do microscópio ótico bem como seu tamanho, estão correlacionados com o nível de ploidia da planta (SUZUKI et al., 1981).

O teste F para as médias dos dados obtidos de plantas diplóides e tetraplóides de *P. edulis* var. *flavicarpa*, mostrou-se estatisticamente significativo, ao nível de 1% de probabilidade (Tabela 8), indicando que tanto o comprimento das células guarda é maior, quanto o número de estômatos por

Figura 6. Plantas regeneradas a partir da cultura de protoplastos de *P. edulis* var. *flavicarpa* (a.) e *P. cincinnata* (b.). D, planta diplóide; T, planta tetraplóide. Barra=10cm.

Figura 7. a. e b. Cromossomos metafásicos de plantas tetraplóides de *P. edulis* var. *flavicarpa* (a.) e *P. cincinnata* (b.) regeneradas a partir da cultura de protoplastos. c. a f. Epidermes foliares inferior e superior de plantas diplóides (c. e e., respectivamente) e tetraplóides (d. e f., respectivamente) de *P. edulis* var. *flavicarpa* regeneradas a partir da cultura de protoplastos. Barras: a., 6,0 μ m; b. 3,0 μ m; c. a f., 60 μ m.

Tabela 8. Quadros das análises de variância dos dados de comprimento das células guarda (**a**) e de número de estômatos por campo de 40x (**b**), da epiderme inferior de plantas diplóides e tetraplóides de *P. edulis* var. *flavicarpa*.

a

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	P > F
Ploidia	1	348,7647	348,7647	0,00001
Resíduo	66	33,3529	0,5053	
Total	67	382,1176		

Coeficiente de variação: 5,782 %

b

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	P > F
Ploidia	1	83804,18	83804,180	0,00001
Resíduo	198	3866,20	19,526	
Total	199	87670,38		

Coeficiente de variação: 8,766 %

campo é significativamente menor nas plantas tetraplóides, em relação às diplóides.

O meio MS suplementado com 5,0 mg.l⁻¹ de NAA e 0,25 mg.l⁻¹ de BAP, foi recomendado por MANDERS et al. (1991) e D'UTRA VAZ et al. (1993) para a cultura de calos originados de protoplastos de *P. edulis* var. *flavicarpa*. Estes autores, no entanto, não comentaram a respeito da ploidia das plantas regeneradas.

A ocorrência de aberrações cromossômicas em plantas derivadas da cultura de tecidos e de protoplastos pode estar correlacionada com o tempo em que a cultura permanece na fase de calo e com o tipo e concentração de fitorreguladores utilizados (EVANS & REED, 1981; CONSTANTIN, 1981; KRIKORIAN et al., 1983; LEE & PHILLIPS, 1988), sendo muitas vezes, a causa da variação somaclonal (LARKIN & SCOWCROFT, 1981).

A origem de células poliplóides em cultura pode se dar pela pré-existência de algumas células poliplóides não evidentes ao lado de outras células diplóides (polissomatia) no tecido que serviu como fonte de explante, bem como pela ocorrência de endomitoses durante a cultura (NAGL, 1978; KRIKORIAN et al., 1983). Em se tratando de cultura de protoplastos, soma-se à estas causas, a fusão espontânea entre protoplastos próximos durante ou logo após o seu isolamento. Este fenômeno se deve a uma instabilidade momentânea e reversível da membrana plasmática, havendo uma influência marcante do tipo e concentração da mistura enzimática utilizada para o isolamento, pH e osmolaridade da solução de lavagem (YE & EARLE, 1991).

As freqüências de poliplóides observadas para *P. edulis* var. *flavicarpa* e *P. cinnamomata* oriundos de calos cultivados em meio MS suplementado com NAA e BAP, são muito maiores às observadas para plantas regeneradas a partir de calos cultivados em meio MD e às relatadas para outras espécies, como

o milho, a aveia e a batata, entre outras, cuja porcentagem de poliplóides média é de 2 a 8% (BENZION et al., 1986; RHODES et al., 1986; LEE & PHILLIPS, 1987; LINDSEY & JONES, 1989).

Em alguns casos, a poliploidia originada pela cultura *in vitro* pode ter utilidade no melhoramento de uma determinada espécie, como ocorre com certos cultivares de batata, que foram originados de plantas tetraplóides, obtidas via variação somaclonal, a partir da cultura de tecidos (HERMSEN et al., 1981). Devido a isto, as plantas tetraplóides de *P. edulis* var. *flavicarpa* e *P. cinnata* obtidas, foram transferidas para o campo, a fim de serem futuramente melhor avaliadas, em conjunto com as plantas diplóides, $2n=18$.

Não observou-se outras aberrações, como aneuploidias ou outros níveis de ploidia, na população de plantas analisadas de *P. edulis* var. *flavicarpa* e *P. cinnata*. Tal fato pode ser devido a uma amostragem pequena e não representativa da variação induzida ou a uma tendência natural da espécie à poliploidização, principalmente à tetraploidização, e à redução da capacidade de regeneração de conjuntos de células aneuplóides. LINDSEY & JONES (1989) observaram que entre as plantas regeneradas a partir da cultura de protoplastos de *S. brevidens*, uma espécie selvagem e diplóide de batata, cerca de 50% eram tetraplóides, 25% eram aneuplóides e apenas 25% eram diplóides e aparentemente normais. Entretanto, algumas cultivares tetraplóides de batata (*S. tuberosum*) podem apresentar até 95% de plantas aneuplóides. Através da manipulação das condições de cultura, a porcentagem de aneuplóides desta mesma cultivar pode ser reduzida para cerca de 30% (LINDSEY & JONES, 1989).

Estudos em plantas de trigo regeneradas a partir da cultura *in vitro* mostraram que, em média, 70% dos regenerantes possuíam o número

normal de cromossomos, entretanto entre estas plantas, alterações estruturais eram evidentes, como deleções, translocações e fissões cêntricas (KARP & MADDOCK, 1984). Outras aberrações numéricas e estruturais já foram descritas para várias espécies de plantas como tabaco, *Brassica*, *Petunia*, cana-de-açúcar e outras (KRIKORIAN et al., 1983).

Portanto as plantas de *P. edulis* var. *flavicarpa* apresentando $2n=18$ cromossomos podem não ser completamente idênticas, uma vez que aberrações estruturais e mudanças ao nível molecular podem igualmente ocorrer em plantas originadas da cultura *in vitro* (LARKIN & SCOWCROFT, 1981; LEE & PHILLIPS, 1988). O emprego de técnicas do tipo RAPD e RFLP pode auxiliar na detecção dessas possíveis alterações.

4.3. Regeneração de híbridos somáticos a partir da cultura de produtos de fusão de protoplastos de *Passiflora* spp.

4.3.1. Obtenção de suspensões celulares de *Passiflora* spp.

A obtenção dos dados de peso de matéria fresca e PCV das culturas, permitiu a elaboração de curvas de crescimento das suspensões celulares (Figuras 8 a 11). Os valores das taxas de crescimento (m), obtidos das equações de regressão destas curvas, são apresentados na Tabela 9. A análise da variância dos dados de diâmetro da massa celular após 15 dias em cultura (Tabela 10), é apresentada na Tabela 11.a e o Teste de Tukey para as médias dos tratamentos, na Tabela 11.b.

a

b

- ⊕ MD completo
- + MD menos água de coco
- + MD menos extrato de levedura
- ⊖ MD menos água de coco e extrato de levedura
- × MS mais compostos orgânicos de MD
- + MS menos água de coco
- MS menos extrato de levedura
- MS menos água de coco e extrato de levedura

Figura 8. Gráfico ilustrativo do peso de matéria fresca (a) e do PCV (*Packed Cell Volume*, b) das suspensões celulares de *P. edulis* var. *flavicarpa*, em relação ao tempo em cultura em diferentes composições de meio líquido, sob 130 rpm de agitação orbital, no escuro.

- MD completo
- + MD menos água de coco
- ✦ MD menos extrato de levedura
- ◻ MD menos água de coco e extrato de levedura
- * MS mais compostos orgânicos de MD
- ◊ MS menos água de coco
- MS menos extrato de levedura
- MS menos água de coco e extrato de levedura

Figura 9. Gráfico ilustrativo do peso de matéria fresca (a) e do PCV (*Packed Cell Volume*, b) das suspensões celulares de *P. arrethystina*, em relação ao tempo em cultura em diferentes composições de meio líquido, sob 130 rpm de agitação orbital, no escuro.

Figura 10. Gráfico ilustrativo do peso de matéria fresca (a) e do PCV (*Packed Cell Volume*, b) das suspensões celulares de *P. cinnamata*, em relação ao tempo em cultura em diferentes composições de meio líquido, sob 130 rpm de agitação orbital, no escuro.

a

b

Figura 11. Gráfico ilustrativo do peso de matéria fresca (a) e do PCV (*Packed Cell Volume*, b) das suspensões celulares de *P. giberti*, em relação ao tempo em cultura em diferentes composições de meio líquido, sob 130 rpm de agitação orbital, no escuro.

Tabela 9. Valores das taxas de crescimento (μ) das culturas de células de *Passiflora* spp em suspensão. Os valores de μ foram obtidos da equação de regressão das curvas de crescimento das culturas celulares, a partir dos dados de peso de matéria fresca ($\mu \pm$ desvio padrão).

	<i>P. edulis</i>	<i>P. amethystina</i>	<i>P. cincinnata</i>	<i>P. giberti</i>
MDcomp	9,90 $\pm$ 1,15	11,04 $\pm$ 0,95	7,52 $\pm$ 0,74	24,12 $\pm$ 1,88
MD-AC	6,00 $\pm$ 0,93	6,15 $\pm$ 0,92	6,13 $\pm$ 0,65	18,54 $\pm$ 1,35
MD-EL	10,05 $\pm$ 1,20	10,11 $\pm$ 1,20	8,33 $\pm$ 0,74	23,09 $\pm$ 1,91
MD-CO	5,37 $\pm$ 0,97	5,56 $\pm$ 0,93	5,47 $\pm$ 0,96	18,52 $\pm$ 1,66
MScomp	10,38 $\pm$ 1,24	10,39 $\pm$ 1,23	9,54 $\pm$ 0,86	23,18 $\pm$ 2,19
MS-AC	6,23 $\pm$ 0,89	6,25 $\pm$ 0,88	6,37 $\pm$ 0,88	19,26 $\pm$ 1,33
MS-EL	10,12 $\pm$ 1,01	10,11 $\pm$ 1,00	9,02 $\pm$ 0,79	21,64 $\pm$ 1,35
MS-CO	5,68 $\pm$ 1,03	5,69 $\pm$ 1,02	5,69 $\pm$ 1,03	19,06 $\pm$ 1,80

MDcomp: Meio de MOURAD-AGHA & DEXHEIMER (1979) completo;

MD-AC: Meio MD sem água de coco;

MD-EL: Meio MD sem extrato de levedura;

MD-CO: Meio MD sem extrato de levedura e água de coco;

MScomp: Meio basal de MURASHIGE & SKOOG (1962) suplementado com compostos orgânicos de MD;

MS-AC: Meio MS sem água de coco;

MS-EL: Meio MS sem extrato de levedura;

MS-CO: Meio MS sem extrato de levedura e água de coco.

Tabela 10. Dados relativos ao diâmetro das massas celulares (em μm) de espécies de *Passiflora*, após 15 dias em cultura em diferentes composições de meio líquido, sob 130 rpm de agitação orbital, no escuro.

Diâmetro da massa celular (média $\pm$ desvio)				
Meio	<i>P. edulis</i> <i>var. flavicarpa</i>	<i>P. amethystina</i>	<i>P. cincinnata</i>	<i>P. giberti</i>
MDcomp	534,4 $\pm$ 0,5	437,6 $\pm$ 2,3	687,2 $\pm$ 1,4	264,2 $\pm$ 1,4
MD-AC	673,4 $\pm$ 1,1	512,4 $\pm$ 3,4	787,2 $\pm$ 2,0	327,2 $\pm$ 2,1
MD-EL	531,2 $\pm$ 1,6	346,4 $\pm$ 7,7	621,0 $\pm$ 3,3	259,4 $\pm$ 0,9
MD-CO	689,0 $\pm$ 3,0	537,0 $\pm$ 3,2	802,4 $\pm$ 2,2	351,4 $\pm$ 1,0
MScomp	533,8 $\pm$ 0,9	436,4 $\pm$ 1,2	680,6 $\pm$ 0,9	261,8 $\pm$ 1,0
MS-AC	682,0 $\pm$ 0,8	520,0 $\pm$ 1,0	796,8 $\pm$ 1,7	373,4 $\pm$ 3,7
MS-EL	527,0 $\pm$ 0,9	306,6 $\pm$ 2,1	626,2 $\pm$ 1,4	328,4 $\pm$ 1,4
MS-CO	694,0 $\pm$ 1,7	591,4 $\pm$ 3,3	799,6 $\pm$ 3,0	417,2 $\pm$ 5,4

MDcomp : Meio de MOURAD-AGHA & DEXHEIMER (1979) completo;

MD-AC: Meio MD sem água de coco;

MD-EL: Meio MD sem extrato de levedura;

MD-CO: Meio MD sem extrato de levedura e água de coco;

MScomp: Meio basal de MURASHIGE & SKOOG (1962) suplementado com compostos orgânicos de MD;

MS-EL: Meio MScomp sem extrato de levedura;

MS-CO: Meio MScomp sem extrato de levedura e água de coco.

Tabela 11. **a.** Quadro da análise da variância de dados de diâmetro máximo da massa celular de suspensões de *Passiflora spp* (Tabela 10), após 15 dias de cultura em diferentes composições de meio líquido, sob 130 rpm de agitação, no escuro. **b.** Teste de Tukey das médias dos tratamentos. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 1%.

a.

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	P > F
Meio	7	777779,844	111111,406	0,0001
Espécie	3	3714924,369	1238308,123	0,0001
Meio x Espécie	21	129228,481	6153,737	0,0001
Resíduo	128	8680,000	67,813	
Total	159	4630612,694		

Coeficiente de variação: 1,558 %

b.

Meio	Média	
MS-CO	625,550	a
MS-AC	593,050	b
MD-CO	589,950	b
MD-AC	575,050	c
MDcomp	480,850	d
MScomp	478,150	d
MS-EL	447,050	e
MD-EL	439,500	e

Em ambos os meios basais, observou-se uma massa celular com menor diâmetro e crescimento mais acelerado quando se suplementava o meio com água de coco (Figura 12). O menor diâmetro das massas celulares facilita o isolamento de protoplastos, pois promove uma maior área de contato com a solução enzimática. A água de coco parece ser então, um componente essencial do meio de cultura de células de *Passiflora*, uma vez que estimula a divisão celular. Esta propriedade da água de coco já foi observada anteriormente em cultura de tecidos de *Passiflora*, onde também induzia à formação de gemas, se associada à adição de BAP (DORNELAS & VIEIRA, 1994).

A modificação da estrutura dos agregados celulares e da forma das células em cultura já havia sido observada por SIMPKINS et al., (1970) em células de *Acer* sp., cultivadas em meio com ou sem água de coco. Estes autores também relataram que as células crescendo em meio contendo 15% de água de coco apresentavam maior porcentagem de mitoses.

A retirada do extrato de leveduras aparentemente não afetou o crescimento das suspensões celulares de *Passiflora*, exceto quando se retirava também a água de coco (Figuras 8 a 11, Tabela 9). Os dados referentes aos valores das taxas de crescimento são concordantes com os resultados do Teste de Tukey (Tabela 11.b). YEOMAN & STREET (1977) relataram que a maior parte das espécies têm o seu crescimento celular em cultura acelerado, quando se adicionam ao meio compostos complexos como água de coco e/ou caseína hidrolisada. SIMPKINS et al. (1970) notaram que as células da cultura em suspensão de sicômoro tornaram-se muito alongadas quando cultivadas em meio suplementado com compostos orgânicos nitrogenados, como caseína hidrolisada, uréia ou cisteína, em comparação com as células essencialmente esféricas, das culturas em meio contendo apenas nitrogênio inorgânico.

Figura 12. a. Suspensões celulares de *Passiflora* spp. b. e c. Massas celulares de *P. cincinnata*, após 15 dias em cultura em meio MD líquido sem água de coco (b.), e suplementado com água de coco (c.), sob 130 rpm de agitação orbital, no escuro.

4.3.2. Isolamento de protoplastos a partir de suspensões celulares de *Passiflora* spp.

Apenas nos tratamentos numerados de 9 a 13 observou-se o isolamento de protoplastos (Tabela 12). A utilização da celulase comercial Cellulysin ou de 4,0% de Cellulase R10 foi essencial para a obtenção de protoplastos de *Passiflora* spp.

EVANS & COCKING (1977) relataram que a enzima Cellulysin, uma preparação de extratos de *Trichoderma viride*, é mais eficiente que as celulases comuns, extraídas de *Aspergillus niger*, pois além de celulase, contém também xilanases, glucanases, pectinases e quitinases.

Tabela 12. Produção de protoplastos de *Passiflora* spp., por 500mg de células, conforme a mistura enzimática utilizada. Os tratamentos estão numerados de acordo com a Tabela 2.

Espécie	Mistura enzimática				
	9	10	11	12	13
<i>P. edulis</i>	$1,4 \times 10^5 \pm 0,9 \times 10^3$	$1,0 \times 10^4 \pm 0,7 \times 10^2$	$2,0 \times 10^5 \pm 0,4 \times 10^3$	$3,5 \times 10^5 \pm 0,7 \times 10^3$	$5,0 \times 10^4 \pm 1,4 \times 10^2$
<i>P. amethystina</i>	$2,0 \times 10^5 \pm 0,6 \times 10^3$	$1,0 \times 10^5 \pm 0,3 \times 10^3$	$1,2 \times 10^5 \pm 0,6 \times 10^3$	$2,3 \times 10^5 \pm 0,8 \times 10^3$	$8,9 \times 10^4 \pm 2,2 \times 10^2$
<i>P. cincinnata</i>	$1,5 \times 10^5 \pm 0,9 \times 10^3$	$1,0 \times 10^5 \pm 0,6 \times 10^3$	$2,4 \times 10^5 \pm 0,7 \times 10^3$	$2,2 \times 10^5 \pm 0,9 \times 10^3$	$9,0 \times 10^4 \pm 2,3 \times 10^2$
<i>P. coccinea</i>	$1,0 \times 10^6 \pm 5,7 \times 10^3$	$2,8 \times 10^5 \pm 0,9 \times 10^3$	$5,9 \times 10^5 \pm 0,5 \times 10^3$	$1,6 \times 10^6 \pm 6,4 \times 10^3$	$1,8 \times 10^5 \pm 0,4 \times 10^3$
<i>P. giberti</i>	$9,0 \times 10^5 \pm 1,2 \times 10^3$	$2,7 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^3$	$6,0 \times 10^5 \pm 1,2 \times 10^3$	$9,2 \times 10^5 \pm 1,3 \times 10^3$	$2,4 \times 10^5 \pm 0,9 \times 10^3$

As misturas enzimáticas recomendadas para várias espécies vegetais por POWER & CHAPMAN (1985, tratamento 1), PUPILLI et al. (1989, tratamento 2) e MYERS et al. (1989a, tratamentos 3 e 4), não foram eficazes no isolamento de protoplastos de células em suspensão de *Passiflora spp.*, indicando que estas possuem uma constituição de parede distinta das espécies estudadas por estes autores. A agitação da solução enzimática durante a incubação foi essencial para o isolamento efetivo dos protoplastos.

Segundo EVANS & COCKING (1977), qualquer discussão a respeito do uso de enzimas para o isolamento de protoplastos deve levar em conta a composição e estrutura da parede celular primária. De acordo com BURGESS (1985), ela é composta de fibrilas de celulose recobertas com uma camada de hemicelulose que, no caso de dicotiledôneas, é uma xiloglucana. Em monocotiledôneas, são arabinoxilanas. As microfibrilas de celulose estão unidas umas às outras através de polímeros de pectina, que se ligam covalentemente à xiloglucana. Portanto, para que haja a degradação de uma estrutura complexa como esta, uma mistura de enzimas é requerida.

FUNGARO & VIEIRA (1989), comentam que o método de isolamento seqüencial, desenvolvido por TAKEBE et al. (1971) envolve uma etapa de dissociação das células do tecido a ser protoplastizado, onde se utiliza uma pectinase, como a Macerozyme, seguida da digestão da parede das células individualizadas com uma celulase. Em *Passiflora*, nos tratamentos onde não se observou o isolamento de protoplastos, foram observadas células plasmolizadas e individualizadas, porém com a parede não totalmente digerida. Isto é uma evidência que as paredes de células de cultura em suspensão de *Passiflora spp.* são, provavelmente, mais ricas em celulose.

POTRYKUS & SHILLITO (1988) não recomendam o uso da pectinase Pectolyase Y23, utilizada nos tratamentos 9 e 12, que se mostraram

mais efficientes no isolamento de protoplastos de suspensões celulares de *Passiflora*. Segundo estes autores, esta enzima, apesar de eficiente, possui efeitos tóxicos e reduz a viabilidade dos protoplastos. POTRYKUS & SHILLITO (1988) alertam também, que o uso de misturas contendo concentrações enzimáticas maiores que 4% ou mais que 3 enzimas comerciais, devem ser evitadas. Assim, as misturas enzimáticas 9 ou 13 são as mais recomendáveis, para o isolamento de protoplastos de suspensões celulares de *Passiflora*.

4.3.3. Otimização das condições de fusão

Obteve-se uma produção média de $3,9 \times 10^6 \pm 1,8 \times 10^5$ protoplastos a partir de 3 pétalas (aproximadamente 0,5g de tecido) excisados de botões florais de *P. coccinea*. O diâmetro médio dos protoplastos foi de $36,76 \pm 8,3 \mu\text{m}$. Tal determinação é importante, uma vez que o diâmetro dos protoplastos é inversamente proporcional à capacidade de fusão dos mesmos (POWER et al., 19870, 1976; POWER & CHAPMAN, 1985). Assim, protoplastos com pequeno diâmetro possuem membrana plasmática mais estável e devem ser misturados em maior proporção aos protoplastos de maior diâmetro.

As porcentagens observadas de protoplastos envolvidos em processos de fusão e de heterodímeros formados, de acordo com o tratamento empregado, podem ser visualizadas na Tabela 13.

No tratamento 2, onde se utiliza apenas 12,5% de PEG, praticamente não observou-se aglutinação dos protoplastos (Figura 13), indicando que esta concentração de PEG pode ser insuficiente para anular as cargas negativas das membranas plasmáticas, e promover a aglutinação dos protoplastos, segundo o modelo proposto por CONSTABEL & KAO (1974), KAO & MICHAYLUK (1974) e

Tabela 13. Dados relativos aos experimentos de fusão entre protoplastos de *P. edulis* var. *flavicarpa* e *P. coccinea* (média $\pm$ desvio).

Tratamento ^a					
	1	2	3	4	5
Protoplastos fundidos (%)	42,45 $\pm$ 3,5	-	45,3 $\pm$ 5,1	43,78 $\pm$ 7,3	-
Heterodímeros (%) ^b	12,86 $\pm$ 5,1	-	9,98 $\pm$ 6,2	10,87 $\pm$ 4,7	-

^a Ver Tabela 3.

^b Porcentagem calculada em função do número de protoplastos fundidos.

Figura 13. Processo de aglutinação e fusão de protoplastos de *P. edulis* var. *flavicarpa* e *P. coccinea*, submetidos aos tratamentos 2. (a.), 5. (b.) e 1. (c. e d.), conforme descrição na tabela 3; c. Início do processo de fusão; d. Processo de fusão finalizado. Barras: a., 60 μ m; b. a d., 30 μ m.

KAO et al. (1974.)

No tratamento 5, onde os protoplastos são aderidos a uma lamínula e utiliza-se 50% de PEG, ocorreu uma forte aglutinação dos protoplastos (Figura 13) favorecendo a fusão inespecífica, diminuindo a formação de heterodímeros e promovendo a destruição de muitos protoplastos. Também a remoção da solução de PEG mostrou-se bastante dificultada neste sistema.

De acordo com o estudo recente de KELL & GLASER (1993), com a aglutinação dos protoplastos, gera-se uma tensão na superfície da membrana plasmática. A intensidade desta tensão é dependente do potencial elétrico transmembrana, proporcionado em grande parte pelas estruturas proteicas às quais se ligam moléculas de PEG e íons de cálcio. Assim, o fenômeno de fusão está também relacionado às concentrações intra e extra-celulares deste íon, bem como o peso molecular do PEG utilizado.

Os tratamentos 1, 3 e 4 mostraram resultados satisfatórios (Tabela 13, Figura 13), apresentando porcentagens de formação de heterodímeros semelhantes às descritas por NEGRUTIU et al. (1986) que utilizaram métodos similares com protoplastos de *Nicotiana plumbaginifolia*.

4.3.4. Fusão de protoplastos de *Passiflora* spp.

Nove a dez por cento dos protoplastos envolvidos em processo de fusão eram heterodímeros entre *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* e as outras espécies estudadas (Tabela 14, Figura 14).

DAVEY & POWER (1988) observaram que a formação ótima de heterodímeros em fusões mediadas por PEG varia de 8 a 11%.

Tabela 14. Formação de heterodímeros, em porcentagem, nos experimentos de fusão de protoplastos de *Passiflora* spp. (média $\pm$ desvio padrão).

Espécie	Formação de heterodímeros ^a
<i>P. edulis</i> (+) <i>P. alata</i>	9,7 $\pm$ 3,7
<i>P. edulis</i> (+) <i>P. amethystina</i>	13,1 $\pm$ 3,8
<i>P. edulis</i> (+) <i>P. cincinnata</i>	10,5 $\pm$ 4,2
<i>P. edulis</i> (+) <i>P. coccinea</i>	10,3 $\pm$ 4,7
<i>P. edulis</i> (+) <i>P. giberti</i>	12,0 $\pm$ 6,1

^a Porcentagem calculada em função do número de protoplastos envolvidos em processo de fusão.

Figura 14. Processo de fusão entre protoplastos isolados de tecido foliar de *P. edulis* var. *flavicarpa* (com cloroplastos) e protoplastos isolados de suspensões celulares de *P. amethystina* (a.) ou *P. giberti* (b. a d.) (incolores). Barras: a., 20 μ m; b. a d., 40 μ m.

GROSSER & GMITTER (1990), fazendo uma análise de vários experimentos de fusão de protoplastos induzida por PEG em *Citrus*, concluíram que a porcentagem média de produção de heterocários estava entre 1 e 10%.

KIRTI et al. (1991) observaram a formação de 10% de heterocários, em um experimento de fusão química de protoplastos de *Brassica juncea* e *B. spinescens*. Entretanto, NARASIMHULU et al. (1992) obtiveram 16% de heterodímeros, trabalhando com a mesma técnica, mas com outras espécies do gênero *Brassica*

Estes valores ainda são inferiores aqueles observados em alguns trabalhos de eletrofusão (SIHACHAKR et al. 1989; CHAPUT et al. 1990; SERRAF et al., 1991). No entanto, NATON et al. (1992) relataram a ocorrência de 6 a 11% de heterodímeros em experimentos de eletrofusão, entre protoplastos de *Nicotiana*. HAMMATT et al. (1992), obtiveram apenas 3,7% de formação de heterodímeros, induzida pela eletrofusão de protoplastos de *Glycine*.

Os produtos de fusão obtidos neste trabalho, regeneraram a parede celular e depois de 36h de cultura, 8,7 a 15,7% das células analisadas eram binucleadas, indicando a ocorrência de fusão celular (Figura 15). O envolvimento de mais de dois protoplastos, ou protoplastos multinucleados, no processo de fusão, foi evidenciado pela presença de 0,6 a 1,6% de células com mais de dois núcleos (Tabela 15). As primeiras divisões celulares foram observadas depois de 72h de cultura.

Pequenas colônias (8 a 16 células, Figura 15) puderam ser observadas após 14 dias de cultura e a eficiência de plaqueamento (PE) pôde ser determinada (Tabela 16).

Figura 15. **a.** Célula contendo dois núcleos, evidenciados pela coloração com carmim acético, oriunda da cultura de produtos de fusão entre protoplastos de *P. edulis* var. *flavicarpa* e *P. cincinnata*. **b.** e **c.** Microcolônias originadas dos produtos de fusão entre protoplastos de *P. edulis* var. *flavicarpa* e *P. giberti* (**b.**) e *P. alata* (**c.**), em cultura em meio KM8P. Barras: **a.**, 30 μ m; **b.** e **c.**, 20 μ m.

Tabela 15. Frequências, em porcentagem, de células binucleadas e multinucleadas nos experimentos de fusão de protoplastos de *Passiflora* spp., após 36h de cultura (média $\pm$ desvio padrão).

	Células binucleadas ^a	Células multinucleadas ^a
<i>P. edulis</i> (+) <i>P. alata</i>	8,7 $\pm$ 3,4	0,6 $\pm$ 0,2
<i>P. edulis</i> (+) <i>P. amethystina</i>	15,7 $\pm$ 3,8	1,4 $\pm$ 0,7
<i>P. edulis</i> (+) <i>P. cincinnata</i>	12,2 $\pm$ 2,6	1,2 $\pm$ 0,5
<i>P. edulis</i> (+) <i>P. coccinea</i>	12,1 $\pm$ 2,3	1,6 $\pm$ 0,4
<i>P. edulis</i> (+) <i>P. giberti</i>	12,3 $\pm$ 3,5	1,2 $\pm$ 0,7

^a Porcentagem calculada em relação ao número total de células analisadas.

Tabela 16. "Plating efficiency" (PE), em porcentagem, dos experimentos de fusão de protoplastos de *Passiflora* spp. (média $\pm$ desvio padrão).

	PE ^b
<i>P. edulis</i> (+) <i>P. alata</i>	3,8 $\pm$ 1,3
<i>P. edulis</i> (+) <i>P. amethystina</i>	1,3 $\pm$ 0,4
<i>P. edulis</i> (+) <i>P. cincinnata</i>	5,3 $\pm$ 0,7
<i>P. edulis</i> (+) <i>P. coccinea</i>	1,9 $\pm$ 0,4
<i>P. edulis</i> (+) <i>P. giberti</i>	1,2 $\pm$ 0,6

^b Número de colônias formadas, em relação ao número total de protoplastos cultivados.

Uma vez transferidas para meio MD sólido, as colônias de *P. edulis* (+) *P. alata*, *P. edulis* (+) *P. amethystina*, *P. edulis* (+) *P. cincinnata*, *P. edulis* (+) *P. coccinea* and *P. edulis* (+) *P. giberti* *, obtidas dos experimentos de fusão, desenvolveram-se em calos branco-amarelados (Figura 16).

A seleção de calos híbridos putativos, foi realizada antes da transferência para meio de regeneração. Após a seleção, a frequência média de formação de brotos foi de $96 \pm 0,8$, $63 \pm 6,6$, $98 \pm 0,8$ and $83 \pm 4,5$ % para *P. edulis* (+) *P. alata*, *P. edulis* (+) *P. amethystina*, *P. edulis* (+) *P. cincinnata* e *P. edulis* (+) *P. giberti*, respectivamente (Figura 17). Estes brotos deram origem a plantas inteiras, quando transferidos para meio MS/2 (Figura 18). Os calos de *P. edulis* (+) *P. coccinea* não regeneraram brotos, mostrando-se ser recalcitrante aos meios de regeneração descritos por DORNELAS & VIEIRA (1994).

4.4. Identificação e caracterização dos híbridos somáticos entre espécies de *Passiflora*.

4.4.1. Análise do padrão eletroforético de proteínas solúveis separadas por SDS-PAGE

São inúmeros os trabalhos na literatura que descrevem a identificação de produtos de fusão através da análise do padrão eletroforético de proteínas e isoenzimas (TUSA et al., 1990; GURI et al., 1991; KIRTI et al., 1991; MATSUMOTO et al., 1991; SAKAMOTO & TAGUCHI, 1991; SERRAF et al., 1991; SPROULE et al., 1991; WAARA et al., 1991; RATUSHNYAK et al., 1991).

* A nomenclatura utilizada para os híbridos somáticos nesta dissertação, é a recomendada por KUMAR & COCKING (1987).

Figura 16. Calos originados da cultura de produtos de fusão de protoplastos de *Passiflora* spp., em cultura no meio MD, no escuro. **a.** *P. edulis* var. *flavicarpa* (+) *P. alata*; **b.** *P. edulis* var. *flavicarpa* (+) *P. amethystina*; **c.** *P. edulis* var. *flavicarpa* (+) *P. cincinnata*; **d.** *P. edulis* var. *flavicarpa* (+) *P. giberti* e **e.** *P. edulis* var. *flavicarpa* (+) *P. coccinea*. Barra = 2mm.

Figura 17. Regeneração de brotos a partir de calos originados da cultura de produtos de fusão de protoplastos de *Passiflora* spp., cultivados em meio MS + 2,0 mg.l⁻¹ de BAP e 10% (v/v) de água de coco. **a.** *P. edulis* var. *flavicarpa* (+) *P. amethystina*; **b.** *P. edulis* var. *flavicarpa* (+) *P. alata*; **c.** *P. edulis* var. *flavicarpa* (+) *P. cincinnata*; **d.** *P. edulis* var. *flavicarpa* (+) *P. giberti*. Barra = 2mm.

Figura 18. a. Calo de *P. edulis* var. *flavicarpa* (+) *P. cincinnata* em meio MS + 2,0 mg.l⁻¹ de BAP e 10% (v/v) de água de coco, com brotos prontos para a transferência para meio MS com metade da concentração de sais e vitaminas (MS/2); b. e c. Plântulas dos híbridos somáticos *P. edulis* var. *flavicarpa* (+) *P. edulis* var. *flavicarpa* (+) *P. cincinnata* (b.) e *P. edulis* var. *flavicarpa* (+) *P. alata* (c.). Barras = 1cm.

Os padrões eletroforéticos de proteínas solúveis de *P. edulis*, *P. alata*, *P. amethystina*, *P. cincinnata*, *P. coccinea*, *P. giberti* e de seus híbridos somáticos putativos podem ser visualizados nas Figuras 19 a 21.

A análise do padrão eletroforético de proteínas solúveis de calos das espécies de *Passiflora* estudadas permitiu a identificação de bandas correspondentes a polipeptídeos específicos de cada espécie. Assim, calos de *P. edulis* var. *flavicarpa* possuem uma banda polipeptídica específica, de peso aparente igual a 27kDa, *P. alata* possui uma banda de 23 kDa, *P. amethystina* e *P. cincinnata* uma de 40 kDa, *P. coccinea*, uma de 41 kDa e *P. giberti*, uma de 40 kDa (Figuras 19 a 21). Outras bandas menos intensas, mas igualmente específicas, também podem ser identificadas.

A mistura física das amostras proteicas destas espécies, mostrou um padrão intermediário, que espera-se seja próximo ao do híbrido somático tetraplóide (GROSSER et al., 1990; KIRTI et al., 1991).

Através da verificação da presença das bandas específicas das espécies parentais e pela comparação com o padrão de bandas da mistura física, foram identificados $4,5 \pm 1,1\%$ de calos híbridos para *P. edulis* (+) *P. alata*, $3,4 \pm 0,8\%$ de calos híbridos para *P. edulis* (+) *P. amethystina*, $3,6 \pm 0,4\%$ para *P. edulis* (+) *P. cincinnata*, $4,6 \pm 0,6\%$ para *P. edulis* (+) *P. coccinea* e $5,3 \pm 0,4\%$ para *P. edulis* (+) *P. giberti*.

Esta porcentagem de calos híbridos obtidos para *Passiflora*, está de acordo com as observadas para outras plantas, como *Citrus* (1 a 10%, GROSSER et al., 1990), *Rudbeckia* (3 %, AL-ATABEE et al., 1990); *Brassica* (3 a 7%, CHRISTEY et al, 1991; KIRTI et al., 1991; NARASIMHULU et al., 1992) e *Solanum* (6 %, PUIE et al., 1986).

Figura 19. Gel de SDS-PAGE corado com Coomassie-blue, mostrando os padrões eletroforéticos de proteínas solúveis de calos de *P. edulis* var. *flavicarpa* (E), *P. alata* (A), *P. amethystina* (M), da mistura física das amostras parentais (EA e EM, respectivamente) e dos híbridos **somáticos** putativos, numerados (os híbridos somáticos estão grifados). Pontos negros indicam **algumas** bandas informativas.

Figura 20. Gel de SDS-PAGE corado com Coomassie-blue, mostrando os padrões eletroforéticos de proteínas solúveis de calos de *P. edulis* var. *flavicarpa* (E), *P. cinnata* (C), *P. coccinea* (O), da mistura física das amostras parentais (EC e EO, respectivamente) e dos híbridos somáticos putativos, numerados (os híbridos somáticos estão grifados). Pontos negros indicam algumas bandas informativas.

Figura 21. Gel de SDS-PAGE corado com Coomassie-blue, mostrando os padrões eletroforéticos de proteínas solúveis de calos de *P. edulis* var. *flavicarpa* (E), *P. giberti* (G), da mistura física das amostras parentais (EG) e dos híbridos somáticos putativos, numerados (os híbridos somáticos estão grifados). Pontos negros indicam algumas bandas informativas.

O padrão eletroforético de proteínas solúveis, também serviu de marcador para a seleção de híbridos somáticos putativos entre *Solanum tuberosum* e *S. brevidens* (BARSBY et al., 1984; IMAI et al., 1992).

4.4.2. Análise do padrão eletroforético de isoenzimas separadas por PAGE

A análise do padrão isoenzimático para os sistemas α -EST (α -esterase), PO (peroxidase) e MDH (malato-desidrogenase) confirmou os resultados obtidos pela análise do padrão eletroforético das proteínas solúveis de *P. edulis*, *P. alata*, *P. amethystina*, *P. cincinnata*, *P. coccinea*, *P. giberti* e seus híbridos somáticos putativos (Figuras 22 a 26).

O sistema de esterases é o mais comumente mencionado na literatura como um sistema eficiente para confirmar a natureza híbrida dos produtos de fusão entre espécies de plantas, tendo sido utilizado em *Brassica* (KIRTI et al., 1991), *Rudbeckia* (AL-ATABEE et al., 1990), batata e outras espécies de *Solanum* (SIHACHAKR et al., 1989; AZIZ et al., 1990; SERRAF et al., 1991; WAARA et al., 1991) alface (MATSUMOTO, 1991) e tomate (RATUSHNYAK et al., 1991). Neste sistema, geralmente o padrão de bandas encontrado para o híbrido somático representa a soma das bandas parentais (SIHACHAKR et al., 1989; MATSUMOTO, 1991).

No sistema MDH, o padrão de bandas do híbrido somático também é composto pela soma das bandas parentais, tendo sido usado para discriminar híbridos de *Citrus* (GROSSER et al., 1989; GROSSER & GMITTER, 1990) e *Solanum* (CHAPUT et al., 1990; GURI et al., 1991).

Figura 22. Géis de PAGE corados para os sistemas α -EST (α -esterase), PO (peroxidase) e MDH (malato-desidrogenase), de amostras de calos de *P. edulis* var. *flavicarpa* (E), *P. alata* (A), da mistura física das amostras parentais (EA) e de alguns dos produtos de fusão (numerados). O híbrido somático é o de número 31.

Figura 23. Géis de PAGE corados para os sistemas α -EST (α -esterase), PO (peroxidase) e MDH (malato-desidrogenase), de amostras de calos de *P. edulis* var. *flavicarpa* (E), *P. amethystina* (M), da mistura física das amostras parentais (EM) e de alguns dos produtos de fusão (numerados). O híbrido somático é o de número 35.

Figura 24. Géis de PAGE corados para os sistemas α -EST (α -esterase), PO (peroxidase) e MDH (malato-desidrogenase), de amostras de calos de *P. edulis* var. *flavicarpa* (E), *P. cincinnata* (C), da mistura física das amostras parentais (EC) e de alguns dos produtos de fusão (numerados). O híbrido somático é o de número 25.

Figura 25. Géis de PAGE corados para os sistemas α -EST (α -esterase), PO (peroxidase) e MDH (malato-desidrogenase), de amostras de calos de *P. edulis* var. *flavicarpa* (E), *P. coccinea* (A), da mistura física das amostras parentais (EO) e de alguns dos produtos de fusão (numerados). O híbrido somático é o de número 11.

Figura 26. Géis de PAGE corados para os sistemas α -EST (α -esterase), PO (peroxidase) e MDH (malato-desidrogenase), de amostras de calos de *P. edulis* var. *flavicarpa* (E), *P. giberti* (G), da mistura física das amostras parentais (EG) e de alguns dos produtos de fusão (numerados). O híbrido somático é o de número 04.

O sistema PO por sua vez, tem sido descrito na literatura como marcador para a identificação de híbridos somáticos de *Rudbeckia* (AL-ATABEE et al., 1990), *Nicotiana* (SPROULE et al., 1991) e batata (SERRAF et al., 1991).

Outros sistemas também têm sido utilizados, com menor frequência, como PGI (GROSSER et al., 1989; SPROULE et al., 1991; WAARA et al., 1991), GOT (WIJBRANDI et al., 1990; SPROULE et al., 1991); PGM (GROSSER et al., 1989; SIHACHAKR et al., 1989; SAKAMOTO & TAGUCHI, 1991) e IDH (GURI et al., 1991; WAARA et al., 1991).

As contagens do número de cromossomos dos híbridos somáticos obtidos revelaram que os mesmos possuíam $4n=36$ (Figura 27), como era esperado, uma vez que as espécies parentais utilizadas possuíam $2n=18$ cromossomos (LOPES, 1991). Não foram regeneradas plantas aneuplóides ou com ploidias superiores a $4n$, como têm sido obtidas em fusões envolvendo protoplastos de *S. brevidens* e *S. tuberosum* (PEHU et al., 1990 a,b,c).

Foram produzidos neste trabalho, 5 híbridos somáticos de *P. edulis* (+) *P. alata*, 7 de *P. edulis* (+) *P. amethystina*, 5 de *P. edulis* (+) *P. cincinnata* e 6 de *P. edulis* (+) *P. giberti*. Plantas destes genótipos foram clonadas através de micro-estaquia e mantidas *in vitro* como descrito por DORNELAS & VIEIRA (1994).

O fenótipo dos híbridos somáticos de *Passiflora* spp. obtidos, mostrou-se intermediário ao das espécies parentais (Figura 28). Esta é uma característica comum aos híbridos somáticos vegetais, embora estes nem sempre se assemelhem aos híbridos sexuais equivalentes, quando os mesmos podem ser obtidos. (GROSSER & GMITTER, 1990; GLIMELIUS et al., 1991).

Figura 27. Metáfase mitótica do meristema radicular dos híbridos somáticos *P. edulis* (+) *P. alata* (a.), *P. edulis* (+) *P. amethystina* (b.), *P. edulis* (+) *P. cincinnata* (c.) e *P. edulis* (+) *P. giberti* (d.), mostrando $4n=36$ cromossomos. Barra = 6 μm .

Figura 28. Folhas destacadas de plantas de *P. edulis* var. *flavicarpa* (E), *P. alata* (A), *P. amethystina* (M), *P. cinnata* (C), *P. giberti* (G) e dos híbridos somáticos entre estas espécies (H): *P. edulis* (+) *P. alata* (a.), *P. edulis* (+) *P. amethystina* (b.), *P. edulis* (+) *P. cinnata* (c.) e *P. edulis* (+) *P. giberti* (d.). Barra = 2 cm.

Pelo menos 3 clones de cada híbrido somático produzido foram aclimatados e transferidos para a casa de vegetação (Figura 29). Estes clones estão sendo propagados por estaquia e transferidos para condições de campo. Isto possibilitará o estabelecimento de ensaios que permitirão a avaliação da fertilidade e de outras características de interesse agrônomo destes híbridos somáticos, particularmente no que diz respeito à resistência à doenças.

A incorporação de híbridos somáticos tetraplóides em programas de melhoramento é muitas vezes dificultada pela baixa fertilidade dos mesmos e de suas progênes, sobretudo quando retrocruzados com as espécies parentais diplóides (EVANS, 1991). Assim, para que híbridos somáticos possam ser incorporados em programas de melhoramento genético, sua ploidia deve ser reduzida, pela obtenção de plantas di-haplóides, via cultura de anteras, ou os mesmos devem ser incorporados em programas de melhoramento de variedades tetraplóides (BAJAJ, 1991).

Não há na literatura, até o momento, protocolos disponíveis para a obtenção de plantas di-haplóides de *Passiflora*. TSAY et al. (1984), trabalhando com anteras do híbrido zigótico (*P. edulis* x *P. edulis* var. *flavicarpa*) x *P. edulis* var. *flavicarpa*, testaram vários meios e condições de cultura, mas não obtiveram a regeneração de plantas inteiras. Apenas calos e algumas protusões, semelhantes à gemas, foram produzidos.

Entretanto, KNIGHT (1991) produziu e avaliou híbridos zigóticos tetraplóides interespecíficos de *Passiflora*, portadores de características desejáveis para o clima temperado, como tolerância ao clima frio. Quando plantas de *P. incarnata* L. foram cruzadas com plantas de *P. edulis* var. *flavicarpa*, todos os híbridos interespecíficos produzidos mostraram-se estéreis e

Figura 29. a. Híbridos somáticos de *Passiflora* spp., transferidos para copos plásticos contendo uma mistura de terra:areia:composto orgânico (1:1:1), em processo de aclimação. b. e c. Plantas de *P. edulis* (+) *P. amethystina* (b.) e de *P. edulis* (+) *P. cincinnata* (c.) em condições de telado. Barras: a. e c., 4,0 cm; b., 1,0 cm.

não produziram frutos. No entanto "seedlings" deste cruzamento foram tratados com uma solução de 0,2% de colchicina e as plantas emergentes foram tetraploidizadas. A fertilidade foi restaurada e progênies puderam ser obtidas dos cruzamentos entre as plantas híbridas. Clones destas progênies foram avaliados a campo para várias características de interesse agrônomo, como cor, acidez e teor de sólidos solúveis do suco dos frutos e tolerância ao frio. O desempenho das plantas tetraplóides nestas avaliações, semelhantes ou superiores ao desempenho das plantas diplóides, permitiram ao autor recomendar o uso destes híbridos zigóticos para a produção de uma cultivar tetraplóide de maracujá.

Da mesma maneira, híbridos somáticos de *Passiflora*, portando características de interesse agrônomo, poderiam ser utilizados em programas de melhoramento de cultivares tetraplóides.

Em estudos posteriores, os híbridos somáticos de *Passiflora* cujos protocolos de produção foram descritos neste trabalho, serão caracterizados quanto a sua fertilidade e suas características agrônomicas, visando seu aproveitamento em programas de melhoramento do maracujazeiro.

5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados e discutidos no capítulo anterior, foram possíveis as seguintes conclusões:

1. Obtem-se, mediante o tratamento enzimático adequado, protoplastos isolados de tecido foliar de *P. edulis* var. *flavicarpa*, *P. alata*, *P. amethystina*, *P. cincinnata* e *P. giberti*. O mesmo tratamento permite o isolamento de protoplastos de pétalas de *P. coccinea*. Plantas inteiras são obtidas a partir da cultura dos protoplastos isolados de tecido foliar de *P. edulis* var. *flavicarpa*, *P. alata*, *P. amethystina*, *P. cincinnata* e *P. giberti*.

3. O cultivo dos calos derivados de protoplastos de *P. edulis* var. *flavicarpa* e *P. cincinnata* em meio de cultura MD, favorece o desenvolvimento das plantas diplóides normais, em relação ao meio MS suplementado com NAA e BAP, onde observa-se a formação de plantas diplóides e tetraplóides.

4. O cultivo de fragmentos de calos de *P. edulis* var. *flavicarpa*, *P. alata*, *P. amethystina*, *P. cincinnata*, *P. coccinea* e *P. giberti* em meio MD líquido, no escuro, forma suspensões celulares em cultura das quais é possível o isolamento de protoplastos. A água de coco favorece o desenvolvimento das suspensões celulares.

5. As maiores porcentagens de formação de heterodímeros entre protoplastos de *Passiflora* são obtidas com a utilização de soluções contendo entre 20 e 30% de PEG.

Figura 29. a. Híbridos somáticos de *Passiflora* spp., transferidos para copos plásticos contendo uma mistura de terra:areia:composto orgânico (1:1:1), em processo de aclimação. b. e c. Plantas de *P. edulis* (+) *P. amethystina* (b.) e de *P. edulis* (+) *P. cincinnata* (c.) em condições de telado. Barras: a. e c., 4,0 cm; b., 1,0 cm.

não produziram frutos. No entanto "seedlings" deste cruzamento foram tratados com uma solução de 0,2% de colchicina e as plantas emergentes foram tetraploidizadas. A fertilidade foi restaurada e progênies puderam ser obtidas dos cruzamentos entre as plantas híbridas. Clones destas progênies foram avaliados a campo para várias características de interesse agrônomo, como cor, acidez e teor de sólidos solúveis do suco dos frutos e tolerância ao frio. O desempenho das plantas tetraplóides nestas avaliações, semelhantes ou superiores ao desempenho das plantas diplóides, permitiram ao autor recomendar o uso destes híbridos zigóticos para a produção de uma cultivar tetraplóide de maracujá.

Da mesma maneira, híbridos somáticos de *Passiflora*, portando características de interesse agrônomo, poderiam ser utilizados em programas de melhoramento de cultivares tetraplóides.

Em estudos posteriores, os híbridos somáticos de *Passiflora* cujos protocolos de produção foram descritos neste trabalho, serão caracterizados quanto a sua fertilidade e suas características agrônomicas, visando seu aproveitamento em programas de melhoramento do maracujazeiro.

5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados e discutidos no capítulo anterior, foram possíveis as seguintes conclusões:

1. Obtem-se, mediante o tratamento enzimático adequado, protoplastos isolados de tecido foliar de *P. edulis* var. *flavicarpa*, *P. alata*, *P. amethystina*, *P. cincinnata* e *P. giberti*. O mesmo tratamento permite o isolamento de protoplastos de pétalas de *P. coccinea*. Plantas inteiras são obtidas a partir da cultura dos protoplastos isolados de tecido foliar de *P. edulis* var. *flavicarpa*, *P. alata*, *P. amethystina*, *P. cincinnata* e *P. giberti*.

3. O cultivo dos calos derivados de protoplastos de *P. edulis* var. *flavicarpa* e *P. cincinnata* em meio de cultura MD, favorece o desenvolvimento das plantas diplóides normais, em relação ao meio MS suplementado com NAA e BAP, onde observa-se a formação de plantas diplóides e tetraplóides.

4. O cultivo de fragmentos de calos de *P. edulis* var. *flavicarpa*, *P. alata*, *P. amethystina*, *P. cincinnata*, *P. coccinea* e *P. giberti* em meio MD líquido, no escuro, forma suspensões celulares em cultura das quais é possível o isolamento de protoplastos. A água de coco favorece o desenvolvimento das suspensões celulares.

5. As maiores porcentagens de formação de heterodímeros entre protoplastos de *Passiflora* são obtidas com a utilização de soluções contendo entre 20 e 30% de PEG.

6. Obtem-se células híbridas a partir da fusão química de protoplastos de *P. edulis* var. *flavicarpa*, *P. alata*, *P. amethystina*, *P. cincinnata*, *P. coccinea* e *P. giberti*. A cultura destes produtos de fusão, permite a regeneração de plantas inteiras de *P. edulis* (+) *P. alata*, *P. edulis* (+) *P. amethystina*, *P. edulis* (+) *P. cincinnata*, e *P. edulis* (+) *P. giberti*.

8. Técnicas de eletroforese de proteínas solúveis e de isoenzimas são adequadas para a identificação dos híbridos somáticos de *Passiflora* obtidos. Estes híbridos possuem características fenotípicas intermediárias às espécies parentais e são tetraplóides, o que corresponde à soma do número de cromossomos das espécies parentais diplóides.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-ATABEE, J.S.; MULLIGAN, B.J.; POWER, J.B. Interspecific somatic hybrids of *Rudbeckia hirta* and *R. laciniata* (Compositae). **Plant Cell Reports**, New York, **8**:517-20, 1990.

ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G. C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa, UFV, 1991. 242p.

ATANASSOV, A.; DIMANOV, D.; ATANASSOV, I.; DRAGOEVA, A.; VASSILEVA, Z.; VITANOV, V.; JANKULOVA, M.; DJILIANOV, D. Transfer of resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV) from wild *Nicotiana* species to *N. tabacum* via somatic hybridization. In: INTERNATIONAL PROTOPLAST SYMPOSIUM, 8., Uppsala, 1991. **Abstracts. Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, **82**:A23, 1991.

AUSTIN, S.; BAER, M.; EHLENFELDT, M.; KAZMIERCZAK, P. J.; HELGESON, J. P. Intra-specific fusions in *Solanum tuberosum*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **71**: 172-5, 1985a.

- AUSTIN, S.; BAER, M.; HELGESON, J. P. Transfer of resistance to potato leaf roll virus from *Solanum brevidens* into *Solanum tuberosum* by somatic fusion. **Plant Science**, Amsterdam, **39**: 75-82, 1985b.
- AUSTIN, S.; EHLENFELDT, M.; BAER, M.; HELGESON, J. P. Somatic hybrids produced by protoplast fusion between *Solanum tuberosum* and *S. brevidens*: phenotypic variation under field conditions. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **71**: 682-90, 1986.
- AUSTIN, S.; LOJKOWSKA, E.; EHLENFELDT, M.; KELMAN, A.; HELGESON, J. P. Fertile interspecific somatic hybrids of *Solanum*: a novel source of resistance to *Erwinia* soft rot. **Phytopathology**, Saint Paul, **78**: 1216-20, 1988.
- AVIV, D. & GALUN, E. Restoration of fertility in cytoplasmic male sterile (CMS) *Nicotiana sylvestris* by fusion with x-ray irradiated *N. tabacum* protoplasts. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **58**: 121-7, 1980.
- AVIV, D. & GALUN, E. Does pretreatment by rhodamine 6-G affect the mitochondrial composition of fusion-derived *Nicotiana* cybrids? **Plant Cell Reports**, New York, **3**: 227-30, 1986.
- AZIZ, M.A.; CHAND, P.K.; POWER, J.B.; DAVEY, M.R. Somatic hybrids between the forage legumes *Lotus corniculatus* L. and *L. tenuis* Waldst et Kit. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, **41**: 471-9, 1990.

- BABIYCHUK, E.; KUSHNIR, S.; GLEBA, Y. Y. Spontaneous extensive chromosome elimination in somatic hybrids between somatically congruent species *Nicotiana tabacum* L. and *Atropa belladonna* L. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **84**: 87-91, 1992.
- BACCARIN, M. N. R. A. Cultura de tecidos e enxertia em *Passiflora* spp., Piracicaba, 1988. 139p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- BAJAJ, Y. P. S. Agricultural biotechnology in crop improvement. In: CROCOMO, O.J.; SHARP, W.R.; MELO, M., ed. **Biotechnologia para a produção vegetal**. Piracicaba, CEBTEC/FEALQ, 1991. p. 279-354.
- BARSBY, T.L.; SHEPARD, J.F.; KEMBLE, R.J.; WONG, R. Somatic hybridization in the genus *Solanum*: *S. tuberosum* and *S. brevidens*. **Plant Cell Reports**, New York, **3**:165-7, 1984.
- BATES, G. W. Asymmetric hybridization between *Nicotiana tabacum* and *N. repanda* by donor-recipient protoplast fusion: transfer of TMV resistance. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **80**: 481-7, 1990.
- BATES, G.W. & HASENKAMPF, C. A. Culture of plant somatic hybrids following electrical fusion. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **70**:227-33, 1985.

- BENNETT, R. I. & SMITH, A.G. Use of a genomic clone for ribosomal RNA from *Brassica olearacea* in RFLP analysis of *Brassica* species. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, **16**: 685-8, 1991.
- BENZION, G.; PHILLIPS, R.L.; RINES, H.W. Case histories of genetic variability *in vitro*: oats and maize. In: VASIL, I. K., ed. **Cell culture and somatic cell genetics**, New York, Academic Press, 1986. v.3, p.435-48.
- BINDING, H. Somatic hybridization experiments in solanaceous species. **Molecular and General Genetics**, Berlin, **144**:171-5, 1976.
- BINDING, H.; BUNNING, D.; GORSCHEN, E.; JORGENSEN, J.; KOLLMANN, R.; KRUMBIEGEL-SCHROEREN, G.; LING, H. Q.; MONZER, J.; MORDHORST, G.; RUDNICK, J.; SAUER, A.; WITT, D.; ZUBA, M. Uniparental, fusant and chimeric plants regenerated from protoplasts after streak plating in agarose gels. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, **12**: 133-7, 1988.
- BONNEMA, A. B.; MELZER, J. M.; MURRAY, L. W.; O'CONNELL, M. A. Non-random inheritance of organellar genomes in symmetric and asymmetric somatic hybrids between *Lycopersicon esculentum* and *L. pennellii*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **84**: 435-42, 1992.

COLIJN-HOOYMANS, C.M.; BOUWER, R.; DONS, J. J. M. Plant regeneration from cucumber protoplasts. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, **12**:147-50, 1988.

CONSTABEL, F. & KAO, K.N. Agglutination and fusion of plant protoplasts by polyethylene glycol. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, **52**: 1603-6, 1974.

CONSTANTIN, M.J. Chromosome instability in cell and tissue cultures and regenerated plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, **31**: 55-9, 1981.

DAUNAY, M. C.; CHAPUT, M. H.; SIHACHAKR, D.; ALLOT, D.; VEDEL, F.; DUCREUX, G. Production and characterization of fertile somatic hybrids of eggplant (*Solanum melongena* L.) with *Solanum aethiopicum* L. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **85**: 841-50, 1993.

DAVEY, M.R. & POWER, J.B. Aspects of protoplast culture and plant regeneration. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, **12**:115-25, 1988.

DENG, X. X.; GROSSER, J. W.; GMITTER JUNIOR, F. G. Intergeneric somatic hybrid plants from protoplast fusion of *Fortunella crassifolia* cultivar 'Meiwa' with *Citrus sinensis* cultivar 'Valencia'. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, **49**: 55-62, 1992.

DE VRIES, S. E.; FERWEDA, M. A.; LOONEN, A. E. H. M.; PIJNACKER, L. P.; FEENSTRA, W. J. Chromosomes in somatic hybrids between *Nicotiana plumbaginifolia* and monoploid potato. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **75**:170-6, 1987.

DORNELAS, M. C. & VIEIRA, M. L. C. Cultura de tecidos e de protoplastos de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA ESALQ, 5., Piracicaba, 1990. **Anais**. Piracicaba, ESALQ, 1990. p 9.

DORNELAS, M.C. & VIEIRA, M. L. C. Plant regeneration from protoplast cultures of *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg., *P. amethystina* Mikan. and *P. cincinnata* Mast. **Plant Cell Reports**, New York, **13**:103-6, 1993.

DORNELAS, M. C. & VIEIRA, M. L. C. Tissue culture studies on species of *Passiflora* L. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, **36**: 211-7, 1994.

- DREW, R. A. *In vitro* culture of adult and juvenile bud explants of *Passiflora* species. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, **26**: 23-7, 1991.
- D'UTRA VAZ, F. B.; SANTOS, A. V. P. dos; MANDERS, G.; COCKING, E. C.; DAVEY, M. R.; POWER, J. B. Plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of the tropical woody plant, passionfruit (*Passiflora edulis* fv *flavicarpa* Degener.): the importance of the antibiotic cefatoxime in the culture medium. **Plant Cell Reports**, New York, **12**:220-5, 1993.
- EHLENFELDT, M. K. & HELGESON, J. P. Fertility of somatic hybrids from protoplast fusion of *Solanum brevidens* and *S. tuberosum*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **73**: 395-402, 1987.
- EVANS, D. A. Somatic hybrids for crop improvement and gene research. **Bio/Technology**, New York, **1**: 856-8, 1983.
- EVANS, D. A. Use of protoplast fusion for crop improvement. In: CROCOMO, O.J.; SHARP, W.R.; MELO, M., ed. **Biotechnologia para a produção vegetal**. Piracicaba, CEBTEC/FEALQ, 1991. p. 391-429.
- EVANS, D. A. & COCKING, E. C. Isolated plant protoplasts. In: STREET, H. E. (ed.) **Plant tissue and cell culture**. Oxford, Blackwell Scientific, 1977. v.11, p.103-35 (Botanical Monographs)

- EVANS, D. A. & REED, S. M. Cytogenetic techniques. In: THORPE, T. A., ed. **Plant tissue culture: methods and applications in agriculture**, Berlin, Springer-Verlag, 1981. p. 213-240.
- EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; FLICK, C. E. Organogenesis. In: THORPE, T. A., ed. **Plant tissue culture: methods and applications in agriculture**, Berlin, Springer-Verlag, 1981. p. 45-76.
- FAHLESON, J.; ERIKSSON, I.; LANDGREN, M.; STYMNE, S.; GLIMELIUS, K. Intertribal somatic hybrids between *Brassica napus* and *Thlaspi perfoliatum* with high content of the *T. perfoliatum*-specific nervonic acid. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **87**: 795-804, 1994.
- FAHLESON, J.; RAHLÉN, L.; GLIMELIUS, K. Analysis of plant regeneration from protoplast fusion between *Brassica napus* and *Eruca sativa*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **76**: 507-12, 1988a.
- FAHLESON, J.; DIXELIUS, J.; SUNDBERG, E.; GLIMELIUS, K. Correlation between flow cytometric determination of nuclear DNA content and chromosome number in somatic hybrids within *Brassica* spp. **Plant Cell Reports**, New York, **7**: 74-7, 1988b.
- FISH, N.; STEELE, S. H.; JONES, M. G. K. Field assessment of dihaploid *S. tuberosum* and *S. brevidens* somatic hybrids. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **76**: 880-6, 1988.

- FORSBERG, J.; LANDGREN, M.; GLIMELIUS, K. Fertile somatic hybrids between *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. **Plant Science**, Amsterdam, **95**: 213-23, 1994.
- FOUQUÉ, A. Espèces frutières d'Amérique tropicale. **Fruits**, Paris, **27**:368-82, 1972.
- FREARSON, E. M.; POWER, J. B.; COCKING, E. C. The isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. **Developmental Biology**, New York, **33**:130-7, 1973.
- FUNGARO, M. H. P. & VIEIRA, M. L. C. Protoplastos de plantas: isolamento e regeneração. **Ciência e Cultura**, São Paulo, **41**:1151-9, 1989.
- GILISSEN, L. J. W.; STAVAREN, M. J. van; VERHOEVEN, H. A.; SREERAMULU, K. Somatic hybridization between potato and *Nicotiana plumbaginifolia*. 1. Spontaneous biparental chromosome elimination and production of asymmetric hybrids. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **84**: 73-80, 1992a.

- JACOBSEN, E.; DANIEL, M. K.; BERGERVOET-VAN DEELEN, J. E. M.; HUIGEN, D. J.; RAMANNA, M. S. The first and second backcross progeny of the intergeneric fusion hybrids of potato and tomato after crossing with potato. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **88**: 181-6, 1994.
- JACOBSEN, E.; REINHOUT, P.; BERGERVOET, J. E. M.; DE LOOFF, J.; ABIDIN, P. E.; HUIGEN, D. J.; RAMANNA, M. S. Isolation and characterization of potato-tomato somatic hybrids using an amylose-free potato mutant as parental genotype. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **85**: 154-64, 1992.
- JADARI, R.; SIHACHAKR, D.; ROSSIGNOL, L.; DUCREUX, G. Transfer of resistance to *Verticillium dahliae* Kleb. from *Solanum torvum* S.W. into potato (*Solanum tuberosum* L.) by protoplast electrofusion. **Euphytica**, Dordrecht, **64**: 39-47, 1992.
- JONES, B.; BLACKHALL, N. W.; HAMMATT, N.; DAVEY, M. R. Somatic hybridization of *Glycine* species: the use of flow cytometry for isolation of heterokaryons. **Soybean Genetics Newsletter**, Saint Louis, **17**: 69-74, 1990.

- JONES, H.; KARP, A.; JONES, M. G. K. Isolation, culture and regeneration of plants from potato protoplasts. **Plant Cell Reports**, New York, **8**:307-11, 1989.
- JOURDAN, P. S.; EARLE, E. D.; MUTSCHLER, M. A. Atrazine-resistant cauliflower obtained by somatic hybridization between *Brassica oleracea* and ATR-*B. napus*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **78**: 271-9, 1989a.
- JOURDAN, P. S.; EARLE, E. D.; MUTSCHLER, M. A. Synthesis of atrazine-resistant *Brassica napus* by somatic hybridization between cytoplasmic male-sterile *B. oleracea* and atrazine-resistant *B. campestris*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **78**: 445-55, 1989b.
- KANTHARAJAH, A. S. & DODD, W. A. In vitro micropropagation of *Passiflora edulis* (Purple passionfruit). **Annals of Botany**, London, **65**:337-9, 1990.
- KAO, K. N. Chromosomal behaviour in somatic hybrids of Soybean-*Nicotiana glauca*. **Molecular and General Genetics**, Berlin, **150**:225-30, 1977.
- KAO, K. N. Protoplast fusion and isolation of heterokarions. In: WETTER, L.R. & CONSTABEL, F., ed. **Plant tissue culture methods**. Saskatoon, Prairie Reg Laboratories, 1982. p. 49-57.

- KAO, K. N. & MICHAYLUK, M. R. A method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. **Planta**, New York, **115**: 335-67, 1974.
- KAO, K. N. & MICHAYLUK, M. R. Nutrient requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. **Planta**, New York, **126**: 105-10, 1975.
- KAO, H. M.; BROWN, G. G.; SCHOLLES, G.; SEGUIN-SWARTZ, G. Ogura cytoplasmic male sterility and triazine tolerant *Brassica napus* cv. Westar produced by protoplast fusion. **Plant Science**, Amsterdam, **75**:63-72, 1991.
- KAO, K. N.; CONSTABEL, F.; MICHAYLUK, M. R.; GAMBORG, O. L. Plant protoplast fusion and growth of intergeneric hybrid cells. **Planta**, New York, **120**: 215-27, 1974.
- KAO, K. N.; KELLER, W. A.; GLEDDIE, S.; BROWN, G. G. Synthesis of *Brassica oleracea*/ *Brassica napus* somatic hybrid plants with novel organelle DNA compositions. **Theoretic and Applied Genetics**, New York, **83**: 313-20, 1992.
- KARP, A. & MADDOCK, S.E. Chromosome variation in wheat plants regenerated from cultured immature embryos. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **67**: 249-55, 1984.

- KARTHA, K. K.; GAMBORG, O. L.; CONSTABEL, F.; KAO, K. N. Fusion of rapeseed and soybean protoplasts and subsequent division of heterokaryocytes. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, **52**: 2435-6, 1974.
- KELL, A. & GLASER, R. W. On the mechanical and dynamic properties of plant cell membranes: their role in growth, direct gene transfer and protoplast fusion. **Journal of Theoretical Biology**, London, **160**: 41-62, 1993.
- KILLIP, E. P. The American species of Passifloraceae. Chicago, 1938. 613 p. (Botanical Series, 19)
- KIRTI, P. B.; PRAKASH, S.; CHOPRA, V. L.; Interspecific hybridization between *Brassica juncea* and *B. spinescens* through protoplast fusion. **Plant Cell Reports**, New York, **9**: 639-42, 1991.
- KISAKA, H. & KAMEYA, T. Production of somatic hybrids between *Daucus carota* L. and *Nicotiana tabacum*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **88**: 75-80. 1994.
- KLEIN, A. L.; FERRAZ, L. C. C. B.; OLIVEIRA, J.C. Comportamento de diferentes maracujazeiros em relação ao nematóide formador de galhas *Meloidogyne incognita*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, **7**:234-6, 1984.

- KLIMAZEWSKA, K. & KELLER, W. A. Regeneration and characterization of somatic hybrids between *Brassica napus* and *Diplotaxis harra*. **Plant Science**, Amsterdam, **58**: 211-22, 1988.
- KNIGHT, R. J. Development of tetraploid hybrid passion fruit clones with potential for the North Temperate Zone. **HortScience**, Homestead, **26**: 1541-3, 1991.
- KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I.; YOSHINAGA, K.; OHGAWARA, T.; ISHII, S.; Fertility in an intergeneric somatic hybrid plant of Rutaceae. **HortScience**, Homestead, **26**: 207, 1991.
- KOFER, W.; GLIMELIUS, K.; BONNETT, H. T. Modifications of floral development in tobacco induced by fusion of protoplasts of different male-sterile cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **79**: 97-102, 1990.
- KOVTUN, Y. V.; KOROSTASH, M. A.; BUTSKO, Y. V.; GLEBA, Y. Y. Amplification of repetitive DNA from *Nicotiana plumbaginifolia* in asymmetric somatic hybrids between *Nicotiana sylvestris* and *Nicotiana plumbaginifolia*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **86**: 221-8, 1993.

KRIKORIAN, A.D.; O'CONNOR, S.A.; FITTER, M.S. Chromosome number variation and karyotype stability in cultures and culture-derived plants. In: AMMIRATO, P.V.; EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; BAJAJ, Y.P.S., ed. **Handbook of plant cell culture**. Berlin, Springer-Verlag, 1983. v.1, p. 541-81.

KRUMBIEGEL, G. & SCHIEDER, O. Selection of somatic hybrids after fusion of protoplasts from *Datura innoxia* Mill. and *Atropa belladonna* L. **Planta**, New York, **145**: 371-5, 1979.

KUMAR, A. & COCKING, E. C. Protoplast fusion: a novel approach to organelle genetics in higher plants. **American Journal of Botany**, Columbus, **74**: 1289-303, 1987.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, **227**: 680-5, 1970.

LANDGRAFF, H. A situação da cultura do maracujazeiro no Brasil e suas perspectivas com o mercado externo. In: SAO JOSÉ (ed.) **A cultura do maracujá no Brasil**. Jaboticabal, FUNEP, 1991. p.1-17.

LARKIN, P.J. & SKOWKROFT, W.R. Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **60**: 197-214, 1981.

- LEE, M. & PHILLIPS, R.L. Genomic rearrangements in maize induced by tissue culture. **Genome**, Ottawa, **29**: 122-8, 1987.
- LELIVELT, C. L. C. & KRENS, F. A. Transfer of resistance to the beet cyst nematode (*Heterodera schachtii* Schm.) into the *Brassica napus* L. gene pool through intergeneric somatic hybridization with *Raphanus sativus* L. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **83**: 887-94, 1992.
- LELIVELT, C. L. C.; LEUNISSEN, E. H. M.; FREDERIKS, H. J.; HELSPER, J. P. F. G.; KRENS, F. A. Transfer of resistance to the beet cyst nematode (*Heterodera schachtii* Schm.) from *Sinapis alba* L. (white mustard) to the *Brassica napus* L. gene pool by means of sexual and somatic hybridization **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **85**: 688-96, 1993.
- LINDSEY, K. & JONES, M.G.K. **Plant biotechnology in agriculture**. Oxford, Open University Press, 1989. 241 p.
- LOPES, S. C. Citogenética do maracujá, *Passiflora* spp. In: SÃO JOSÉ, A.R. (ed.) **A cultura do maracujá no Brasil**, Jaboticabal, FUNEP, 1991. p.201-9.
- LÖRZ, H.; LARKIN, P.J.; THOMSON, J.; SCOWCROFT, W.R. Improved protoplast culture in agarose media. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, **2**:217-26, 1983.

- LOUSADA, E. S.; GROSSER, J. W.; GMITTER JUNIOR, F. G. Intergeneric somatic hybridization of sexually incompatible parents: *Citrus sinensis* and *Atalantia ceylanica*. **Plant Cell Reports**, New York, **12**:687-90, 1993.
- LOUSADA, E. S.; GROSSER, J. W.; GMITTER JUNIOR, F. G.; NIELSEN, B.; CHANDLER, J. L.; DENG, X. X.; TUSA, N. Eight new somatic hybrid citrus root stocks with potential for improved disease resistance. **HortScience**, Homestead, **27**:1033-6, 1992.
- LYNCH, P. T.; ISAAC, S.; COLLIN, H. A. Electrofusion of protoplasts from celery (*Apium graveolens* L.) with protoplasts from the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. **Planta**, New York, **178**: 207-14, 1989.
- MALIGA, P.; LÖRZ, H.; LAZAR, G.; NAGY, F. Cytoplasm-protoplast fusion for interspecific chloroplast transfer in *Nicotiana*. **Molecular and General Genetics**, Berlin, **185**: 211-5, 1982.
- MANDERS, G.; D'UTRA VAZ, F. B.; dos SANTOS, A. N. P.; DAVEY, M. R.; POWER, J. B. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of passionfruit (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) In: INTERNATIONAL PROTOPLAST SYMPOSIUM, 8., Uppsala, 1991. **Abstracts, Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, **82**:A16, 1991.
- MARTIN, F.W. & NAKASONE, H. Y. The edible species of *Passiflora*. **Economic Botany**, Dordrecht, **24**:333-43, 1970.

MATIBIRI, E. A. & MANTEL, S. H. Cybridization in *Nicotiana tabacum* L. using double inactivation of parental protoplasts and post-fusion selection based on nuclear-encoded and chloroplast-encoded marker genes. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **88**: 1017-22, 1994.

MATSUMOTO, E. Interspecific somatic hybridization between lettuce (*Lactuca sativa*) and wild species *L. virosa*. **Plant Cell Reports**, New York, **9**:531-4, 1991.

MATTHEIJ, W. M. & PUITE, K. J. Tetraploid potato hybrids through protoplast fusion and analysis on their performance in the field. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **83**: 807-12, 1992.

MELCHERS, G.; MOHRI, Y.; WATANABE, K.; WAKABAYASHI, S.; HARADA, K. One-step generation of cytoplasmic male sterility by fusion of mitochondrial-inactivated tomato protoplasts with nuclear-inactivated *Solanum* protoplasts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, **89**: 6832-6, 1992.

MELCHERS, G.; SACRISTAN, M. D.; HOLDER, A. A. Somatic hybrid plants of potato and tomato regenerated from fused protoplasts. **Carlsberg Research Communications**, Carlsberg, **43**: 203-18, 1978.

- MENCZEL, L.; GALIBA, G.; NADY, F.; MALIGA, P. Effect of radiation dosage on efficiency of chloroplast transfer by protoplast fusion in *Nicotiana*. **Genetics**, Chapel Hill, **100**: 487-95, 1982.
- MILLER, S. A.; FLICK, C. E.; EVANS, D. A. Inheritance of TMV resistance in backcross progeny of somatic hybrids of *Nicotiana tabacum* and *N. nesophila*. **Phytopathology**, Saint Paul, **74**: 851-2, 1984.
- MOLL, B.; POLSBY, L.; MALIGA, P. Streptomycin and lincomycin resistances and selective plastid markers in cultured *Nicotiana* cells. **Molecular and General Genetics**, Berlin, **221**:245-50, 1990.
- MÖLLERS, C.; FREI, U.; WENZEL, G. Field evaluation of tetraploid somatic potato hybrids. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **88**: 147-52, 1994.
- MORAN ROBLES, M. J. Multiplication végétative, *in vitro*, des bourgeons axillaires de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg. et de *P. mollissima* Bailey. **Fruits**, Paris, **33**: 693-9, 1978.
- MORAN ROBLES, M. J. Potentiel morphogénétique des entrenoeuds de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg. et *P. mollissima* Bailey en culture *in vitro*. **Turialba**, Paris, **29**: 224-8, 1979.

- MOURAD-AGHA, N.; & DEXHEIMER, J. Étude ultrastructurale de la différenciation des éléments conducteurs dans une culture de tissu de *Passiflora quadrangularis* L. I. Cals cultivés à l'obscurité. **Cytologia**, Tokyo, **44**: 615-31, 1979.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, **15**:473-97, 1962.
- MYERS, J. R.; GROSSER, J. W.; TAYLOR, N. L.; COLLINS, G. B. Genotype-dependent whole plant regeneration from protoplasts of red clover (*Trifolium pratense* L.). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, **19**: 113-27, 1989a.
- MYERS, J. R.; LAZZERI, P. A.; COLLINS, G.B. Plant regeneration of wild *Glycine* species from suspension culture-derived protoplasts. **Plant Cell Reports**, New York, **8**: 112-5, 1989b.
- NAGATA, T. & TAKEBE, I. Cell wall regeneration and cell division in isolated tobacco mesophyll protoplasts. **Planta**, New York, **92**: 301-8, 1970.
- NAGL, W. **Endopolyploidy and polyteny in differentiation and evolution, towards an understanding of quantitative and qualitative variation of nuclear DNA in ontogeny and phylogeny**. New York, North-Holand, 1978. 123 p.

NAKAYAMA, F. Cultivo *in vitro* de tejidos de *Passiflora caerulea*. **Revista de la Facultad de Agricultura de la Universidad Nacional de La Plata**, La Plata, **42**:63-74, 1966.

NARASIMHULU, S. B.; KIRTI, P. B.; PRAKASH, S.; CHOPRA, V. L. Resynthesis of *Brassica carinata* by protoplast fusion and recovery of a novel cytoplasmic hybrid. **Plant Cell Reports**, New York, **11**: 428-32, 1992.

NATON, B.; ECKE, M.; HAMPP, R. Production of fertile hybrids by electrofusion of vacuolated and evacuated tobacco mesophyll protoplasts. **Plant Science**, Amsterdam, **85**: 197-208, 1992.

NEGRUTIU, I.; DE BROWER, D.; WATTS, J. W.; SIDOROV, V. I.; DIRKS, R.; JACOBS, M. Fusion of plant protoplasts: a study using auxotrophic mutants of *Nicotiana plumbaginifolia*, Viviani. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **72**: 279-86, 1986.

NETO, J.; SUGIMORI, M. H.; MALAVOLTA JUNIOR, V. A.; Infecção natural em *Passiflora alata* Ait. por *Xanthomonas campestris* f.sp. *passiflorae* In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 7., Botucatu, 1984. **Resumos**. Botucatu, UNESP, 1984. p.29.

OCHATT, S.J.; COCKING, E.C.; POWER, J.B. Isolation, culture and plant regeneration of Colt cherry (*Prunus avium* x *P. pseudocerasus*) protoplasts. **Plant Science**, Amsterdam, **50**: 139-43, 1987.

OHGAWARA, T.; KOBAYASHI, S.; ISHII, S.; YOSHINAGA, K.; OIYAMA, I. Somatic hybridization in Citrus: navel orange (*C. sinensis* Osb.) and grapefruit (*C. paradisi* Macf.). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **78**:609-12, 1989.

OHGAWARA, T.; KOBAYASHI, S.; ISHII, S.; YOSHINAGA, K.; OIYAMA, I. Fertile fruit trees obtained by somatic hybridization: navel orange (*Citrus sinensis*) and Troyer citrange (*C. sinensis* x *Poncirus trifoliata*). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **81**:141-3, 1991.

OHGAWARA, T.; KOBAYASHI, E.; OHGAWARA, E.; UCHIMAYA, H.; ISHII, S. Somatic hybrid plants obtained by protoplast fusion between *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **71**: 1-4, 1985.

OLIVEIRA, J. C. de Melhoramento Genético In: RUGGIERO, C., ed. **Cultura do Maracujazeiro**. Ribeirão Preto, Editora Legis Summa, 1987. 250p.

OLIVEIRA, J. C. de & FERREIRA, F.R. Melhoramento genético do maracujazeiro. In: SAO JOSÉ (ed.) **A Cultura do maracujá no Brasil**. Jaboticabal, FUNEP, 1991. p.211-239.

- OLIVEIRA, J. C. de; CARNIER, P. E.; ASSIS, G. M. de Preservação de germoplasma de maracujazeiros. In: ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS, 1., Jaboticabal, 1988. **Anais.** Jaboticabal, UNESP, 1988. p.200.
- OLIVEIRA, J. C. de ; NAKAMURA, K.; RUGGIERO, C.; FERREIRA, F. R. Determinação de fonte de resistência em Passifloraceae quanto à morte prematura de plantas. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, **9**:64-5, 1983.
- OLIVEIRA, J. C. de; NAKAMURA, K.; RUGGIERO, C.; FERREIRA, F. R. Determinação de fonte de resistência em Passifloraceae quanto à morte prematura de plantas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 8., Brasília. **Anais.** Brasília, UNB, 1986. p.403-8.
- OLIVEIRA, J. C. de ; RUGGIERO, C.; NAKAMURA, K.; FERREIRA, F. R. Variações observadas em frutos de *Passiflora alata* Ait. **Proceedings of the Tropical Region of American Society of Horticultural Sciences**, New York, **25**:343-5, 1982.
- PANDEYA, R. S.; DOUGLAS, G. C.; KELLER, W. A.; SETTERFIELD, G.; PATRICK, Z. A. Somatic hybridization between *Nicotiana rustica* and *N. tabacum*: development of tobacco breeding strains with disease resistance and elevated nicotine content. **Zeitschrift für Pflanzenzucht**, Berlin, **96**: 346-52, 1986.

- PAROKONNY, A. S.; KENTON, A. Y.; GLEBA, Y. Y.; BENNETT, M. D.
Genome reorganization in *Nicotiana* asymmetric hybrids analysed by *in situ* hybridization. **Plant Journal**, York, **2**: 863-74, 1992.
- PAYAN, F. R. & MARTIN, F. W. Barriers to the hybridization of *Passiflora* species. **Euphytica**, Dordrecht, **24**:706-16, 1975.
- PEHU, E.; KARP, A.; MOORE, K.; STEELE, S.; DUNCKLEY, R.; JONES, M. G. K. Molecular, cytogenetic and morphological characterization of somatic hybrids of dihaploid *Solanum tuberosum* and diploid *S. brevidens* **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **78**:696-704, 1989.
- PEHU, E.; THOMAS, M.; POUTALA, T.; KARP, A.; JONES, M. G. K. Species-specific sequences in the genus *Solanum*: identification, characterization, and application to study somatic hybrids of *S. brevidens* and *S. tuberosum*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **80**:693-8, 1990a.
- PEHU, E.; GIBSON, R. W.; JONES, M. G. K.; KARP, A. Studies on the genetic basis of the resistance to potato leaf roll virus, potato virus Y and potato virus X in *Solanum brevidens* using somatic hybrids of *S. brevidens* and *S. tuberosum*. **Plant Science**, Amsterdam, **69**:95-101, 1990b.

- PEHU, E.; NURMI, A.; PARRY, M. A. J. Variation in net photosynthesis, Rubisco activity and chloroplast ultrastructure among somatic hybrids of *S. tuberosum* and *S. brevidens*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, **41**:769-774, 1990c.
- PELLETIER, G.; PRIMARD, C.; VEDEL, F.; CHETRIT, P.; REMY, R.; ROUSELLE, P.; RENARD, M. Intergeneric cytoplasmic hybridization in Cruciferae by protoplast fusion. **Molecular and General Genetics**, Berlin, **191**: 244-50, 1983.
- PERL, A.; AVIV, D.; GALUN, E. Protoplast-fusion-derived CMS potato cybrids: potential seed-parents for hybrid, true-potato-seeds. **Journal of Heredity**, Washington, **6**:438-42, 1990.
- PLA, M.; MATHIEU, C.; VEDEL, F.; DURAND, J. Olygomycin/venturicidin-resistance is due to a nuclear modification in a somatic hybrid between *Nicotiana tabacum* and a variant line of *Nicotiana sylvestris*. **Plant Science**, Amsterdam, **78**: 53-60, 1991.
- POTRIKUS, I. & SHILLITO, R. D. Protoplasts: isolation, culture, plant regeneration. In: WEISSBACH, A. & WEISSBACH, H. **Methods for plant molecular biology**. New York, Academic Press, 1988. p.355-83.
- POULSEN, G. B.; KAHL, G.; WEISING, K. Oligonucleotide fingerprinting of resynthesized *Brassica napus*. **Euphytica**, Dordrecht, **70**: 53-9, 1993.

POWER, J. B. & CHAPMAN, J. V. Isolation, culture and genetic manipulation of plant protoplasts. In DIXON, R. A., ed. **Plant Cell Culture: a practical approach**. Washington, IRL Press, 1985. p.37-66.

POWER, J. B.; CUMMING, S. E.; COCKING, E. C. Fusion of isolated plant protoplasts. **Nature**, London, **225**: 1016-8, 1970.

POWER, J. B.; DAVEY, M. R.; FREEMAN, J. P.; MULLIGAN, B. J.; COCKING, E. C. Fusion and transformation of plant protoplasts. In: WEISSBACH, A. & WEISSBACH, H. **Methods for plant molecular biology**. New York, Academic Press, 1988. p. 385-401.

POWER, J. B.; PEARSON, E. M.; HEYWARD, C.; GEORGE, D.; EVANS, P. K.; BERRY, S. F.; COCKING, E. C. Somatic hybridization of *Petunia hybrida* and *P. parodii*. **Nature**, London, **263**: 500-2, 1976.

PREISZNER, J.; FEHER, A.; VEISZ, O.; SUTKA, J.; DIDITS, D. Characterization of morphological variation and cold resistance in interspecific somatic hybrids between potato (*Solanum tuberosum* L.) and *S. brevidens* Phil. **Euphytica**, Dordrecht, **57**: 37-49, 1991.

PRIMARD, C.; LEPINGLE, A.; MASSON, J.; LANCELIN, D.; CHEVRE, A. M.; PELLETIER, G. Transfer of male sterile cybrid cytoplasm into winter rape cultivars of *Brassica napus* by protoplast fusion. **Cruciferae Newsletter**, Invergowrie, **13**:78-9, 1988.

- PUITE, K. J. & SCHAART, J. G. Nuclear genomic composition of asymmetric fusion products between irradiated transgenic *Solanum brevidens* and *S. tuberosum*: limited elimination of donor chromosomes and polyploidization of the recipient genome. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **86**: 237-44, 1993.
- PUITE, K.J.; ROEST, S.; PIJNACKER, L.P. Somatic hybrid potato plants after electrofusion of diploid *Solanum tuberosum* and *S. phureja*. **Plant Cell Reports**, New York, **5**:262-5, 1986.
- PUPILLI, F.; DAMIANI, F.; PEZZOTTI, M.; ARCIONI, S. Plant regeneration from callus protoplasts of *Onobrychis viciifolia* Scop. (Sainfoin). **Plant Science**, Amsterdam, **63**: 87-94, 1989.
- RAINERI, D.; JORDAN, P.; KUMAR, A. Restoration of fertility in cytoplasmic male-sterile *Nicotiana tabacum* (cytoplasm *N. bigelovii*) by protoplast fusion with x-irradiated protoplasts of *N. tabacum*, SR-1. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, **43**: 195-203, 1992.
- RATUSHNYAK, Y.I.; LATYPOV, S.A.; SAMOYLOV, A.M.; PIVEN, N.M.; GLEBA, Y.Y. Introgressive hybridization of tomatoes by 'gamma-fusion' of *Lycopersicon esculentum* Mill. and *L. peruvianum* var. *dentatum* Dun. protoplasts. **Plant Science**, Amsterdam, **73**:65-78, 1991.

REINERT, J. & YEOMAN, M.M. **Plant cell & tissue culture:** a laboratory manual. Berlin, Springer-Verlag, 1982. 83p.

RHODES, C.A.; PHILLIPS, R.L.; GREEN, C.E. Cytogenetic stability of aneuploid maize tissue cultures. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, Ottawa, **28**: 374-84, 1986.

ROSÉN, B.; HALDÉN, C.; HENEEN, W. K. Diploid *Brassica napus* somatic hybrids: Characterization of nuclear and organellar DNA. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **76**:197-203, 1988.

RUGGIERO, C., ed. **Cultura do maracujazeiro**. Ribeirão Preto, Legis Summa, 1987. 250p.

SAITO, W.; OHGAWARA, T.; SHIMIZU, J.; ISHII, S. Acid citrus somatic hybrids between sudachi (*Citrus sudachi* Hort. ex Shirai) and lime (*C. aurantifolia* Swing.) produced by electrofusion. **Plant Science**, Amsterdam, **77**: 125-30, 1991.

SAITO, W.; OHGAWARA, T.; SHIMIZU, J.; ISHII, S.; KOBAYASHI, S. *Citrus* cybrid regeneration following cell fusion between nucellar cells and mesophyll cells. **Plant Science**, Amsterdam, **88**: 195-201, 1993.

- SAKAMOTO, K. & TAGUCHI, T. Regeneration of intergeneric somatic hybrid plants between *Lycopersicon esculentum* and *Solanum muricatum*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **81**:509-13, 1991.
- SALA, C.; BIASINI, M. G.; MORANDI, C.; NIELSEN, E.; PARISI, B.; SALA, F. Selection and nuclear DNA analysis of cell hybrids between *Daucus carota* and *Oryza sativa*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, **118**: 409-19, 1985.
- SALHANI, N.; VIENKEN, J.; ZIMMERMANN, U.; WARD, M.; DAVEY, M. R.; CLOTHIER, R. H.; BALLS, M.; COCKING, E. C.; LUCY, J. A. Haemoglobin synthesis and cell wall regeneration by electric field-induced interkingdom heterokaryons. **Protoplasma**, New York, **126**: 30-5, 1985.
- SCHENK, H. R. & RÖBBELEN, G. Somatic hybrids by fusion of protoplasts from *Brassica oleracea* and *B. campestris*. **Zeitschrift für Pflanzenzuechtung**, Berlin, **89**: 278-88, 1982.
- SCHOENMAKERS, H. C. H.; WOLTERS, A. M. A.; DE HAAN, A.; SAIEDI, A. K.; KOORNNEEF, M. Asymmetric somatic hybridization between tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and gamma-irradiated potato (*Solanum tuberosum* L.): a quantitative analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **87**: 713-20, 1994.

SCHUMANN, U. & GOTZ, E. Somatic hybridization of *Solanum tuberosum* L. with *Phytophthora*-resistant wild potato species. In: INTERNATIONAL PROTOPLAST SYMPOSIUM, 8., Uppsala, 1991. **Abstracts. Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, **82**:A23, 1991.

SCORZA, R. & JANICK, J. *In vitro* flowering of *Passiflora suberosa* L. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Homestead, **105**:892-7, 1980.

SENDA, M.; TAKEDA, J.; ABE, S.; NAKAMURA, T. Induction of cell fusion of plant protoplasts by electrical stimulation. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, **20**: 1441-3, 1979.

SERRAF, I.; SIHACHAKR, D.; DUCRUUX, G. BROWN, S.C.; ALLOT, M.; BARGHI, N.; ROSSIGNOL, L. Interspecific somatic hybridization in potato by protoplast electrofusion. **Plant Science**, Amsterdam, **76**:115-26, 1991.

SHILLITO, R. D.; PASZKOWSKI, J.; POTRYKUS, I. Agarose plating and a bed type culture technique enable and stimulate development of protoplast-derived colonies in a number of plant species. **Plant Cell Reports**, New York, **2**:244-7, 1983.

SIDOROV, V. A.; MENCZEL, L.; NAGY, F.; MALIGA, P. Chloroplast transfer in *Nicotiana* based on metabolic complementation between irradiated and iodoacetate treated protoplasts. **Planta**, New York, **152**: 341-5, 1981.

SIHACHAKR, D.; HAICOUR, R.; CHAPUT, M.H.; BARRIENTOS, E.; DUCREUX, G.; ROSSIGNOL L. Somatic hybrid plants produced by eletrofusion between *Solanum melongena* L. and *Solanum torvum* Sw. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **77**:1-6, 1989.

SIHACHAKR, D.; SERRAF, I.; CHAPUT, M.H.; ALLOT, M.; DUCREUX, G.; ROSSIGNOL L. Transfer of disease and insect resistance to intra- and interespecific somatic hybrids of potato (*Solanum tuberosum* L.) by protoplast electrofusion. In: INTERNATIONAL PROTOPLAST SYMPOSIUM, 8., Uppsala, 1991. **Abstracts. Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, **82**:A23, 1991.

SIKDAR, S. R.; CHATTERJEE, G. ;DAS, S.; SEN, S. K. "*Erussica*", the intergeneric fertile somatic hybrid developed through protoplast fusion between *Eruca sativa* Lam. and *Brassica juncea* (L.) Czern. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **79**:561-7, 1990.

SILVA JUNIOR, P. F.; TIHOHOD, D.; OLIVEIRA, J. C. Avaliação de cultivares de maracujazeiros (*Passiflora* sp.), a uma população de *Meloidogyne incognita* (Raça 1) In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 12., Dourados. 1988 **Resumos**. Dourados, UFMS, 1988. p.23.

SIMPKINS, I.; COLLIN, H.A.; STREET, H.E. The growth of *Acer pseudoplatanus* cells in a synthetic liquid medium: response to the carbohydrate, nitrogenous and growth hormone constituents. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, **23**:385-96, 1970.

SJÖDIN, C. & GLIMELIUS, K. *Brassica naponigra*, a somatic hybrid resistant to *Phoma lingam*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **77**:651-6, 1989a.

SJÖDIN, C. & GLIMELIUS, K. Transfer of resistance to *Phoma lingam* to *Brassica napus*, by asymmetric somatic hybridization combined with toxin selection. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **78**:513-20, 1989b.

SPANGENBERG, G.; OSUSKY, M.; OLIVEIRA, M. M.; FREYDL, E.; NAGEL, J.; PAIS, M. S.; POTRYKUS, I. Somatic hybridization by microfusion of defined protoplast pairs in *Nicotiana*: morphological, genetic and molecular characterization. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **80**: 577-87, 1990.

SPROULE, A.; DONALDSON, P.; DIJAK, M.; BEVIS, E.; PANDEYA, R.; KELLER, W.A.; GLEDDIE, S. Fertile somatic hybrids between transgenic *Nicotiana tabacum* and transgenic *N. debneyi* selected by dual-antibiotic resistance. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **82**:450-6, 1991.

- SUNDBERG, E. & GLIMELIUS, K. A method for production of interspecific hybrids within *Brassica* via somatic hybridization using resynthesis of *Brassica napus* as a model. **Plant Science**, Amsterdam, **43**:155-162, 1986.
- SUNDBERG, E. & GLIMELIUS, K. Effects of cell type used for fusion on chromosome elimination and chloroplast segregation in *Brassica oleracea* (+) *Brassica napus* hybrids. **Plant Science**, Amsterdam, **78**:89-98, 1991.
- SUNDBERG, E.; LANDGREN, M.; GLIMELIUS, K. Fertility and chromosome stability in *Brassica napus* resynthesised by protoplast fusion. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **75**:96-104. 1987.
- SUZUKI, D.T.; GRIFFITHS, A.J.; LEWONTIN, R.C. **An introduction to genetic analysis**, New York, W.H. Freeman and Company, 1981. 911p.
- TABAEIZADEL, Z.; PERENNES, C.; BERGOUNIOUX, C. Increasing the viability of *Lycopersicon peruvianum* Mill. by protoplast fusion with *Petunia hybrida* L. **Plant Cell Reports**, New York, **4**: 7-11, 1985.
- TAKEBE, I.; LABIB, G.; MELCHERS, G. Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco. **Naturwissenschaften**, Hamburg, **58**: 318-20, 1971.

- TORIYAMA, K.; HINATA, K.; KAMEYA, T. Production of somatic hybrid plants, 'Brassicomoricaandia' through protoplast fusion between *Moricandia arvensis* and *Brassica oleracea*. **Plant Science**, Amsterdam, **48**: 123-8, 1987a.
- TORIYAMA, K.; HINATA, K.; KAMEYA, T. Selection of an universal hybridizer in *Sinapis turgida* Del. and regeneration of plantlets from somatic hybrids with *Brassica* species. **Planta**, New York, **170**: 308-13, 1987b.
- TORRES, R. E. & MARTIN, F. W. First generation hybrids of edible passion fruit species. **Euphytica**, Dordrecht, **23**:61-70, 1974.
- TSAY, H. S.; HSU, J. Y.; YANG, T. P.; YANG, C. R. Anther culture of passion fruit (*Passiflora edulis*). **Journal of Agricultural Research of China**, Taichung, **33**:126-31, 1984.
- TUSA, N.; GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F.G. Plant regeneration of 'Valencia' sweet orange, 'Femminello' lemon, and the interspecific somatic hybrid following protoplast fusion. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Homestead, **115**:1043-6, 1990.
- VAN WERT, S. L. & SAUNDERS, J. A. Electrofusion and electroporation of plants. **Plant Physiology**, Rockville, **99**: 365-7, 1992.

- VARDI, A.; ARZEE-GONEN, P.; FRYDMAN-SHANI, A.; BLEICHMAN, S.; GALUN, E. Protoplast-fusion-mediated transfer of organelles from *Microcitrus* into *Citrus* and regeneration of novel alloplasmic trees. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **78**: 741-7, 1989.
- WAARA, S.; WALLIN, A.; ERIKSSON, T. Production and analysis of intraspecific somatic hybrids of potato (*Solanum tuberosum* L.). **Plant Science**, Amsterdam, **75**:107-15, 1991.
- WALTERS, T. W.; MUTSCHLER, M. A.; EARLE, E. D. Protoplast fusion-derived Ogura male sterile cauliflower with cold tolerance. **Plant Cell Reports**, New York, **10**: 624-8, 1991.
- WANG, G. R. & BINDING, H. Somatic hybrids and cybrids of *Senecio fuchsii* Gmel. (x) *S. jacobaea* L. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **87**: 561-7, 1993.
- WANG, T. B.; NIIZEKI, M.; HARADA, T.; ISHIKAWA, R.; QIAN, Y. Q.; SAITO, K. Establishment of somatic hybrid cell lines between *Zea mays* L. (maize) and *Triticum sect. trititrigia* MacKey (trititrigia). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **86**: 371-6, 1993.

- WENZEL, G.; SCHIEDER, O.; PRZEWOZNY, T.; SOPORY, S. K.; MELCHERS, G. Comparison of single-cell-culture derived *Solanum tuberosum* L. plants and a model for their application in breeding programs. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **55**: 49-55, 1979.
- WIJBRANDI, J.; VAN CAPELLE, W.; HANHART, C.J.; VAN LOENEN, E.P.; KOORNNEEF, M. Selection and characterization of somatic hybrids between *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum*. **Plant Science**, Amsterdam, **70**:197-208, 1990.
- WOLTERS, A. M. A.; VERGUNST, A. C.; WERFF, F. van der; KOORNNEEF, M. Analysis of nuclear and organellar DNA of somatic hybrid calli and plants between *Lycopersicon* spp. and *Nicotiana* spp. **Molecular and General Genetics**, Berlin, **241**: 707-18, 1993.
- XU, Y. S. & PEHU, E. RFLP analysis of asymmetric somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and irradiated *S. brevidens*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **86**: 754-60, 1993.
- XU, Y. S.; CLARK, M. S.; PEHU, E. Use of RAPD markers to screen somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *S. brevidens*. **Plant Cell Reports**, New York, **12**: 107-9, 1993a.

XU, Y. S.; JONES, M. G. K.; KARP, A.; PEHU, E. Analysis of the mitochondrial DNA of the somatic hybrids of *Solanum brevidens* and *Solanum tuberosum* using non-radioactive digoxigenin-labelled DNA probes. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **85**: 1017-22, 1993b.

XU, Y. S.; VALKONEN, J.; JONES, M. G. K.; PEHU, E. Characterization of regenerants derived through protoplast culture of somatic hybrids between *Solanum brevidens* and *Solanum tuberosum*. In: INTERNATIONAL PROTOPLAST SYMPOSIUM, 8., Uppsala, 1991. **Abstracts. Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, **82**:A24, 1991.

YAMASHIRO, T. Principais doenças do maracujazeiro amarelo no Brasil. In: RUGGIERO, C., ed. **Cultura do maracujazeiro**. Ribeirão Preto, Legis Summa, 1987. p.146-159.

YAMASHIRO, T. & LANDGRAFF, J. H. Maracujá-açu (*Passiflora alata* Ait.), porta-enxerto resistente à fusariose do maracujazeiro (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 5., Pelotas, 1979. **Anais**. Pelotas, UFRS, 1979. p.918-921.

YE, G. N. & EARLE, E.D.; Effects of cellulases on spontaneous fusion of maize protoplasts. **Plant Cell Reports**, New York, **10**: 213-6, 1991.

YEOMAN, M. M. & STREET, H. E. General cytology of cultured cells. In: STREET, H. E., ed. **Plant tissue and cell culture**. Oxford, Blackwell Scientific, 1977. v.11, p.137-76 (Botanical Monographs)

ZELCER, A.; AVIV, D.; GALUN, E. Interspecific transfer of cytoplasmic male sterility by fusion between protoplasts of normal *Nicotiana sylvestris* and x-ray irradiated protoplasts of male-sterile *N. tabacum*. **Zeitschrift für Pflanzensphysiologie**, Hamburg, **90**: 397-407, 1978.

ZIMMERMANN, U. & SCHEURICH, P. High frequency fusion of plant protoplasts by electric fields. **Planta**, New York, **151**: 26-32, 1981.

Apêndice 1.

Trabalhos publicados em decorrência do desenvolvimento desta pesquisa

Plant regeneration from protoplast cultures of *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg., *P. amethystina* Mikan. and *P. cincinnata* Mast.

Marcelo Carnier Dornelas and Maria Lúcia Carneiro Vieira

Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Caixa Postal 83, 13418-900 Piracicaba, SP, Brasil

Received 12 December 1992/Revised version received 16 August 1993 – Communicated by J.J. Finer

Summary. Protoplasts isolated from seedling cotyledons of yellow passionfruit (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg.) and two related wild species, *P. amethystina* Mikan. and *P. cincinnata* Mast., divided in culture and produced calli. Shoot regeneration was obtained in MS medium (Murashige and Skoog 1962) containing 2.0 mg/l 6-benzylaminopurine (BAP). Regenerated plants produced roots in half-strength hormone-free MS medium and could be transferred to soil after being acclimatized.

Key words: Passionfruit - *Passiflora* - Protoplast culture - *Passiflora* wild species

Abbreviations: BAP - 6-benzylaminopurine, MES - 2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid, MS - Murashige and Skoog (1962) medium, NAA - 1-naphthaleneacetic acid.

Introduction

The Passifloraceae family consists of 12 genera. The genus *Passiflora* is the widest spread (Sacco 1980), including 400 species (Cronquist 1981) of which more than 350 are found in tropical regions of South America (Killip 1938). While a large number of species have edible fruits, many *Passiflora* species are also of medicinal and ornamental value (Martin and Nakasone 1970).

Passiflora edulis var. *flavicarpa* Deg., the yellow passionfruit, is an economically important species in America, Australia and Africa. Fruits are consumed fresh or processed for juice industries (Suzuki 1987).

P. amethystina Mikan. is a wild passionfruit species. It has purple-blue flowers which are very aromatic and is found in the rain forest of the Brazilian south-eastern coast (Fouqué 1972).

P. cincinnata Mast. (Figure 1.a.) is found from east of Brazil to Paraguay and Argentina (Fouqué, 1972), and it is tolerant to *Xanthomonas campestris* f. *passiflorae*, a limiting disease in passionfruit orchards (Yamashiro 1991).

Interspecific sexual hybridisation using the germplasm of wild species has been attempted in *Passiflora* breeding in order to promote disease resistance gene introgression and to transfer desirable traits into cultivated species (Torres and Martin 1974; Payan and Martin 1975). Interspecific hybrids are difficult to produce and have fertility problems (Payan and Martin 1975; Oliveira and Ferreira 1991). Tissue culture techniques, such as somatic hybridisation, offer additional methods for achieving gene flow between *Passiflora* species. A prerequisite for the production of somatic hybrid plants is the development of protoplast-to-plant technology. To date, plant regeneration from *Passiflora* protoplasts has been reported by Manders *et al.* (1991) and D'Ultra Vaz *et al.* (1993), where shoot regeneration was obtained from mesophyll cells of *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg.

The present paper describes plant regeneration from protoplasts isolated from seedling cotyledons of *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg. and two related wild species, *P. amethystina* Mikan. and *P. cincinnata* Mast., using a protocol that may be also applicable to other species of *Passiflora*.

Figure 1. a. Appearance of a *Passiflora cincinnata* plant in the field (Bar= 5 cm). b. Freshly isolated protoplasts of *P. amethystina* (Bar= 100 μ m). c. First cellular division in a *P. amethystina* protoplast culture (Bar= 20 μ m). d.-f. microcolonies (Bar = 100 μ m) shoot regeneration (Scale = 1 cm) and a potted plant (Bar= 5cm) derived from cultures of *P. cincinnata* protoplasts.

Table I. Percentage of division (mean $\pm$ SE) in protoplast-derived cultures of *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*, *P. amethystina* and *P. cincinnata* at different densities after 7d of culture.

Plating densities	<i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i>	<i>P. amethystina</i>	<i>P. cincinnata</i>
5.0×10^4	5.2 ± 1.2 (LC)	3.5 ± 1.1 (LC)	3.6 ± 0.9 (LC)
	27.9 ± 3.2 (DC)	22.6 ± 7.9 (DC)	14.1 ± 6.3 (DC)
	21.3 ± 5.5 (QC)	18.8 ± 9.6 (QC)	10.3 ± 5.7 (QC)
1.0×10^5	3.0 ± 0.9 (LC)	1.5 ± 0.8 (LC)	3.3 ± 1.2 (LC)
	40.1 ± 8.5 (DC)	27.2 ± 6.3 (DC)	15.7 ± 5.1 (DC)
	35.0 ± 3.2 (QC)	30.7 ± 6.8 (QC)	12.8 ± 3.4 (QC)
2.0×10^5	0.9 ± 0.1 (LC)	0.7 ± 0.3 (LC)	1.1 ± 0.6 (LC)
	36.2 ± 7.3 (DC)	26.6 ± 9.2 (DC)	13.1 ± 7.7 (DC)
	27.6 ± 8.2 (QC)	28.1 ± 8.5 (QC)	11.9 ± 5.5 (QC)

LC: Liquid culture; DC: Droplets of agarose; QC: Quarters of agarose

Table II. Comparison of yield, viability, plating efficiency and regeneration ability of cotyledon protoplasts derived from *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*, *P. amethystina* and *P. cincinnata* (mean $\pm$ SE)

	<i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i>	<i>P. amethystina</i>	<i>P. cincinnata</i>
Yield ^a	$6.9 \times 10^6 \pm 7.5 \times 10^5$	$5 \times 10^6 \pm 2.5 \times 10^5$	$3.5 \times 10^7 \pm 5.0 \times 10^6$
protoplast Viability (%)	83.4 ± 4.4	93.8 ± 0.9	94.8 ± 0.8
Plating Efficiency (%) ^b	2.7 ± 0.9 (LC) 25.5 ± 21.1 (DC) 24.1 ± 2.8 (DC)	0.9 ± 0.3 (LC) 16.3 ± 1.7 (DC) 19.1 ± 2.3 (DC)	0.6 ± 0.4 (LC) 18.2 ± 2.4 (DC) 17.6 ± 2.5 (DC)
Regeneration Frequency (%) ^c	48 ± 3	75 ± 6	93 ± 4

^a Number of protoplasts released per 500 mg of cotyledon tissue

^b Number of colonies obtained/total number of protoplasts plated $\times$ 100

^c Number of calli with shoot regeneration/total number of calli plated in MS medium with 2.0 mg/l BAP and 10% (v/v) coconut water

LC: Liquid culture; DC: Droplets of agarose; QC: Quarters of agarose

Materials and methods

Seed germination. Seeds of *P. edulis* var. *flavicarpa* and *P. cincinnata* were kindly provided by J C de Oliveira (FCAV/UNESP, Jaboticabal, Brazil). *P. amethystina* seeds were collected in Munhoz, Minas Gerais State, Brazil.

Seeds were surface sterilised by immersion for 40 sec in 70% (v/v) ethanol and for 20 min in 2% (v/v) NaOCl solution. The seeds were rinsed four times in sterile distilled water, and 5 seeds were placed in each 300 ml glass jars, containing 30 ml half-strength MS medium, 1.5% (w/v) sucrose and 0.8% agar (common purified agar, Sealgas, São Paulo, Brazil). The jars were sealed with parafilm (Rolopac, São Paulo, Brazil) and cultures were maintained at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ in the dark until seed germination. Seedlings were then exposed to $22 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ of light intensity, provided by cool white fluorescent tubes, under 16 h light regime.

Protoplast isolation. Fifteen to 20 d after seed sowing, approximately 500 mg (ca. 7 pairs) of seedling cotyledons were excised and cut transversely into 1 mm thick slices. The tissues were plasmolysed for 20 min in a CPW solution (Frearson *et al.* 1973) containing 5 mM MES and 9.0 or 13.0% (w/v) mannitol (CPW9M and CPW13M, respectively), at pH 5.8. CPW was then removed and the tissues incubated for 16 h in 5.0 ml of enzyme solution, in the dark. The enzyme mixture consisted of 2.0% (w/v) Cellulase R10, 0.2 or 0.4% (w/v) Macerozyme R10 (Kinki Yakult Manufacturing Co. Ltd., Nishinomiya, Japan) and 5.0 mM MES dissolved in CPW solution.

Protoplast size was determined by using a micrometric ocular under optical microscopy.

Protoplast culture. Protoplasts were cultured in 5.0 cm Petri dishes, at densities of 5.0×10^4 , 1.0×10^5 and 2.0×10^5 protoplasts/ml, in 4.0 ml of liquid KM8P medium (Kao 1977, modified by Gilmour *et al.* 1989), or were embedded in 0.6% (w/v) agarose (low gelling temperature, Sigma) as described by Power and Chapman (1985).

Agarose beds were produced by mixing equal volumes of agarose with liquid KM8P medium containing twice the final protoplast densities. Four ml of this mixture were poured into 5.0 cm Petri dishes. After setting, the agarose was cut into four pieces, two of those pieces were transferred to another Petri dish. Droplets of 100 μl of the protoplast-agarose mixture were also placed on Petri dishes. 3.0 ml of liquid KM8P was used to bathe the embedded protoplasts.

The osmoticum of the culture medium was progressively lowered, by replacing 1.0 ml of the medium (or bathing medium) with an equal volume of the KM8P:KM8 mixture every 7 d. The KM8 component was also modified according to Gilmour *et al.* (1989) from the formulation of Kao (1977). KM8P and KM8 media were mixed in the ratios 2:1, 1:1 and 1:2 (v/v), before use.

Protoplast viability was determined according to Power and Chapman (1985) after 24 h of culture. The frequency of division (number of dividing cells/living cells $\times 100$) and the plating efficiency (number of colonies obtained/protoplasts plated $\times 100$) were also evaluated after 7 and 14 d of culture, respectively.

All cultures were maintained at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ in the dark until microcalli were formed. Experiments were repeated at least four times.

Culture of protoplast-derived microcalli and plant regeneration. After 28 d of culture, yellowish colonies (ca. 2 mm diameter) were transferred to MS medium supplemented with 5.0 mg/l NAA, 0.25 mg/l BAP

(Manders *et al.* 1991), plus 3.0% (w/v) sucrose and solidified with 1.5% (w/v) Phytigel (Sigma). After 20 d, the microcalli were transferred to $22 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ of light intensity and placed on Phytigel-solidified MS basal medium, supplemented with 2.0 mg/l BAP, 10% (v/v) coconut water (prepared according to Dixon 1985) and 3.0% (w/v) sucrose to promote shoot regeneration.

Shoots 2-3 cm height were excised from the calli and transferred to half-strength MS medium (1.5% w/v of sucrose) to induce root formation.

Cytology. Regenerants of *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* chromosome counts were made in the Feulgen-stained metaphase plates prepared from root meristems pretreated for 2:45 h in a solution of 0.03% (w/v) 8-hydroxyquinoline at $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Results and Discussion

When CPW9 was used to prepare the enzymatic solutions, the protoplasts lysed and produced much debris. The enzymatic treatment containing macerozyme at 0.2% gave poor yield of protoplasts that still showed residual cell wall. Better results were obtained using cellulase at 2.0% plus macerozyme at 0.4% dissolved in CPW13 solution.

Protoplasts of *P. amethystina* (Figure 1.b.) ($54.9 \pm 9.4 \mu\text{m}$) and *P. cincinnata* ($53.9 \pm 10.0 \mu\text{m}$) were larger than *P. edulis* var. *flavicarpa* ($32.8 \pm 6.5 \mu\text{m}$) protoplasts.

After 24 h of culture, the chloroplasts migrated to one pole of the protoplast-derived cells. Divisions were first observed in protoplast-derived cells cultured in droplets or layers (Figure 1.c.) after 3 days of culture. Protoplasts, that were embedded in droplets or quarters of agarose showed high division frequencies (Table I.) and plating efficiencies (Table II). The positive effect of embedded cultures of protoplasts has also been reported by Lorz *et al.* (1983), Shillito *et al.* (1983), Colijn-Hooymans *et al.* (1988) and Vieira *et al.* (1990). Binding *et al.* (1988) have reported that the droplet system may allow better nutrient exchange between solid and liquid phases.

In liquid cultures the protoplasts aggregated and a brownish precipitate was observed. Under these conditions, the division frequency was very low. An effect of protoplast density on cell division has been reported for many plant species (Bhojwani *et al.* 1984, Pupilli *et al.* 1989, Vieira *et al.* 1990) and was also observed in the present study (Table I.). The density of 1×10^5 protoplasts/ml of medium was the most suitable for all the species studied.

Protoplast-derived colonies grew fast in embedded

cultures (Figure 1.d.) and could be transferred to solid medium after 28 d of culture. On that medium, they produced friable white-yellowish calli. These calli became green when transferred to the regeneration medium, under $22 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ of light intensity. Shoot regeneration occurred through organogenesis with the development of adventitious buds on the surface of the calli.

P. cincinnata showed the highest frequency of shoot regeneration (Table II., Figure 1.e.). Despite the use of coconut water, recommended to improve cell proliferation and shoot production from *Passiflora* cultured tissues (Mourad-Agha and Dexheimer 1979, Kantharajah and Dodd 1989), only 48% of the protoplast-derived calli of *P. edulis* var. *flavicarpa* regenerated shoots. However, callus of *P. edulis* var. *flavicarpa* (on average 12.5 ± 2.3 shoots/callus) produced a large number of regenerated plants.

Plants elongated and produced roots when transferred to hormone-free half-strength MS medium and could then be transferred to soil (Figure 1.f.).

We have examined 300 metaphases (30 plates per 10 rooted shoots) from which 40% showed polyploidy ($4n=36$). Although the reasons for these chromosome variations are still unknown, they might have originated due to the presence of a callus phase and media components (Bayliss 1980, Lee and Phillips 1988). Polyploidy is particularly prevalent in *in vitro* cultures (D'Amato 1985) and attempts must be made to obtain or select *Passiflora* adventitious shoots cytogenetically normal and stable.

Our results demonstrated that it is possible to regenerate plants from protoplast cultures of two wild and one cultivated species of *Passiflora*.

This protocol should be useful in future research for the application of somatic techniques to *Passiflora* species. Refinements are still required to reduce the callus phase, possibly lowering the level of regenerated polyploids. Somatic hybrids and genetically modified *Passiflora* plants could be valuable in yellow passionfruit breeding programmes.

Acknowledgements. The authors acknowledge the following Brazilian Institutions: FCAV/UNESP Jaboticabal, for providing the *Passiflora* seeds and FAPESP, for financial support. We also acknowledge Dr C.A. Labate for reading the manuscript and Mr C. A. de Oliveira for technical assistance.

References

- Bayliss MW (1980) International Review of Cytology Suppl. 11A:113-144
- Binding H, Bunning D, Gorschen E, Jorgensen J, Kollmann R, Krumbiegel-Schroeren G, Ling HQ, Monzer J, Mord-Horst G, Rudnick J, Sauer A, Witt D, Zuba M (1988) Plant Cell Tissue and Organ Culture 12: 133-137
- Bhojwani S, Mullins K, Cohen D (1984) Euphytica 33: 915-921
- Colijn-Hooymans CM, Bouwer R, Dons JJM (1988) Plant Cell Tissue and Organ Culture 12: 147-150
- Cronquist A (1981) An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, New York
- D'Amato F (1985) Critical Reviews in Plant Sciences, CRC, 3:73-112
- D'Ultra Vaz FB, dos Santos AVP, Manders G, Cocking EC, Davey, MD, Power JB (1993) Plant Cell Reports (in press)
- Dixon RA (1985) In: Dixon RA (ed) Plant cell culture: a practical approach, IRL Press, Washington, pp 1-20
- Fouqué A (1972) Fruits 27: 368-382
- Frearson EM, Power JB, Cocking EC (1973) Developmental Biology 33:130-137
- Gilmour DM, Davey MR, Cocking EC (1989) Plant Cell Reports 8:29-32
- Kantharajah AS, Dodd WA (1990) Annals of Botany 65:337-339
- Kao KN (1977) Molecular General Genetics 150:225-230
- Killip EP (1938) The American species of Passifloraceae. Field Museum of Natural History, Chicago
- Lee M and Phillips RL (1988) Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 39:413-437
- Lorz H, Larkin PJ, Thomson J, Scowcroft WR (1983) Plant Cell Tissue and Organ Culture 2: 217-226
- Manders G, d'Ultra Vaz FB, dos Santos AVP, Davey MR, Power JB (1991) Physiologia Plantarum 82: A16
- Martin WM, Nakasone HY (1970) Economic Botany 24: 333-343
- Mourad-Agha N, Dexheimer J (1979) Cytologia 44:615-631
- Murashige T, Skoog F (1962) Physiologia Plantarum 15: 473-497
- Oliveira JC, Ferreira FR (1991) In: São José AR, Ferreira FR, Vaz RL (eds) A cultura do maracujá no Brasil. Funep, Jaboticabal, pp 211-239
- Payan FR, Martin FW (1975) Euphytica 24: 706-716
- Power JB, Chapman JV (1985) In: Dixon RA (ed) Plant cell culture: a practical approach, IRL Press, Washington, pp37-66
- Pupilli F, Damiani F, Pezzotti M, Arcioni S (1989) Plant Science 63: 87-94
- Sacco JC (1980) Flora ilustrada catarinense, part 1, Herbário "Barbosa Rodrigues", Itajaí
- Shillito RD, Paszkowski J, Potrykus I (1983) Plant Cell Reports 2: 244-247
- Suzuki OY (1987) In: Ruggiero C (ed) Cultura do maracujazeiro, Legis Suma, Ribeirão Preto, pp 8-19
- Torres RR, Martin FW (1974) Euphytica 23: 61-70
- Vieira MLC, Jones B, Cocking EC, Davey MR (1990) Plant Cell Reports 9:289-292
- Yamashiro T (1991) In: São José AR, Ferreira FR, Vaz RL (eds) A cultura do maracujá no Brasil, Funep, Jaboticabal, pp169-174

Plant regeneration from protoplast fusion in *Passiflora* spp.

Marcelo Carnier Dornelas, Flávio César Almeida Tavares, João Carlos de Oliveira e Maria Lúcia Carneiro Vieira.

Summary. Protoplasts were isolated from leaf explants of *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* (the yellow passion fruit) and from cell suspensions of five *Passiflora* species. Chemical fusion was performed using polyethylene glycol and the microcolonies obtained were transferred to growth medium to produce calli. Electrophoresis of soluble proteins and analysis of isoenzymes from calli produced from the fusion experiments were performed to select somatic hybrids. Specific polypeptide bands allowed the identification of somatic hybrids between *P. edulis* var. *flavicarpa* (+) *P. alata*, *P. edulis* var. *flavicarpa* (+) *P. amethystina*, *P. edulis* var. *flavicarpa* (+) *P. cincinnata*, *P. edulis* var. *flavicarpa* (+) *P. giberti* and *P. edulis* var. *flavicarpa* (+) *P. coccinea*. An average of 3 to 5 % hybrid calli were obtained. With the exception of the *P. edulis* var. *flavicarpa* (+) *P. coccinea*, whole plants were recovered from all hybrids. These somatic hybrids showed $4n=36$ chromosomes, which represents a further evidence of their hybridity.

Key words: Passion fruit - *Passiflora* - Protoplast fusion - Somatic hybridization

Introduction

The genus *Passiflora* is essentially of American origin and comprises approximately 350 species (Fouqué 1972), among them *Passiflora alata* Ait. and *P. edulis* var. *flavicarpa* Deg, the passion fruit plant. Passion fruit is extensively cultivated in tropical regions for direct fruit consumption (Ruggiero 1987).

Despite the great importance of these species, most of the commercial passion fruit varieties are susceptible to a large number of pests and diseases (Oliveira 1987).

Yamashiro (1987) reported that *P. alata* Ait., *P. quadrangularis* L. and *P. macrocarpa* Mast. are resistant to fusariosis caused by *Fusarium oxysporum*

f. *passiflorae*. *P. giberti* N.E. Brown is resistant to both fusariosis and a disease of unknown etiology which causes sudden plant death. Oliveira and Ferreira (1991) reported that *P. mollissima* Bailey, *P. cincinnata* Mast., *P. foetida* L., *P. maliformis* L., *P. giberti* N.E. Brown, and *P. coccinea* Aubl. were resistant to bacteriosis caused by *Xanthomonas campestris* f. *passiflorae*.

Interspecific hybrids between wild species and the two commercial species of passion fruit (*P. edulis* var. *flavicarpa* Deg. and *P. alata* Ait.) have been obtained with the objective to produce disease-resistant plants (Oliveira and Ferreira 1991). However, these sexual hybrids were difficult to produce and showed varying degrees of fertility which limit their use in genetic breeding programs.

Protoplast fusion is a technique which bypasses the barriers of sexual reproduction and permits the transfer of a trait from a wild into a cultivated species. Somatic hybridization has been extensively used to obtain genotypes with agronomically desirable characteristics (Glimelius *et al.* 1991) in the genera *Citrus* (Grosser *et al.* 1989; Grosser and Gmitter 1990; Grosser *et al.* 1990; Ohgawara *et al.* 1989, 1991), *Brassica* (Yarrow *et al.* 1990; Kao *et al.* 1991; Kirti *et al.* 1991), *Solanum* (Chaput *et al.* 1990; Perl *et al.* 1990), and *Lycopersicon* (Guri *et al.* 1991; Sakamoto and Taguchi 1991).

Whole plant regeneration from protoplasts has been reported previously for several *Passiflora* species (Dornelas and Vieira 1993). The present paper describes for the first time the production of somatic hybrids between *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* and five other species of *Passiflora*. The wild species are not grown commercially but are potential sources of genes for the improvement of passion fruit in the tropics.

Material and methods

Plant material. All explants of *Passiflora* plants were obtained from an *in vitro* collection maintained at Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", in Piracicaba, Brazil.

Isolation of leaf tissue protoplasts. *In vitro* cultures of stem apex of *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg. plants were initiated and maintained as described previously (Dornelas and Vieira 1994). Protoplasts were isolated from leaf tissue of these plants using an enzyme mixture containing 2% cellulase R10 (w/v) and 0.4% macerozyme R10 (w/v) (Yakult Honsha Co., Tokyo, Japan) diluted in CPW 13 solution (Frearson *et al.* 1973), with 5 mM MES added, pH 5.8. The conditions for protoplast isolation have been described previously (Dornelas and Vieira 1993).

Protoplast isolation from cell suspension cultures. Calli of *P. alata* Ait., *P. amethystina* Mikan, *P. cincinnata* Mast., *P. coccinea* Aubl. and *P. giberti* N.E. Brown were obtained from leaf explants cultured for 28 days in MD medium (Mourad-Agha and Dexheimer 1979) in the dark. Approximately 1 g friable callus tissue was transferred to 25 ml of liquid MD medium in 125-ml Erlenmeyer flasks. The flasks were sealed with aluminum foil and maintained in the dark with shaking (130 rpm) at $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Subcultures were performed at 7-day intervals by transfer to fresh liquid MD medium. Protoplasts were isolated from cell suspensions 3 days after subculture using an enzyme mixture containing 2.0% (w/v) Pectolyase Y-23 (Seishin Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan) and 1.0% (w/v) Cellulysin (Calbiochem) diluted in CPW 13 solution.

Protoplast fusion, culture of the fusion products and plant regeneration. Protoplasts of *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* and of the other species were resuspended at a density of 2×10^6 protoplasts/ml CPW 13 at a 1:1 ratio. Chemical fusion using polyethylene glycol (PEG) was carried out according to Power and Chapman (1985). The number of green-white cells was determined to rapidly access the frequency of heterodimer formation. The percentage of heterodimers was calculated in relation to the number of protoplasts that underwent fusion. Three independent fusion experiments with at least 4 replicates each were performed for all the *P. edulis*-wild species combination. The products of the fusion experiments were cultured in agarose droplets in KM8P medium (Kao and Michayluk 1975, modified by Gilmour *et al.* 1989) without selection. The bathing liquid medium was replaced every 7 days with a mix (1:1) of KM8P and KM8 media (Gilmour *et al.* 1989). The colonies were transferred to solid MD medium (0.6% agarose, w/v, Sigma) and maintained in the dark for 56 days. Putative somatic hybrid calli were selected by their electrophoretic pattern of soluble proteins and isoenzymes before induction of plant regeneration. Calli of approximately 1 cm in diameter were transferred to solid (0.15% Phytigel, w/v, Sigma) MS basal medium (Murashige and Skoog 1962) supplemented with 3.0% (w/v) sucrose, 2.0 mg l⁻¹ BAP and 10% (v/v) coconut water, at $23 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ of light radiation, for shoot regeneration. Shoots of 1 to 2 cm long were excised and subcultured every 28 days on phytigel-solidified half-strength MS basal medium, free of hormones until roots developed. The plants were transferred to glasshouse conditions to be acclimated.

Soluble proteins and isoenzymes analysis. Samples of calli from putative hybrids were collected, frozen at -18°C and macerated in 0.1 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF). Protein extracts were separated by polyacrylamide gel electrophoresis (Laemmli 1970). Gels were stained with 0.05% (w/v) Coomassie blue R-250 in acetic acid:methanol:water (1:4:8, v:v). Protein samples were also submitted to PAGE under nondenaturing conditions and to specific staining for the isoenzymatic systems esterase (EST), malate dehydrogenase (MDH) and peroxidase (PO) according to the protocols of Wendel and Weeden (1991).

Cytology. After 24 h of culture, samples of the agarose droplets were aseptically removed from the Petri dishes, fixed in ethanol:acetic acid

(3:1, v:v), stained with acetic carmine (2%, w/v) and placed on slides for counts of number of nuclei per cell (Wang and Binding 1993). One hundred cells were scored per dish. To determine chromosome number of the somatic hybrids, root tips were collected, pretreated with 0.03% hydroxyquinoline (w/v) for 2:45 h, fixed in ethanol-acetic acid (3:1, v:v) for 24 h and preserved in 70% ethanol. Root tips were stained by using the Feulgen methodology and squashed in a drop of 2% (w/v) acetic carmine (Sharma and Sharma 1980). Slides were mounted in Canada balsam. At least 30 metaphases were analysed per plant.

Results and Discussion

Culture of fusion products and plant regeneration

Nine to thirteen percent of the protoplasts involved in fusions were heterodimers of *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* with the other species (Table 1., Figure 1.a.). Davey and Power (1988) observed optimum heterodimer formation in PEG-mediated fusions ranging from 8 to 11%. The fusion products regenerated a cell wall and the first division could be observed after 72 h. After 34 h in culture, 8.7 to 15.7 % of the cells were binucleated indicating the occurrence of cell fusion. From 0.6 to 1.6 % of the cells had more than two nuclei, which may have resulted from multiple fusions or the fusion of multinucleated protoplasts (Table 2.). After 14 days of culture, small colonies (8 to 16 cells, Figure 1.b.) were observed and the plating efficiencies (PE) could be determined (Table 1.).

Table 1. Heterodimer formation and plating efficiency (PE) in experiments involving *Passiflora* protoplast fusion (mean $\pm$ standard deviation).

	Heterodimer formation (%) ^a	PE (%) ^b
<i>P. edulis</i> (+)	9.7 $\pm$ 3.7	3.8 $\pm$ 1.3
<i>P. alata</i>		
<i>P. edulis</i> (+)	13.1 $\pm$ 3.8	1.3 $\pm$ 0.4
<i>P. amethystina</i>		
<i>P. edulis</i> (+)	10.5 $\pm$ 4.2	5.3 $\pm$ 0.7
<i>P. cincinnata</i>		
<i>P. edulis</i> (+)	10.3 $\pm$ 4.7	1.9 $\pm$ 0.4
<i>P. coccinea</i>		
<i>P. edulis</i> (+)	12.0 $\pm$ 6.1	1.2 $\pm$ 0.6
<i>P. giberti</i>		

^a Percentage calculated in relation to the number of protoplasts that underwent fusion.

^b Number of colonies formed in relation to total number of plated protoplasts.

After transfer to solid MD medium, the colonies obtained from the fusion experiments between *P. edulis* (+) *P. alata*, *P. edulis* (+) *P. amethystina*, *P. edulis* (+) *P. cincinnata*, *P. edulis* (+) *P. coccinea* and *P. edulis*

(+) *P. giberti* developed into white-yellowish calli (Figure 1.c.). These calli became green following transfer to the light.

Putative somatic hybrid calli were selected by their electrophoretic pattern of soluble proteins and isoenzymes, before transfer to shoot regeneration medium. After selection, the frequency of shoot formation was 96 ± 0.8 , 63 ± 6.6 , 98 ± 0.8 and $83 \pm 4.5\%$ for *P. edulis* (+) *P. alata*, *P. edulis* (+) *P. amethystina*, *P. edulis* (+) *P. cincinnata* and *P. edulis* (+) *P. giberti*, respectively (Figure 1.d.). These shoots gave origin to whole plants when transferred to half-strength MS medium free of hormones. The *P. edulis* (+) *P. coccinea* hybrid calli failed to regenerate plants.

Analysis of the electrophoretic pattern of soluble proteins and isoenzymes, and chromosome counts

Several studies have been reported in the literature about the identification of somatic hybridization products by analysis of the electrophoretic pattern of proteins and isoenzymes (Power *et al.* 1988).

Electrophoretic patterns of soluble proteins extracted from calli of *Passiflora* species allowed the identification of bands corresponding to specific polypeptides for each species analysed (data not shown). Calli of *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* showed a specific polypeptide band of 27 kDa, *P. alata* a band of 42 kDa, *P. amethystina*, *P. cincinnata* and *P. giberti* a band of 41 kDa.

Table 2. Frequency of binucleated and multinucleated cells in experiments involving *Passiflora* protoplast fusion after 36 h of culture (mean $\pm$ standard deviation).

	Binucleated cells (%) ^a	Multinucleated cells (%) ^a
<i>P. edulis</i> (+) <i>P. alata</i>	8.7 ± 3.4	0.6 ± 0.2
<i>P. edulis</i> (+) <i>P. amethystina</i>	15.7 ± 3.8	1.4 ± 0.7
<i>P. edulis</i> (+) <i>P. cincinnata</i>	12.2 ± 2.6	1.2 ± 0.5
<i>P. edulis</i> (+) <i>P. coccinea</i>	12.1 ± 2.3	1.6 ± 0.4
<i>P. edulis</i> (+) <i>P. giberti</i>	12.3 ± 3.5	1.2 ± 0.7

^a Percentage calculated in relation to total number of cells.

The physical mixture of the protein samples of the two parental species showed an intermediate pattern which is expected to be closer to the tetraploid somatic hybrid (Grosser and Gmitter 1990; Grosser *et al.* 1990; Kirti *et al.* 1991).

By determining the presence of specific bands of the parental species and comparing them with the band pattern of the physical mixture, we identified $4.5 \pm 1.1\%$ hybrid calli for *P. edulis* (+) *P. alata* (5 hybrid calli from a total of 110), $3.4 \pm 0.8\%$ hybrid calli for *P. edulis* (+) *P. amethystina* (5 out of 146), $3.6 \pm 0.4\%$ for *P. edulis* (+) *P. cincinnata* (7 out of 191), $4.6 \pm 0.6\%$ for *P. edulis* (+) *P. coccinea* (8 out of 168) and $5.3 \pm 0.4\%$ for *P. edulis* (+) *P. giberti*. (7 out of 131) This percentage of hybridity agrees with those observed for other plants such as *Citrus* (1 to 10%, Grosser and Gmitter 1990; Grosser *et al.* 1990), *Rudbeckia* (3%, Al-Atabee *et al.* 1990), *Brassica* (3%, Kirti *et al.* 1991), and *Solanum* (6%, Puite *et al.* 1986). There are many reports describing the electrophoretic pattern of soluble proteins from Fraction I as a marker for the selection of putative somatic hybrids. Barsby *et al.* (1984) used this marker to select somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *S. brevidens*.

Isoenzyme band patterns for the EST, MDH and PO systems confirmed the results obtained by analysis of the electrophoretic pattern of soluble proteins, providing evidence of hybridity (Figures 1.e.-g. and Figures 2.a.-c.). Esterases are commonly utilized to confirm somatic hybridization between plant species, and have been used in *Brassica* (Kirti *et al.* 1991), *Rudbeckia* (Al-Atabee *et al.* 1990), potatoes and other *Solanum* species (Sihachakr *et al.* 1989; Aziz *et al.* 1990; Serraf *et al.* 1991; Waara *et al.* 1991), lettuce (Matsumoto 1991), and tomato (Ratushnyak *et al.* 1991).

Fig. 2.a. - c. Electrophoretic pattern of PO isoenzymes from *P. edulis* var. *flavicarpa* (E), *P. giberti* (G), *P. amethystina* (M), and *P. alata* (A) calli and their somatic hybrids (EG, EM and EA). d. - f. Phenotypes of *P. edulis* var. *flavicarpa* (E), *P. giberti* (G), *P. amethystina* (M), and *P. alata* (A) leaves and of their somatic hybrids (EG, EM and EA) (Bar = 1cm).

Fig. 1. *P. edulis* var. *flavicarpa* (+) *P. cinnamomum* somatic hybrid production. a. Fusion of *P. edulis* var. *flavicarpa* (with chloroplasts) and *P. cinnamomum* (white) protoplasts (Bar = 15 μ m). b. Colony after 14 days of culture on KM8P medium (Bar = 15 μ m). c. Friable callus after 28 days of culture on MD medium, in the dark (Bar = 15 mm). d. Regeneration of buds after 56 days on regeneration medium under light (Bar = 1.5 mm). e.-g. Electrophoretic pattern of *P. edulis* var. *flavicarpa* (E) and *P. cinnamomum* (C) calli and their somatic hybrid (EC), due to MDH (e.), EST (f.) and PO (g.) specific staining. h. Acclimated somatic hybrid plant (Bar = 5 mm). i. Phenotype of leaves of *P. edulis* var. *flavicarpa* (E), *P. cinnamomum* (C) and their somatic hybrid (EC) (Bar = 1 cm). j. Mitotic metaphase of a somatic hybrid plant showing $4n=36$ chromosomes (Bar = 5 μ m).

In the esterase system, the band pattern detected represents the sum of parental bands (Sihachakr *et al.* 1989; Matsumoto 1991). The same was observed for the MDH system which has been used to determine the hybrid nature of *Citrus* (Grosser *et al.* 1989; Grosser and Gmitter 1990), *Solanum* (Chaput *et al.* 1990; Guri *et al.* 1991), and *Lycopersicon* (Shoenmakers *et al.* 1994) somatic hybrids. The PO system, in turn, has been described as a marker for the selection of somatic hybrids of *Rudbeckia* (Al-Atabee *et al.* 1990), *Nicotiana* (Sproule *et al.* 1991), and potatoes (Serraf *et al.* 1991). In view of the results obtained, the techniques of soluble protein electrophoresis combined with techniques of isoenzyme analysis proved to be appropriate for the identification of *Passiflora* somatic hybrids.

The somatic hybrid plants were successfully acclimated to greenhouse conditions (Figure 1.h.) and their phenotypes were intermediate to parentals (Figure 1.i. and Figures 2.d.-f.). As expected, chromosome analysis of the somatic hybrids showed $4n=36$ chromosomes (Figure 2.j.) since all the species involved in the fusion process presented $2n=18$ chromosomes (Snow and MacDougal 1993).

Thus, the present study showed that it is possible to regenerate whole plants derived from fusion experiments involving *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* and other species carrying genes of interest. The fertility and the agronomic potential of these materials are currently being evaluated in our laboratory for their use in passion fruit genetic breeding programmes.

Acknowledgments. We are grateful to Carlos Alberto de Oliveira for technical assistance and to Luiz Humberto Gomes and Keila Maria Roncato Duarte for help with the PAGE analyses. This research was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, grant 92/3636-5) and by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, grant 301466-91-2).

References

- Al-Atabee JS, Mulligan BJ, Power JB (1990) Plant Cell Rep 8:517-520
- Aziz MA, Chand PK, Power JB, Davey MR (1990) J Exp Bot 41:471-479
- Barsby TL, Shepard JF, Kemble RJ, Wong R (1984) Plant Cell Rep 3:165-167
- Chaput MH, Sihachakr D, Ducreux G, Marie D, Barghi N (1990) Plant Cell Rep 9:411-414
- Davey MR, Power JB (1988) Plant Cell Tiss Org Cult 12:115-125
- Dornelas MC, Vieira MLC (1993) Plant Cell Rep 13:103-106
- Dornelas MC, Vieira MLC (1994) Plant Cell Tiss Org Cult 36: 211-217
- Fouqué A (1972) Fruits 27: 368-382
- Frearson EM, Power JB, Cocking EC (1973) Dev Biol 33:130-137
- Gilmour DM, Davey MR, Cocking EC (1989) Plant Cell Rep 8:29-32
- Glimelius K, Fahleson J, Landgren M, Sjödin C, Sundberg E (1991) Trends Biotech 9:24-30
- Grosser JW, Gmitter FR (1990) HortSci 25:147-151
- Grosser JM, Gmitter FG, Tusa N, Chandler JL (1990) Plant Cell Rep 8:656-659
- Grosser JW, Moore GA, Gmitter FG (1989) Scientia Hort 39:23-29
- Guri A, Dunbar LJ, Sink KC (1991) Plant Cell Rep 10:76-80
- Kao HM, Brown GG, Scholes G, Seguin-Swartz G (1991) Plant Sci 75:63-72
- Kao, KN, Michayluk, MR (1975) Planta 126:105-110
- Kirti PB, Prakash S, Chopra VL (1991) Plant Cell Rep 9:639-642
- Laemmli UK (1970) Nature 227:680-685
- Matsumoto E (1991) Plant Cell Rep 9:531-534
- Mourad-Agha N, Dexheimer J (1979) Cytologia 44: 615-631
- Murashige T, Skoog F (1992) Physiol Plant 15:473-497
- Ohgawara T, Kobayashi S, Ishii S, Yoshinaga K, Oiyama I (1991) Theor Appl Genet 81:141-143
- Ohgawara T, Kobayashi S, Ishii S, Yoshinaga K, Oiyama I (1989) Theor Appl Genet 78:609-612
- Oliveira JC (1987) In: Ruggiero C (ed) Cultura do Maracujazeiro. Legis Summa, Ribeirão Preto, pp 218-246
- Oliveira JC, Ferreira FR (1991) In: São José AR, Ferreira FR, Vaz RL (eds) A Cultura do maracujá no Brasil. FUNEP, Jaboticabal, pp 211-239
- Perl A, Aviv D, Galun E (1990) J Heredity 6:438-442
- Power JB, Chapman JV (1985) In: Dixon RA (ed) Plant Cell Culture: a practical approach. IRL Press, Washington, pp 37-66
- Power JB, Davey MR, Freeman JP, Mulligan BJ, Cocking EC (1988) In: Weissbach A, Weissbach H (eds) Methods for plant molecular biology. Academic Press, New York, pp 385-401
- Puite KJ, Roest S, Pijnacker LP (1986) Plant Cell Rep 5:262-265
- Ratushnyak YI, Latypov SA, Samoylov AM, Piven NM, Gleba YY (1991) Plant Sci 73:65-78
- Ruggiero C (1987) Cultura do Maracujazeiro. Legis Summa, Ribeirão Preto
- Sakamoto K, Taguchi T (1991) Theor Appl Genet 81:509-513
- Serraf I, Sihachakr D, Ducreux G, Brown SC, Allot M, Bargui N, Rossignol L (1991) Plant Sci 76:115-126
- Schoenmakers HCH, Wolters AMA, Haan A de, Saiedi AK, Koornneef, M (1994) Theor Appl Genet 87:713-720
- Sharma AK, Sharma A (1980) Chromosome techniques: theory and practice. Butterworths, London
- Sihachakr D, Haicour R, Chaput MH, Barrientos E, Ducreux G, Rossignol L (1989) Theor Appl Genet 77:1-6
- Snow N, MacDougal, JM (1993) Systematic Botany 18:261-273
- Sproule A, Donaldson P, Dijak M, Bevis E, Pandeya R, Keller WA, Gleddie S (1991) Theor Appl Genet 82:450-456
- Yamashiro T (1987) In: Ruggiero C (ed) Cultura do Maracujazeiro. Legis Summa, Ribeirão Preto, pp 146-159
- Yarrow SA, Burnett LA, Wildeman RP, Kemble RJ (1990) Plant Cell Rep 9:185-188
- Wara S, Wallin A, Eriksson T (1991) Plant Sci 75:107-115
- Wang GR, Binding H (1993) Theor Appl Genet 87: 561-567
- Wendel JF, Weeden NF (1989) In: Soltis DE, Soltis PS (eds) Isozymes in plant biology. Chapman and Hall, London, pp 5-45

Apêndice 2. Fórmula da solução salina de lavagem CPW 13 (FREARSON et al., 1973)

Solução estoque A:

CaCl ₂ .2H ₂ O	7,4 g
Água destilada e deionizada	q.s.p 500,0 ml

Solução estoque B:

KH ₂ PO ₄	136,0 mg
KNO ₃	505,0 mg
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,23 mg
KI	8,0 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,125 mg
Água destilada deionizada	q.s.p. 500,0 ml

Juntar 50 ml dos estoques A e B, 110 mg de MES, 65g de manitol e completar o volume para 500 ml com água destilada e deionizada. Acertar o pH para 5,7 com NaOH e HCl 0,1N. Distribuir 50 ml de CPW em frascos com 300 ml de capacidade. Autoclavar a 120°C, 1 atm, 20 min.

Apêndice 3. Fórmula da mistura enzimática para isolamento de protoplastos a partir de tecido foliar e de pétalas de *Passiflora*.

2,0% (p/v) de Cellulase R10

0,4% (p/v) de Macerozyme R10

Dissolver as enzimas em CPW13. Acertar o pH para 5,8 com NaOH e HCl 0,1N. Filtro-esterilizar à vácuo, utilizando membrana com poros de 20µm de diâmetro.

Apêndice 4. Fórmulas dos meios KM8P e KM8 (KAO & MICHAYLUK, 1975, modificado por GILMOUR et al., 1989).

Meio KM8P (Fórmula para 500ml de meio 2x concentrado)

a. Sais Minerais (mg)

NH ₄ NO ₃	600	KI	0,75
KNO ₃	1900	H ₃ BO ₃	3,00
CaCl ₂ .2H ₂ O	600	MnSO ₄ .H ₂ O	10,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	300	ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,00
KH ₂ PO ₄	170	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
KCl	300	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
NaFeEDTA	28	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025

b. Açúcares (mg)

Glucose	100.000	Manose	125
Sacarose	250	Rhamnose	125
Frutose	125	Cellobiose	125
Ribose	125	Sorbitol	125
Xylose	125	Manitol	125

c. Vitaminas (mg)

Inositol	100	Biotina	0,005
Nicotinamida	1	Riboflavina	0,1
Piridoxina	1	Ácido ascórbico	1,0
Tiamina	1	Vit. A	0,005
Ca-Pantotenato	0,5	Vit. D3	0,005
Ácido p-aminobenzóico	0,01	Vit. B12	0,01

d. Ácidos orgânicos (mg)

Na-Piruvato	5	Ácido málico	10
Ácido cítrico	10	Ácido fumárico	10

e. Fitorreguladores (mg)

2,4-D	0,2
Zeatina	0,5
NAA	1,0

f. Caseína hidrolisada 125 mg

g. Água de coco 10 ml

Acertar o pH para 5,7 com NaOH e HCl 0,1N. Filtro-esterilizar à vácuo, utilizando membrana com poros de 0,2 μ m de diâmetro. Armazenar em frascos escuros, em alíquotas de 20 ml, à -20°C.

Meio KM8

Idem ao descrito para o meio KM8P exceto:

Glucose	10.000 mg
Sacarose	20.000 mg
2,4-D	0,1 mg
Zeatina	0,2 mg

Apêndice 5. Protocolo para a determinação da viabilidade dos protoplastos, utilizando a técnica de coloração com FDA (POWER & CHAPMAN, 1985).

- a. Preparar uma solução estoque de FDA (1 a 5 mg de FDA/ml de acetona) e armazenar a 0°C, no escuro.
- b. Adicionar 1 gota da solução-estoque a 10ml de CPW13.
- c. Mesclar volumes iguais da solução de CPW/FDA com a suspensão de protoplastos.
- d. Aguardar 5 min. e examinar sob microscopia de fluorescência.
- e. A porcentagem de protoplastos viáveis é calculada em função do número de protoplastos que apresentam fluorescência verde-amarelada, pelo número total de protoplastos num determinado campo visual.

Apêndice 6. Protocolos para a cultura de protoplastos de *Passiflora* em meio líquido ou sólido.

6.1. Cultura em meio líquido:

- a. Ressuspender os protoplastos na densidade adequada, em meio KM8P.
- b. Colocar 3ml da suspensão por placa de Petri de 5,0 cm de diâmetro.
- c. Selar a placa com parafilme.
- d. Cultivar no escuro, sem agitação, à 25±2°C.
- e. Realizar trocas semanais do meio KM8P por meio KM8, na seguinte proporção:

semana 1: apenas acrescentar 0,5 ml de meio KM8

semana 2: substituir 1ml por meio KM8

semana 3 em diante: substituir 2ml por meio KM8

6.2. Cultura em *droplets* de agarose:

- a. Ressuspender os protoplastos no dobro da densidade adequada.
- b. Aquecer uma solução de 2.4% (p/v) de agarose e mantê-la a 40°C.
- c. Misturar, na proporção 1:1, a solução de agarose e meio KM8P 2x concentrado.
- d. Misturar, na proporção 1:1, a solução de agarose+meio e os protoplastos.
- e. Fazer os *droplets* (gotas de aprox. 0,01 ml) com a mistura de agarose, meio de cultura e protoplastos em placas de Petri de 5,0 cm de diâmetro (cerca de 14 *droplets*/placa).
- f. Banhar os *droplets* com 3ml de meio KM8P por placa, assim que os mesmos se solidificarem.
- g. Selar as placas de Petri com parafilme e cultivar sob as mesmas condições descritas nos subitens d. e e. do item 6.1.

6.3. Cultura em fatias de agarose

- a. Realizar os passos a. a d. do item 6.2.
- b. Distribuir 3ml da mistura de agarose, meio de cultura e protoplastos, em placas de Petri de 5,0 cm de diâmetro.
- c. Cortar o meio em 4 fatias e transferir 2 delas para outra placa de Petri.
- d. Banhar cada par de fatias com 3ml de meio KM8P.
- e. Selar as placas de Petri com parafilme e cultivar sob as mesmas condições descritas nos subítens d. e e. do item 6.1.

Apêndice 7. Fórmula e preparo do meio MD (MOURAD-AGHA & DEXHEIMER, 1979)

Componente	Quantidade (mg.l ⁻¹)	Componente	Quantidade (mg.l ⁻¹)
NH ₄ NO ₃	720,0	mio-Inositol	100,0
KNO ₃	950,0	Ac. nicotínico	5,0
CaCl ₂ .2H ₂ O	166,0	Piridoxina	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	185,0	Tiamina	0,5
KH ₂ PO ₄	68,0	Glicina	2,0
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	Adenina	40,0
Na ₂ EDTA	37,3	Ác. fólico	0,5
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	Biotina	0,05
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	Sacarose	5.000,0
H ₃ BO ₃	6,2	Glucose	5.000,0
KI	0,83	Extrato de Levedo	5.000,0
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	AIA	2,5
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	NAA	2,5
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	Cinetina	1,0
Água de coco	170,0 ml		

Acertar o pH para 5,8 com NaOH e HCl 0,1N. Solidificar com 1,5g.l⁻¹ de Phytigel (Sigma). Distribuir 10 ml em tubos de cultura de 2,5 x 8,5 cm (30 ml de capacidade). Autoclavar a 120°C, 1 atm, por 15 min.

Apêndice 8. Fórmula e preparo do meio MS basal (MURASHIGE & SKOOG, 1962)

Componente	Quantidade (mg.l ⁻¹)	Componente	Quantidade (mg.l ⁻¹)
NH ₄ NO ₃	1.650,0	KI	0,83
KNO ₃	1.900,0	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CaCl ₂ .2H ₂ O	440,0	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
MgSO ₄ .7H ₂ O	370,0	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
KH ₂ PO ₄	170,0	mio-Inositol	100,0
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	Ac. nicotínico	0,5
Na ₂ EDTA	37,3	Piridoxina	0,5
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	Tiamina	0,1
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	Glicina	2,0
H ₃ BO ₃	6,2	Sacarose	30.000,0

Acertar o pH para 5,8 com NaOH e HCl 0,1N. Solidificar com 1,5g.l⁻¹ de Phytigel (Sigma). Distribuir 10 ml em tubos de cultura de 2,5 x 8,5 cm (30 ml de capacidade). Autoclavar a 120°C, 1 atm, por 15 min.

Apêndice 9. Protocolo de fusão de protoplastos de *Passiflora* spp. Adaptado de POWER & CHAPMAN (1985)

- a. Ressuspender os protoplastos à uma população de 2×10^5 por ml de CPW13.
- b. Misturar gentilmente 2ml da suspensão de protoplastos de ambas as espécies em tubos de centrífuga de vidro, com capacidade para 8ml.
- c. Centrifugar a 1500 rpm, por 7 min.
- d. Retirar o sobrenadante e adicionar 1ml da solução de PEG em cada tubo.
- e. Deixar em repouso por 10 minutos.
- f. Adicionar, a cada 5 min. os seguintes volumes de CPW13 (em ml): 0,25; 0,5; 1,0; 1,0; 1,5.
- g. Completar o volume com CPW13.
- h. Repetir o passo c.
- i. Ressuspender em CPW13 e repetir o passo c.
- j. Substituir o sobrenadante por 4ml de meio KM8P.
- k. Acrescentar 4 ml de uma mistura 1:1 de agarose tipo VII (Sigma) 2,4% (p/v), a 40°C e meio KM8P 2x concentrado, à temperatura ambiente.
- l. Fazer os "droplets" e cultivar como descrito no Apêndice 6.

Apêndice 10. Fórmula e preparo da solução de PEG (POWER & CHAPMAN, 1985)

30% (p/v) de polietileno glicol, pm 6000

4% (p/v) de sacarose

0,01M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Acertar o pH para 5,7 com NaOH e HCl 0,1N. Autoclavar (120°C, 1 atm, 20 min) e armazenar a 4°C, no escuro.

Apêndice 11. Fórmulas das soluções estoque e preparo dos géis desnaturantes de poli(acrilamida) para a eletroforese de proteínas (SDS-PAGE). Adaptado de LAEMMLI (1970)

11.1. Soluções estoque

A. Solução de acrilamida

Acrilamida	30,0 g
Bis	0,8 g
Água destilada deionizada	q.s.p. 100 ml

Armazenar em frasco escuro, a 4°C, por no máximo duas semanas.

B. Solução de Persulfato

Persulfato de amônio	0,3g
Água destilada deionizada	3,0 ml

Esta solução deve ser preparada apenas no momento de usar.

C. Tampão do gel acumulador (UPPER; TRIS-HCl 0,25M)

TRIS	3 g
SDS	0,2 g
Água destilada deionizada	q.s.p. 100 ml

Acertar o pH para 6,8 com HCl concentrado.

D. Tampão do gel separador (LOWER; TRIS-HCl 0,75M)

TRIS	9 g
SDS	0,2 g
Água destilada deionizada	q.s.p. 100 ml

Acertar o pH para 8,8 com HCl concentrado.

E. Tampão da amostra:

Glicerol	1 ml
TRIS-HCl 0,25M	10 ml
SDS 10%	10 ml
2-mercaptoetanol	3ml
Azul de bromofenol 0,1%	10ml

Armazenar a 4°C, em frasco escuro.

F. Tampão de corrida 4x concentrado

TRIS	12,0 g
Glicina	57,6 g
Água destilada deionizada	q.s.p. 1 l

Acertar o pH para 8,3 com HCl ou NaOH 0,1N. No momento do uso, preparar o tampão 1x, diluindo 6ml de uma solução de SDS 10% (p/v) em 150 ml do tampão 4x e completando o volume para 600 ml.

G. Solução descorante

Metanol	300 ml
Acido acético glacial	70 ml
Água destilada deionizada	q.s.p. 600 ml

11.2. Preparo dos géis e condições de eletroforese

Composição do gel separador (12% de acrilamida):

Solução de acrilamida	15,0 ml
Tampão LOWER	12,0 ml
Água destilada deionizada	2,5 ml
TEMED	20,0 μ l
Solução de perssulfato	350,0 μ l

a. Misturar os ingredientes acima, na ordem apresentada. Colocar a mistura imediatamente entre os moldes de vidro, separado pelos espaçadores apropriados (1 mm de espessura) devidamente vedados com ágar 1% fundente.

b. Isolar a superfície do gel do contato com o ar com uma camada de água destilada deionizada, adicionada cuidadosamente entre os moldes com o auxílio de uma seringa sem êmbolo.

c. Descartar a água logo após a polimerização do gel (10-15 min.).

Composição do gel acumulador (4% de acrilamida):

Solução de acrilamida	1,0 ml
Tampão UPPER	5,0 ml
Água destilada deionizada	3,5 ml
TEMED	15,0 μ l
Solução de perssulfato	300,0 μ l

- a. Misturar os ingredientes na ordem apresentada. Colocar a mistura imediatamente entre os moldes de vidro, sobre o gel separador já polimerizado.
- b. Encaixar o pente apropriado e aguardar a polimerização (10-15 min.)
- c. Retirar cuidadosamente o pente.
- d. Remover o espaçador inferior.
- e. Conectar os moldes contendo os géis no aparato de eletroforese vertical.
- f. Vedar as conexões com ágar 1% fundente.
- g. Preencher o reservatório inferior com 300 ml de tampão de corrida. Retirar as bolhas de ar formadas abaixo do gel, com o auxílio de uma seringa.
- h. Preencher as canaletas com as amostras.
- i. Preencher o reservatório superior com 300 ml de tampão de corrida.
- j. Conectar os cabos à fonte de alta voltagem.
- k. Proceder a corrida de eletroforese, mantendo a amperagem constante em 60 mA, desde que a voltagem não ultrapasse os 250 V. Manter a temperatura de corrida a aproximadamente 4°C.
- l. A eletroforese estará completa quando a banda de bromofenol começar a "cair" no tampão do reservatório inferior.

11.3. Coloração e fixação dos géis

Corar o gel com Coomassie Brilliant-blue 0,05% (p/v) em solução descorante. Retirar o excesso de corante e fixar o gel em uma cuba contendo solução descorante, que deve ser renovada quando quando a mesma ficar azulada.

Apêndice 12. Fórmulas das soluções estoque e preparo dos géis não desnaturantes de poliacrilamida para a eletroforese de isoenzimas (PAGE). Adaptado de ALFENAS et al. (1991)

12.1. Preparo dos géis e condições de eletroforese

As soluções de acrilamida, perssulfato e os tampões UPPER e LOWER utilizadas nos géis não-desnaturantes são as mesmas utilizadas para géis desnaturantes, mas não contêm SDS.

Composição do gel separador (8% de acrilamida):

Solução de acrilamida	8,8 ml
Tampão LOWER	8,3 ml
Água destilada deionizada	15,0 ml
TEMED	20,0 µl
Solução de perssulfato	350,0 µl

Preparar o gel separador como descrito no Apêndice 11., item 11.2. A composição do gel acumulador, o seu preparo e as condições de corrida também são semelhantes às descritas anteriormente para o gel desnaturante, com a ressalva de que para o gel não-desnaturante, nenhuma solução deve conter SDS.

12.2. Coloração dos géis

A. Coloração para o sistema de α -esterase (α -EST)

Tampão TRIS-HCl 0,05M

TRIS	0,6 g
Água destilada deionizada	q.s.p. 100 ml

Acertar o pH para 7,1 com HCl concentrado.

Solução corante

α -naftil acetato	30,0 mg
Acetona 50% (v/v)	3,0 ml
Fast Blue RR	100,0 mg
TRIS-HCl 0,05M	q.s.p. 100 ml

Revelar o gel no escuro, a 37°C. Descartar a solução corante quando as bandas aparecerem e lavar o gel em água corrente. O gel corado pode ser armazenado por alguns meses em solução de glicerol 10% (v/v).

B. Coloração para o sistema de peroxidase (PO)

Solução 1.

Benzidina	0,1g
Ácido acético glacial	0,9 ml
Água destilada dedionizada	3,6 ml

Solução 2.

Água oxigenada 30 volumes	5,0 ml
Água destilada dedionizada	5,0 ml

Misturar as soluções 1. e 2. na proporção de 1:1 no momento de usar. Espalhar a mistura sobre o gel. Após o aparecimento das bandas, lavar em água corrente. O gel corado pode ser armazenado em solução de glicerol 10% (v/v) por alguns meses.

C. Coloração para o sistema de malato-desidrogenase (MDH)

Tampão TRIS-HCl 0,1M

TRIS	1,2 g
Água destilada deionizada	q.s.p. 100 ml

Acertar o pH para 8,5 com HCl concentrado.

Solução corante

Ácido málico 0,5M	5,0 ml
NAD	20,0 mg
MTT	20,0 mg
PMS	2,0 mg
TRIS-HCl 0,1M	q.s.p. 100 ml

Revelar o gel no escuro, a 37°C. Descartar a solução corante quando as bandas aparecerem e lavar o gel em água corrente. O gel corado pode ser armazenado por alguns meses em solução de glicerol 10% (v/v).