



Filomena Maria Alexandre Morgado

## Melhoramento em *Actinidia chinensis* Planch. e *Actinidia deliciosa* A. Chev: Clonagem, Indução de poliploides e Avaliação da germinação de pólen

Dissertação de Mestrado em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal,  
orientada pela Doutora Sílvia Castro e pelo Professor Doutor Jorge Manuel Pataca Leal Canhoto  
e apresentada ao Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



# DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Melhoramento em *Actinidia chinensis*  
Planch. e *Actinidia deliciosa* A.Chev:  
Clonagem, Indução de poliplóides e  
Avaliação da germinação de pólen

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal, realizada sob a orientação científica da Doutora Sílvia Castro (Universidade de Coimbra) e do Professor Doutor Jorge Manuel Pataca Leal Canhoto (Universidade de Coimbra).

Filomena Maria Alexandre Morgado

---

2016

Ilustrações de capa, da esquerda para a direita: *Actinidia deliciosa in vitro*, rebento sem raízes (imagem de cima) e plantas enraizadas (imagem de baixo); *Actinidia chinensis* em processo de aclimação; “Flores de *Actinidea deliciosa*, machos (imagem de cima) e fêmeas (imagem de baixo)”; *A. deliciosa* com frutos maduros; Kiwis prontos a consumir de *A.deliciosa* (imagem de cima) e *A.chinensis* (imagem de baixo). Fotografias da autoria de Filomena Morgado.

## Agradecimentos

Agradeço a Deus pela força que me tem dado na realização deste trabalho.

Agradeço ao Doutor Jorge Canhoto e à Doutora Sílvia Castro pela simpatia, dedicação, paciência e orientação.

Agradeço ao João Martins pelos conselhos, esclarecimento de dúvidas e ajuda prestada no laboratório para a execução de várias técnicas necessárias neste trabalho, no citómetro de fluxo e na estatística.

Agradeço ao André Caeiro por me ter iniciado no funcionamento do laboratório e na prática da micropropagação.

Agradeço à Doutora Sandra pela simpatia e esclarecimento de algumas dúvidas.

Agradeço à Daniela Tavares pela ajuda a tornar-me autónoma no Citómetro de Fluxo.

Agradeço à Tatiana Gaspar e à Vera Costa pela ajuda na preparação de amostras para análise em citometria de fluxo, na execução da germinação e contagem do pólen, e na polinização *in vitro*.

Agradeço a todos os meus colegas de mestrado e de laboratório pela ajuda laboratorial, pela amizade, companheirismo e momentos bons.

Agradeço à minha família, a todos os meus amigos e ao Piruças pela amizade e apoio incondicional.

Muito obrigada por me tornarem possível a  
realização deste trabalho!



## Lista de Abreviaturas

APK – Associação Portuguesa de Kiwicultores

BAP – N<sup>6</sup>-benziladenina

DMSO - Dimetilsulfóxido

GA<sub>3</sub> – Ácido giberélico

IBA – ácido indol-3-butirico

NAA – ácido 1-nafilacético

PCA – *Pseudomonas syringae* pv. *actinidae*



## Resumo

*Actinidia chinensis* e *A. deliciosa* são espécies fruteiras de elevada importância económica. Nativas da China e regiões limítrofes, são actualmente cultivadas em muitas zonas do globo devido à qualidade dos seus frutos. Em Portugal, a cultura do kiwi, tornou-se um caso de sucesso sendo actualmente uma das fruteiras mais cultivadas. No entanto, os genótipos utilizados são importados, não tendo sido especialmente desenvolvidos para as nossas condições edafo-climáticas. Torna-se assim imperioso desenvolver estratégias que permitam o melhoramento desta fruteira. Neste trabalho, procedeu-se à indução de octoplóides e dodecaplóides, e à avaliação da germinação de pólen da *A. deliciosa* para posterior cruzamento com *A. chinensis* e formação de híbridos.

Os ensaios de germinação do pólen ‘Hayward’ mostraram-se eficazes tendo-se atingido taxas de germinação da ordem dos 80% em meios com 6% de sacarose com ou sem GA<sub>3</sub>. O pólen germina igualmente de forma eficaz em ensaios de polinização cruzada em que se utilizou como progenitor feminino *A. deliciosa*.

De forma a rentabilizar a indução dos poliplóides, realizou-se antecipadamente o estabelecimento de linhas *in vitro*, e ensaios de micropropagação por meristemas, organogénese e enraizamento para escolher os melhores tratamentos a aplicar aos poliplóides induzidos. Os melhores resultados foram obtidos em meios com 1 mg/l de BAP e 10 mg/l de GA<sub>3</sub> nos ensaios de proliferação dos meristemas axilares e com 1mg/l de BAP combinado com 0,1 mg/l de NAA na indução de organogénese. Taxas consideráveis de enraizamento (100% em K3 e 93% em K2) foram conseguidas após submersão da parte basal dos rebentos caulinares em meio líquido com 1g/l de IBA.

Conseguiu-se ainda a obtenção de linhas de *A. deliciosa* (6x) e *A. chinensis* (4x) por estacas e/ou sementes, nas quais se induziu ulteriormente a poliplóidização, para colquicina a 0,05% e 0,1%, com obtenção de octaplóides e dodecaplóides: a maior percentagem de dodecaplóides obtida foi de 38% em fitómeros K3 e a maior percentagem de obtenção de octoplóides foi 7% em plântulas KG. Na sua globalidade os resultados são promissores e estabelecem as bases de um futuro programa de melhoramento mais global para esta espécie.

**Palavras-chave:** *Actinidia* sp., dodecaplóides, germinação de pólen, octaplóides, organogénese, poliploidização.



## Abstract

*Actinidia chinensis* and *A. deliciosa* fruit species are of major economic importance. Native of China and neighboring regions, are now cultivated in many parts of the world due to the quality of its fruits. In Portugal the kiwi culture, has become a success story being currently one of the most cultivated fruit species. However, the genotypes used are imported, and were not specially developed for our soil and climate conditions. Thus, it becomes imperative to develop strategies to improve this plant. In this work, we proceeded to the induction octoploids and dodecaploids, and evaluation of *A. deliciosa* pollen germination for further crossing with *A. chinensis* and formation of hybrids.

The 'Hayward' pollen germination assays were effective having reached germination rates around 80% in medium with 6% sucrose with or without GA<sub>3</sub>. The pollen also germinated in cross-pollination tests carried out *in vitro* which used as female parent *A. deliciosa*.

In order to optimize the induction of polyploid, held in advance the establishment of lines *in vitro*, and meristems micropropagation assays, organogenesis and rooting to choose the best treatments to be applied to induced polyploidy. Best results for axillary shoot proliferation were obtained on a medium containing 1 mg/l BAP and 10 mg/l GA<sub>3</sub>. Induction of organogenesis was best achieved on 1 mg/l BAP combined with 0.1 mg/l NAA. Considerable rooting rates (100% for K3 and K2 93%) were obtained after immersion of the basal part of the stem shoots in liquid medium with 1 g/l IBA.

Polyploidization assays were carried out and the results allowed the formation of octoploids and dodecaploids following treatments with colchicine 0,05% and 0,1%. The highest percentage of dodecaploids obtained was 38% following axillary shoot proliferation of K3. For KG the highest percentage of octoploids 7% from seedling explants. Together, the results are promising and lay the foundations for a future breeding program for this species in our country.

**Keywords:** *Actinidia sp.*, dodecaploids, pollen germination, octaploids, organogenesis, polyploidy.



## Índice:

1. Introdução.....	1
1.1. <i>Actinidia chinensis</i> e <i>Actinidia deliciosa</i> (Kiwi): taxonomia e características morfológicas.....	1
1.1.1. Distribuição geográfica, detalhes ecológicos e importância económica.....	4
1.1.2. Biotecnologia de plantas.....	6
1.1.3. Propagação e cultura <i>in vitro</i> do kiwi.....	7
1.1.4. Poliploidia.....	8
1.1.5. Indução de poliploidia <i>in vitro</i> e seu interesse no melhoramento vegetal.....	9
1.2. Determinação do nível de ploidia.....	12
1.3. Poliploidização no Kiwi .....	13
1.4. Objectivos .....	13
2. Métodos.....	15
2.1. Material vegetal de estudo.....	15
2.2. Propagação <i>in vitro</i> de <i>A. chinensis</i> e <i>A. deliciosa</i> .....	16
2.2.1. Cultura <i>in vitro</i> .....	16
2.2.2. Estabelecimento <i>in vitro</i> a partir de estacas.....	17
2.2.3. Estabelecimento <i>in vitro</i> por sementes.....	18
2.2.4. Micropropagação por meristemas axilares de <i>Actinidia deliciosa</i> (clones K2 e K3).....	21
2.2.5. Organogénese.....	22
2.2.6. Enraizamento e Aclimação .....	23
2.3. Indução de octoplóides e dodecaplóides.....	25
2.4. Citometria de fluxo.....	29
2.6. Avaliação da viabilidade do pólen.....	31
2.7. Acetólise do polén.....	33
2.8. Polinização artificial.....	33
2.9. Análise estatística dos resultados.....	34
3. Resultados.....	35
3.1. Estabelecimento <i>in vitro</i> de linhas de <i>A. deliciosa</i> e <i>A. chinensis</i> por estacas e germinação de sementes.....	35
3.2. Micropropagação de <i>A. deliciosa</i> (clones K2 e K3) .....	39
3.3. Indução de organogénese.....	42
3.3.1. Organogénese em K2 e K3.....	42
3.3.2. Organogénese em KG e Ks.....	45
3.4. Enraizamento das plantas .....	48
3.5. Determinação do nível de ploidia dos rebentos caulinares obtidos.....	51

3.6. Avaliação da viabilidade do pólen de <i>A.deliciosa</i> .....	57
4. Discussão dos Resultados.....	65
4.1- Germinação de sementes.....	65
4.2- Micropropagação por proliferação de meristemas axilares.....	67
4.3- Indução de organogénese.....	68
4.4- Enraizamento.....	70
4.5- Obtenção de octoplóides e dodecaplóides.....	71
4.6- Avaliação da viabilidade do pólen.....	74
5. Conclusão e perspectivas futuras .....	76
6. Referências bibliográficas.....	77

# 1. Introdução

O kiwi é uma espécie fruteira que foi introduzida recentemente no nosso país, mas que rapidamente se tornou um caso de sucesso, quer em termos do interesse dos consumidores quer no que diz respeito à produção. Nos últimos anos, têm surgido alguns problemas com esta cultura, nomeadamente a concorrência de outros países europeus, como a Itália e a Espanha, mas também o aparecimento de algumas doenças que têm causado grande apreensão entre os produtores, por exemplo a PSA (*Pseudomonas syringae* pv. *actinidae*). Esta situação requer que se iniciem programas de melhoramento desta espécie, tentando criar novos génotipos melhor adaptados às nossas condições edafo-climáticas e que possam apresentar, simultaneamente uma boa qualidade de produção. Neste sentido, o Laboratório de Biotecnologia do Centro de Ecologia Funcional do Departamento de Ciências da Vida, da Universidade de Coimbra, iniciou uma colaboração com a Associação Portuguesa de Kiwicultores e com alguns produtores particulares com o objectivo de desenvolver actividades com vista ao melhoramento desta espécie fruteira. Os ensaios inseridos neste trabalho enquandram-se nesse projecto mais vasto.

## 1.1. *Actinidia chinensis* e *Actinidia deliciosa* (Kiwi): taxonomia e características morfológicas

A *Actinidia chinensis* Planch. e a *Actinidia deliciosa* (A.Chev.) C.F.Liang & A.R.Ferguson (Fig. 1 e Fig. 2, respectivamente) são conhecidas vulgarmente como kiwi (Ferguson, 1984). Devido à natural variação de ploidia e hibridizações neste género, e em particular em *A. chinensis* e à proximidade genética desta com a *A. deliciosa* (Liu *et al.*, 2010), não existe um consenso entre os autores, uns classificam a *A. deliciosa* como uma espécie independente, enquanto outros (Fergusson, 2008; Li *et al.*, 2010; Ferguson, 2016; Liu *et al.*, 2010) consideram-na uma variedade da *A. chinensis* (*A. chinensis* var. *deliciosa*).



Figura 1- Flores de *A. deliciosa*. A: Flor masculina com muitos estames, B: Flor feminina.

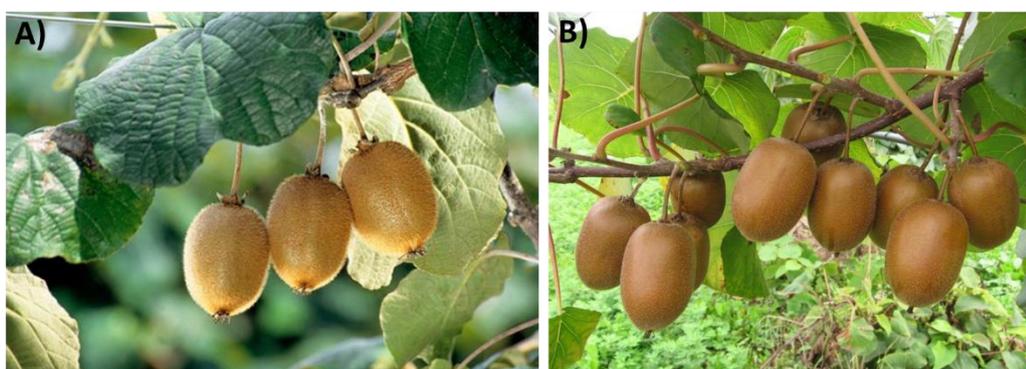


Figura 2 – Fotografia de cultivares de *A. deliciosa* (A) e de *A. chinensis* (B) <http://www.learn2grow.com/plantdatabase/plants/DisplayImage.ashx?ImageID=97187&width=560> e <http://www.sustainablegardener.org/wp-content/uploads/2014/07/Golden-Kiwifruit-150x150.jpg> acessado a 28/07/2016.

Além disso, foi defendido em estudos anteriores que *A. deliciosa* var. *deliciosa* é um aloploplóide a partir da *A. chinensis* var. *chinensis* (2x) e *A. chrysantha* (4x), como seus progenitores (Crowhurst & Gardner, 1991; Hopping, 1994). No entanto, a distribuição geográfica caracterizada por uma variação clinal das espécies sugere que *A. chinensis* var. *deliciosa* e a *A. chinensis* var. *chinensis* sejam tratadas como variedades de uma espécie, *A. chinensis*, em vez de espécies distintas (*A. deliciosa* e *A. chinensis*)

(Ferguson 2014). Neste trabalho, por uma questão prática optou-se por designar apenas *A. deliciosa*, tratando-a como uma espécie independente.

O género *Actinidia* engloba mais de 70 espécies, das quais apenas algumas são de importância comercial, principalmente *Actinidia deliciosa* e *Actinidia chinensis* (Huang & Ferguson, 2007). Neste género, as espécies são na maioria dióicas ou seja, existem plantas apenas com flores femininas ou masculinas (Fig. 1), e ambas são indispensáveis para a reprodução e conseqüente formação dos frutos. As espécies do género *Actinidia* caracterizam-se por serem perenes e produzirem bagas ovais ou esféricas que variam consideravelmente na forma e na cor (Fig. 2) (Ferguson, 1984, Wang & Gleave, 2012).

Os grãos pólen produzidos têm três colpos (sulcos longitudinais) com bordos espessados. Os grãos são esferoidais prolato (eixo polar maior que o eixo equatorial). O grão de pólen é binucleado e tem uma exina fina (Fergusson, 1984).

*Actinidia chinensis* e *Actinidia deliciosa* são trepadeiras lenhosas (lianas) e crescem à volta dos ramos de outras plantas, devido aos seus troncos flexíveis que não conseguem manter-se erectos sem um apoio durante as suas fases jovens. Os ramos são designados por rebentos (ramos não lenhificados com pêlos que tendem a ficar avermelhados com a idade) e por varas (ramos lenhificados). As folhas são grandes, verdes, caducas e têm muitos pêlos na página inferior. Normalmente são cordiformes com recorte dentado e nervuras peninerviadas. Os pecíolos também podem apresentar uma cor avermelhada (Cunha *et al.*, 2007).

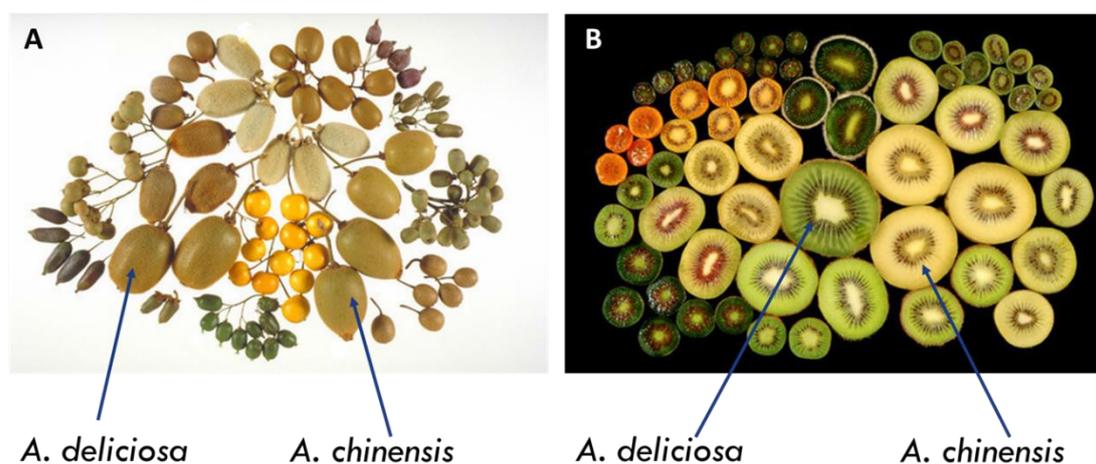


Figura 3- Frutos do género *Actinidia* mostrando variação da cor da polpa, tamanho e forma. **A)** corresponde a *Actinidia deliciosa*; **B)** corresponde a *Actinidia chinensis* (Adaptado de: Wang & Gleave, 2012; Ferguson, 1999).

No género *Actinidia* os frutos variam muito quanto à cor da polpa, forma, tamanho e textura (Fig. 3) (Wang & Gleave, 2012). *A. chinensis* distingue-se de *A. deliciosa*, essencialmente pela cor da polpa amarela mais doce e pequena quantidade de pêlos marcescentes no epicarpo do fruto. No fruto de *A. deliciosa*, os pêlos numerosos permanecem no epicarpo do fruto com polpa verde (Ferguson, 1984).

### **1.1.1. Distribuição geográfica, detalhes ecológicos e importância económica**

O género *Actinidia* é originário da China (Ferguson & Stanley, 2003) tendo uma distribuição vasta pela Ásia oriental, desde o sul do Equador (região tropical) até às regiões temperadas e frias do Norte com uma latitude de 50 ° (Liang 1983; Ferguson & Huang, 2007).

A maior quantidade de espécies e variedades intraespecíficas e endémicas ocorre na China. Ainda ocorrem naturalmente espécies deste género pelo Extremo Oriente Russo, Ilha Sacalina e Ilhas Curilas, Japão, Coreia, Camboja, Laos, Vietnam, Mianmar, Tailândia, Malásia, Indonésia e Norte da Índia. (Liang 1983; Huang & Ferguson, 2007).

Sendo as variedades de *A. deliciosa* mais conhecidas a Abbott, Allison, Bruno, Hayward, e Monty, a Hayward é a variedade comercial predominante, uma vez que o tamanho do seu fruto é grande e de excelente capacidade de conservação (Mainland & Fisk, 2006). Na espécie *A. chinensis*, as mais conhecidas são 'Hort16A' e a 'Zesy002' (Ferguson, 2015).

O kiwi é uma das mais importantes culturas frutícolas no comércio internacional. A China, Nova Zelândia, Chile, Itália e Grécia exportam quantidades consideráveis de kiwis (Fig. 4). A produção comercial mundial de kiwis (frutos) ultrapassa 2,4 milhões de toneladas por ano e a China produz cerca de metade da produção total; cerca de 1,2 milhões de toneladas por ano.

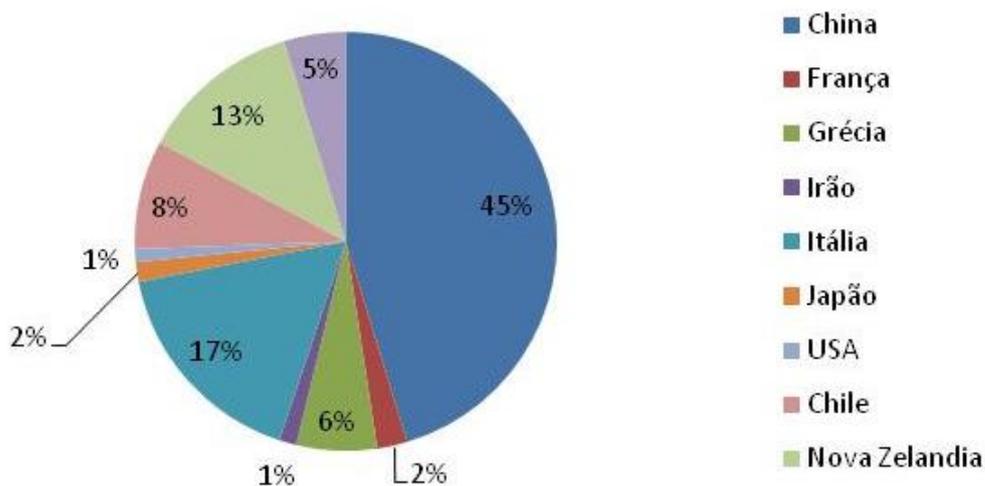


Figura 4 - Produção comercial de kiwi (*A. deliciosa* e *A. chinensis*) em 2013 a nível mundial (Ferguson, 2015).

O fruto kiwi é apreciado pelos consumidores pelo seu sabor e qualidades nutricionais. Tem um elevado teor de vitamina C, de potássio, de magnésio, de fibra e de ácido fólico (Ferguson & Stanley, 2003). O aroma do kiwi é o resultado de uma mistura subtil de compostos voláteis, e é um dos factores importantes da aceitação pelo consumidor, em conjunto com doçura e acidez (Marsh *et al.*, 2006; Garcia *et al.*, 2012).

O cultivar de *A. chinensis* 'Hort16A' da Nova Zelândia foi o cultivar kiwi de polpa amarela mais importante no comércio internacional. Desde a chegada da Psa à Nova Zelândia, que a 'Hort16A' tem sido amplamente substituída pelo cultivar 'Zesy002' (SunGold) (Ferguson, 2015). Com a perda de muitos cultivares de kiwis de polpa amarela (*A. chinensis*) devido à doença causada por *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (PSA), o cultivar 'Hayward' assumiu o principal papel no comércio internacional do kiwi. A resistência à PSA tem sido uma das características mais importantes na seleção de novos cultivares de kiwis. Existem novos cultivares de polpa verde, amarela e vermelha a serem cultivados em diferentes países, mas a sua comercialização internacional não é significativa (Ferguson, 2015).

A nível ecológico, as espécies de *Actinidia* assumem um papel importante, em especial na sua região nativa e regiões circulantes. Um facto curioso nestas regiões é a grande diversidade genética, entre muitos factores também promovido pelo cruzamento

obrigatório (espécies dióicas) e recombinação entre um elevado número de cromossomas (Li *et al.*, 2014).

Segundo Ferguson & Huang (2016), diferentes níveis de ploidia coexistem dentro de uma única população. Os diplóides e tetraplóides encontram-se mais a leste da China, enquanto os hexaplóides mais no oeste. Os diplóides ocorrem principalmente em altitudes mais baixas, os tetraplóides em altitudes intermédias e os hexaplóides ocorrem essencialmente nas altitudes mais elevadas e toleradas pelo género (Ferguson, 2015; Liu *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010).

Em Portugal, a produção comercial de kiwis localiza-se essencialmente nos distritos de Viana do Castelo, Braga, Porto, Aveiro e Coimbra. Nestas regiões, as condições ambientais à sua produção são bastante favoráveis por se assemelharem às condições naturais e nativas (Cunha *et al.*, 2007).

### **1.1.2. Biotecnologia de plantas**

Uma das ferramentas utilizadas pela biotecnologia é a clonagem. A clonagem nas plantas é um dos mais antigos exemplos da utilização da biotecnologia por parte do Homem, através de processos de reprodução assexuada (Herren, 2005). Esta, consiste num processo pelo qual uma célula, um grupo de organismos ou um organismo completo é produzido assexuadamente a partir de uma célula mãe ou organismo, sendo o “filho”, o clone, geneticamente idêntico ao “progenitor” (Newton, 2015).

Esta propagação assexuada pode ser feita de uma forma mais artesanal, como a propagação por estacas ou a realização de enxertias, ou utilizado processos mais sofisticados, em que se torna importante a utilização de um ambiente mais controlado, em laboratório, como a micropropagação (Loberant & Altman, 2010).

A macropropagação é caracterizada pela utilização de técnicas que utilizam porções relativamente grandes de plantas (George *et al.*, 2007), englobando assim, a propagação por estacas. Por sua vez, a micropropagação, possivelmente a técnica mais utilizada na obtenção do género *Actinidia*, é uma técnica de propagação *in vitro* que permite uma produção mais rápida e ao longo de todo o ano, homogenia genética e livre de vírus (Félix *et al.*, 2008).

Na micropropagação são usualmente utilizadas partes de uma planta adulta (explante), da qual se conhece bem o fenótipo, de modo a reproduzir as qualidades da mesma. No entanto, esta técnica pode também desempenhar um papel importante na produção de maiores quantidades em plantas com baixa taxa de propagação.

A micropropagação recorre há utilização de pequenos explantes de várias fontes, que devido à totipotência das células vegetais, originam novas plantas por organogénese (formação de órgãos, como, por exemplo, as raízes) ou embriogénese somática (Loberant & Altman, 2010).

### **1.1.3. Propagação e cultura *in vitro* do kiwi**

A selecção do tipo de células ou explantes que possuem a capacidade para se diferenciarem em plantas inteiras é muito importante para uma micropropagação bem sucedida. A formação de calos e meristemas caulinares adventícios em *A. deliciosa* e *A. chinensis* é relativamente fácil a partir de segmentos foliares, pecíolos e fitómeros, especialmente se estes forem jovens (Wang & Gleave, 2012).

O meio MS tem sido utilizado com sucesso quando suplementado com factores de crescimento específicos (auxinas, citocininas e giberelinas) para a indução de calo, bem como regeneração e micropropagação em *Actinidia*. No entanto, as condições de aplicação de auxinas, citocininas e giberelinas e as suas combinações, podem variar dependendo do tipo de explante utilizado e espécie (Vattiprolu *et al.*, 2011; Wang & Gleave, 2012).

Estudos, como Uematsu *et al.*, 1991; Wang e Gleave, 2012, relatam que as diferenças entre NAA (ácido 1-naftalenoacético) e IAA (ácido indole-3-acético) foram insignificantes no crescimento em *Actinidia* sp.

#### 1.1.4. Poliploidia

Durante o processo evolutivo de 70% das angiospérmicas existentes, calcula-se a ocorrência de pelo menos um processo de poliploidização (Masterson, 1994). A poliploidia pode existir apenas nas células de alguns tecidos, nas células de alguns órgãos ou em partes do organismo, em células dispersas por todo o organismo ou em todas as células de um organismo. A presença de poliplóides em angiospérmicas é elevada com uma frequência relativa de 1/100.000 (Ramsey & Schemske, 1998). A poliploidização (Fig. 5) pode ocorrer através de 3 vias: duplicação somática de cromossomas, união de gâmetas não reduzidos ou polispermia (Song *et al.*, 2012). A duplicação somática de cromossomas ocorre quando o núcleo com o DNA replicado não chega a dividir-se. Esta via é pouco comum, tendo sido assinalada, no zigoto, em embriões, calo embriogénico ou em meristemas (Soltis *et al.*, 2003; Ramsey & Schemske, 1998).

A polispermia consiste na fertilização da oosfera por dois ou mais células espermática. Esta tem sido observada na formação de poliplóides em algumas orquídeas. Contudo, este processo é muito raro e quando acontece geralmente é revertido (Ramsey & Schemske, 1998).

A poliploidização por união de gâmetas também pode ser considerada bilateral, quando o poliplóide tem origem em dois gâmetas não reduzidos; ou unilateral quando desde o diplóide até ao surgimento do poliplóide há um estado intermédio “triplóide bridge”) (Ramsey & Schemske, 1998).

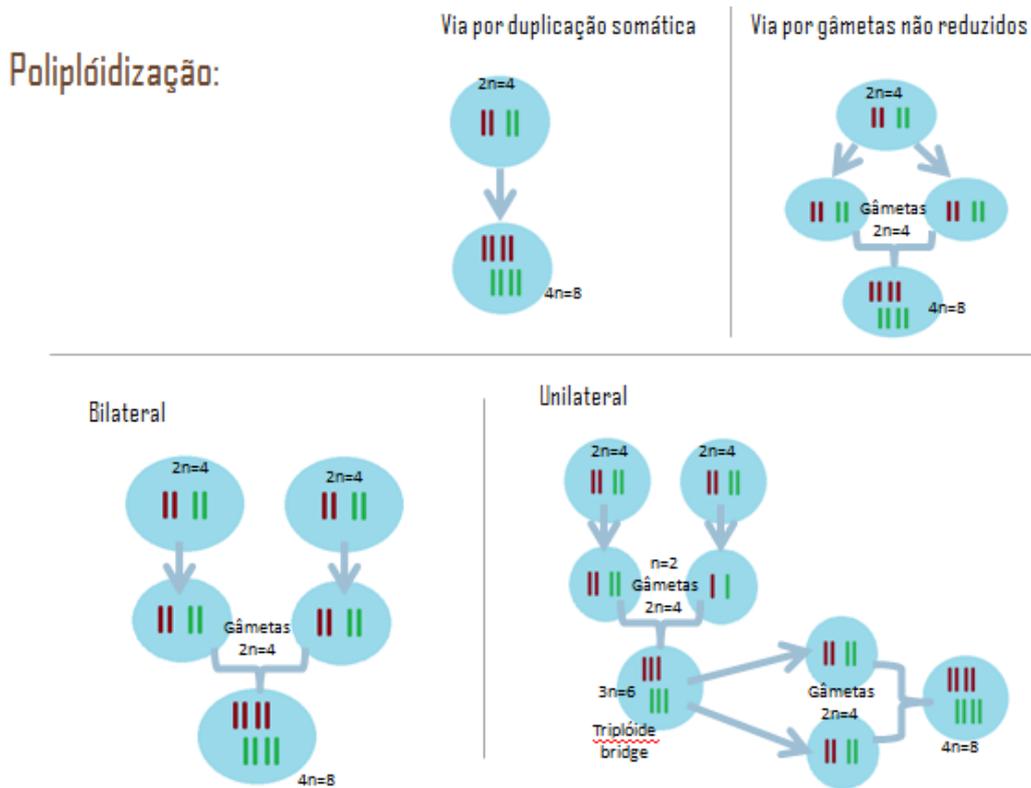


Figura 5 - Modelos ilustrativos da poliplóidização.

Ainda pode ocorrer a alopoliploidia por hibridização entre gametas de espécies diferentes mas próximas filogeneticamente. Posteriormente, estes cromossomas não homólogos podem passar por um processo de duplicação cromossómica ainda no zigoto sem que ocorra a seguir a mitose, constituindo-se cromossomas homólogos com alelos homozigóticos, ou formação de gametas não reduzidos na F1 (Song *et al.*, 2012). A partir daqui as divisões celulares mitóticas vão ocorrer com o dobro da soma dos cromossomas presentes nos gametas iniciais de espécies diferentes formando um novo indivíduo distinto dos seus progenitores capaz de produzir gametas viáveis (Soltis *et al.*, 2003).

### 1.1.5. Indução de poliploidia “*in vitro*” e seu interesse no melhoramento vegetal

*In vitro*, a duplicação do genoma pode ser induzida por diversos agentes c-mitóticos. Os mais usados são a colquicina, a orizalina e a trifluralina. O sucesso na indução de poliploidia depende de vários factores, tais como o meio, o agente c-mitótico,

o tipo de explante, os tempos de exposição e as concentrações do agente c-mitótico e as características intrínsecas de cada espécie ou indivíduo usado (Dhooghe *et al.*, 2011).

Uma alteração significativa do genoma, como acontece na poliploidia, é normalmente acompanhada por alterações reprodutivas, morfológicas e funcionais. Estas, por sua vez, têm impacto ecológico, seja ao nível de um alargamento da sua distribuição, da diversificação do habitat, de um novo nicho ecológico, ou de uma capacidade competitiva superior (Castro *et al.*, 2012; Levin, 2002; Levy & Feldman, 2002).

Teoricamente a poliploidia, traz consigo várias vantagens porque as plantas apresentam um número maior de genes e alelos. Por isso, também se acredita na possibilidade de uma alteração no metabolismo da planta no sentido de taxas elevadas de síntese ou uma maior variabilidade de compostos metabolicamente relevantes (Yang *et al.*, 2011). Em muitas plantas poliplóides, verifica-se o aumento do seu tamanho e vigor, tal como por exemplo nos seus frutos, mais resistência a doenças, e diminuição do número de sementes, quando comparadas com os progenitores diplóides (Predieri, 2001).

A primeira planta a ser sujeita a indução de poliploidia *in vitro* foi a planta do tabaco (Murashige & Nakano, 1966). A propagação de plantas *in vitro* melhora consideravelmente a eficiência na indução artificial de poliplóides, uma vez que as culturas *in vitro* oferecem um ambiente mais controlado e reprodutível do que as induções realizadas no terreno (Jelenic *et al.*, 2001). Contudo, tem sido relatada a duplicação do genoma espontânea em consequência transversal à micropropagação *in vitro* (Meyer *et al.*, 2009).

A poliploidização tem muitas consequências no crescimento e desenvolvimento da planta, e por isso a duplicação do número de cromossomas tem sido intensamente estudada nos últimos anos e tem sido aproveitada para várias aplicações no melhoramento de plantas (Dhooghe *et al.*, 2011).

Muitas culturas agrícolas e plantas propagadas vegetativamente são poliploides. São as características interessantes obtidas em consequência da poliploidização, que tornam as culturas dos poliplóides atrativas economicamente, como por exemplo resistência a pestes e doenças, tolerância ao stress hídrico, aumento do vigor e tamanho de órgãos para consumo humano, maior produção de metabólitos secundários e constituição de cultivares estéreis (ex: a banana comercial é triplóide). Daí, a utilização

de poliplóides induzidos artificialmente em culturas agrícolas nas últimas décadas. Já para não falar, na selecção artificial de plantas poliplóides realizada desde o início da humanidade (Dhooghe *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2012).

O sucesso da indução de poliploidia depende do tipo de explante usado (plantas, plântulas, rebentos, fitómeros, calo, embriões zigóticos ou somáticos, sementes), uma vez que depende da permeabilidade dos tecidos do explante ao transporte do agente c-mitótico até ao núcleo de todas as células, inclusive as meristemáticas. Um obstáculo à livre circulação do agente c-mitótico, é o facto de este poder interagir e ficar ligado a outros constituintes celulares levando à ausência deste no seu destino para a poliploidização como também acarretando efeitos adversos no funcionamento celular (Murashia & Nakano, 1966; Marejohn *et al.*, 1987; Yemets & Blume, 2008).

No que se refere à concentração e tempo de exposição, doses baixas não são bem sucedidas, enquanto doses excessivamente altas são letais. Além disso, concentrações elevadas ou tempos de exposição muito prolongados podem resultar em duplicações sucessivas, o que conduz a células com níveis de ploidia (ex: um diplóide passa a ser um octaplóide) acima do nível desejado. Ou seja, existe uma combinação ideal entre tempo de exposição e concentração para cada espécie (Allum *et al.*, 2007).

O solvente no qual o agente anti-mitótico é dissolvido também é importante. Ele contribui para a eficácia ou toxicidade do tratamento, pois pode aumentar ou diminuir a permeabilidade das células à entrada do agente c-mitótico (Dhooghe *et al.*, 2011). Em diversos estudos, agentes c-mitóticos são dissolvidos em DMSO (Dimetilsufóxido) para aumentar a permeabilidade das células (Hamill *et al.*, 1992).

Os agentes c-mitóticos mais utilizados na indução de poliplóides são a colchicina e a orizalina, porque a aplicação destes agentes não requer equipamento específico (van Harten, 1998). Mas, entre os vários agentes anti-microtubulares, a colchicina tem sido a mais útil na duplicação dos cromossomas em várias espécies de culturas, incluindo flores decorativas, plantas medicinais e agrícolas (Yemets & Blume, 2008). A utilização destes agentes tem como fim interromper a progressão da mitose em células (Panda *et al.*, 1995). A colchicina é um alcalóide extraído a partir das sementes e bolbos da planta *Colchicum autumnale* (Panda *et al.*, 1995). A colchicina liga-se aos dímeros de tubulina levando à formação de um complexo de colchicina-tubulina limitativo da polimerização dos microtúbulos durante a mitose (Panda *et al.*, 1995).

Para que a colquicina não danifique os cromossomas tem de ser aplicada correctamente (Caperta *et al.*, 2006). Caperta *et al.* (2006) mostraram que o bloqueio do fuso, por si só, não é suficiente para a indução de células poliplóides, e que a polimerização de novas estruturas com tubulina é essencial para a reformulação de núcleos poliplóides e sua progressão no ciclo celular. O mesmo estudo refere que concentrações baixas (0,5 mM), induzem a despolimerização de microtúbulos do citoesqueleto em todas as fases do ciclo celular e consequentemente reduzindo a viabilidade celular caso a repolimerização não se verifique em 12 horas. Também sugere que concentrações elevadas (5 mM) induzem a polimerização de novas estruturas contendo tubulina em células de c-metáfase necessárias à reconstituição dos núcleos poliplóides e sua progressão no ciclo celular (Caperta *et al.*, 2006).

Tanto a orizalina como a colquicina são capazes de induzir poliploidia inibindo o fuso acromático. A aplicação bem sucedida (resultando em poliplóides) destes agentes também se deve ao facto destes terem como alvo zonas de elevada actividade meristemática (van Harten, 1998). Há espécies que reagem melhor à orizalina (Allum *et al.*, 2007) e outras à colquicina (Caperta *et al.*, 2006). Contudo, a colquicina foi seleccionada para este estudo.

## **1.2. Determinação do nível de ploidia**

Após o tratamento de indução e depois de as plantas crescerem o suficiente para análise é fundamental determinar a eficácia de cada método de indução uma vez a taxa de transformação é frequentemente reduzida e ainda ocorre produção de plantas quimera (Dart *et al.*, 2004).

A confirmação pode ser feita através de várias técnicas, umas mais convencionais (ex: contagem dos cromossomas nos núcleos de células em metáfase, por microscopia óptica), outras mais dispendiosas [ex: com PCR (Tate *et al.*, 2009)], e outras mais práticas, mas que exigem algum equipamento (ex: citometria de fluxo) (Loureiro, 2007).

A citometria de fluxo é o método mais eficaz para a avaliação da eficácia da poliploidização induzida. No entanto, os métodos de confirmação alternativos, como as contagens de cromossomas e observações morfológicas, também são utilizados (Dhooghe

*et al.*, 2011). A citometria de fluxo permite analisar um elevado número de amostras num reduzido intervalo de tempo sem necessidade de uma grande quantidade de material vegetal (Dhooghe *et al.*, 2011).

### 1.3. Poliploidização no Kiwi

O número base de cromossomas deste género é  $x=29$  que corresponde a 58 cromossomas no diplóide (McNeilage & Considine 1989; He *et al.*, 2005). No género *Actinidia*, ocorre grande variação da ploidia, variando de plantas diplóides até hexaplóides, e ocasionalmente, são encontrados octoplóides ( $8x$ ), decaplóides ( $10x$ ) e dodecaplóides ( $12x$ ) (Huang & Ferguson 2007; Ferguson, 2016).

Também se verificam variações do nível de ploidia dentro de algumas espécies de *Actinidia*. *Actinidia chinensis* tem cultivares e variedades diplóides e outras tetraplóides. O número de cromossomas no género *Actinidia* é o mesmo tanto em machos como em fêmeas (Yan *et al.*, 1997). Apesar do elevado número de cromossomas nas espécies de *Actinidia*, estes apresentam um tamanho reduzido e a nível morfológico não foram encontradas diferenças nos cromossomas entre machos e fêmeas (Yan *et al.*, 1997).

A variação intraespecífica do número de cromossomas é frequente na *Actinidia*, ocorrendo em 8 de 26 espécies anteriormente estudadas. Em *A. chinensis* foram confirmados dois níveis de ploidia ( $2x=58$ ,  $4x=116$ ), enquanto que em *A. arguta* encontraram-se tetraplóides, hexaplóides ( $6x=174$ ), octaplóides ( $8x=232$ ). As espécies *A. arguta*, *A. chinensis* e *A. kolomikta* apresentam ambas ploidias de  $2n=116$  cromossomas ( $4x$ ), e as espécies de *A. arguta* e *A. deliciosa* tem cultivares/variedades com  $2n=174$  cromossomas ( $6x$ ), o que também acontece em diferentes espécies com  $2n=58$  deste género (Ferguson & Huang 2007). Portanto, verifica-se a presença de uma série de níveis de poliplóides simples no género

### 1.4. Objectivos

Como foi referido na contextualização deste trabalho, o kiwi é uma espécie que vem assumindo um papel cada vez mais importante no mercado de frutos e no de viveiros.

No entanto, é necessário seleccionar génotipos com novas características de forma a melhorar as variedades já existentes. Neste sentido, o presente trabalho teve como principal objectivo a aplicação de técnicas de melhoramento ao kiwi cultivado no nosso país. Assim, pretendeu-se estabelecer um protocolo de propagação *in vitro* a partir de material adulto, visto que a clonagem de plantas adultas é essencial para assegurar a uniformidade genética das plantas a propagar. Testou-se também a germinação de sementes e a cultura de explantes de origem seminal visando obter plantas com novas características, uma vez que as plantas obtidas por semente podem apresentar características interessantes. A rentabilidade do kiwi depende cada vez mais de métodos eficazes de polinização artificial. Para que essa polinização seja eficaz é necessário determinar a qualidade do pólen. Para além disso, os agricultores guardam muitas vezes o pólen de um ano para o outro o que pode condicionar a sua viabilidade. Deste modo, avaliou-se o pólen fornecido por um produtor, tendo-se determinado as condições para a sua germinação *in vitro* bem como a consequente viabilidade.

Finalmente, tentou-se a duplicação do número de cromossomas de plantas de kiwi com o objectivo de obter plantas com novas características em termos de produtividade.

## 2. Métodos

### 2.1. Material vegetal de estudo

Neste estudo, foram utilizadas várias fontes de material de *A. chinensis* e *A. deliciosa* sumariados na Tabela 1. Obtiveram-se frutos de *A. chinensis* e de *A. deliciosa* comercializados pela empresa Zespri e de origem na Nova Zelândia. Além destas sementes, foram também usadas sementes de frutos com origem em Portugal da espécie *A. deliciosa*, e rebentos de *A. deliciosa* previamente estabelecidos *in vitro* pela empresa InProPlant a partir do abrolhamento de estacas pertencentes a Kiwis cultivados em Portugal. Também se utilizaram estacas colhidas de outros kiwis cultivados em Portugal (Tabela 1). A recolha das sementes e estacas foi efectuada em 2015. A ploidia do material vegetal foi confirmada por citometria de fluxo.

As análises de pólen foram realizadas utilizando pólen recolhido por um produtor da região de Anadia e que é utilizado nos ensaios de polinização artificial em pomares de kiwi.

Tabela 1- Material vegetal de *A. chinensis* e *A. deliciosa* utilizados no presente trabalho

Material vegetal	Origem	Espécie	Designação	Ploidia
Sementes de frutos SunGold (Zespri®)	Nova Zelândia	<i>A. chinensis</i>	KG (linhas de 1 a 74)	4x = 116 cromossomas
Sementes de frutos GreenZespri (Zespri®)	Nova Zelândia	<i>A. deliciosa</i>	KZ	6x = 174 cromossomas
Sementes de frutos adquiridos em supermercado		<i>A. deliciosa</i>	Ks (linhas de 1 a 60)	6x = 174 cromossomas
Rebentos masculinos e femeninos estabelecidos <i>in vitro</i> em 2015 pela InProPlant	Portugal	<i>A. deliciosa</i>	Clones K2(fêmeas), clones K3 (machos)	6x = 174 cromossomas
Estacas de uma planta masculina e de duas plantas femeninas	Portugal	<i>A. deliciosa</i>	Clones Kev1(fêmea), Kev2(fêmea), Kev3(macho)	6x = 174 cromossomas
Sementes	Portugal	<i>A. deliciosa</i>	Kp (sementes dos frutos 1 a 21)	6x = 174 cromossomas

## 2.2. Propagação *in vitro* de *A. chinensis* e *A. deliciosa*

### 2.2.1. Cultura *in vitro*

Nos ensaios de cultura *in vitro* utilizou-se o meio MS (Murashige & Skoog, 1962), constituído por sacarose (30g/l), macronutrientes, micronutrientes, vitaminas ou compostos orgânicos, FeEDTA e Mioinositol (Tabela 2). Todos os meios foram ajustados para pH 5,8. Para o Meio MS sólido foi adicionado 0,6% de agar. Consoante o tratamento, foram adicionados ou não reguladores de crescimento vegetal (PGRs). Na germinação de sementes usou-se ¼ da concentração de meio MS e 0,8% de agar.

As culturas foram colocadas a crescer em estufa com temperatura constante de 25 °C e fotoperíodo de 16 horas de luz/ 8 horas de escuro.

Tabela 2 – Composição do meio MS base usado na cultura *in vitro*, para além da sacarose e do agar

	Composto	Concentração (mg/l)
Macronutrientes	KNO <sub>3</sub>	1900
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
Micronutrientes	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22,30
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,60
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20
	KI	0,83
	NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25
	CuCl <sub>2</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025
Fe-EDTA	Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	37,3
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,8
Compostos Orgânicos	Glicina	2
	Ácido nicotínico	0,5
	Piridoxina H-Cl (vitamina B6)	0,5
	Tiamina H-Cl (vitamina B1)	0,1
Mioinositol	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	100

### **2.2.2. Estabelecimento *in vitro* a partir de estacas**

Para o estabelecimento de explantes *in vitro* utilizaram-se: uma planta adulta masculina (Kev3) e de duas plantas adultas femininas (Kev1 e 2). Recolheram-se estacas de plantas adultas e retiraram-se as folhas (Fig. 6). As estacas foram submetidas a uma desinfecção com o fungicida de contacto Mancozebe a 1g/l durante 10 minutos seguida por 3 lavagens em água destilada e esterilizada. De seguida, foram pulverizadas com o fungicida sistémico Aliete (1 g/l). Colocaram-se as estacas a abrolhar em recipientes com água esterilizada, envoltos por um saco de plástico (Fig. 6), numa estufa a 25 °C.

Após abrolhamento, os rebentos foram retirados das estacas, desinfectados com etanol a 70% durante 30 segundos e com uma solução filtrada de hipoclorito de sódio a 5% durante 10 minutos, sendo depois lavados 3 vezes com água esterilizada. Os rebentos foram colocados a crescer em meio de cultura MS no Fitoclima (fotoperíodo de 16h/8h), sob condições assépticas. Posteriormente, os rebentos não contaminados foram transferidos para meio MS com factores de crescimento (Fig. 6).

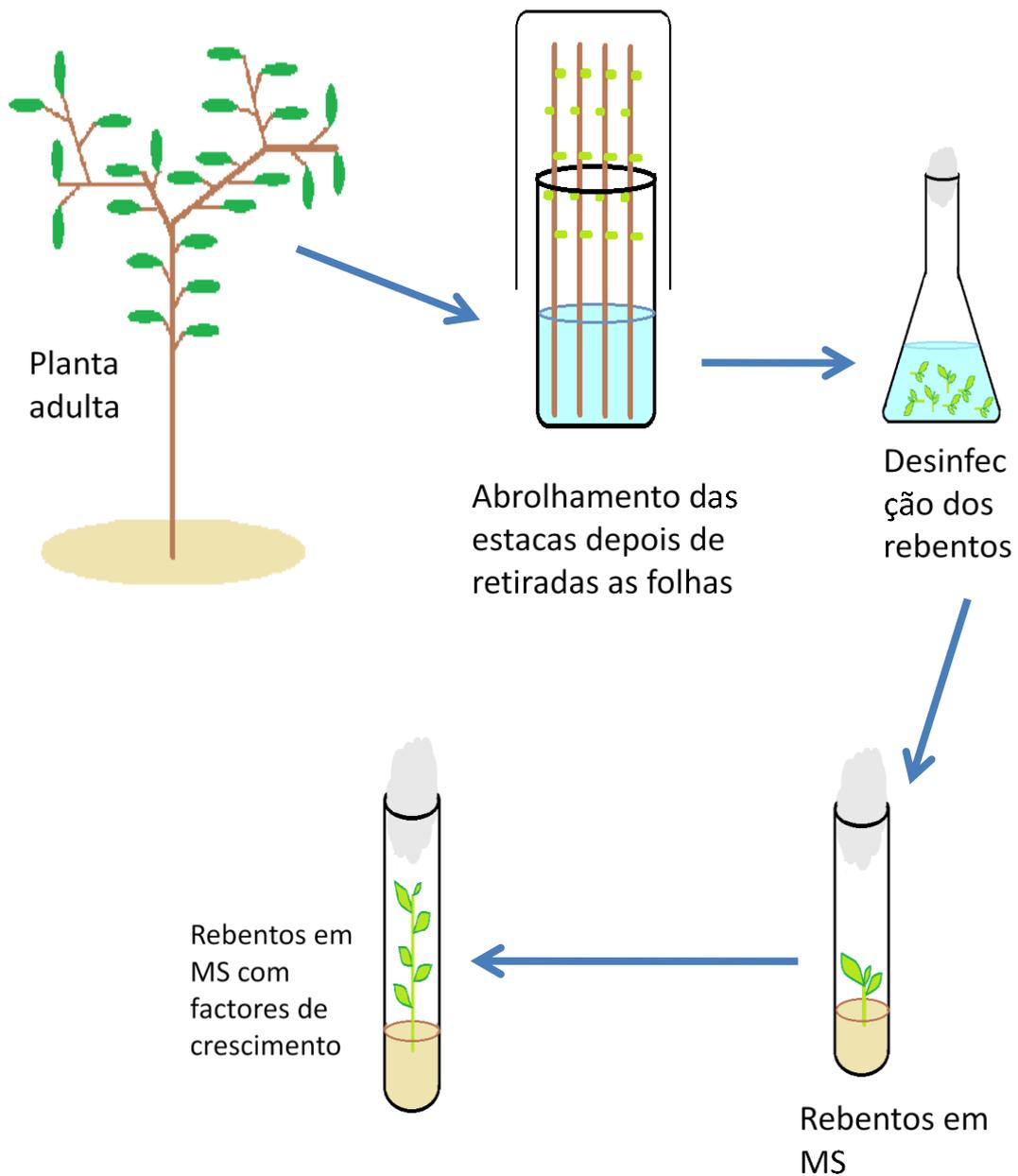


Figura 6- Estabelecimento *in vitro* de clones por abrolhamento de estacas.

### 2.2.3. Estabelecimento *in vitro* por sementes

Na germinação das sementes usaram-se diferentes tratamentos na tentativa de obter o maior número possível de plântulas para posterior indução de poliploidia com agentes c-mitóticos. A germinação revelou-se particularmente difícil uma vez que os

frutos usados estiveram sujeitos a condições de armazenamento variáveis e diferentes entre si (e.g., poderão ter estado sujeitos a temperaturas baixas aquando o seu armazenamento antes de serem comercializados) alterando a taxa de germinação. Assim, foram efetuados diferentes tratamentos de estratificação, embebição em água e GA<sub>3</sub> de forma a obter o maior número e plântulas possível.

No estabelecimento *in vitro* de explantes por germinação de sementes (Fig. 7), as sementes inicialmente foram esterilizadas superficialmente com etanol a 70% durante 30 segundos seguido por imersão numa solução filtrada de hipoclorito de sódio a 5% durante 10 minutos. Decorrido esse tempo, as sementes passaram por 3 lavagens com água autoclavada e ficaram embebidas também em água autoclavada a 4°C (estratificação a frio) durante diferentes períodos de tempo, desde 24h até 6 semanas (Tabela 3).

Depois da embebição e/ou estratificação a frio, voltaram a ser desinfectadas com hipoclorito de sódio a 5% durante 5 minutos e lavadas 3 vezes com água autoclavada. Concluído este passo, foram colocadas em Meio MS a ¼ e 0,8% de agar, na estufa a 25°C até germinarem. Nas plântulas germinadas (*seedlings*) cortaram-se os ápices e colocaram-se em meio MS e mais tarde em meio MS com factores de crescimento (BAP a 1mg/l e GA<sub>3</sub> a 10mg/l).

Tabela 3 – Diferentes tratamentos aplicados na germinação das Sementes de *Actinidia* sp.

Sementes	Estratificação a 4°C	Embebição em água autoclavada	Embebição em solução autoclavada de GA <sub>3</sub>	¼ Meio MS sólido	¼ Meio MS sólido com 10mg/l de GA <sub>3</sub>
KG (160 sementes, destas 74 seguiram linhas)	Não	24h	Não	Sim	Não
Ks (99 sementes, destas 55 seguiram linhas)	Não	Não	Não	Sim	Não

Tabela 3 (continuação) – Diferentes tratamentos aplicados na germinação das Sementes de *Actinidia* sp.

KG	1 Semana (todas as sementes)	1 Semana (90 sementes)	1 Semana (50 sementes) a 10mg/l de GA <sub>3</sub>	Sim	Não
KZ	1 Semana (todas as sementes)	1 Semana (130 sementes)	1 Semana (110 sementes) a 10mg/l de GA <sub>3</sub>	Sim	Não
Kp (Sementes de 21 frutos)	6 Semanas (todas as sementes)	6 Semanas (30 Sementes de cada fruto)	6 Semanas (30 sementes de cada fruto e para cada concentração de 5mg/l de GA <sub>3</sub> e 10mg/l de GA <sub>3</sub> )	Sim	Não
Sementes KG	Não	3 dias (todas as sementes)	Não	Sim (180 sementes)	Sim (30 sementes)
Sementes KZ	Não	3 dias (todas as sementes)	Não	Sim (90 sementes)	Não

Na análise da germinação das sementes com origem nos frutos Kp, também foi tido em conta a forma e tamanho dos frutos, pelo que foram agrupados em KpA (frutos 8, 9, 10, 11, 13, 19, 20, 21), KpB (frutos 1, 7 e 14) e KpC (frutos 2, 3, 4, 5, 6, 12, 15, 16, 17 e 18) (Fig. 21).



Figura 21- Agrupamento dos frutos em tipos consoante o seu tamanho e forma: KpA (A), KpB (B), KpC (C). KpA (tamanho pequeno inferior ou igual a 8 cm e forma característica da *A. deliciosa*), KpB (tamanho grande superior a 8 cm e frutos unidos levemente que partilham o mesmo pedúnculo), KpC (tamanho grande superior a 8 cm e frutos fundidos formando um só). As medidas consideradas nos frutos foram as maiores atingidas por estes, o comprimento no caso KpA e a largura no KpB e KpC.

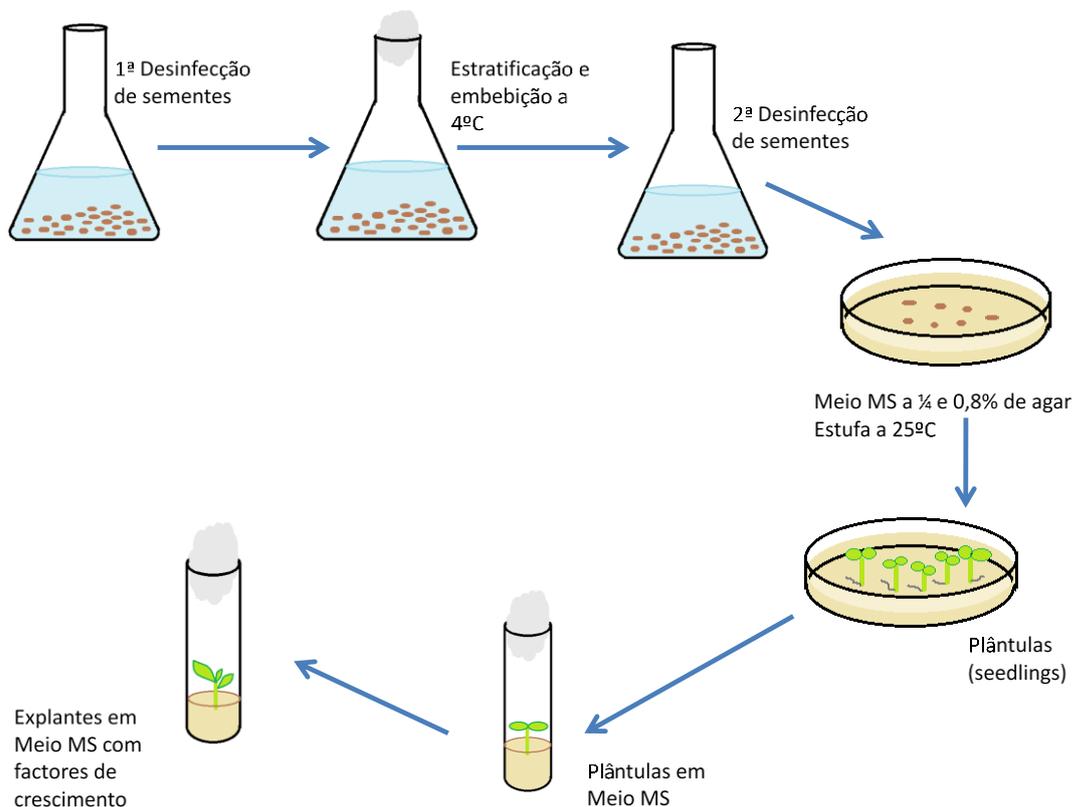


Figura 7- Estabelecimento *in vitro* de explantes por germinação de sementes.

#### 2.2.4. Micropropagação por meristemas axilares de *Actinidia deliciosa* (clones K2 e K3)

Foi realizado um ensaio para estimar as concentrações de factores de crescimento (BAP e GA<sub>3</sub>) em meio MS que resultem num maior e melhor crescimento dos fitómeros nos clones K2 e K3. Neste ensaio, foi testado o crescimento em diferentes combinações das hormonas BAP (citocinina) e GA<sub>3</sub> (ácido giberélico), mais os controlos (meio MS sem hormonas), em 3 réplicas de 10 explantes (cada explante com dois meristemas) (Tabela 4).

A micropopagação por meristemas axilares (Fig. 8) foi realizada em caixas transparentes de plástico (12 cm de altura por 9 cm de diâmetro) e em tubos na intenção de aumentar os explantes disponíveis para posterior indução de poliploidia. O meio utilizado nesta micropopagação foi o meio MS suplementado com os factores de crescimento BAP

(1mg/l) e GA<sub>3</sub> (10 mg/l). Cada caixa continha cerca de 100 ml de meio e cada tudo tinha cerca de 10ml de meio.

Tabela 4 – Concentrações de BAP e GA<sub>3</sub> usadas no ensaio de micropropagação de meristemas axilares nos clones K2 (fêmeas) e K3 (machos).

Controlo (apenas meio MS)	Meio MS com 1mg/l de BAP	Meio MS com 1mg/l de BAP e 5mg/l de GA <sub>3</sub>	Meio MS com 1mg/l de BAP e 10mg/l de GA <sub>3</sub>	Meio MS com 1mg/l de BAP e 15mg/l de GA <sub>3</sub>
---------------------------	--------------------------	---	--	--

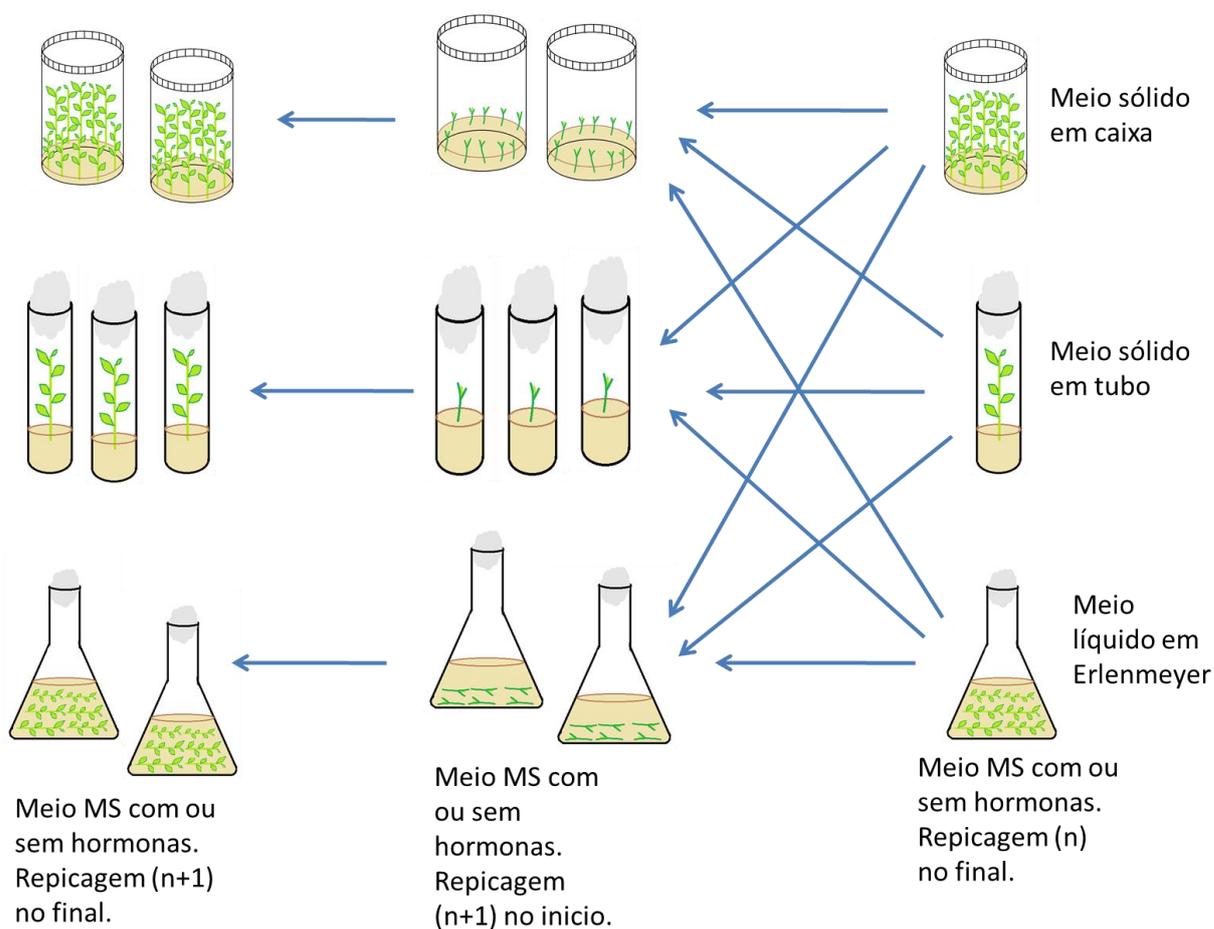


Figura 8 – Micropropagação de meristemas axilares em meios MS com diferentes combinações de hormonas e em diferentes recipientes.

## 2.2.5. Organogénese

Para a proliferação de rebentos por organogénese a partir da folha usaram-se 3 réplicas de 10 explantes para cada clone de K2 e K3 e para cada tratamento, com 0,5 cm

e provenientes da parte central da folha (Figura 9): Controlo (meio MS sem hormonas); 0,5 mg/l de BAP+0,1 mg/l de NAA; 1mg/l de BAP+0,1 mg/l de NAA; 2 mg/l de BAP+0,1 mg/l de NAA; 3 mg/l de BAP+0,1 mg/l de NAA.

Estes explantes foram colocados nos diferentes meios MS atrás referidos e em tubos (10 ml de meio para cada tubo) na estufa a 25 °C com fotoperíodo de 16 horas luz/8horas escuro. Os resultados foram obtidos após 42 dias de cultura (Fig. 9).

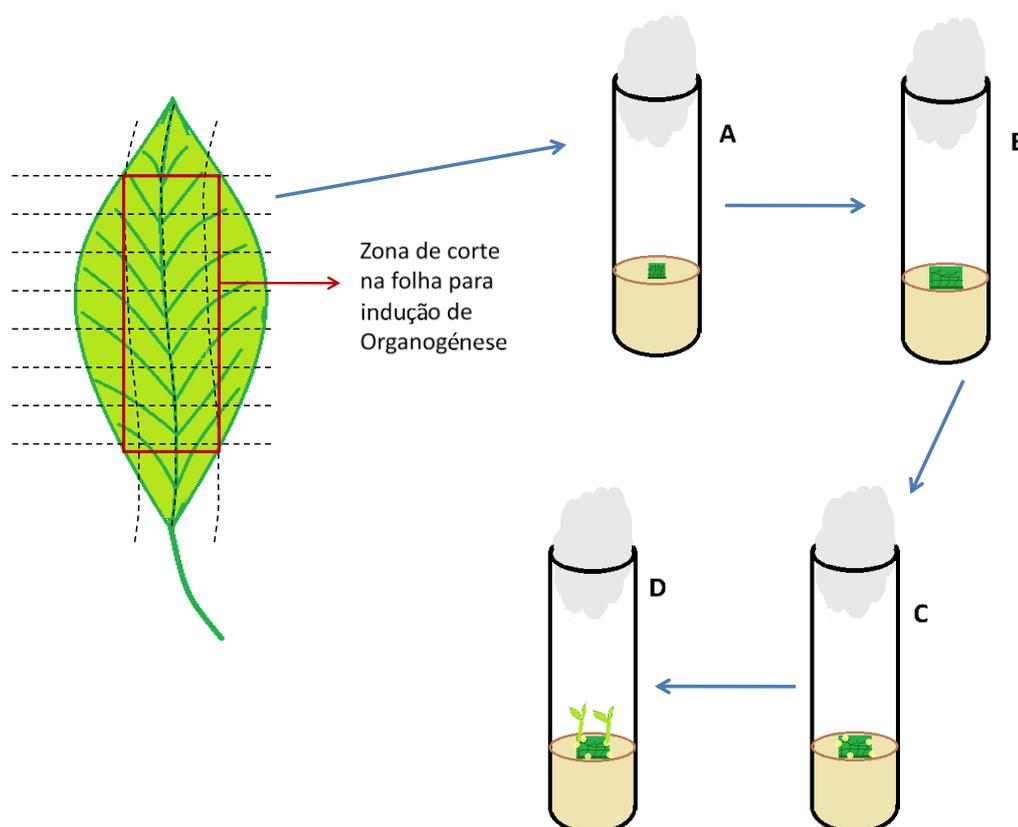


Figura 9 – Indução de organogênese foliar durante 42 dias. A- Corte da folha com 0,5 cm de cada lado. B- Expansão foliar. C- Formação de calos. D- Formação de rebentos.

### 2.2.6. Enraizamento e Aclimação

Para o enraizamento dos rebentos caulinares K2 e K3 (estes não estiveram na presença de colquicina) procedeu-se ao tratamento destes com 1 g/l de IBA (ácido indol-3-butírico) em meio líquido (*dipping*) durante 20 segundos (Pedroso *et al.*, 1992) e a seguir foram colocadas em caixas (10 por cada caixa) com meio MS a 25°C e fotoperíodo 16h luz/8h escuro na câmara de cultura (Fig. 15).

Após um mês foram contabilizadas e transferidas individualmente para recipientes com substrato (mistura de  $\frac{3}{4}$  de turfa e  $\frac{1}{4}$  de perlite) no Fitoclima (16h luz/8h escuro) cobertas por um plástico durante a primeira semana, até atingirem aproximadamente 15 cm de comprimento. Depois foram mudadas para recipientes maiores e colocadas na estufa maior com fotoperíodo ambiente (aclimação) (Fig. 15).

As plantas Kev1, Kev2 e Kev3 para enraizarem foram colocadas em meio MS com 1g/l de IBA durante 15 dias (tubos) e depois transferidas para meio MS. Após formarem raízes no meio MS procedeu-se à aclimação destas com o mesmo tipo de substrato referido anteriormente e no Fitoclima (Fig. 15).

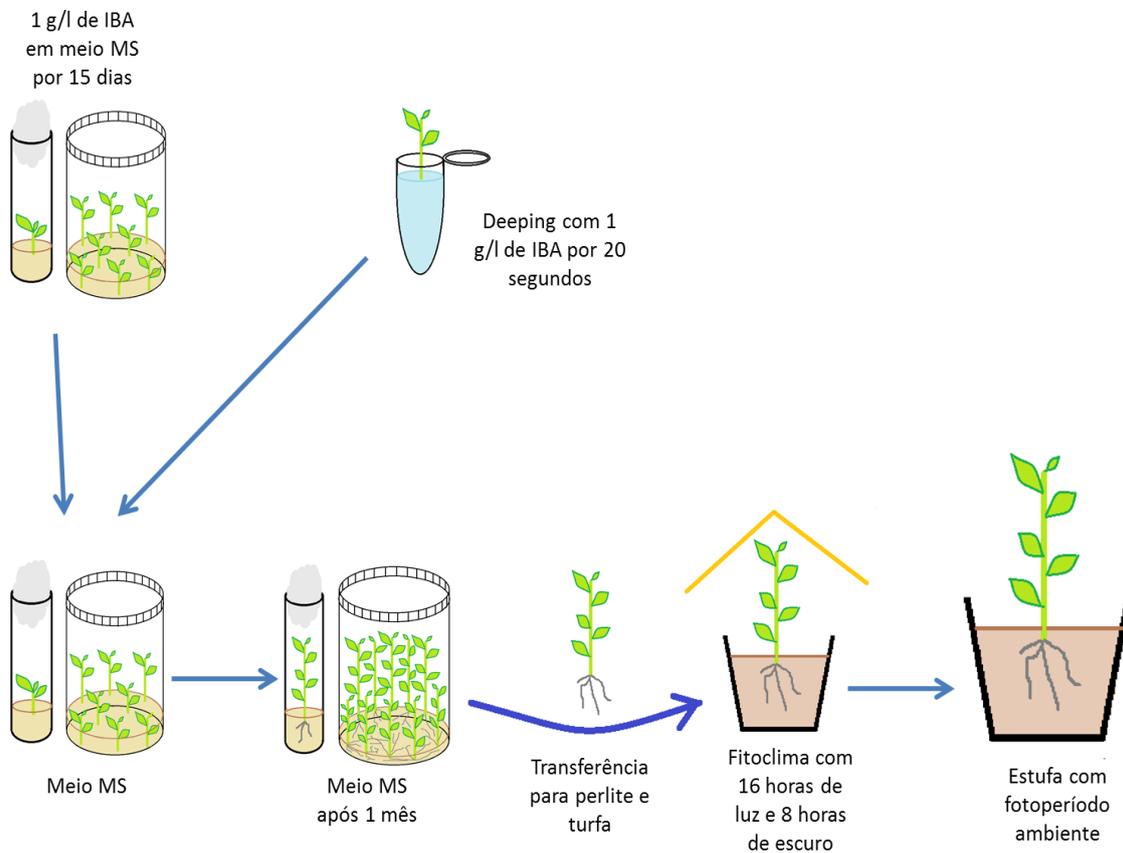


Figura 15 – Enraizamento dos rebentos de *Actinidia* sp. através da hormona IBA, e posterior aclimação dos mesmos com substrato de turfa e perlite em fitoclima.

### 2.3. Indução de octoplóides e dodecaplóides

Explantos dos clones K2 e K3 (meristemas axilares), ápices de plântulas KG e KZ, e explantes foliares e peciolares e meristemas axilares das linhas KG e Ks estiveram sob o efeito do agente c-mitótico colquicina (Figura 13). Os explantes usados K2, K3, KZ e KS são hexaplóides ( $6x$ ) e portanto espera-se obter dodecaplóides ( $12x$ ) nos tratamentos com este agente. Os explantes KG são tetraplóides ( $4x$ ) e podem resultar em octoplóides na presença deste agente.

Nos clones K2 e K3 optou-se por induzir poliploidização em meristemas axilares (1 meristema por explante), em meio líquido em balões Erlenmeyer (20ml de meio MS) nas concentrações de 0% (controle), 0,05% e 0,1% de colquicina durante 4 horas (Figura 11).

Foi induzida poliploidização em ápices de 30 plântulas geneticamente diferentes de KZ e KG em soluções autoclavadas de colquicina diferentes e diferentes períodos de imersão usando caixas Multiwells (Figura 10). Selecionaram-se plântulas com os cotilédones expandidos de forma a expor melhor o meristema apical à colquicina.

Segmentos foliares, pecíolos e meristemas axilares das linhas anteriormente estabelecidas Ks e KG (Tabela 5), geneticamente diferentes, foram também sujeitas a diferentes concentrações de colquicina durante 4h. Após período de indução com a colquicina e posterior lavagem, estes explantes foram submetidos a Organogênese com 1mg/l de BAP e 0,1mg/l de NAA em meio MS sólido e em tubos (Figura 12).

Todos os explantes foram lavados com água filtrada e autoclavada 1 a 3 vezes após terminado o tempo de indução de poliploidização. A seguir as plântulas foram colocadas em tubos com meio MS, enquanto os outros explantes (com exceção dos segmentos foliares e pecíolos) foram colocados a crescer em meio MS com 1mg/l de BAP e 10 mg/l de GA<sub>3</sub> (Figs 10-13).

Tabela 5 – Ensaio usados para induzir dodecaplóides em *A. deliciosa* e octoplóides em *A. chinensis*.

Tipo de explantes	Concentrações de Colquicina	Tempo de indução da poliploidização	Nº de explantes para cada concentração de colquicina e tempo de indução
Meristemas K2 e K3	0% (controle); 0,05%; 0,1%; 0,5%	4 horas	30
Plântulas KZ	0% (controle); 0,05%; 0,1%	4 e 8 horas	30
Plântulas KG	0% (controle); 0,05%; 0,1%	4 horas	15 (4 plantas no controle)
Cortes foliares e pecíolos KG	0% (controle); 0,05%; 0,1%	4 horas	30
Cortes foliares e pecíolos Ks	0% (controle); 0,05%; 0,1%	4 horas	30
Meristemas KG	0% (controle); 0,05%; 0,1%	4 horas	30
Meristemas Ks	0% (controle); 0,05%; 0,1%	4 horas	30

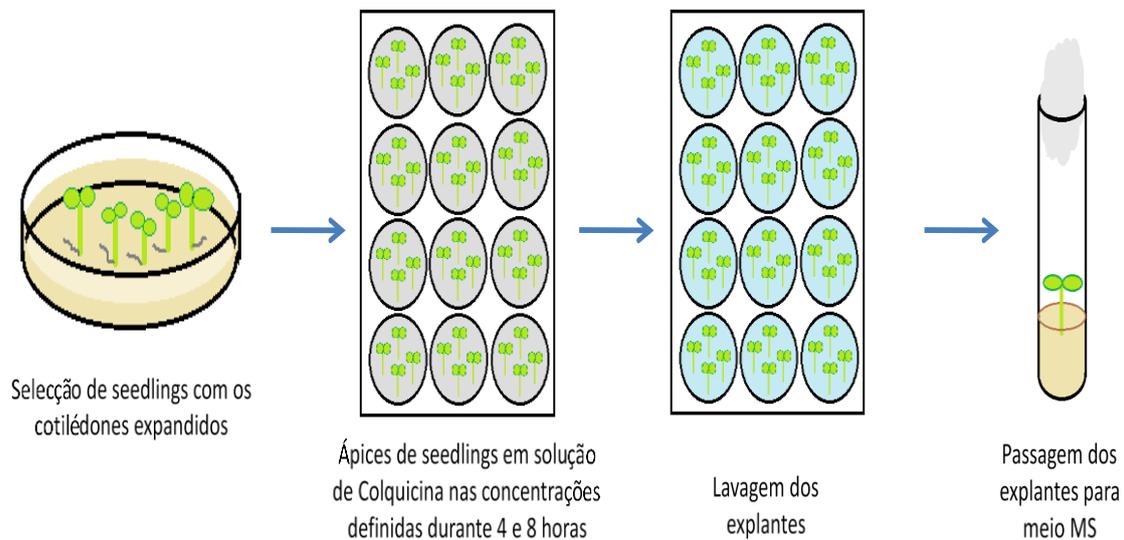


Figura 10 – Indução de dodecaplóides em ápices de plântulas KZ e octoplóides em ápices de plântulas KG.

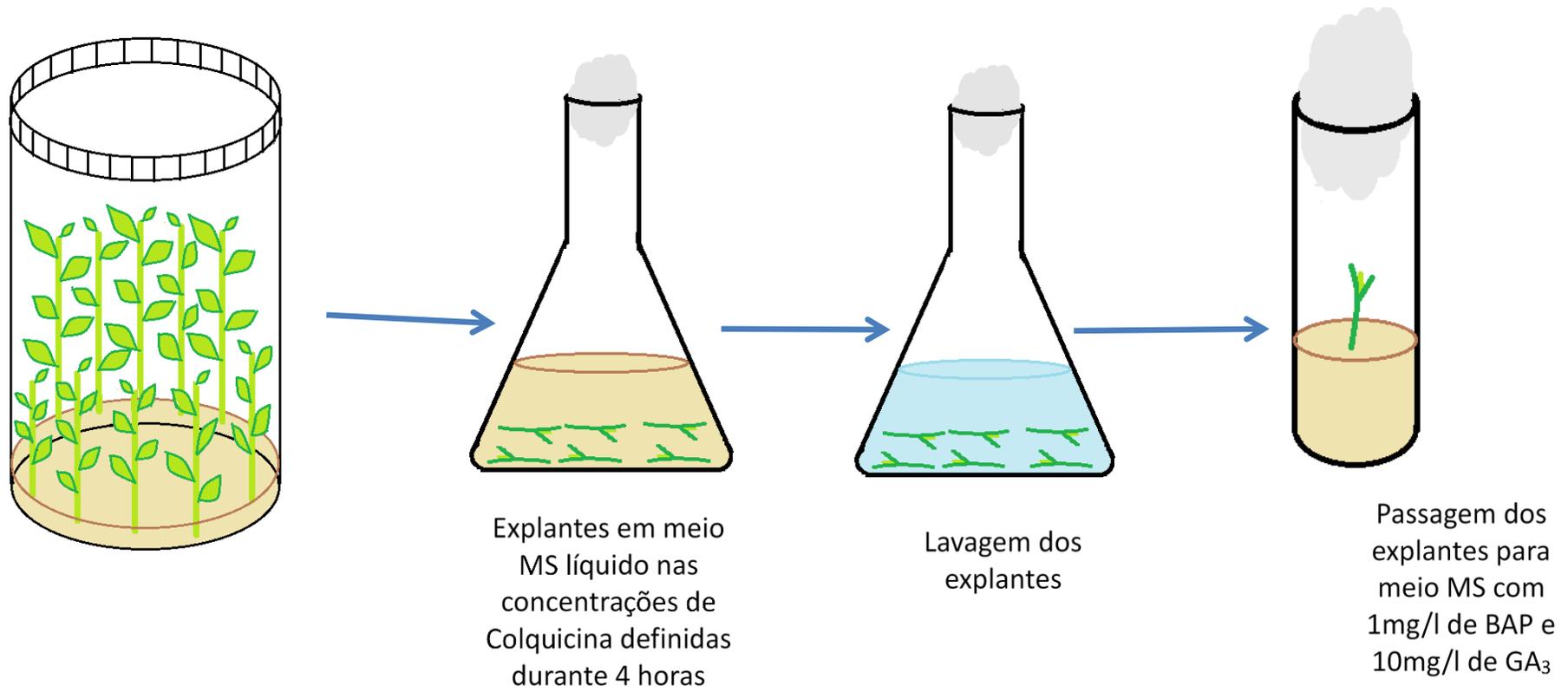


Figura 11 – Indução de dodecaplóides em meristemas axilares dos clones K2 e K3.

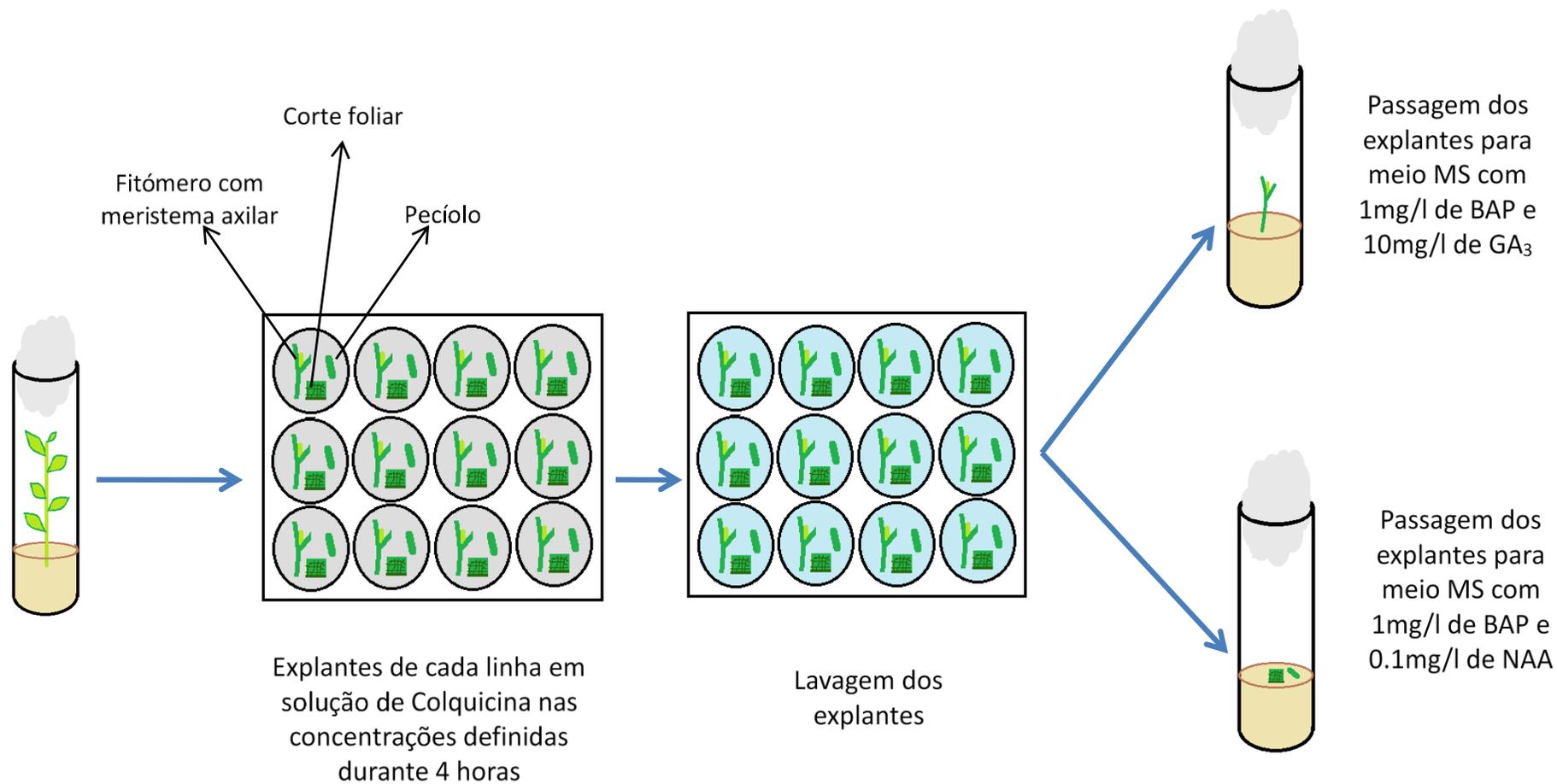


Figura 12 – Indução de dodecaplóides em meristemas axilares, cortes foliares e pecíolos KS, e de octoplóides em meristemas axilares, segmentos foliares e pecíolos KG.

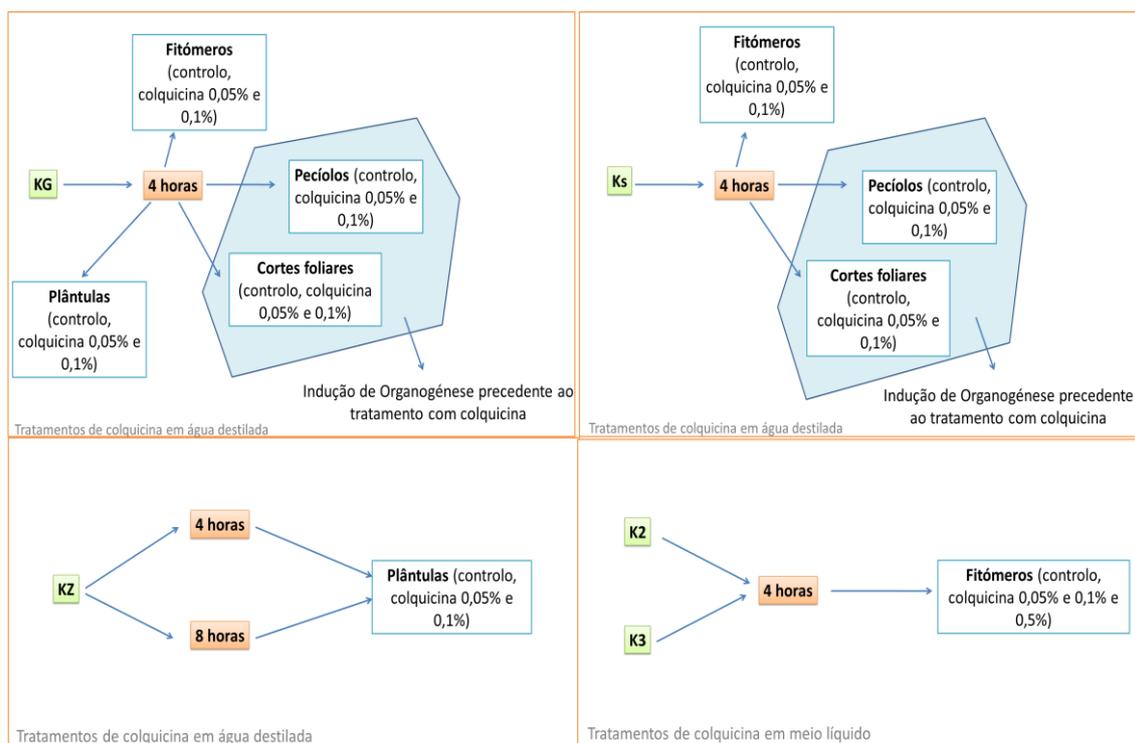


Figura 13 – Esquema geral dos ensaios de poliploidização em *Actinidia chinensis* (KG) e *Actinidia deliciosa* (Ks, KZ, K3, K2). Os explantes dos grupos Ks, KZ e KG foram obtidos a partir do estabelecimento com sementes (geneticamente diferentes, excepto aqueles que tiveram origem na mesma semente e incluídos numa linha designada), enquanto nos explantes do K2 e do K3 são esperados genomas idênticos, pois são clones de plantas adultas.

## 2.4. Citometria de fluxo

Os explantes foram mantidos em cultura até atingirem o tamanho suficientemente grande para colher uma amostra foliar para análise por citometria de fluxo. A citometria de fluxo permitiu analisar o conteúdo em ADN dos explantes submetidos aos diferentes processos de indução e determinar a sua ploidia, permitindo avaliar o sucesso do processo de indução.

Antes de serem analisadas no citómetro de fluxo, as amostras foliares têm de ser preparadas, o que significa um chopping destas. O chopping consiste na libertação dos núcleos intactos para um 1 ml de tampão WPB – Woody Plant Buffer (0,2M de Tris.HCl; 4mM de MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O; 2% (v/v) de Triton X – 100; 2mM de EDTA Na<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 86 mM de NaCl; 10mM de metabissulfito; 1% (p/v) de PVP – 10; pH 7,5; conservar a 4°C) por corte num só golpe. Depois desta solução obtida ser filtrada (isolados núcleos) com filtros

em malha de nylon 50  $\mu\text{m}$ , é lhe adicionado 50 $\mu\text{l}$  de iodeto de propídio (fluocromo/corante que se liga aos ácidos nucleicos) e de RNase (Loureiro, 2007).

Como não eram esperadas alterações nos indivíduos dos ensaios controle, 6 indivíduos foram analisados simultaneamente.

O padrão foi usado em simultâneo com a amostra para cada leitura. Foram escolhidos para padrões o *Solanum lycopersicum* cv. *stupidice* e a *Bellis perennis* por terem um tamanho de genoma próximo mas não sobreposto com o tamanho do genoma da *A. chinensis* e *A. deliciosa* na janela do gráfico a ser lido pelo citómetro.

A escolha do padrão para a determinação da ploidia também é importante de forma a não coincidir os picos deste com os da amostra, sejam próximos o suficiente para os dois aparecerem na janela do gráfico. Nos padrões usados, o *Solanum lycopersicum* tem 1.96 pg e a *Bellis perennis* tem 3.46 pg aproximadamente (Doležel *et al.*, 2007), enquanto a *A. deliciosa* tem 4.80 pg (Loureiro *et al.*, 2007) e a *A. chinensis* tetraplóide tem cerca de 3.10 pg (Hopping, 1994.). Os octoplóides e dodecaplóides que aparecem possuem o dobro do tamanho do genoma, aproximadamente 6.20 pg e 9.60 pg correspondente à duplicação de ploidia. Na leitura do ADN nuclear pelo citómetro ocorrem variações, então é estimado o CV (coeficiente de variação) correspondente ao desvio padrão dividido pela média. O CV permite validar as metodologias envolvidas na citometria, o qual deve ser inferior a 5% (Galbraith *et al.*, 2002), mas difícil de obter em plantas lenhosas (Loureiro *et al.*, 2007).

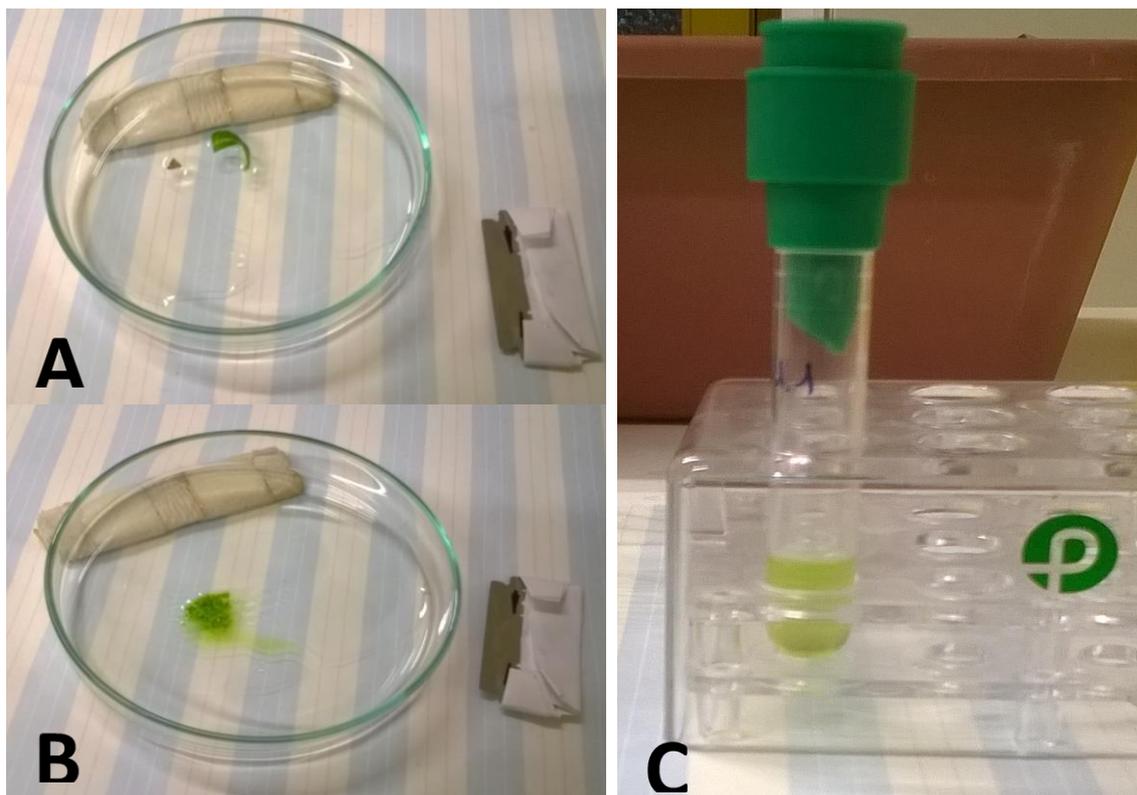


Figura 14 – Algumas etapas do chopping. A) Padrão *S. lycopersicum* cv. stupike à esquerda e amostra de *A. deliciosa* à direita com 1 ml de tampão WPB. O tamanho seleccionado de padrão é menor do que o da amostra porque liberta mais núcleos que o da amostra. B) Cortes sucessivos e lancinantes feitos por uma lâmina na amostra e padrão juntos. C) Filtração da amostra e padrão.

## 2.5. Avaliação da viabilidade do pólen

No âmbito de uma empresa, também foram realizados ensaios para estimar a viabilidade do pólen. O pólen usado foi fornecido por uma empresa portuguesa produtora de kiwis que o adquiriu em Itália. Este pólen tinha sido congelado e armazenado pela empresa durante um ano.

A estimativa da viabilidade do pólen e eficácia da polinização artificial permite antever se o pólen e carpelos estão em condições de serem usados em ensaios futuros ou ajustar a técnica, tal como é necessário saber a viabilidade do pólen para despistar este em caso de falha da polinização artificial (ex: hibridização artificial).

Para testar a viabilidade do pólen, o pólen depois de descongelado foi colocado a germinar em diferentes meios compostos por combinações diferentes de concentrações de sacarose, concentrações de GA<sub>3</sub> e meio base (5 mg/l de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 15 mg/l de CaClNO<sub>3</sub>

e 10 mg/l de KNO<sub>3</sub> (Jahier *et al.*, 1992), com pH 5,8 e 0,7% de ágar, durante 6h e 24h (Tabela 6).

De cada meio foram recolhidas 5 amostras com cerca de 0,3 cm de cada lado, e feitas preparações (coradas com carmin acético e aquecidas até derreter o ágar) para contar os grãos de pólen germinados em microscópio óptico e posterior determinação da percentagem de germinação. Só foram considerados germinados grãos de pólen com um tubo polínico maior que seu diâmetro.

Tabela 6 – Meios utilizados para a germinação do pólen com 0,7% de ágar de pH de 5.8

Meio A	Água destilada
Meio B	Meio base + 0% de sacarose
Meio B3	Meio base + 3% de sacarose
Meio B6	Meio base + 6% de sacarose
Meio B9	Meio base + 9% de sacarose
Meio B12	Meio base + 12% de sacarose
Meio B15	Meio base + 15% de sacarose
Meio C	Água destilada +1mg/l de GA <sub>3</sub>
Meio D	Meio base + 0% de sacarose +1mg/l de GA <sub>3</sub>
Meio E	Meio base + 3% de sacarose +1mg/l de GA <sub>3</sub>
Meio F	Meio base + 6% de sacarose +1mg/l de GA <sub>3</sub>
Meio G	Meio base + 9% de sacarose +1mg/l de GA <sub>3</sub>
Meio H	Meio base + 12% de sacarose +1mg/l de GA <sub>3</sub>
Meio I	Meio base + 15% de sacarose +1mg/l de GA <sub>3</sub>
Meio J	Água destilada +10mg/l de GA <sub>3</sub>
Meio K	Meio base + 0% de sacarose +1mg/l de GA <sub>3</sub>
Meio L	Meio base + 3% de sacarose +1mg/l de GA <sub>3</sub>
Meio M	Meio base + 6% de sacarose +1mg/l de GA <sub>3</sub>
Meio N	Meio base + 9% de sacarose +1mg/l de GA <sub>3</sub>
Meio O	Meio base + 12% de sacarose +1mg/l de GA <sub>3</sub>
Meio P	Meio base + 15% de sacarose +1mg/l de GA <sub>3</sub>
Meio Q	Água destilada +100mg/l de GA <sub>3</sub>
Meio R	Meio base + 0% de sacarose +1mg/l de GA <sub>3</sub>
Meio S	Meio base + 3% de sacarose +1mg/l de GA <sub>3</sub>
Meio T	Meio base + 6% de sacarose +1mg/l de GA <sub>3</sub>
Meio U	Meio base + 9% de sacarose +1mg/l de GA <sub>3</sub>
Meio V	Meio base + 12% de sacarose +1mg/l de GA <sub>3</sub>
Meio W	Meio base + 15% de sacarose +1mg/l de GA <sub>3</sub>

## 2.7. Acetólise do pólen

O pólen foi colocado num eppendorf com ácido acético glacial e de seguida centrifugado a 2000 rpm durante 2 minutos e centrifugado (processo desidratação). Depois foi adicionada uma combinação de anidrido acético e ácido sulfúrico (9 gotas de anidrido acético para 1 gota de ácido sulfúrico). Este foi deixado a incubar em banho-maria numa temperatura de 100 °C durante 25 minutos. O pólen voltou a ser centrifugado e decantado e lavado com acetona 3 vezes (Erdtman, 1960).

A seguir à acetólise dos grãos de pólen foi adicionado glicerol a 87% e de novo centrifugado até os cobrir. À parte juntou-se 3 gotas de gelatina glicerada (anteriormente liquefeita por aquecimento moderado) aos grãos de pólen acetolizados com glicerol (Erdtman, 1960). Após este procedimento, foram realizadas preparações para observação ao microscópio óptico. Foram tiradas fotografias ao pólen.

## 2.8. Polinização artificial

Procedeu-se à polinização artificial de 8 flores de *A. deliciosa* (Origem: Falachos, Guarda; 40°46'45.1"N 7°18'41.1"W) com o pólen fornecido pela empresa anteriormente referida. Os controlos não foram inoculados artificialmente com o pólen.

Os pistilos foram separados das restantes partes das flores. As anteras destas flores foram colocadas numa caixa de petri forrada por papel de alumínio, a libertação do pólen. Os pistilos polinizados foram colocados frascos com 20 ml meio sólido apenas constituído por água e agar durante 24 horas.

Os pistilos foram fixados numa solução de Formaldeído (90% de etanol a 70°, 5% de formol, 5% de ácido acético) durante 24 horas. Depois foram lavados 3 vezes e mergulhados numa solução quase saturada de NaOH, durante 8 horas. Voltaram a ser lavados. Para a coloração foram imersos em azul de anilina 0,1M. Fizeram-se preparações e observaram-se ao microscópio óptico a 365 nm.

## **2.9. Análise estatística dos resultados**

Todos os resultados aqui obtidos (capacidade de germinação, produção de rebentos por meristemas axilares, produção de rebentos por organogénese, capacidade de enraizamento e aclimatação, e eficácia na indução de octoplóides e dodecaplóides) foram analisados estatisticamente com recurso ao Microsoft Excel e GraphPad Prism (Teste paramétrico ANOVA para resultados com distribuição normal e Teste de Kruskal-Wallis não paramétrico). A determinação da plóidia foi previamente avaliada no programa FloMax em associação com o citómetro de fluxo.

### 3. Resultados

#### 3.1. Estabelecimento *in vitro* de linhas de *A. deliciosa* e *A. chinensis* por estacas e germinação de sementes

No estabelecimento *in vitro* por estacas, foram obtidos rebentos desde outubro de 2015 até março de 2016, no macho (Kev3) e nas duas fêmeas recolhidas (Kev1 e Kev2). Os primeiros rebentos surgiram quatro semanas após as estacas terem sido colocadas em água, no fitoclima, a 25 °C, para abrolhar.

O abrolhamento ocorreu gradualmente, pelo que os rebentos com origem nos meristemas axilares existentes inicialmente nas estacas recolhidas não se desenvolveram todos em rebentos na mesma altura. Contudo, foi possível observar a formação de mais rebentos depois dos anteriores serem colhidos para desinfeção e estabelecimento *in vitro* (Figs 16-18).

Observou-se ainda a formação de calo nas extremidades das estacas (Kev 1, Kev 2, Kev 3) (Figs. 16-18) e, no caso do Kev 3, foi possível observar a formação de um rebento a partir de um desses calos numa das extremidades não submersa de uma estaca (Fig. 16).

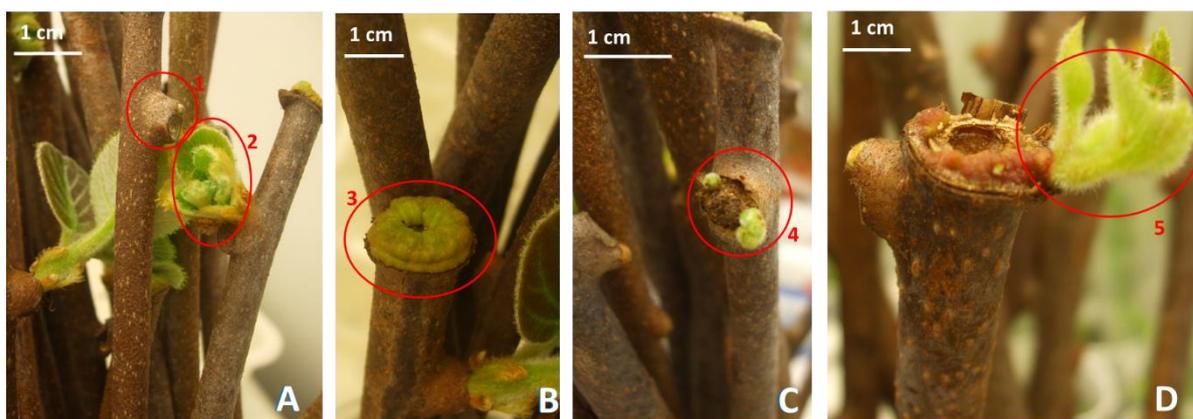


Figura 16 – Abrolhamento *in vitro* de estacas de Kev 3 para estabelecimento *in vitro*. A – Gema foliar resultante de um meristema axilar (1), primeiro rebento do gomo foliar (2), B – Calo (3) na extremidade superior da estaca, C - Formação de novos rebentos depois do primeiro ser removido (4), D – Formação de um rebento a partir do calo presente na extremidade superior da estaca (5).



Figura 17 – Abrolhamento *in vitro* de estacas Kev 2 para estabelecimento *in vitro*. A – Gema foliar com meristema axilar (1), B – calo na extremidade superior da estaca (2) e rebento caulinar em desenvolvimento (3), C - gomo foliar com meristema axilar (1), calo na extremidade superior da estaca (2), primeiro rebento no gomo foliar (4); D- dois rebentos formados no gomo foliar depois de o primeiro rebento ter sido recolhido (3).

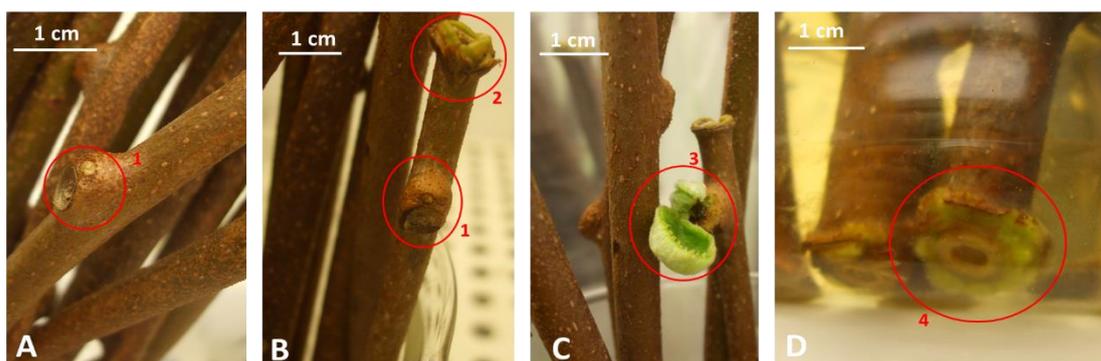


Figura 18 – Abrolhamento *in vitro* de estacas Kev 1 para estabelecimento *in vitro*. A – Gomo foliar com meristema axilar (1), B – Gomo foliar com meristema axilar (1) e calo na extremidade superior da estaca (2), C - rebento formado no gomo foliar posteriormente ao inicial (3); D- formação de calo na extremidade submersa da estaca (4).

A maior parte dos rebentos posteriormente expostos ao hipoclorito de sódio e colocados em meio MS ao longo destes meses apresentaram ainda muitas contaminações, ficando apenas 1 ou 2 estabelecidos de cada linha Kev. Mais tarde, para o enraizamento de 2 exemplares de cada uma destas linhas, levaram um choque com IBA a 1mg/l em MS durante 15 dias antes de serem colocados em MS sem hormonas, contudo a Kev 1 não enraizou (Fig. 19).

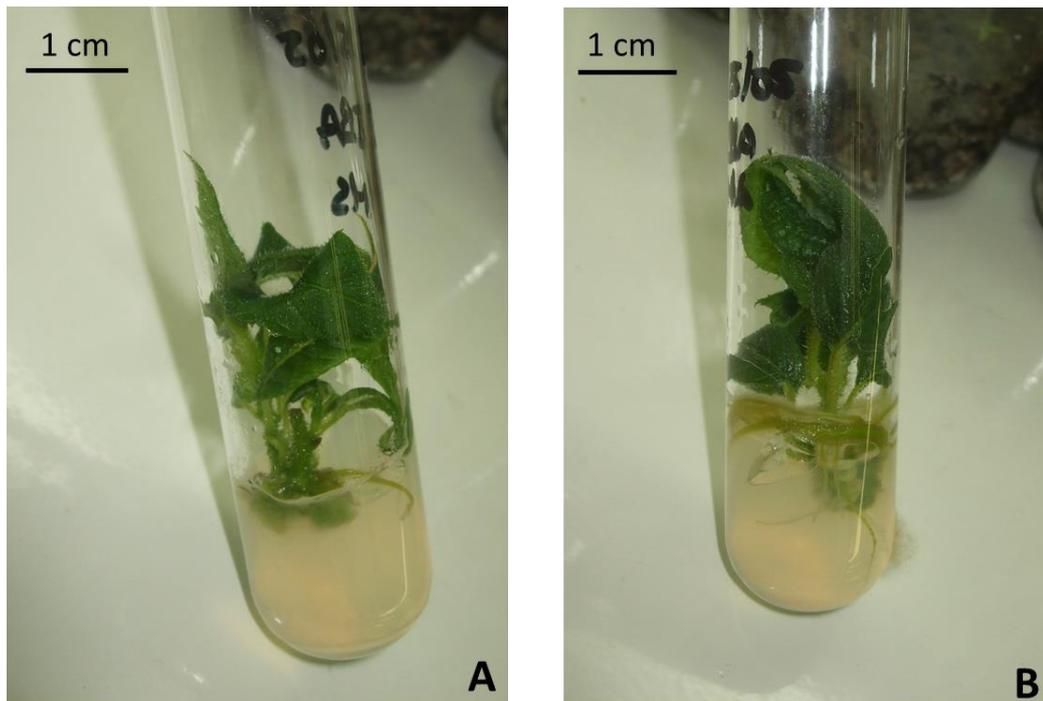


Figura 19 – Enraizamento das linhas Kev. A) Planta Kev 3 *in vitro* com calo e uma raiz. B) Planta Kev 2 *in vitro* com calo e várias raízes. As raízes não emergem do calo mas sim do caule.

No estabelecimento *in vitro* por sementes, foram contabilizadas as taxas de germinação nas diferentes linhas utilizadas (Ks, KZ, KG, Kp). Apesar dos tratamentos antecedentes à germinação serem diferentes foi possível obter uma percentagem de germinação superior ou igual a 46% nas linhas Ks, KZ e KG. Nas restantes linhas, a taxa de germinação foi de 48% para KG, 60% para KZ e 56% para Ks (Fig. 20).

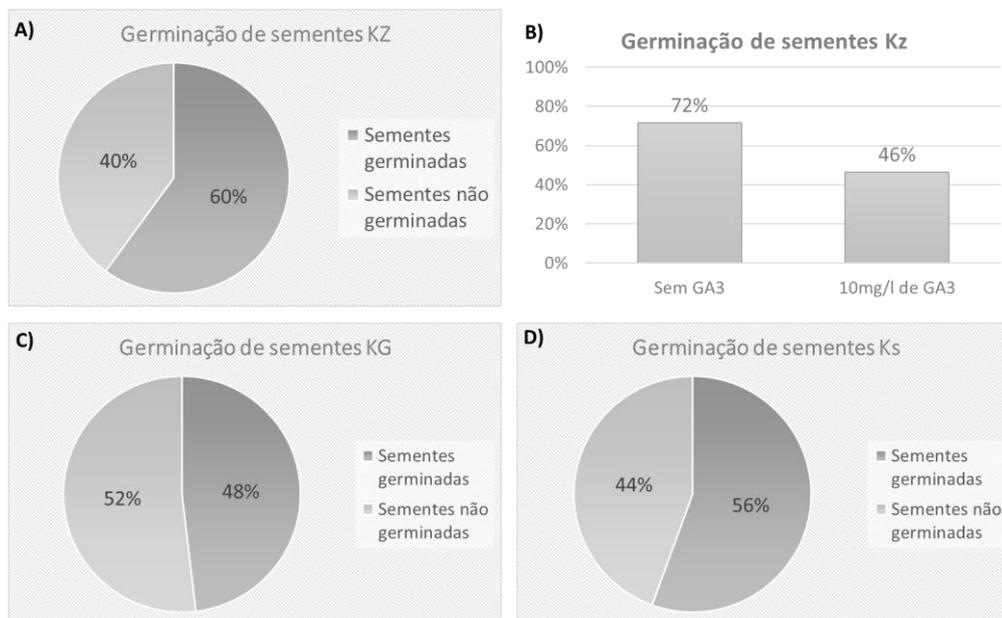


Figura 20 – Taxas de germinação para a linha Kz (A), KG (C) e Ks (D). Taxas de germinação KZ para 10mg/l de GA<sub>3</sub> (B).

As KZ estiveram sujeitas a estratificação durante uma semana a 4 °C embebidas em água vs solução com 10 mg/l de GA<sub>3</sub>. Contudo, neste caso, a germinação no ensaio com GA<sub>3</sub> foi menor (46%) do que o seu controlo (sem GA<sub>3</sub>) com 72%, perfazendo uma média aproximada de 60% de germinação.

As sementes Kp estiveram sujeitas a uma estratificação a 4 °C durante 6 semanas nas soluções de 5 mg/l e 10 mg/l de GA<sub>3</sub> e em água destilada (sem GA<sub>3</sub>), antes de serem colocadas a germinar.

Os frutos KpC foram aqueles em que as sementes apresentaram uma maior taxa de germinação (90%) em condições em que o GA<sub>3</sub> não estava presente. Os frutos KpB conseguiram maior germinação também no ensaio sem GA<sub>3</sub> com 80%. Nos frutos KpA foi observada uma maior germinação sem GA<sub>3</sub> (75%) (Fig. 22C).

Sem GA<sub>3</sub> houve uma melhoria na germinação de KpA para KpB e de KpB para KpC (maior para tamanhos maiores e maior agregação dos frutos e anteriormente seus ovários) (Fig. 22C).

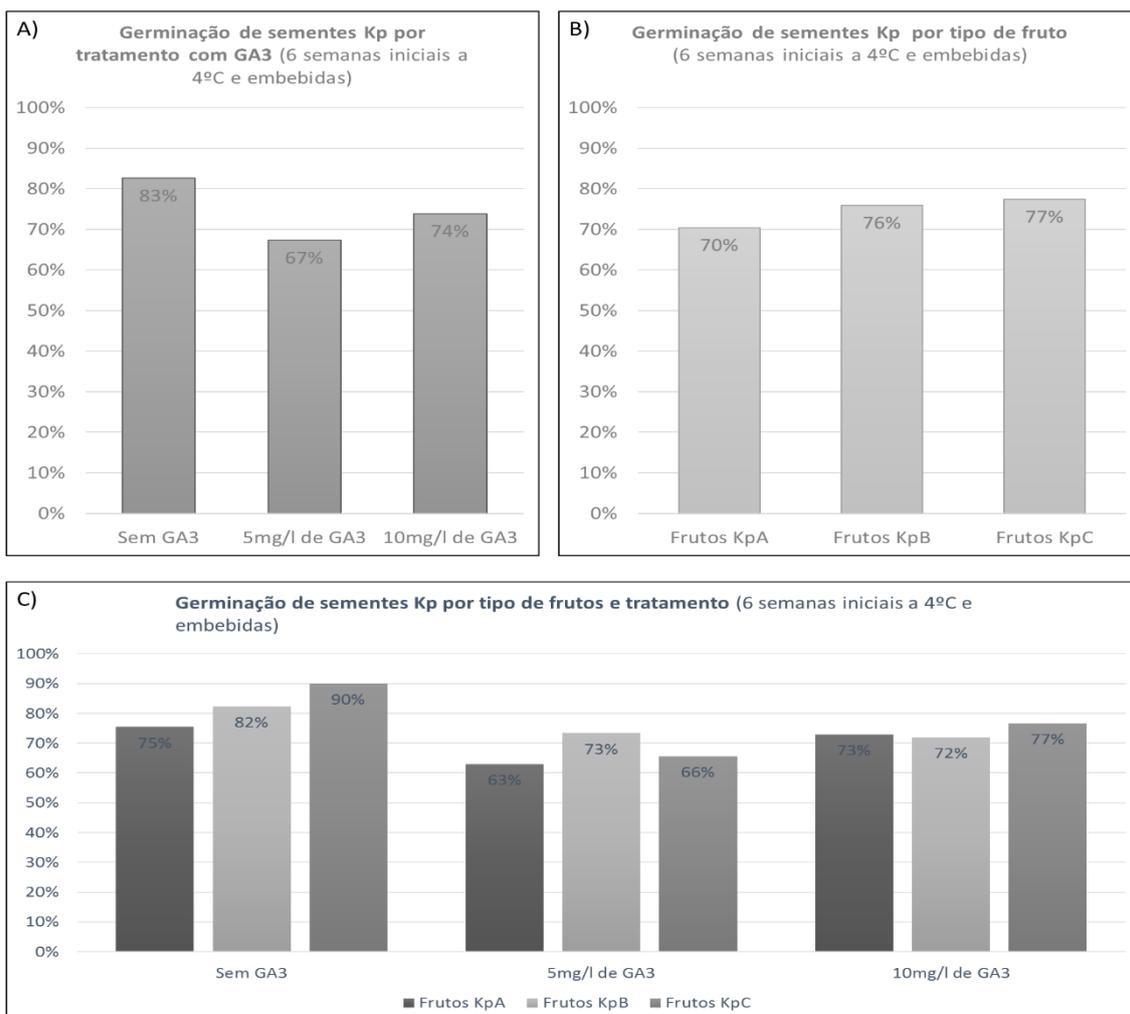


Figura 22 - Ensaio de germinação consoante a concentração a concentração de GA<sub>3</sub> e tipo de fruto. A: Taxa de germinação Kp consoante a concentração GA<sub>3</sub>. B: Taxa de germinação consoante o tipo de fruto (KpA, KpB, KpC). C: Germinação de sementes para cada concentração de GA<sub>3</sub> em cada tipo de frutos (KpA, KpB e KpC). Os resultados foram obtidos após 35 dias de cultura e foram inoculadas 30 sementes por tratamento.

Ainda foi estimada a taxa de germinação Kp em cada concentração GA<sub>3</sub> (Fig. 22A) e a taxa de germinação em cada tipo de fruto (Fig. 22B). A melhor taxa de germinação aconteceu em meios sem GA<sub>3</sub>, seguida por 10 mg/l de GA<sub>3</sub> (83%) (Fig. 22A). As sementes dos frutos KpC (77%) permitiram obter as melhores taxas de germinação, seguidos dos KpB. No entanto, os frutos KpA também permitiram uma taxa de germinação considerável de 70% (Fig. 22B).

### 3.2. Micropropagação de *A. deliciosa* (clones K2 e K3)

Na micropropagação, uma maior produção do número de nós e de rebentos caulinares acompanhado por um maior crescimento do caule, possibilita um maior número de réplicas na repicagem seguinte e consequentemente a obtenção final de mais

plantas clonadas. Nos nossos ensaios recorreu-se a BAP e ao GA<sub>3</sub> que quando combinados se revelaram eficazes na propagação (Fig. 23).

Nos ensaios em que se utilizou 1 mg/l de BAP + 10 mg/l de GA<sub>3</sub> ou 1mg/l de BAP + 15 mg/l de GA<sub>3</sub> verificou-se um maior crescimento do caule tanto em fêmeas como em machos, mas nos machos este crescimento já era notório para 1 mg/l de BAP + 5 mg/l de GA<sub>3</sub> (Fig. 23).

Quanto à produção de nós, os melhores resultados foram obtidos no meio contendo 1 mg/l de BAP + 10mg/l de GA<sub>3</sub> (Fig. 23). No K3 com a concentração 1mg/l de BAP+10mg/l de GA<sub>3</sub> conseguiu melhores resultados. No K2, também se obtiveram mais nós em 1mg/l de BAP+10mg/l de GA<sub>3</sub> (Fig. 23).

Na formação de rebentos em K2 ocorreu um maior nº de rebentos em 1mg/l de BAP+10mg/l de GA<sub>3</sub> e 1mg/l de BAP+15mg/l de GA<sub>3</sub> com valores aproximados. Neste, o controlo (sem factores de crescimento adicionados ao meio) obteve menos rebentos (Fig. 23). No clone K3, a combinação 1mg/l de BAP + 15mg/l de GA<sub>3</sub> destacou-se com mais rebentos e o controlo teve menos rebentos (Fig. 23).

No K2 e K3, estimou-se uma maior formação de rebentos em meios mais enriquecidos com factores de crescimento. Ocorreu um aumento significativo do nº de rebentos do controlo para a adição de BAP, potenciada pela adição de GA<sub>3</sub> nas maiores concentrações (Fig. 23).

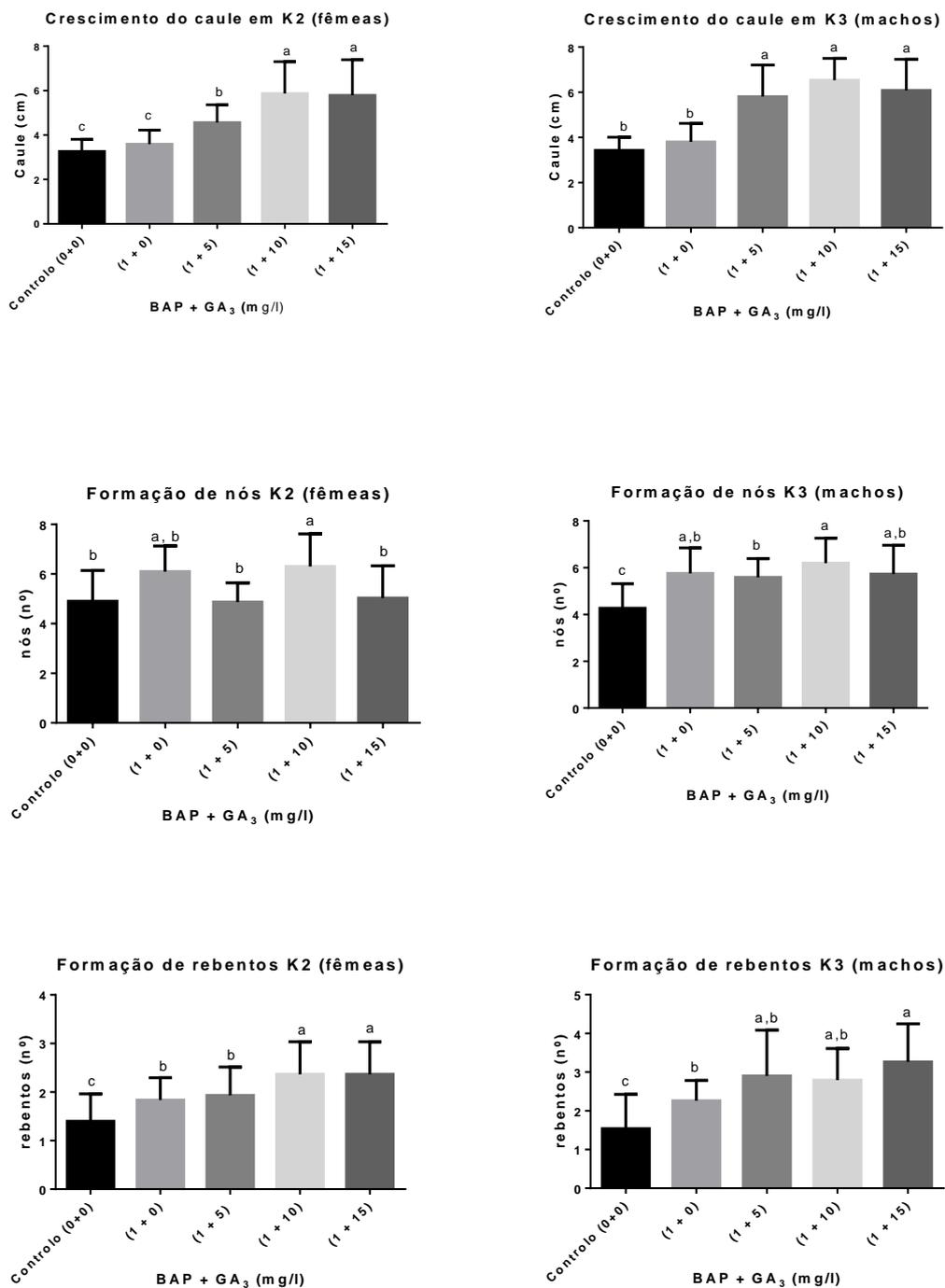


Figura 23 – Efeito da BAP e do GA<sub>3</sub> na micropropagação de K2 (fêmeas) e K3 (machos). Teste estatístico usado: ANOVA (resultados significativamente diferentes). As barras assinaladas com letras diferentes indicam que existem diferenças significativas entre os tratamentos ( $P < 0,05$ ). Para cada tratamento foram utilizados 30 explantes e os resultados registados após 30 dias de cultura.

### **3.3. Indução de organogénese**

#### **3.3.1. Organogénese em K2 e K3**

Neste ensaio, avaliaram-se os seguintes parâmetros; expansão do explante, formação de calo, o número de explantes com rebentos, e o número de rebentos total em cada tratamento/grupo de explantes (Fig. 24). Em todas os tratamentos com BAP e NAA ocorreu o aumento dos explantes com expansão em relação ao controlo. Os ensaios também mostraram uma redução da senescência em K2 e K3 na presença simultânea de BAP e NAA. A formação de calos é elevada a partir de 0,5 mg/l de BAP nas fêmeas, e vai aumentando com o aumento de BAP nos machos, mais acentuadamente a partir de 1 mg/l de BAP. O número de explantes com rebentos foi maior para 3 mg/l de BAP em K2 e maior para 1mg/l de BAP em K3 (Fig. 24A).

Já o número de rebentos totais obtidos num conjunto de 36 explantes foi maior para a concentração de 1 mg/l de BAP com NAA em ambos K2 e K3 (Fig. 24B). Este resultado, permitiu optar por aplicar esta concentração em ensaios futuros de organogénese noutras linhas de kiwi estudadas neste trabalho.



Figura 24 – Comportamento dos segmentos foliares durante o processo de indução de organogênese em K2 e K3. Para cada tratamento foram utilizados 36 explantes e os resultados registados após 42 dias de cultura. A) Organogênese em percentagem para a senescência, expansão foliar, presença de calos e explantes com rebentos; B) Número médio de rebentos.

Como os resultados obtidos nos ensaios com K2 e K3 não passaram no teste de normalidade procedeu-se a uma análise estatística não paramétrica usando o teste de Kruskal – Wallis, de forma a determinar a existência de diferenças estatisticamente significativas para os parâmetros analisados.

Os resultados quanto à produção de rebentos obtidos na concentração de 3 mg/l de BAP com NAA foram maiores para K2 neste teste Kruskal – Wallis (Fig. 25) em concordância com a percentagem de explantes com rebentos, mas a média do nº de rebentos por explante foi maior para 1 mg/l de BAP com NAA (Tabela 1). Neste clone, e neste teste não paramétrico os resultados foram semelhantes entre 3 mg/l de BAP e 1 mg/l de BAP e entre 1 mg/l de BAP e 2 mg/l de BAP, os quais são distintos do controlo e de

0,5 mg/l de BAP. Já o controlo e 0,5 mg/l de BAP tem resultados menores e semelhantes entre si (Fig. 10).

Formação de rebentos em K2 (organogénese)

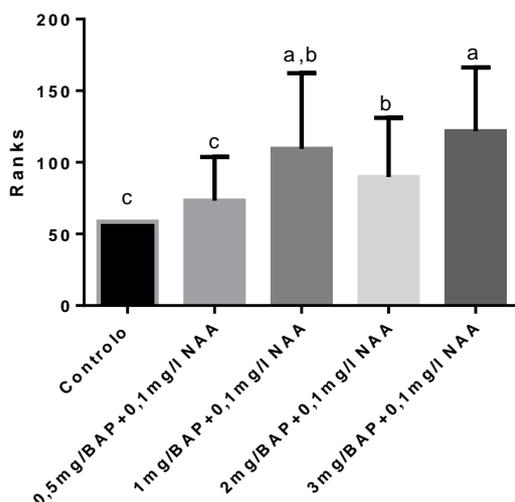


Figura 25- Organogénese em segmentos foliares de K2 (fêmeas). As letras iguais identificam semelhanças na formação de rebentos entre os ensaios (resultados significativamente diferentes). Teste de Kruskal – Wallis com resultado de 48,18 ( $P < 0,05$ ). Para cada tratamento foram utilizados 36 explantes e os resultados registados após 42 dias de cultura. Na formação de rebentos por organogénese em K2, as médias para nº de rebentos formados por explante em cada tratamento foram:  $0,36 \pm 0,80$  (0,5 mg/BAP + 0,1 mg/l NAA),  $3,25 \pm 4,18$  (1 mg/BAP + 0,1 mg/l NAA),  $1,17 \pm 2,44$  (2 mg/BAP + 0,1 mg/l NAA), e  $2,8 \pm 2,65$  (3 mg/BAP + 0,1 mg/l NAA). Nos controlos não se obtiveram rebentos.

A produção de rebentos obtidos na concentração de 1 mg/l de BAP com NAA foi maior para K3 neste teste Kruskal – Wallis (Fig. 26) em concordância com o nº de explantes com rebentos, e com a média do nº de rebentos por explante foi maior. Os resultados foram semelhantes entre 1 mg/l de BAP e 2 mg/l de BAP e 3 mg/l de BAP, os quais são distintos do controlo e de 0,5 mg/l de BAP. O controlo e 0,5 mg/l de BAP tem resultados semelhantes entre si (Fig. 26).

### Formação de rebentos em K3 (organogénese)

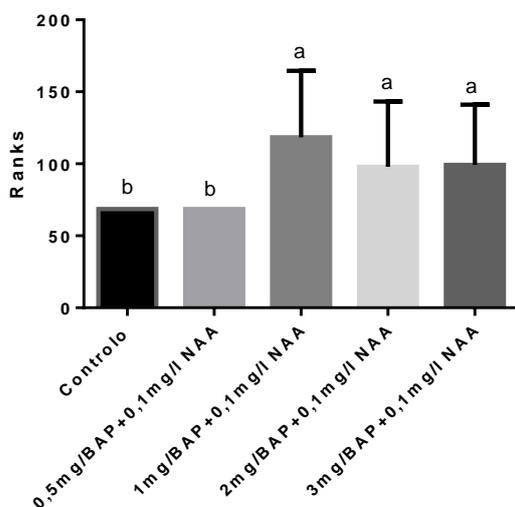


Figura 26- Produção de rebentos por organogénese em corte foliar no clone K3 (macho). As letras iguais identificam semelhanças na formação de rebentos entre os ensaios (resultados significativamente diferentes). Teste de Kruskal – Wallis com resultado 43,80 ( $P < 0,05$ ). Para cada tratamento foram utilizados 36 explantes e os resultados registados após 42 dias de cultura. Na formação de rebentos por organogénese em K3, as médias para nº de rebentos formados por explante em cada tratamento foram:  $2,11 \pm 2,95$  (1 mg/BAP + 0,1 mg/l NAA),  $1,75 \pm 3,42$  (2 mg/BAP + 0,1 mg/l NAA), e  $0,83 \pm 1,34$  (3 mg/BAP + 0,1 mg/l NAA). Os controlos e o ensaio 0,5 mg/BAP + 0,1 mg/l NAA.

### 3.3.2. Organogénese em KG e Ks

Nas linhas Ks (*A. deliciosa*) e KG (*A. chinensis*), os ensaios de organogénese (1 mg/l de BAP e 0,1 mg/l de NAA) realizaram-se a seguir à indução de poliplóidia com colquicina. Os explantes utilizados foram segmentos foliares e peciolares. Os explantes destas espécies têm genomas diferentes porque tem origem em diferentes sementes. Na figura 30, é possível observar explantes senescentes e explantes expandidos (aumentam de tamanho) com rebentos formados a partir de calo (organogénese indirecta).

Segundo o teste Kruskal – Wallis (resultado: 11,30), os resultados dos controlos não são significativamente diferentes para os quatro grupos de explantes (folha de KG, pecíolo de KG, folha de Ks, pecíolo de Ks) sugerindo semelhanças na produção de rebentos por organogénese nestes quatro tipos de amostras (Fig. 27).

Também foi avaliada o impacto de pré-tratamentos de colquicina na indução de organogénese com o fim de obter bastantes rebentos a partir de pouco material e

consequentemente encontrar rebentos com plóidia duplicada. A taxa de explantes com rebentos é bem maior no controlo (sem colquicina), em especial na folha KG. Para os ensaios de colquicina a 0,05% e 0,1% os explantes com rebentos são muito menos. O pecíolo Ks é a que perde menos explantes na presença de colquicina (Fig. 29).

O numero de rebentos total em cada grupo de explantes foi claramente superior no controlo, diminuindo drasticamente na presença de colquicina. Na concentração de 0,05%, os rebentos foram ligeiramente menos que em 0,1% em todos os grupos de explantes. No controlo corte foliar KG e pecíolos Ks ocorreram mais rebentos. Na presença da colquicina os rebentos ocorreram mais no Pecíolo Ks e menos na Folha KG (Fig. 28).

Numa colquicina a 0,05% a produção de rebentos é maior em pecíolos Ks, e semelhante entre cortes foliares KG e pecíolos KG. A produção de rebentos em folha Ks aproxima-se das produções obtidas nos pecíolos KG e Ks em 0,05%. Nos ensaios com 0,1% de colquicina, de acordo com este teste, a formação de rebentos é idêntica entre cortes foliares KG e Ks e pecíolos KG, enquanto os pecíolos Ks têm mais capacidade de produção de rebentos destacando-se dos outros explantes (Fig. 28).

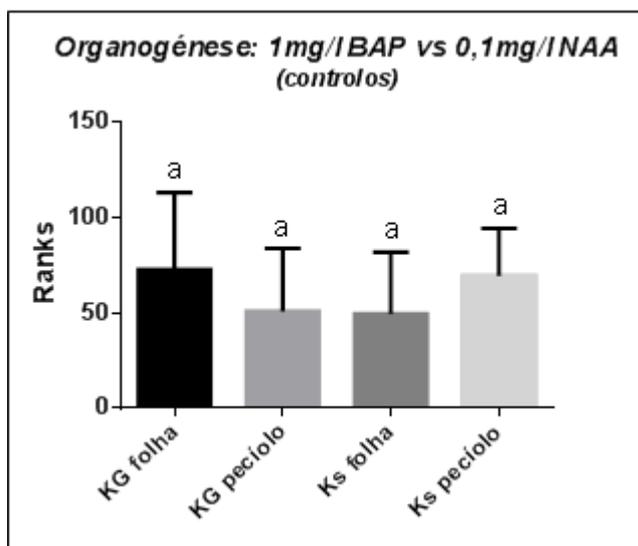


Figura 27- Organogênese para os controlos em segmentos foliares de KG e Ks e pecíolos de KG e Ks. Teste de Kruskal – Wallis ( $P < 0,05$  – Valor P de 0,0102). Para cada tratamento foram utilizados 36 explantes e os resultados registados após 42 dias de cultura. Na formação de rebentos por organogênese, as médias para nº de rebentos formados por explante foram:  $9,53 \pm 9,07$  (KG folha),  $3,73 \pm 5,27$  (KG pecíolo),  $3,73 \pm 5,80$  (Ks folha) e  $5,90 \pm 6,00$  (Ks pecíolo).

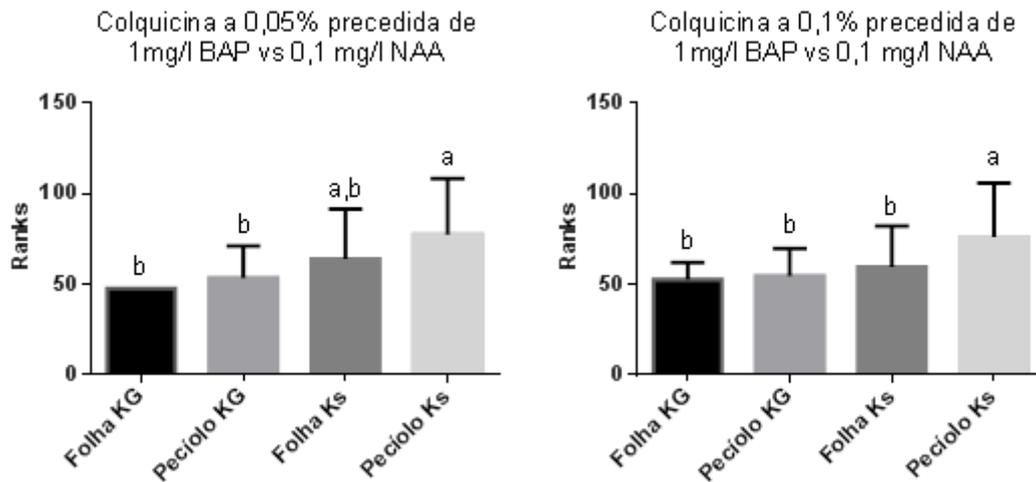


Figura 28- Rebentos formados em organogênese após exposição dos grupos de explantes Ks e KG nas concentrações 0,05% e 0,1% de colquicina. Teste de Kruskal – Wallis. Com resultado de 24,83 em colquicina a 0,05% e de 20,42 em colquicina a 0,1% ( $P < 0,05$ ). Para cada tratamento foram utilizados 36 explantes e os resultados registados após 60 dias de cultura. Na formação de rebentos por organogênese, as médias para nº de rebentos formados por explante na colquicina a 0,05% foram:  $0,17 \pm 0,59$  (KG pecíolo),  $0,60 \pm 1,22$  (Ks folha) e  $0,97 \pm 1,19$  (Ks pecíolo) e em 'KG folha' não ocorreram rebentos. E na colquicina a 0,1% foram:  $0,03 \pm 0,10$  (KG folha)  $0,20 \pm 0,92$  (KG pecíolo),  $0,67 \pm 1,79$  (Ks folha) e  $1,20 \pm 1,94$  (Ks pecíolo) e em 'KG folha' não ocorreram rebentos. Letras diferentes indicam diferenças significativas.

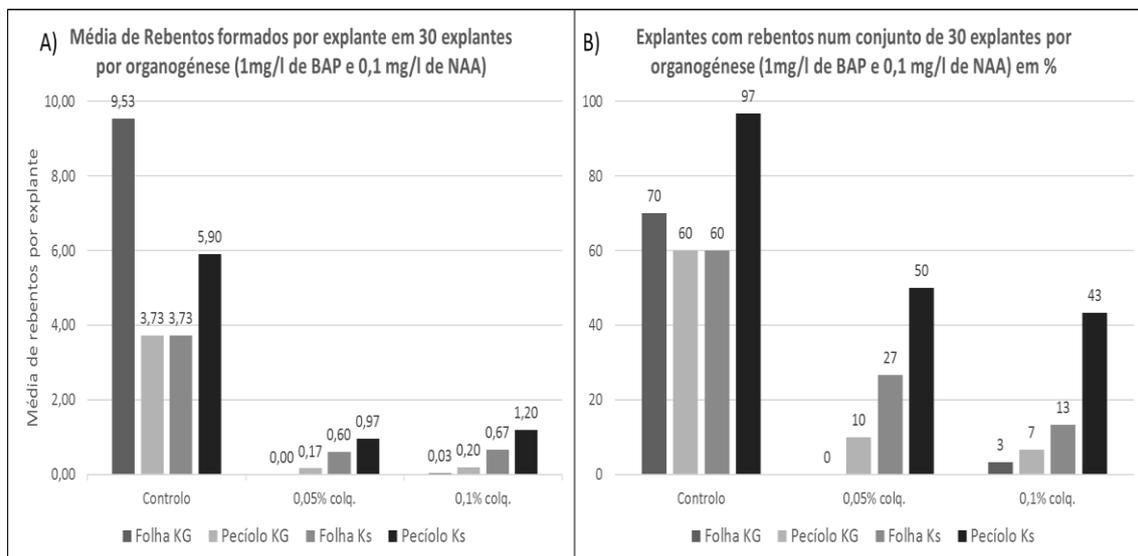


Figura 29- Organogênese (1mg/l de BAP e 0,1 mg/l de NAA) após indução de poliplóides com colquicina em Folha KG, Pecíolo KG, Folha Ks e Pecíolo Ks. A) Média de rebentos formados por explante. B) Taxa de explantes com rebentos. Resultados registados ao fim de 60 dias para 30 explantes de cada ensaio.

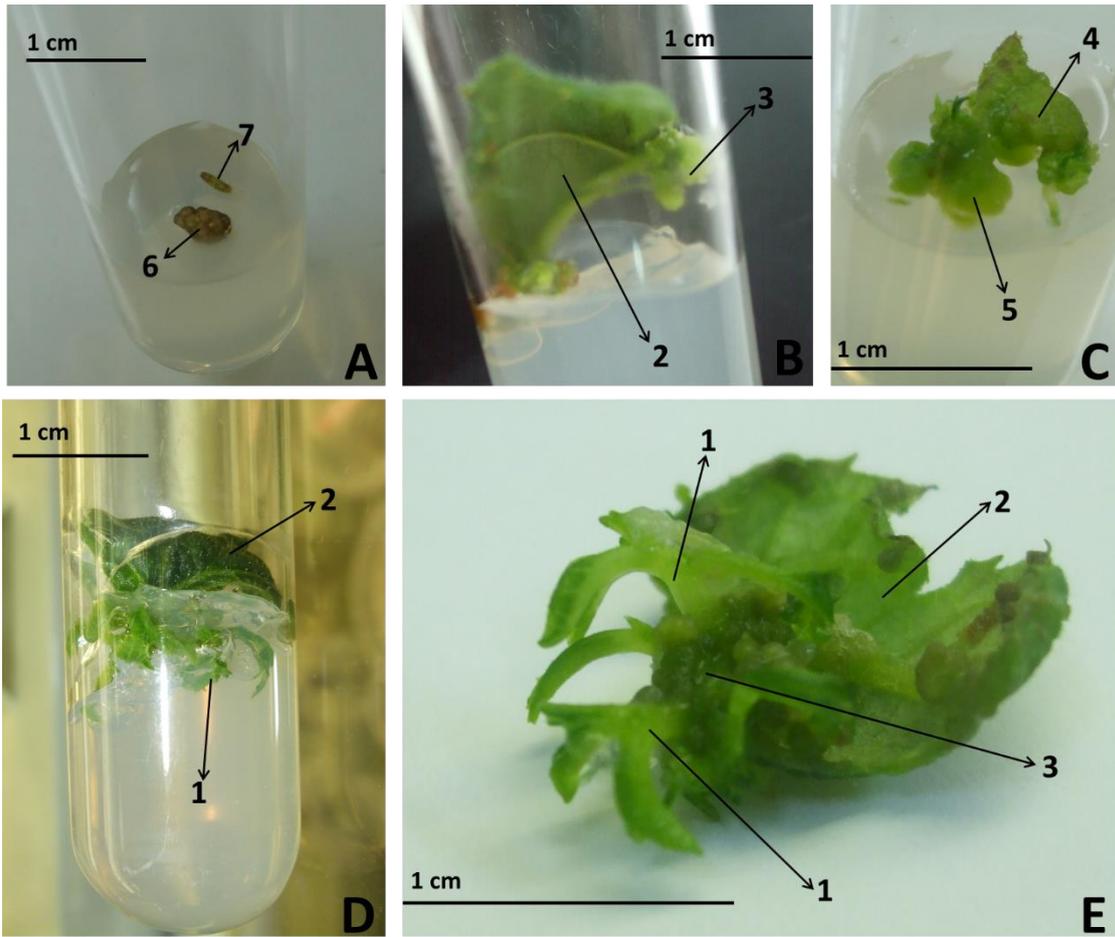


Figura 30- Indução de organogênese na presença de colquicina. A- Explantes senescentes de KG cultivados em meio com colquicina 0,05% (6-segmento foliar, 7-segmento do pecíolo); B- explante K3 com expansão foliar evidente (3- calo, 2- expansão foliar); C- explantes KG do controle em processo de organogênese (4- corte foliar expandida com calo e um rebento, 5- pecíolo expandido com calo e um rebento); D- explante foliar K3 com vários rebentos (1- rebento); E- explante foliar K2 em pormenor com vários rebentos (1), expansão foliar (2) e calo (3).

### 3.4. Enraizamento das plantas

Foi possível verificar que tanto nas fêmeas (K2) como nos machos (K3) a média de formação de raízes aumentou com o tratamento com IBA. Apesar de se formarem raízes sem choque auxínico (tratamento A) em meio MS, o processo foi mais lento. No *dipping* de 20 segundos os machos produziram mais raízes por planta em relação às fêmeas (Fig. 40). No tratamento B, o nº de plantas com raízes foi quase 100% (100% para K3 e 93% para K2) e não houve grandes diferenças entre os clones K2 e K3. No tratamento A, o clone K2 teve mais plantas com raízes do que o K3 (Fig. 40).

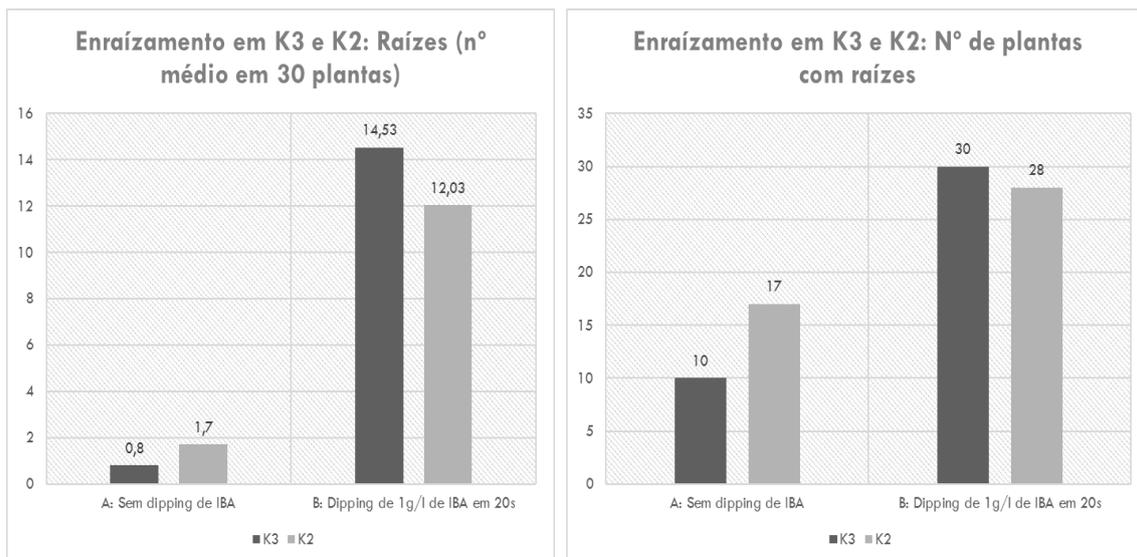


Figura 40- Enraizamento em K2 e K3 por deeping numa solução com 1 mg/l de IBA, durante 20 segundos: n° médio de raízes e n° de plantas com raízes. Após um choque auxínico com IBA os explantes foram transferidos para meio MS. O tratamento **A** (sem IBA) só foi contabilizado ao fim de 10 semanas, enquanto o tratamento **B** (1 mg/l de IBA durante 20 segundos) foi contabilizado após 5 semanas.

Tabela 7 - Enraizamento com e sem dipping em 1 g/de IBA (valores médios entre os clones K2 e K3)

<b>Crítérios de enraizamento</b>	<b>A: Sem dipping de IBA</b>	<b>B: Dipping de 1g/l de IBA em 20s</b>	
Raízes (n° médio em 30 plantas)	1,25	13,28	↑
Raiz maior (cm)	2,01	2,13	↑↓
Caule (cm)	3,70	3,19	↑↓
Folhas (n° médio em 30 plantas)	8,03	1,73	↓
N° de plantas com raízes	13,5	29	↑

Foi possível constatar que do tratamento A (sem *dipping*) para o tratamento B (com *dipping*), o aumento do número de raízes e plantas com raízes está associado a uma menor produção de folhas. O comprimento das raízes e do caule não diferem muito (Tabela 7).



Figura 41- Plantas de *A. deliciosa* dos clones K3 (A) e K2 (B) após um mês no fitoclima a 25 °C.



Figura 42- Plantas de *A. deliciosa* dos clones K3 e K2 após uma semana na estufa.

As plantas enraizadas foram transferidas para o fitoclíma. Durante o 1º mês de aclimação, a sobrevivência das plantas K3 foi de 43,3% e a sobrevivência das plantas K2 foi de 33,3% (Fig. 41). Estas foram a seguir para a estufa exterior (Fig. 42). Algumas plântulas KG e Kp germinadas *in vitro* também foram colocadas em turfa com perlite no fitoclíma, as quais se desenvolveram bem na sua maioria. Houve algumas mortes nas Kp, mas as KG não se secaram, no primeiro mês (Fig. 43).



Figura 43- Plantas de *A. chinensis* (KG) e *A. deliciosa* (Kp) após uma semana no fitoclíma.

### 3.5. Determinação do nível de ploidia dos rebentos caulinares obtidos

Os resultados mostram que os tratamentos com colchicina provocam uma maior senescência dos explantes cultivados (Fig. 31) comparativamente ao controlo. No conjunto de todos os ensaios foi possível encontrar algumas plantas com a ploidia duplicada e bastantes mixaplóides em *A. deliciosa* e *A. chinensis* (Figs. 32-34).

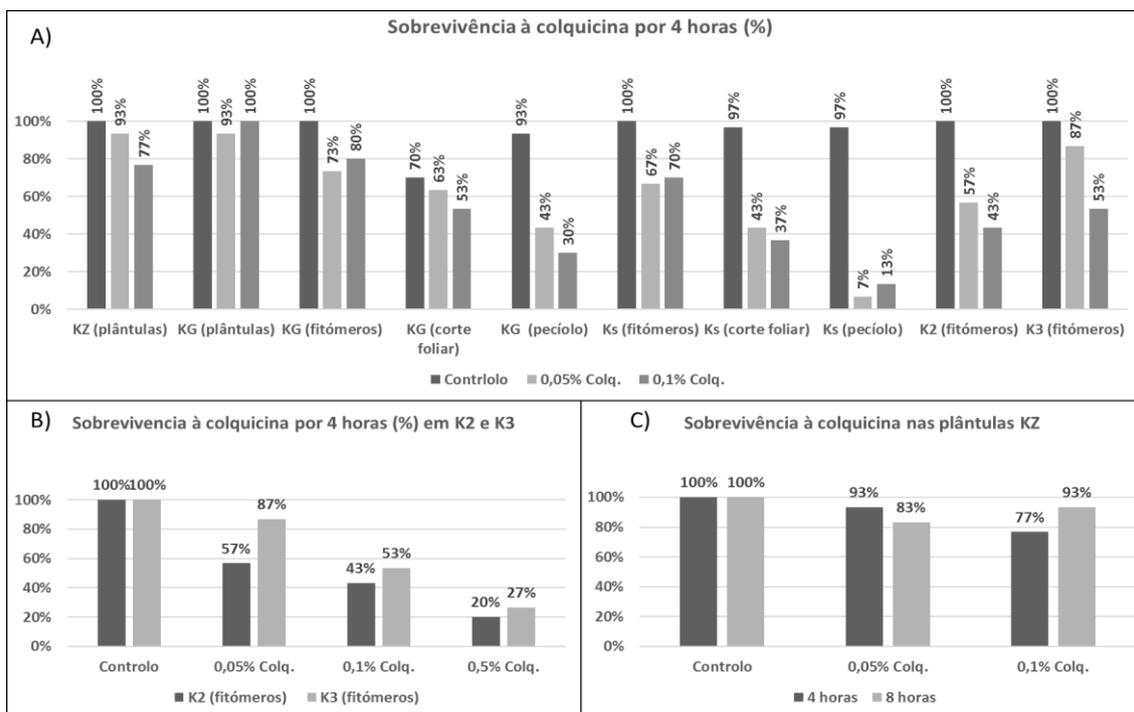


Figura 31 – Sobrevivência (%) de diferentes explantes na presença de 0,05%, 0,1% e 0,5% de colchicina durante 4 e 8 horas. A) Sobrevivência por tipos de explantes para 0,05% e 0,1% de colchicina em 4 horas. B) Sobrevivência dos K2 e K3 a 0,05%, 0,1% e 0,5% de colchicina em 4 horas. C) Sobrevivência das plântulas KZ a 0,05% e 0,1% de colchicina em 4 e 8 horas.

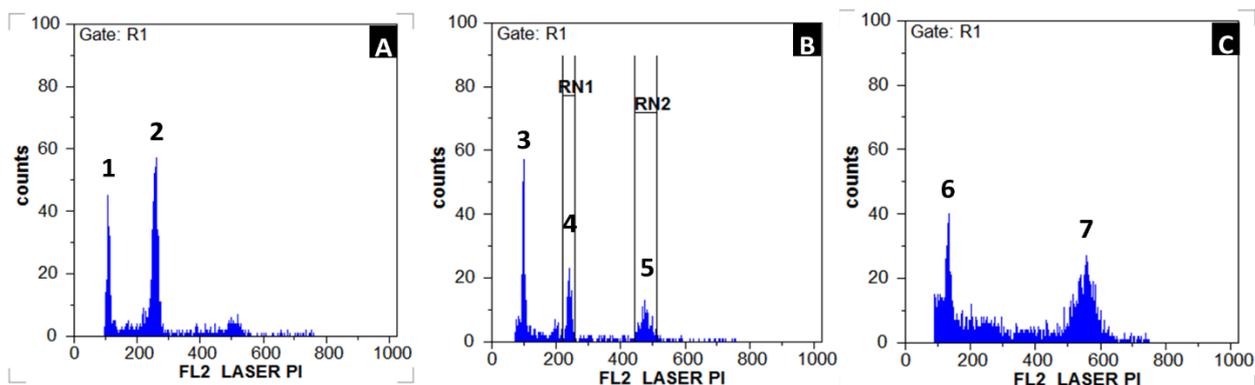


Figura 32- Citometria de fluxo em *A. deliciosa* com o padrão *Solanum lycopersicum* cv. *stupidke*. Eixo y: contagem do nº de núcleos. Eixo x: FL2 Laser PI (medida da fluorescência iodeto de propídio que corresponde ao tamanho do genoma). A- amostra de *A. deliciosa* com plóidia 6x (1- pico do padrão, 2- pico 6x da amostra). B- amostra de *A. deliciosa* mixoplóide com núcleos 6x e 12x (3- pico do padrão, 4- pico da amostra para os núcleos 6x, 5- pico da amostra para os núcleos 12x). C- amostra de *A. deliciosa* com plóidia 12x (6- pico do padrão, 7- pico 12x da amostra).

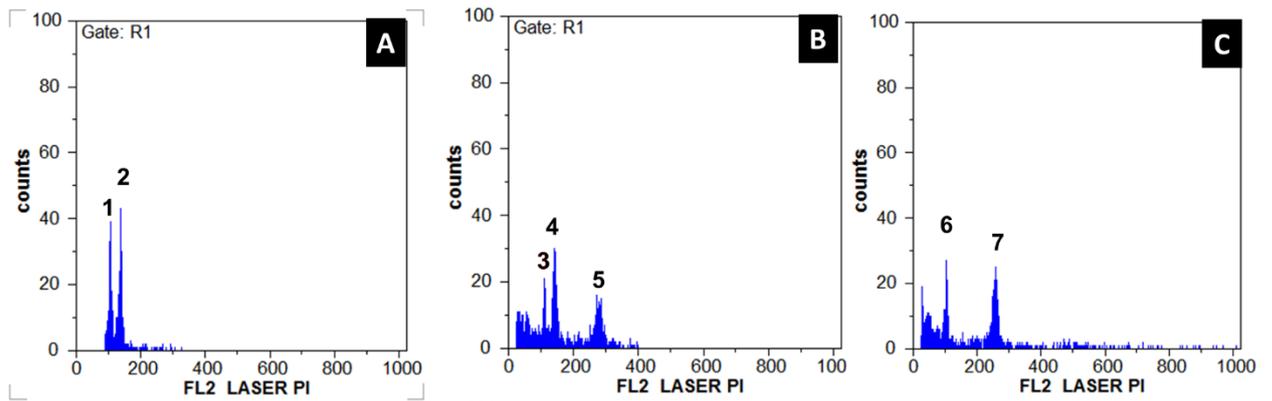


Figura 33- Citometria de fluxo em *A. deliciosa* com o padrão *Bellis perennis*. Eixo *x*: contagem do nº de núcleos. Eixo *y*: FL2 Laser PI (medida da fluorescência iodeto de propídio que corresponde ao tamanho do genoma). A- amostra de *A. deliciosa* com plóidia 6x (1- pico do padrão, 2- pico 6x da amostra). B- amostra de *A. deliciosa* mixaplóide com núcleos 6x e 12x (3- pico do padrão, 4- pico da amostra para os núcleos 6x, 5- pico da amostra para os núcleos 12x). C- amostra de *A. deliciosa* com plóidia 12x (6- pico do padrão, 7- pico 12x da amostra).

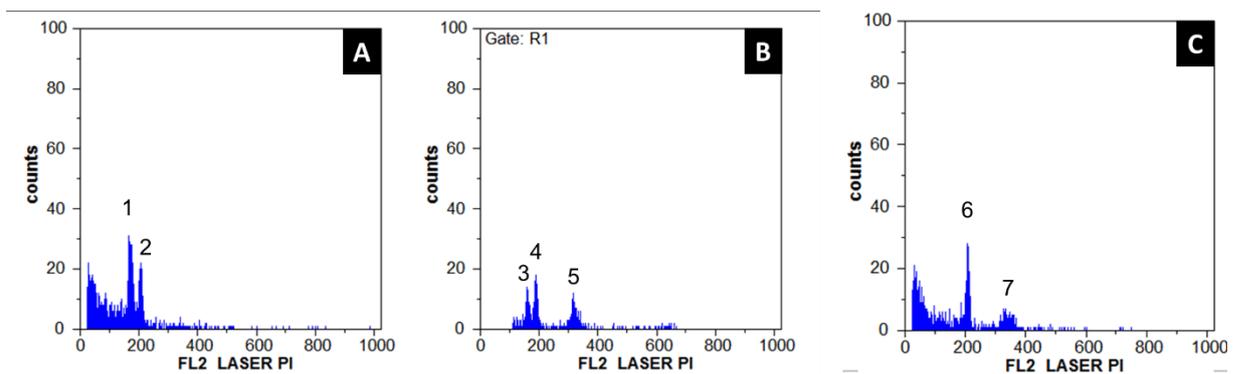


Figura 34- Citometria de fluxo em *A. chinensis* com o padrão *Bellis perennis*. Eixo *x*: contagem do nº de núcleos. Eixo *y*: FL2 Laser PI (medida da fluorescência iodeto de propídio que corresponde ao tamanho do genoma). A- amostra de *A. chinensis* com plóidia 6x (1- pico do padrão, 2- pico 6x da amostra). B- amostra de *A. chinensis* mixaplóide com núcleos 6x e 12x (3- pico do padrão, 4- pico da amostra para os núcleos 6x, 5- pico da amostra para os núcleos 12x). C- amostra de *A. chinensis* com plóidia 12x (6- pico do padrão, 7- pico 12x da amostra).

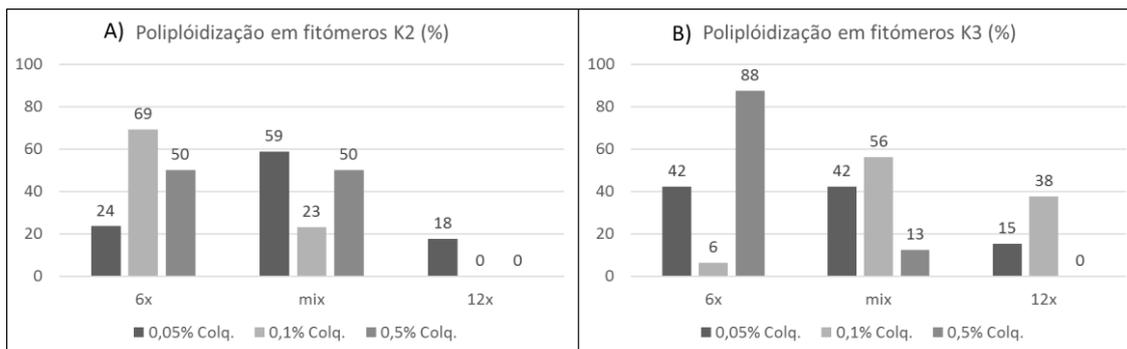


Figura 35- Efeito da colquicina a 0,05% e 0,1% e 0,5% na plóidia de fitómeros K2 e K3, em meio MS líquido durante 4 horas. Níveis de plóidia expressos em percentagens. A) Efeito da colquicina em K2 (fêmeas); B) Efeito da colquicina em K3 (machos).

O aumento da concentração de colquicina não permitiu obter mais dodecaplóides ou mixoplóides. Aliás, a concentração de colquicina mais baixa (0,05%) foi a única capaz de obter plantas dodecaplóides nestas fêmeas (K2) embora se tenham obtido muitos mixoplóides (até 59% em 0,05% de colquicina). Os mixoplóides diminuíram com o aumento da concentração de colquicina (Fig. 35A). Nos machos K3 apenas em 0,05% e 0,1% de colquicina se encontram dodecaplóides (ploidia 12x). Os mixoplóides também são mais comuns para 0,05% e 0,1% de colquicina (Fig. 35B).

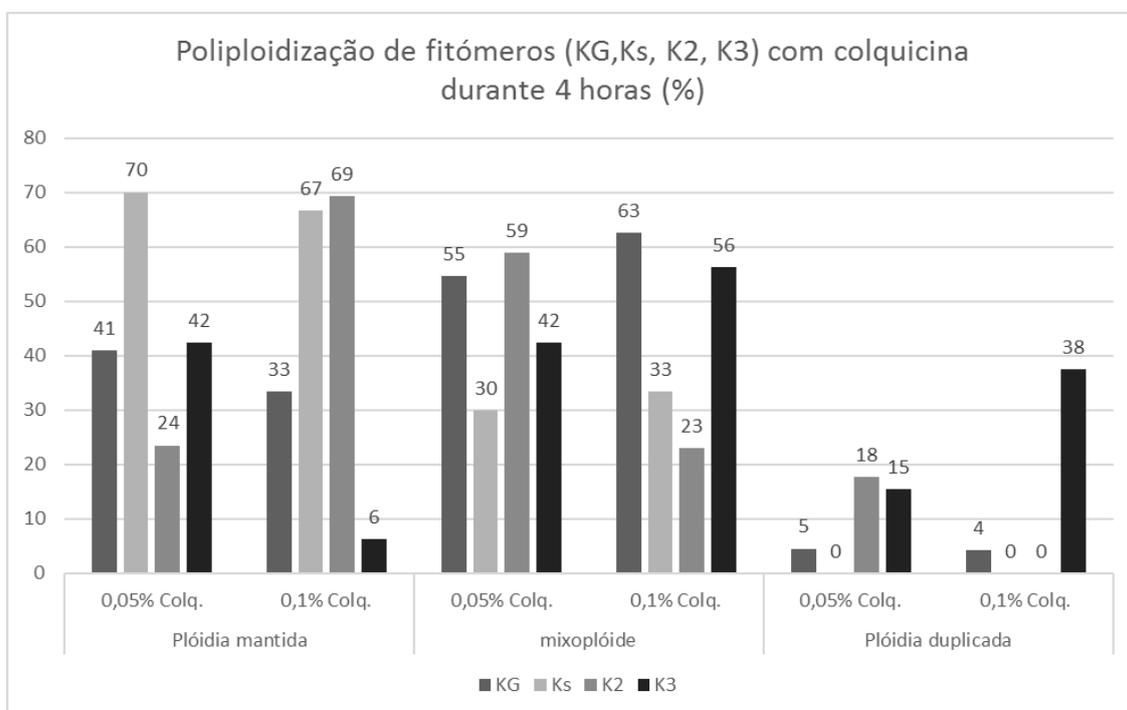


Figura 36- Efeito da colquicina a 0,05% e 0,1% nos fitómeros K2 e K3 em meio MS líquido e nos KG e Ks em solução, durante 4 horas.

Nos fitómeros KG, concentrações de colquicina induziram 5% e 4%, e os tetraplóides foram ligeiramente menores na maior concentração de colquicina aplicada ao contrário dos mixoplóides que ocorreram um pouco mais em 0,05%. Nos fitómeros Ks, em ambas as concentrações não ocorreram dodecaplóides, mas houve 30% e 33% de mixoplóides em 0,05% e 0,1% de colquicina (Figura 36).

A percentagem de espécimes que apresentou ploidia duplicada nos fitómeros foi maior para K3 (machos) a 0,1% de colquicina chegando a uma taxa de duplicação de 38%. A maior percentagem de mixoplóides foi obtida com KG (63%) para uma concentração de colquicina a 0,1%. O nível de ploidia duplicada e mixoplóides variou bastante entre os quatro tipos de explantes. Os ensaios com exposição a soluções de colquicina sem meio MS e sem agitação têm menos indivíduos com ploidia duplicada do que aqueles ensaios com inclusão de agitação e meio MS nas soluções de colquicina.

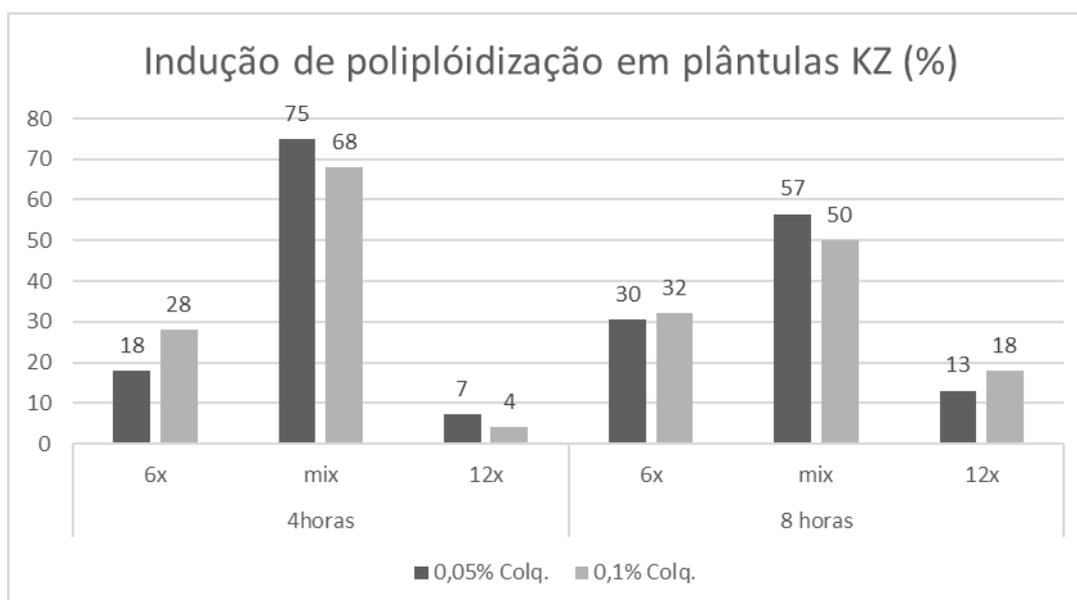


Figura 37- Efeito das soluções de colquicina a 0,05% e 0,1% na plóidia de plântulas KZ num período de 4 horas e 8 horas.

Nas plântulas KZ obtiveram-se 75% de mixoplóides a 0,05% de colquicina e foi possível obter dodecaplóides nas duas concentrações. As melhores percentagens de dodecaplóides ocorreram para 0,05% e 0,1% de colquicina com 13% e 18% nas 8 horas e para 0,05% de colquicina com 7% nas 4 horas. (Fig. 37).

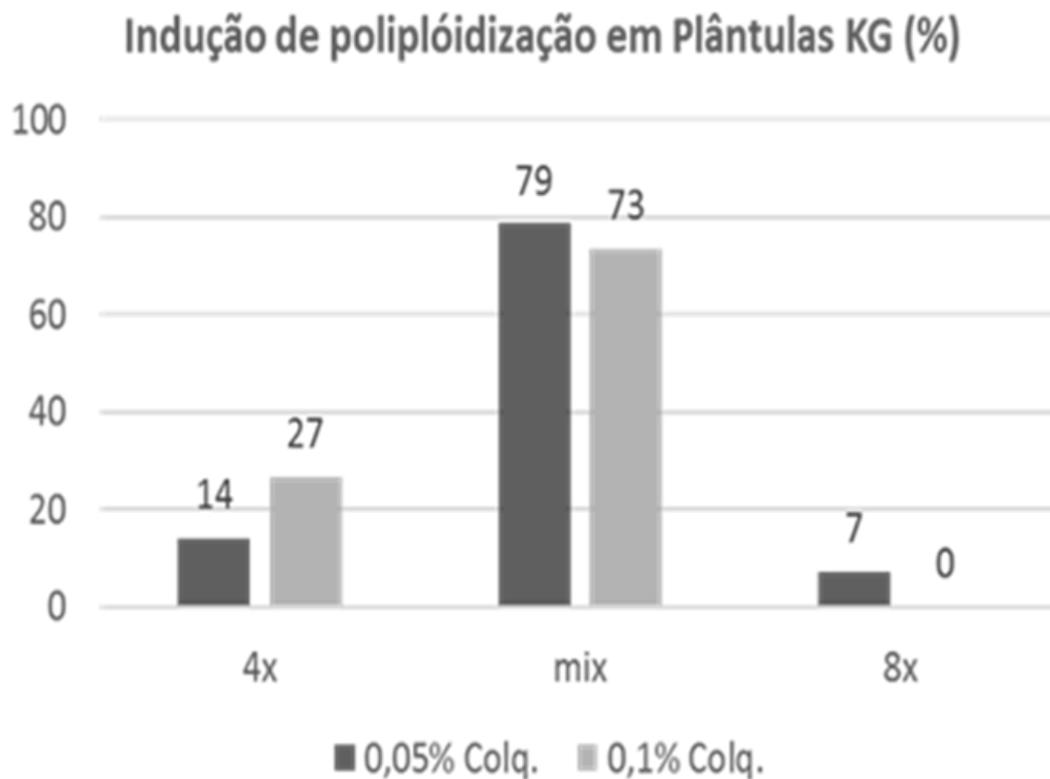


Figura 37- Variação da plóidia (%) em plântulas KG consoante a aplicação de colquicina a 0,05% e a 0,1% durante 4 horas.

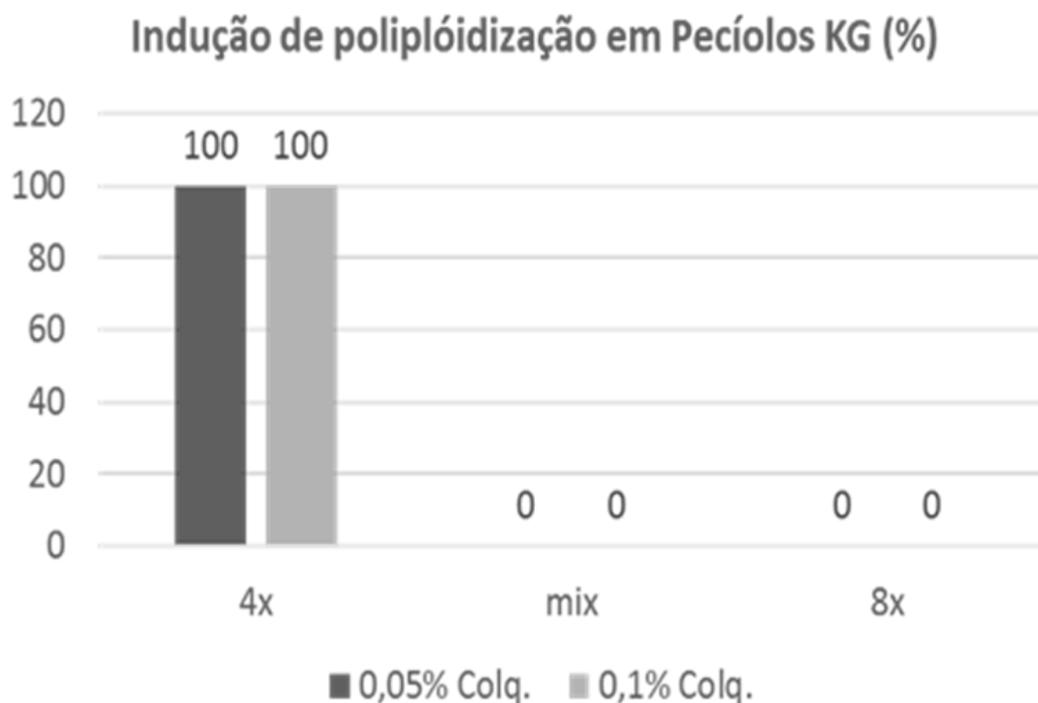


Figura 38- Variação da plóidia (%) pecíolos KG consoante a aplicação de colquicina a 0,05% e a 0,1% durante 4 horas.

Nas plântulas KG (*A. chinensis* 4x), houve 7% de octoplóides, 79% de mixoplóides na concentração de 0,05% de colquicina e 73% de mixoplóides para colquicina a 0,1%. Os restantes indivíduos mantiveram-se tetraplóides (Figura 37). Nos pecíolos KG não se formaram mixoplóides nem octoplóides, pelo que se mantiveram tetraplóides. É possível verificar uma menor ocorrência de octaplóides e ausência de mixoplóides a partir de explantes sujeitos à indução de organogénese após exposição à colquicina (Fig. 38).

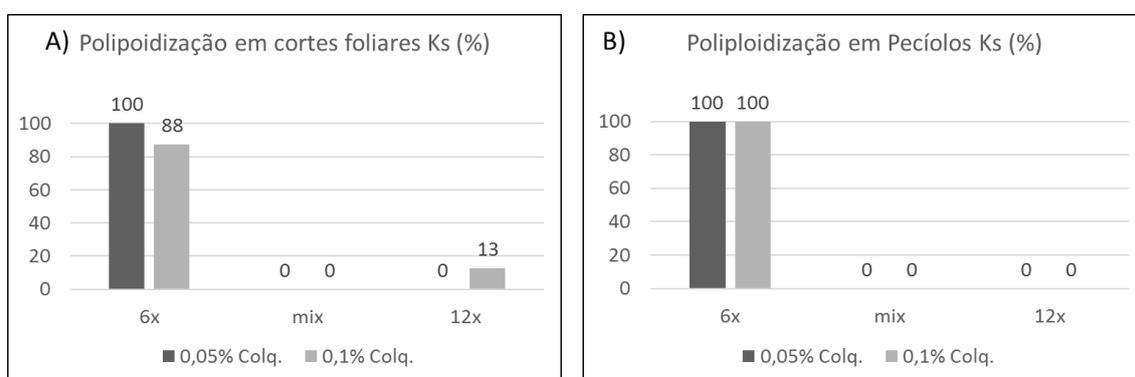


Figura 39- Efeito das soluções de colquicina a 0,05% e 0,1% na plóidia de três tipos de explantes Ks durante 4 horas, com organogénese posterior. A) Efeito em segmentos foliares Ks B); Efeito em pecíolos Ks.

Nos pecíolos Ks, todos os rebentos ocorridos e analisados mostraram ser hexaplóides. Os rebentos provenientes dos segmentos foliares Ks também tinham quase todos ploidia hexaplóide, mas ainda se conseguiu 13% de dodecaplóides no ensaio de colquicina a 0,1%. Neste caso, não se verificou a ocorrência de mixoplóides (Fig. 39).

### 3.6. Avaliação da viabilidade do pólen de *A. deliciosa*

Após acetólise do pólen, foi possível visualizar três colpos em *A. deliciosa* (Fig. 44). Os grãos de pólen quando colocados em meio base sólido suplementado com sacarose germinaram mais facilmente formando também um tubo polínico mais longo (Fig. 45).

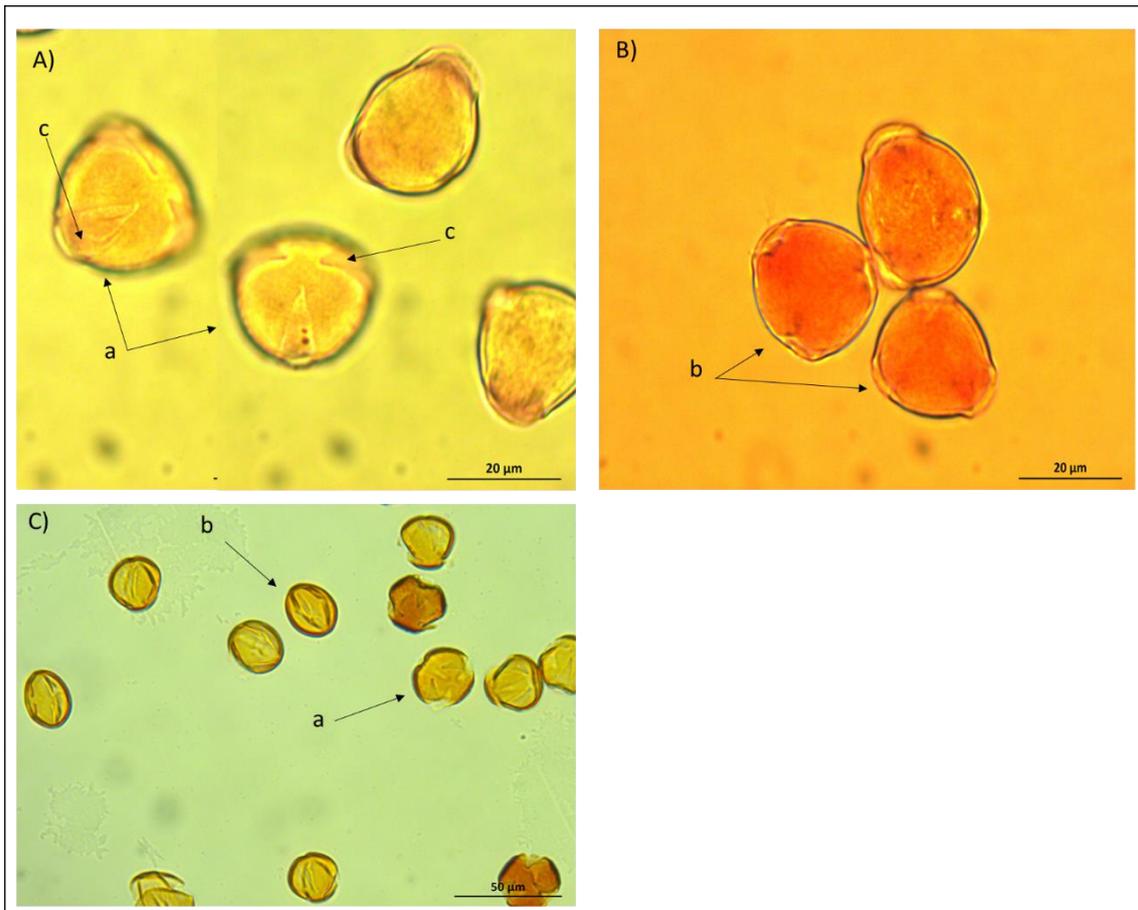


Figura 44- Observação de grãos de pólen acetolisados ao microscópio óptico. A) Grãos de pólen com 3 colpos evidentes em perspectiva polar, escala para 20μm; B) Perspectiva polar dos grãos de pólen, escala para 20μm; C) Perspectiva polar e equatorial dos grãos de pólen, escala para 50μm. Legenda: a- perspectiva polar, b- perspectiva equatorial, c- colpos.

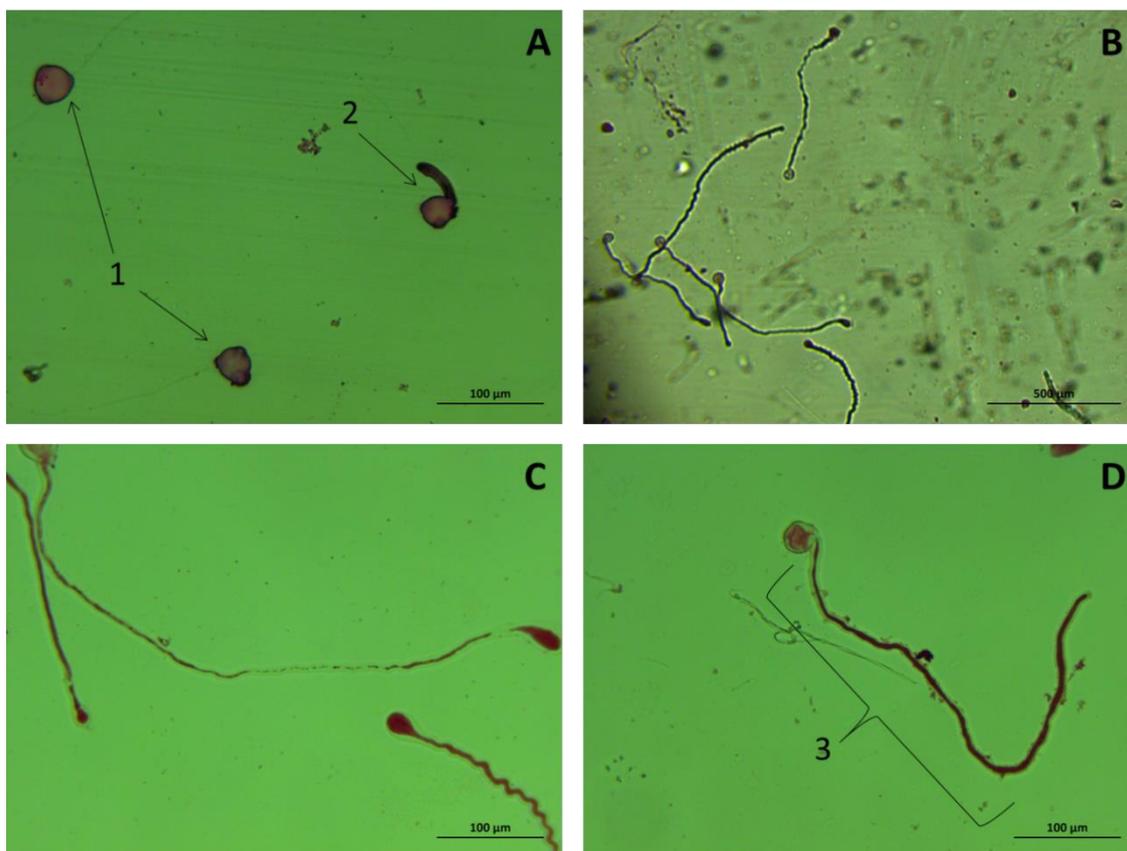


Figura 45- Observação ao microscópio óptico de grãos de pólen colocados a germinar em meio de germinação base com sacarose e corados com carmim acético. A - Pólen germinado em meio base com 0% de sacarose durante 24 horas; B e C- Pólen germinado em meio base com 6% de sacarose durante 6 horas; D- Pólen germinado em meio base com 9% de sacarose durante 6 horas; 1- Grão de pólen não germinado; 2- Grão de pólen germinado; 3- Tubo polínico de um grão de pólen germinado.

No ensaio de germinação do pólen, os melhores resultados foram obtidos em meio com sacarose a 6% nas 24h. A adição de GA<sub>3</sub> permitiu taxas de germinação muito mais elevadas do que sem GA<sub>3</sub>, especialmente quando utilizado nas concentrações de 10 e 100 mg/l (Fig.46).

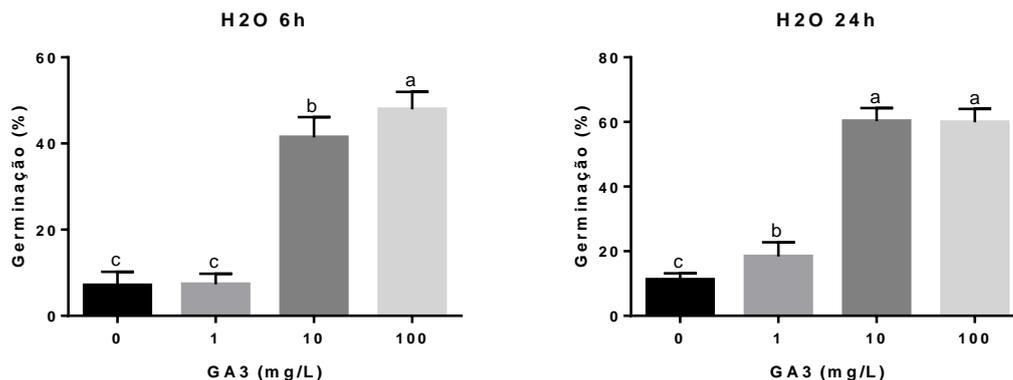


Figura 46- Percentagem de germinação de acordo com a concentração de GA<sub>3</sub> (mg/l) em H<sub>2</sub>O (àgar dissolvido em água sem sacarose nem meio base) durante 6 e 24 horas. Teste estatístico usado: ANOVA. As barras assinaladas com letras diferentes indicam que existem diferenças significativas entre os tratamentos (P < 0,05). Para cada tratamento foram contados 100 grãos de pólen de 10 amostras e os resultados registados.

A germinação do pólen sem a adição de GA<sub>3</sub> aumenta substancialmente na sacarose a 3%, mas é na sacarose a 6% que atinge os melhores valores em 6 e 24 horas. (Fig. 47).

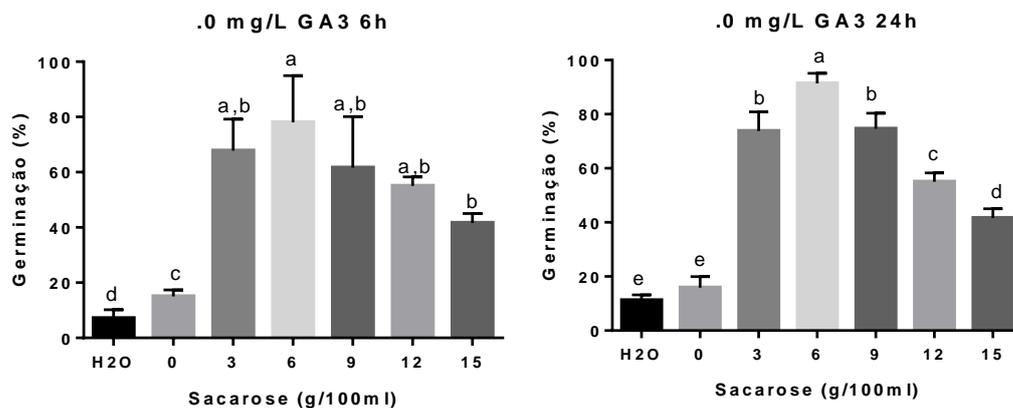


Figura 47- Percentagem de germinação de acordo com a concentração de sacarose para sem GA<sub>3</sub> em meio base durante 6 e 24 horas. Teste estatístico usado: ANOVA. As barras assinaladas com letras diferentes indicam que existem diferenças significativas entre os tratamentos (P < 0,05). Para cada tratamento foram contados 100 grãos de pólen de 10 amostras e os resultados registados.

Para 1 mg/l de GA<sub>3</sub> durante 6 horas, a maior germinação é alcançada com 6% de sacarose. De 0% até 15 % de sacarose, com exceção do 3% de sacarose as percentagens de germinação atingiram valores acima de 60%. As concentrações de 12% e 15% tem valores idênticos de germinação. Nos ensaios de germinação por um período de 24 horas em 1mg/l de GA<sub>3</sub>, a maior taxa de germinação foi conseguida com 9% (77 %). Quando o meio não tinha nutrientes, a taxa de germinação aumenta muito nas 24 horas (Fig. 48).

Numa concentração de 10 mg/l de GA<sub>3</sub>, mesmo sem adição de sacarose e nutrientes, as taxas de germinação quase chegam a atingir 60%. As melhores taxas de germinação (aproximadamente 80%) encontram-se nas concentrações de 6%, 9%, 12% e 15%. Se esperar-mos as 24 horas, as taxas de germinação das concentrações sem adição de sacarose e sem nutrientes ainda se aproximam mais dos valores elevados das restantes concentrações de sacarose (Figura 48).

Quando o meio tem 100 mg/l de GA<sub>3</sub> durante 6 horas, a germinação para o meio H<sub>2</sub>O ultrapassa os 40 %, mas é inferior para 10 mg/l de GA<sub>3</sub> em 24 horas. O GA<sub>3</sub> a 100 mg/l apresenta taxas de germinação significativamente idênticas (quase 80%) para as concentrações de 6%, 9%, 12% e 15% nas 6 horas. Se esperarmos até às 24 horas a germinação ainda sobe mais para quase todas concentrações excepto para 9% de sacarose. Com o GA<sub>3</sub>, a germinação aumenta logo no meio de H<sub>2</sub>O com 47,9% nas 6 horas e 60% nas 24 horas (Fig.48).

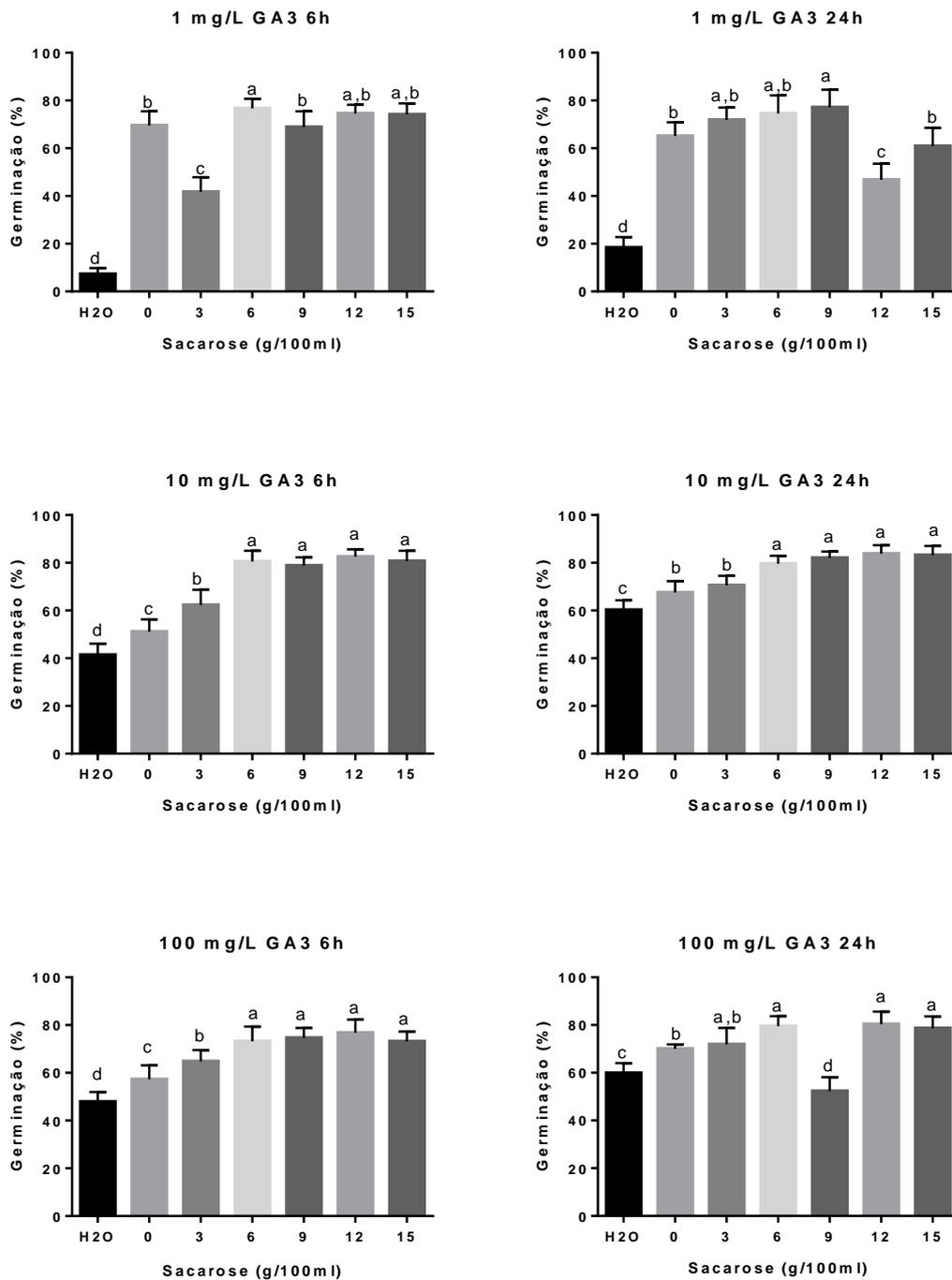


Figura 48- Percentagem de germinação de acordo com a concentração de sacarose e GA3 durante 6 e 24 horas. As barras assinaladas com letras diferentes indicam que existem diferenças significativas entre os tratamentos ( $P < 0,05$ ). Para cada tratamento foram contados 100 grãos de pólen de 10 amostras e os resultados registados.

Na polinização *in vitro* de flores *A. deliciosa* verificou-se a germinação em todas as flores testadas. A flor do controlo positivo estava polinizada ao longo de todos os estiletos como suposto, mas o controlo negativo apresentou dois estigmas com grãos de

pólen germinados devido a uma possível contaminação destes com pólen no momento da polinização *in vitro* ou ainda antes (Tabela 8).

Tabela 8- Polinização *in vitro* de flores *A. deliciosa* com pólen *A. deliciosa* cv. 'Hayward'.

<b>Pistilos</b>	<b>Nº de estiletos com grãos de pólen germinados</b>	<b>Nº de estiletos com grãos de pólen não germinados</b>	<b>% de estiletos germinados</b>
<b>Flor Controlo (-)</b>	<b>2</b>	<b>23</b>	<b>8%</b>
<b>Flor Controlo (+)</b>	<b>19</b>	<b>0</b>	<b>100%</b>
<b>Flor 1</b>	<b>30</b>	<b>0</b>	<b>100%</b>
<b>Flor 2</b>	<b>25</b>	<b>0</b>	<b>100%</b>
<b>Flor 3</b>	<b>26</b>	<b>0</b>	<b>100%</b>
<b>Flor 4</b>	<b>36</b>	<b>0</b>	<b>100%</b>
<b>Flor 5</b>	<b>11</b>	<b>0</b>	<b>100%</b>
<b>Flor 6</b>	<b>36</b>	<b>0</b>	<b>100%</b>
<b>Flor 7</b>	<b>30</b>	<b>0</b>	<b>100%</b>
<b>Flor 8</b>	<b>32</b>	<b>0</b>	<b>100%</b>

É possível observar grãos de pólen germinados no estigma com o tubo polínico a crescer no seu interior (Fig. 49). Os ensaios de microscopia de fluorescência permitiram verificar que a germinação não se limitava à zona do estigma, havendo crescimento do tubo polínico ao longo do estilete, até ao ovário (Fig. 50).

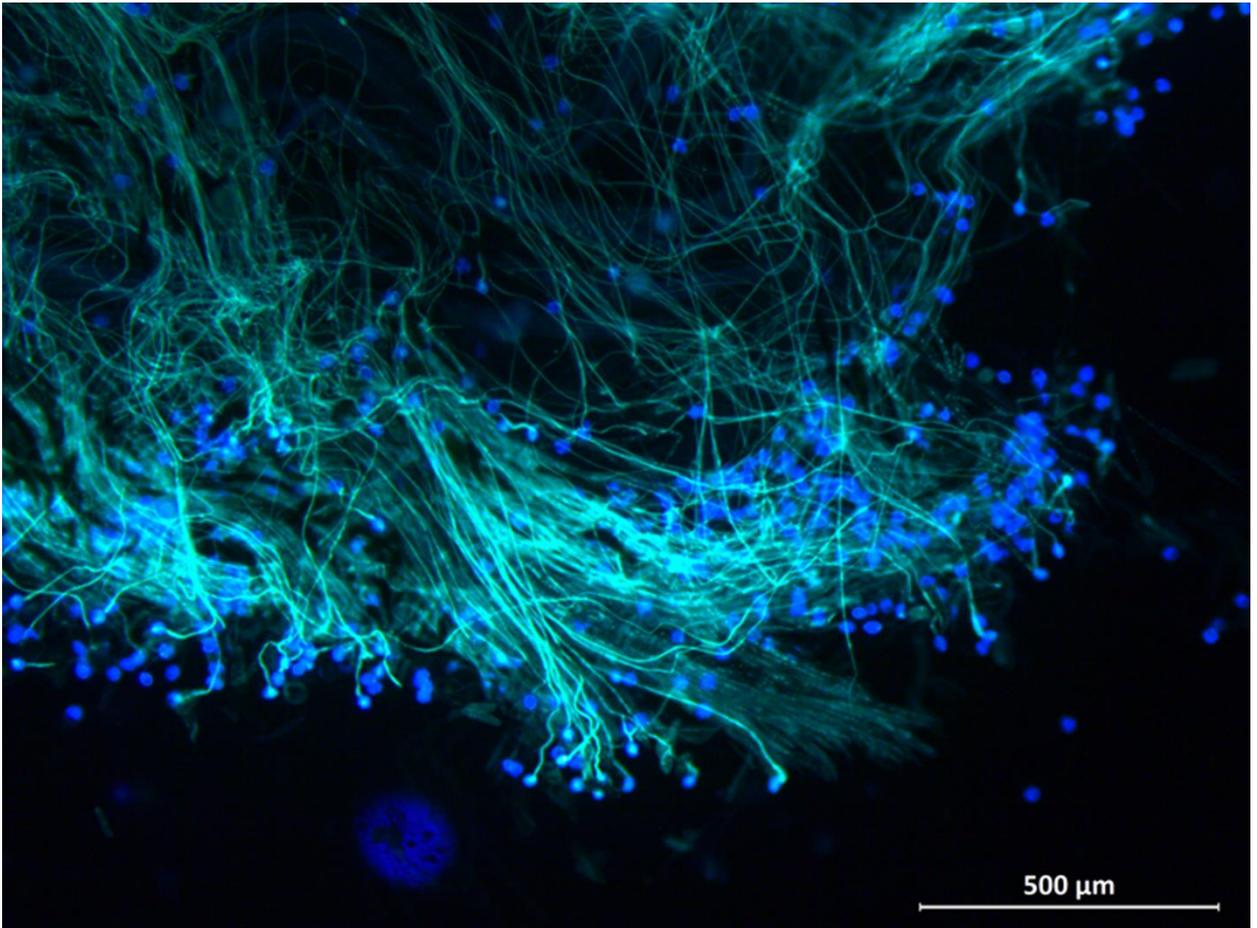


Figura 49- Imagem ao microscópio com filtro ultravioleta de grãos de pólen germinados (azul turquesa) e outros não germinados (azul vivo) no estigma muito esmagado durante a realização da preparação.

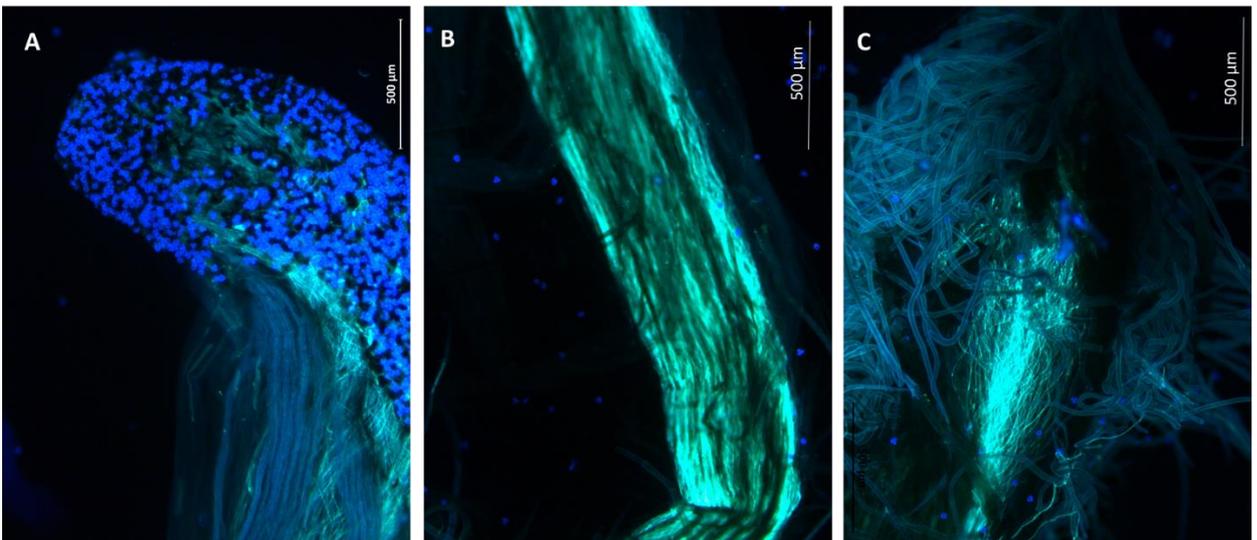


Figura 50- Imagem ao microscópio com filtro ultravioleta de grãos de pólen germinados (azul turquesa) e outros não germinados (azul vivo) ao longo do pistilo. A- estigma intacto com grãos de pólen germinados e outros germinados a desenvolverem o tudo polínico no interior do estigma. B- Tubos polínicos no interior e ao longo do estilete. C- tubos polínicos na extremidade conectada com o ovário.

## 4. Discussão

### 4.1. Germinação de sementes

O estabelecimento *in vitro* pode ser feito a partir de estacas provenientes de plantas adultas ou a partir da germinação *in vitro* de sementes previamente desinfetadas. A vantagem de usar o estabelecimento por estacas é sabermos à partida o sexo, fenótipo e genótipo das plantas a clonar e selecioná-las de acordo com isso (Bonga, 1987). Contudo, o estabelecimento por sementes permite-nos despistar mais facilmente contaminações e doenças, mas não sabemos o sexo delas. Saber se são machos ou fêmeas e ter garantia de ausência de PSA, é fundamental para fazer uma exploração agrícola de kiwis (Wu *et al.*, 2015).

Quando as estacas foram colocadas a abrolhar, os primeiros rebentos demoraram quatro semanas a surgir e não apareceram todos na mesma altura. Contudo após os primeiros rebentos serem recolhidos para desinfeção e cultura *in vitro*, voltavam a surgir, no mesmo local, novos rebentos. Esta situação prolongou-se até março quando as estacas já estavam demasiado contaminadas por fungos.

Depois de desinfetados com hipoclorito de sódio, os rebentos recolhidos foram colocados em meio MS e maioria revelaram ainda muitas contaminações pelo que não poderiam ser aproveitados. Alguns que não tinham mostrado contaminações na primeira vez em meio MS, apareciam contaminados numa segunda ou terceira renovação do meio. Além disso, também cresciam mais devagar. Como cresciam muito devagar e voltavam a contaminar, ainda não estavam estabelecidos. Apenas, se conseguiu estabelecer completamente um de cada fêmea (Kev 1 e 2) e dois machos (Kev3).

Outro dado interessante foi a formação de calo nas extremidades das estacas em todas as linhas logo em paralelo com o abrolhamento, e no calo de uma estaca Kev3, surgiu um rebento (organogénese indirecta).

A germinação das sementes em *A. deliciosa* e *A. chinensis* também não foi nada fácil, porque exigiram um período longo de estratificação, um período de embebição e não germinaram todas na mesma altura. As taxas de germinação também variaram muito entre as diferentes origens de sementes, mas é preciso ter em conta que os pré-tratamento de germinação usados foram diferentes. Convém lembrar ainda que os frutos adquiridos

já estavam a ser comercializados, pelo que já podiam estar anteriormente sujeitos a um período indeterminado de estratificação pelo frio nas arcas frigoríficas de armazenamento, que pode ter influenciado nos resultados.

As sementes dos frutos KpC tiveram a melhor taxa de germinação com 90% após embebição em água (sem GA<sub>3</sub>). Nestes ensaios o GA<sub>3</sub> não parece estar a promover a germinação das sementes, pelo contrário a presença do GA<sub>3</sub> pode ter sido desfavorável. Talvez a temperatura de 4 °C tenha sido mais estimuladora a quebrar a dormência e a levar á germinação. Contudo, os piores resultados não foram para a maior concentração de GA<sub>3</sub> mas sim para 5 mg/l. Já anteriormente tinha se verificado germinação mais baixa nas sementes Ks embebidas em GA<sub>3</sub>.

Em muitos estudos anteriores, tanto em *Actinidia* como noutras espécies o GA<sub>3</sub> melhora a germinação, especialmente na substituição da estratificação pelo frio. Contudo, os estudos acerca da germinação de sementes de kiwi aprofundam e também dão relevância à temperatura como factor decisivo na quebra de dormência nas sementes deste género, apesar de ser um processo muito demorado (Lawes & Anderson, 1980; Srivastava, 2002; Celik *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2015).

As sementes que germinaram melhor foram as provenientes dos frutos KpC embebidas sem GA<sub>3</sub> a 4 °C, A germinação melhor a seguir aos KpC, foi a do grupo KpB e por ultimo o grupo KpA (frutos de menores dimensões e que não partilharam o pedicelo com outros). Seria curioso estudar a existência de algum benefício que esta partilha do pedicelo pode trazer à germinação das sementes

Estudos sugerem que este fenómeno (frutos fundidos e de maiores dimensões) que ocorre em frutos KpC está associado a tratamentos específicos aplicados nas plantas e a variações nas estações do ano, e já decorre da fusão de botões florais em maior ou menor grau no inicio do seu desenvolvimento (Brundell, 1975; Watson & Gould, 1994). Durante as fases de desenvolvimento precoces das inflorescências foi observada a formação das pré-sépalas nas margens de dois meristemas e a fusão de meristemas terminais com laterais precocemente, que mais tarde dariam frutos agregados, fundidos, suportados por um pedúnculo e com uma forma alargada e aglutinada (Watson & Gould, 1994). A proporção no tamanho e forma da flor parece também prever de certa forma o tamanho e forma futura no fruto (Brundell, 1975).

Conseguiu-se estabelecer as linhas KG (*A.chinensis*), KZ e Ks (*A.deliciosa*) por sementes, e as linhas Kev1 e Kev2 (fêmeas) e Kev3 (machos) a partir de estacas.

## 4.2. Micropropagação por proliferação de meristemas axilares

A otimização de um protocolo de micropropagação para manter estas linhas e poliplóides produzidos *in vitro*, teve como ponto de referência a micropropagação por meristemas axilares recorrendo a fitómeros de *Actinidia deliciosa* (clones K2 e K3).

O aumento do número de nós pelo BAP é muito importante pois significa aumento do número de meristemas para a repicagem seguinte, e mais plantas no final (Spasenoski & Neskovic, 1985). Os resultados obtidos, também demonstraram que o BAP não é apenas importante para diferentes fases da micropropagação, mas também regula o desenvolvimento dos rebentos em *A. deliciosa* (Akbas *et al.*, 2007), e noutras espécies (Srivastava, 2002; Nelson *et al.*, 2015).

Para tornar a micropropagação por meristemas axilares bem sucedida usar apenas a citocinina BAP não foi suficiente neste caso, porque apenas aumentou significativamente o número de nós e não alongou o caule entre os nós suficientemente.

Na prática o aumento de nós sem o alongamento dos entrenós torna muito difícil a separação e individualização de novos explantes e, também, do processo de enraizamento (Vattiprolu *et al.*, 2011).

Para ultrapassar essa dificuldade foi testado o GA<sub>3</sub> em combinação com BAP. Vários estudos têm revelado a utilidade do GA<sub>3</sub> no alongamento do caule entre os nós, até mesmo em espécies do género *Actinidia* (Srivastava, 2002; Vattiprolu *et al.*, 2011; Kadhimi *et al.*, 2014). A combinação do GA<sub>3</sub> com a citocinina BAP permitiu aumentar em simultâneo o número de nós e um aumento do comprimento do caule. A partir dos ensaios com a adição do GA<sub>3</sub> ao meio, o crescimento do caule foi notório tanto em machos como em fêmeas. O crescimento do caule no tratamento só com BAP foi parecido ao do controlo em ambos os sexos.

Na sua globalidade os resultados indicaram que na formação de nós, crescimento do caule e produção de rebentos, a concentração de 1 mg/l de BAP + 10 mg/l de GA<sub>3</sub>

mostrou-se mais eficaz em *A. deliciosa*. Nos machos a concentração 1 mg/l de BAP + 15 mg/l de GA<sub>3</sub> também teve um bom desempenho. O GA<sub>3</sub> a 10mg/l em associação com 1mg/l de BAP não só alongou o caule entre os nós como também aumentou ligeiramente o número de nós em comparação com o tratamento que incluí apenas a adição de BAP. Perante estes resultados optou-se por usar a concentração de 1mg/l de BAP + 10mg/l de GA<sub>3</sub> para a micropropagação das linhas estabelecidas e clones K2 e K3 e futuros poliplóides produzidos *in vitro*.

### **4.3. Indução de organogénese**

A organogénese permite micropropagar plantas a partir de vários tipos de explantes como sejam folhas, raízes, segmentos caulinares e mesmo órgãos florais. A organogénese é também um método muito utilizado para clonagem a partir de plantas adultas (George, 1993; Akbas *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2011)

Os explantes utilizados para induzir organogénese foram segmentos foliares e pecíolos bem diferenciados dos clones K2, K3, Ks e KG. Antes de induzir organogénese nos clones KZ e KG em conjunto com a exposição à colquicina, foram testados vários tratamentos que combinavam a auxina NAA a 0,1mg/l com diferentes concentrações da citocinina BAP nos clones K2 (fêmeas) e K3 (machos), de forma a escolher a melhor concentração de BAP com NAA a aplicar em Ks e KG previamente sujeitos à colquicina (com os seus efeitos secundários e adversos) para obter um maior número possível de rebentos. De acordo com os resultados obtidos, a partir daqui, e para os ensaios de organogénese seguintes aplicou-se a combinação de 1mg/l de BAP com 0,1mg/l de NAA.

Tal como relatado noutros artigos foi possível observar a expansão do explante anterior à formação de rebentos, isto é todos os explantes com rebentos passaram antes por uma etapa de expansão. Mas nem todos os explantes expandidos produziram rebentos, à semelhança do verificado noutros ensaios (Canhoto & Cruz, 1987; George, 1993; Wu *et al.*, 2011). Observou-se a formação de rebentos em explantes com calo, contudo não foi obrigatório porque existiram rebentos formados sem a formação prévia de calo, como tem sido referido na bibliografia (Ludvová & Ostrolucka, 1998).

Devido à toxicidade da colquicina, os explantes senescentes foram mais frequentes nos ensaios que incluíam a exposição prévia à colquicina. Neste contexto, a indução da organogénese após exposição à colchicina para aumentar o número de rebentos e consequentemente aumentar as hipóteses de encontrar rebentos com ploidia duplicada, não é promissora, pois é difícil que esses explantes possam formar rebentos (Foster *et al*, 2007; Wu *et al.*, 2011).

Como a colquicina interfere não apenas com a mitose, mas também com o alongamento celular seria expectável obter uma maior percentagem de culturas senescentes nas concentrações mais elevadas de colchicina que foram testadas (Caperta *et al*, 2006; Ranney, 2006). No entanto, ao contrário do que se esperava, a colquicina a 0,05% originou mais senescentes do que a colquicina a 0,1% em segmentos foliares de KG e Ks e pecíolos KG.

Quanto à presença de calos e explantes com rebentos, e apesar da variação ocorrida entre os grupos de explantes, os controlos tiveram mais calos e explantes com rebentos do que os ensaios com a colquicina, e entre as duas concentrações de colquicina os resultados foram semelhantes. Na expansão foliar verificou-se uma diminuição nos ensaios sujeitos à colquicina e variaram bastante entre os diferentes grupos de explantes testados, relativamente aos seus controlos correspondentes.

Os controlos tiveram muito mais rebentos do que aqueles explantes que estiveram na presença de colquicina, como seria de prever. Mas, ao contrário do que se esperava obtiveram-se mais rebentos para a colquicina a 0,1% do que para 0,05%. De todos os ensaios de organogénese, submetidos previamente à colquicina, aquele que obteve mais rebentos corresponde a 0,1% de colquicina em pecíolos Ks (*A.deliciosa*).

As situações inesperadas, onde na maior concentração de colquicina se verifica melhores resultados de organogénese, quando teoricamente seria o contrário, podem estar subjacentes variáveis externas menos motorizadas durante o processo experimental. Estas podem ser o resultado de diversidade intraespecífica dos explantes, distribuição/imersão dos explantes nas soluções de colquicina com bolhas de ar aprisionadas entre os tricomas, agitação insuficiente das soluções durante o contacto da colquicina com os explantes e variabilidade morfológica entre explantes (Caperta *et al*, 2006; Foster *et al*, 2007; Wu *et al.*, 2011;).

#### 4.4. Enraizamento

O enraizamento das plantas K2 e K3 foi testado sujeitando os rebentos caulinares a um tratamento com 1 g/l de IBA durante 20 segundos antes de serem colocadas em meio MS sem hormonas durante 5 semanas. Paralelamente a este ensaio foi feito um controlo sem o choque auxínico, sem IBA.

Segundo estudos anteriores, este período de 20 segundos ou menos seria suficiente para induzir a formação de raízes em *Actinidia deliciosa* e *A. chinensis* (Pedroso *et al.*, 1992), como também aconteceu aqui. Os caules iniciais de todas as plantas tinham o mesmo comprimento para não afectarem muito e não fazerem variar a formação de raízes em cada tratamento, alterando o que seria o resultado final (Clearwater *et al.*, 2011).

Em ambos os ensaios, houve formação de raízes. Contudo, no controlo, formaram-se muito menos raízes e de forma mais lenta. Após 5 semanas verificou-se que no ensaio com *dipping* de IBA as raízes formadas eram em maior número do que no controlo às 10 semanas. A média do comprimento da maior raiz também foi mais elevado no ensaio com o IBA nos dois clones, e no K2 (fêmeas) foi maior que no K3. O nº de plantas com raízes para o ensaio de IBA foi um sucesso em ambos clones, pelo que pode muito bem ser utilizado no enraizamento de futuros octoplóides e dodecaplóides.

Muitos trabalhos valorizam a utilização do choque auxínico no enraizamento (Pedroso *et al.*, 1992; Kadhimi *et al.*, 2014). Verifica-se que o *dipping* com IBA é importante na formação de um número suficiente de raízes em pouco tempo para assegurar a concretização da aclimação em K2 e K3.

O tratamento B (*dipping* com IBA) teve uma média de raízes e uma percentagem de plantas enraizadas maior, mas teve menos folhas e caules menos compridos. O tratamento A (controlo) teve uma média de raízes e uma percentagem de plantas enraizadas menor, enquanto teve mais folhas em cada planta e caules mais compridos. Isto também sugere um desvio dos recursos para a formação de raízes deixando a parte aérea mais restringida na aplicação de IBA, ao contrário do que acontece quando esta hormona não é aplicada. (Clearwater *et al.*, 2011, Kadhimi *et al.*, 2014)

Sabe-se que o sucesso no enraizamento (mais raízes e compridas) aumenta as probabilidades de aclimação das plantas a um substrato equivalente ao solo e a variações de temperatura, até mais significativamente do que o comprimento do caule e o número de folhas. Um caule de tamanho suficiente vai ser útil no envasamento das plantas e na competição destas por luz caso estejam muitas juntas e a manterem uma posição ereta (Clearwater *et al*, 2011; Pedroso *et al.*, 1992).

Durante o primeiro mês as plantas K2 e K3 colocadas a aclimatizar, nas K3 43,3 % resistiram e nas K2 resistiram à aclimatização 33,3% (menos do que os machos). Na estufa também resistiram e cresceram, enquanto foram regadas. A maior parte das plântulas KG e Kp germinadas *in vitro* também se adaptaram e cresceram com o novo substrato no fitoclima.

#### **4.5. Obtenção de octoplóides e dodecaplóides**

Em ensaios de determinação do nível de ploidia por citometria de fluxo é importante que as plantas tenham um desenvolvimento adequado para que se possa obter um conjunto de células adequado às determinações a realizar (Caperta *et al*, 2006; Ranney, 2006). No entanto, nos nossos ensaios isso não foi muitas vezes possível devido ao reduzido crescimento que as plantas ou rebentos caulinares frequentemente manifestavam.

Do ponto de vista analítico, os padrões (*Solanum lycopersicum* e *Bellis perennis*) usados para estimar a ploidia das amostras mostraram-se adequados à leitura da ploidia das amostras de *A. deliciosa* e *A. chinensis* porque não coincidiram com os picos das amostras e estavam próximos destes (Doležel *et al.*, 2007; Loureiro *et al.*, 2012).

Os explantes dos clones K2 e K3 (geneticamente iguais) e os explantes Ks e KG e KZ partem de sementes geneticamente diferentes. Deste modo, a possibilidade de ocorrer variação dos resultados é menor para K2 e K3, uma vez que a variável de diversidade intraespecífica não interfere tanto nestes clones. A diversidade intraespecífica dos explantes KG, Ks e KZ pode aumentar as oportunidades de ocorrerem explantes com genomas mais favoráveis à duplicação de ploidia pela colquicina.

Os resultados quanto à duplicação cromossómica em todos os grupos de explantes não foram muito homogéneos, até mesmo em K2 e K3 o que sugere que talvez esteja aqui

subjacente alguma variação somaclonal e até morfológica típica na micropropagação e anteriormente relatada em alguns estudos efetuados na *Actinidia* sp. (Rani & Raina., 2000; Leva *et al.*, 2012). Contudo, foi possível obter 18% de dodecaplóides para colquicina a 0,05% em fitómeros K2 e 15% e 38% de dodecaplóides para colquicina a 0,05% e 0,1% em K3.

A presença de mixoplóides foi notória em fitómeros K2, K3, KG e Ks submetidos à colquicina, sugerindo o funcionamento desta na indução de poliploidia de muitos núcleos apesar de não ter actuado em todos os núcleos do explante (Caperta *et al*, 2006; Ranney, 2006). Mas ainda foi possível obter alguns dodecaplóides e octaplóides (apesar das baixas percentagens, 38 % no máximo).

Nos ensaios de colquicina pré-indução de organogénese em segmentos foliares e pecíolos, os mixoplóides foram inexistentes. Talvez, a organogénese seja mais difícil de ocorrer num conjunto de células com níveis de ploidia diferentes, pois podem ter ritmos de mitose e diferenciação também diferentes (Dhooghe *et al.*, 2011).

Outros estudos têm sido bem sucedidos a induzir poliploidização com estas concentrações de colquicina em explantes do kiwi, mais concretamente em *A. chinensis* (2x) e na *A. arguta* (4x) (Liu *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011), ao contrário do que aconteceu neste trabalho. Além de todos os riscos inerentes à indução de poliploidização em *A. deliciosa* (elevado número de cromossomas: 174, elevado grau de plóidia: 6x), arriscou-se proceder à poliplóidização porque foi realizado um estudo que relata a ocorrência pontual de dodecaplóides paralelamente aos ensaios de embriogénese somática (Boase *et al.*, 1995) e a *A. deliciosa* não é um autopoliplóide mas sim um alopólóide entre duas espécies (*A. chysanta* e *A. chinensis*) (Crowhurst & Gardner, 1991; Hopping, 1994) e depois de ter surgido na natureza também tem estado sob pressão evolutiva (Crowhurst & Gardner, 1991; Levy & Feldman, 2002; Ferguson & Huang, 2016).

Nos fitómeros a ocorrência de mixoplóides é expressiva e semelhante nas duas concentrações, e até supera ligeiramente aqueles que mantêm a plóidia. Em menos quantidade existem alguns com plóidia duplicada e em semelhante número nas duas concentrações de colquicina testadas. Noutros estudos a presença de mixoplóides não é expressiva (Liu *et al.*, 2011), como acontece aqui.

As plântulas têm todas origens em sementes geneticamente diferentes e portanto é normal que isso traga alguma variação moderada nos resultados (Leva *et al.*, 2012). Nos ensaios de colquicina em plântulas KZ, os resultados na plóidia e perdas também variaram quanto à concentração como tempo de exposição e o número de mixoplóides continua a ser expressivo em todos eles. Contudo, nas 4 horas o aumento dos dodecaplóides e perdas já acompanhou o aumento da concentração de colquicina e os hexaplóides e mixoplóides diminuíram com o aumento da colquicina. Nas 8 horas, os hexaplóides e os dodecaplóides aumentaram na concentração maior de colquicina, e os mixoplóides e perdas diminuíram em colquicina a 0,1%. Entre as 4 horas e as 8 horas, não se notaram muitas alterações significativas entre a plóidia e explantes perdidos, em especial nos dodecaplóides e perdas. Os hexaplóides e mixoplóides reduziram ligeiramente das 4 horas para as 8 horas. Todos os tratamentos deram dodecaplóides.

Nas plântulas KG (derivam de diferentes sementes), os mixoplóides foram predominantes e em igual número para as duas concentrações de colquicina. Sem grandes diferenças entre as concentrações de colquicina, o ensaio com colquicina 0,05% teve ligeiramente mais mixoplóides e octaplóides do que o da colquicina 0,1%, quando teoricamente é suposto ocorrer o contrário (Wu *et al.*, 2011; Caperta *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2015). Como o número de plântulas KG nestes ensaios foi muito reduzido, é mais difícil confirmar estes resultados, sendo necessário fazer mais.

Tal como na *A. chinensis*, e apesar do número elevado de cromossomas (risco de cromossomas perdidos no decorrer das mitoses) e elevado nível de ploidia em *A. deliciosa* (Skirvin *et al.*, 1994; Comai, 2005; He *et al.*, 2005), esta espécie reagiu positivamente à colquicina com a formação de bastantes mixoplóides e alguns dodecaplóides, que podem futuramente serem estudados quanto ao seu melhoramento (ex: resistência ao stress hídrico, frutos de maiores dimensões) ( Skirvin *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 2012). A maior percentagem de dodecaplóides conseguida foi de 38% em fitómeros K3 e a maior de octoplóides foi 7% em plântulas KG.

Face às alterações que ocorrem no fenótipo e genótipo de poliplóides em comparação com os seus diplóides correspondentes, mesmo no género *Actinidia*, segundo alguns autores (Wang & Gleave, 2012; Wu *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2014), é necessário continuar a acompanhar a plóidia e estabilidade do desenvolvimento destas plantas ao

longo tempo, e apurar se ocorrem alterações da plóidia, anomalias morfológicas e reprodutivas ou vantagens económicas e ambientais.

A maior parte dos estudos efectuados anteriormente, em ensaios de indução de poliplóidia, defendem o aumento de poliploides e senescentes e a diminuição dos diplóides para concentrações de agentes c-mitóticos e períodos de indução maiores (Caperta *et al.*, 2006; Leher *et al.*, 2008), contudo isso nem sempre acontece em todas as espécies (Caperta *et al.*, 2006; Ranney *et al.*, 2006; Leher *et al.*, 2008) e nem aconteceu neste estudo.

Contudo, será necessário voltar a reavaliar a ploidia dos mixoplóides no citómetro de fluxo para saber como evolui o teor em DNA (Levy & Feldman, 2002): manutenção do estado mixoplóide, mudança para octoplóides/dodecaplóides, ou se voltam a ser tetraplóides/hexaplóides, no decorrer do seu desenvolvimento.

#### **4.6. Avaliação da viabilidade do pólen**

A acetólise do pólen de *A. deliciosa* permitiu obter imagens do pólen com qualidade para melhor visualização dos colpos ao microscópio óptico. Esta acetólise permitiu uma melhor visualização do interior (Erdtman, 1960). No entanto, foi possível visualizar três colpos em todos os grãos de pólen observados em *A. deliciosa*, como referem noutros artigos acerca da *Actinidia* sp. (Ferguson, 1984).

Os resultados mostraram que nos meios suplementados com sacarose 6% ou meios com GA<sub>3</sub> se obtiveram as taxas mais elevadas de germinação. Estes resultados comprovam a importância destes factores na germinação á semelhança do verificado noutros estudos (Swain *et al.*, 1993.; Swain *et al.*, 1997; Singh *et al.*, 2002).

Em ágar dissolvido em água a germinação aumentou com a adição de GA<sub>3</sub> (10 mg/l) logo nas primeiras 6 horas em relação ao controlo e foi maior para 100 m/l em 24 horas. Sem a utilização do GA<sub>3</sub>, a concentração de sacarose na germinação revelou-se também muito importante com destaque para 6% de sacarose logo nas 6 horas e continuou a subir até às 24horas (aproximadamente e acima de 80%), tal como sugerem outros

autores (Malik & Chhabra 1976). A maior taxa de germinação (91%) foi conseguida às 24h com sacarose 6% (sem GA<sub>3</sub>).

Nos ensaios que combinam o GA<sub>3</sub> com a sacarose e tem o meio base existe uma taxa de germinação bem satisfatória acima da metade, mesmo para as três concentrações de GA<sub>3</sub>, com exceção dos ensaios com 1 mg/l de GA<sub>3</sub> a 3% de sacarose nas 6 horas e a 12% de sacarose nas 24 horas e com 100 mg/l de GA<sub>3</sub> a 9% de sacarose. Estas exceções pontuais podem dever-se a lapsos na execução prática dos ensaios, porque por exemplos os dois últimos ensaios atrás referidos têm menos germinação nas 24 horas do que os ensaios correspondentes das 6 horas.

O GA<sub>3</sub> sobe muito a germinação deste pólen até mesmo para concentrações de sacarose menos favoráveis, e quando a concentração de GA<sub>3</sub> é 10 ou 100 mg/l até os controlos (Sem meio base e sem sacarose) rondam os 60% de taxa de germinação nas 24h.

O GA<sub>3</sub> faz muita diferença na germinação deste pólen e quando tem pelo menos 10 mg/l até mesmo para meios só com ágar sem os preciosos nutrientes (ex: cálcio, (Setia *et al*, 1994)) incrementa a taxa de germinação.

A polinização *in vitro* de flores *A. deliciosa* com este pólen com um ano dado pela empresa correu bem, com algumas exceções por falha na execução prática. Este pólen germinou bem nos estigmas e os tubos polínicos cresceram bem ao longo do estilete até à entrada do ovário destas flores

Perante os dados obtidos, pode-se dizer que este pólen com um ano de congelamento ainda está viável na sua maioria nas suas condições favoráveis de sacarose (6%) e GA<sub>3</sub> (principalmente para 10 e 100 mg/l) testadas, e ainda é capaz de polinizar flores da mesma espécie. Este pólen está apto a ser usado na produção de kiwis pela empresa, e também pode ser usado no cruzamento com a espécie *A. chinensis* para melhoramento fenotípico das plantas e seus kiwis (frutos).

## 5. Conclusões e perspectivas futuras

Neste trabalho foi possível estabelecer linhas das espécies *A. deliciosa* e *A. chinensis in vitro* necessárias para posterior indução de poliploidia e otimizar um protocolo de micropropagação para manter estas linhas e poliplóides produzidos *in vitro* onde foi definida a melhor conjugação das concentrações de BAP (1 mg/l) e GA<sub>3</sub> (10 mg/l);

No caso dos segmentos foliares e pecíolos usados na poliploidização, conseguiu-se otimizar um protocolo de organogénese tendo a combinação de 0,1 mg/l de NAA e 1 mg/l de BAP, sido aquela que produziu os melhores resultados.

Também foi possível concluir que o enraizamento através de um choque auxínico (*dipping*) numa solução com 1 mg/l de IBA seguida de transferência para meio sem auxina é um método expedito para o enraizamento de rebentos caulinares. Com estas etapas anteriores definidas foi possível conceber um plano mais fiável para proceder à poliploidização induzida nas linhas e clones das espécies *A. deliciosa* e *A. chinensis*. Os resultados revelaram-se promissores, uma vez que foi possível obter dodecaplóides e octoplóides nestas espécies, cumprindo assim um dos objectivos do trabalho.

A avaliação da viabilidade *in vitro* do pólen de *A. deliciosa* também permitiu concluir que este pólen (com um ano de congelamento) apresenta um elevado grau de viabilidade e pode ser usado de forma eficaz nos ensaios de campo e em polinizações com vista a obter híbridos (*A. chinensis* ♀ x *A. deliciosa* ♂).

Em jeito de balanço, pode referir-se que os resultados já obtidos permitiram 1) estabelecer as bases para a micropropagação de material seleccionado, por organogénese e ou proliferação de meristemas axilares, 2) determinar a viabilidade do pólen, um passo importante para os produtores de kiwi e 3) conseguir a poliploidização de algumas plantas. No entanto, no que diz respeito a este último aspecto, será necessário melhorar os protocolos de indução de poliploidia bem como a ulterior clonagem destas plantas. No que se refere ao pólen será importante verificar de que forma o pólen utilizado nas explorações comerciais pode ser combinado com matrizes de origem biológica de maneira a obter uma polinização eficaz e assegurar produções mais elevadas.

## 6. Referências Bibliográficas

- “Boase, M. R., and M. E. Hopping (1995) “DNA dodecaploid plants detected among somaclones of *Actinidia deliciosa* var. *deliciosa* cv. Hayward”. *Plant Cell Rep.* 14: 319–323.
- Akbas F, İkalın Ç., Namlı, S (2009). “Callus Induction and Plant Regeneration from Different Explants of *Actinidia deliciosa*”. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 158(2): 470-475.
- Akbaş, F. A., İşikalan, C., Namlı, S. and Başaran, D. (2007) “Micropropagation of kiwi fruit (*Actinidia deliciosa*)”, *International Journal of Agriculture and Biology* 9: 489–493.
- Allum, J.F., Bringloe, D.H., Roberts, A.V. (2007) “Chromosome doubling in a *Rosa rugosa* Thunb. hybrid by exposure of *in vitro* nodes to oryzalin: the effects of node length, oryzalin concentration and exposure time”. *Plant Cell Report*: 26(11) 1977-1984.
- Bonga, J. M. (1987). “Clonal propagation of mature trees: problems and possible solutions”. *Cell and tissue culture in forestry* 249-271. doi: 10.1007/978-94-017-0994-1
- Brundell, D. J. 1975. “Flower development of the Chinese gooseberry (*Actinidia chinensis* Planch.)”. II. Development of the flower bud 13:485–496.
- Canhoto M. J., Cruz G.S. (1987) “*In Vitro* multiplication of *Actinidia chinensis* Planch. by Culture of Young Leaves”. *Boletim da Sociedade Broteriana. Universidade de Coimbra* 2(60): 239-252.
- Canhoto, J. M. (2010). *Bioteχνologia vegetal, da clonagem de plantas à transformação Genética*. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra.
- Caperta, A.D., Delgado, M., Ressurreição, F., Meister, A., Jones, R.N., Viegas, W., Houben, A. (2006) “Colchicine-induced polyploidization depends on tubulin polymerization in c-metaphase cells”. *Protoplasma* 227: 147–153.

- Caperta, A.D., Delgado, M., Ressurreição, F., Meister, A., Jones, R.N., Viegas, W., Houben, A. (2006) “Colchicine-induced polyploidization depends on tubulin polymerization in c-metaphase cells”. *Protoplasma* 227: 147–153.
- Castro, S., Loureiro, J., Procházka, T., Münzbergová, Z. (2012) “Cytotype distribution at a diploid-hexaploid contact zone in *Aster amellus* L. (Asteraceae)”. *Annals of Botany* 110: 1047-1055.
- Celik, H., Zenginbal, H., Ôzcan, M. (2006). “Enhancing germination of kiwifruit seeds with temperature, medium and gibberellic acid”. *Horticultural Science* 33: 39-45.
- Clearwater, M.J., Luo, Z., Ong, S.E.C., Blattmann, P., Thorp, T.G. (2011) “Vascular functioning and the water balance of ripening kiwifruit (*Actinidia chinensis*) berries”. *Journal of Experimental Botany* 63:1835–1847.
- Comai, L. (2005) “The advantages and disadvantages of being polyploid”. *Nature Reviews Genetics*, 6: 836–845.
- Crowhurst, R. N., Gardner, R. C. (1991) “A genome-specific repeat sequence from kiwifruit (*Actinidia deliciosa* var. *deliciosa*)”. *Theoretical and Applied Genetics*. 81:71–78.
- Cunha, C., Oliveira, J., Perestrelo, L., Oliveira, M., Silva, R., Rodrigues, S. (2007) “Manual do Kiwicultor”. APK- Associação Portuguesa de Kiwicultores.
- Dart, S., Kron, P., Mable, B.K. (2004) “Characterizing polyploidy in *Arabidopsis lyrata* using chromosome counts and flow cytometry”. *Canadian Journal of Botany* 82(2): 185-197.
- Dhooghe E, Van Laere K, Eeckhaut T, Leus L, Van Huylenbroeck J (2011) “Mitotic chromosome doubling of plant tissues *in vitro*”. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 104:329–341.
- Doležel J., Greilhuber J., Suda, J. (2007) “Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry”. *Nature Protocols*. 2: 2233-2244.
- Erdtman, G. (1960) “The acetolysis method, a revised description”. *Sven Bot Tidskr* 54: 561–564.

- Félix, A. P., Pacheco, C. C. A., Mendes, F., Veloso, F. A. A., Santos, F., Chicau, G., Sofia, J. M. E. C., Oliveira, M. A. S., Costa, J. P. N., Xavier, M. A. R. G. L., Antunes, M. D. C., Curado, M. F. C., Calouro, M. F. S., Franco, M. J. B., Cavaco, M., Neves, N. J. L., Silva, R. M. P. & Rodrigues, S. I. A. (2008) “Wang Kiwi da produção à comercialização”. Faro: Universidade do Algarve.
- Ferguson A.R., Huang H-W (2007) “Genetics resources of Kiwifruit: domestication and greeding”. Horticultural Reviews 33:1-121.
- Ferguson, A. R., & Stanley, R. (2003). “Kiwifruit. In Encyclopedia of food sciences and nutrition”. Oxford: Academic Press 3425-3431.
- Ferguson, A.R. (1984) “Kiwifruit: a botanical review”. Horticultural Reviews 6:1–64.
- Ferguson, A.R. (1999) “New Temperate Fruits: *Actinidia chinensis* and *Actinidia deliciosa*”. In: J. Janick (Eds.) Perspectives on new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria, VA. 342-347.
- Ferguson, A.R. (2015) “Kiwifruit in the World - 2014”. Acta Horticulturae. 1096, 33-46  
DOI: 10.17660/ActaHortic.2015.1096.1
- Ferguson, A.R., Huang, H. (2016) “Cytology, Ploidy and Ploidy Manipulation”. In: R. Testolin, R., Huang, H-W, Ferguson, A. R. (Eds.), The Kiwifruit Genome, Compendium of Plant Genomes. Springer International Publishing Switzerland 55-63  
DOI: 10.1007/978-3-319-32274-2.
- Foster, TM, Seleznyova AN, Barnett, AM. (2007) “Independent control of organogenesis and shoot tip abortion are key factors to developmental plasticity in kiwifruit (*Actinidia*)”. Annals of Botany 100:471-481.
- Garcia, C.V., Quek, S., Stevenson, R.J., Winz, R.A. (2012) “Kiwifruit flavour: a review”. Trends in Food Science & Technology 24: 82–91.
- George, E. F., Hall, M. A., Klerk, G. D. (2007) “Plant Propagation by Tissue Culture: Volume 1. The Background”. Springer Science & Business Media.

- George, E.F. (1993) "Plant propagation by tissue culture: The Technology", 2nd ed. London Exegetics Ltd.
- Hamill, S., Smith, M., Dodd, W. (1992) "*In vitro* induction of banana autotetraploids by colchicine treatment of micropropagated diploids". Australian Journal of Botany 40:887–896.
- He, Z.-C., Li, J.-Q., Cai, Q., Wang Q. (2005) "The cytology of *Actinidia*, *Saurauia* and *Clematoclethra* (Actinidiaceae)". Botanical Journal of the Linnean Society 147:369–374.
- Hopping, M.E. (1994) "Flow cytometric analysis of *Actinidia* species". New Zealand Journal of Botany 32: 85-93.
- Huang, H. W., Ferguson, A. R. (2007) "Actinidia in China: natural diversity, phylogeographical evolution, interspecific gene flow and kiwifruit cultivar improvement". Acta Horticulturae (ISHS) 753: 31-40.
- Jahier J, Chevre AM, Delourme R, Eber F & Tanguy AM (1992) "Techniques de cytogénétique végétale". Paris: INRA.
- Jelenic, S., Berljak, J., Papes, D., Jelaska, S. (2001) "Mixoploidy and chimeric structures in somaclones of potato (*Solanum tuberosum* L.) cv. Bintje". Food Technology and Biotechnology 39:13–17.
- Kadhimi, A., A. Alhasnawi, A. Mohamad, A. Yusoff and C. Zain (2014). "Tissue culture and some of the factors affecting them and the micropropagation of strawberry". Life Science Journal, 11: 484-493.
- Lawes, G.S., Anderson, D.R. (1980). "Influence of temperature and gibberellic acid on kiwifruit (*Actinidia chinensis*) seed germination". N.Z. Journal of Experimental Agriculture 8: 277-280
- Lehrer, J.M., Mark, H.B., Jessica, D. (2008) "Lubell induction of tetraploidy in meristematically active seeds of Japanese barberry (*Berberis thunbergii* var. *Atropurpurea*) through exposure to colchicine and oryzalin". Scientia Horticulturae 119:671.

- Leva, A.R., Petruccelli, R., Rinaldi, L.M.R. (2012) “Somaclonal Variation in Tissue Culture: A Case Study with Olive”. *Recent Advances in Plant in vitro Culture* 10-17
- Levin, D. A. (2002). *The role of chromosomal change in plant evolution*. Oxford University Press.
- Levy A. A., Feldman M. (2002) “The impact of polyploidy on grass genome evolution”. *Plant Physiology* 130: 1587–1593.
- Li, D., Liu, Y., Li, X., Rao, J., Yao, X., Zhong, C. (2014) “Genetic diversity in kiwifruit polyploid complexes: insights into cultivar evaluation, conservation, and utilization”. *Tree Genetics & Genomes* 10(5): 1451-1463.
- Li, D., Liu, Y., Zhong, C., Huang, H. (2010) “Morphological and cytotype variation of wild kiwifruit (*Actinidia chinensis* complex) along an altitudinal and longitudinal gradient in central-west China”. *Botanical Journal of the Linnean Society* 164:72-83.
- Liang, C.-F. (1983) “On the distribution of Actinidias”. *Guihaia* 3:229–248.
- Liu Y, Li D., Yan, L., Huang, H. (2015) “The microgeographical patterns of morphological and molecular variation of a mixed ploidy population in the species complex *Actinidia chinensis*”. *PLoS One* 10:e0117596.
- Liu, C., Sun, X., Dai, H., Zhang, Z. (2010). “*In Vitro* Induction of Octoploid Plants from Tetraploid *Actinidia arguta*”. In VII International Symposium on Kiwifruit 913: 185-190.
- Liu, Y-F, Liu, Y-L, Huang, H-W (2010) “Genetic variation and natural hybridization among sympatric *Actinidia* species and the implications for introgression breeding of kiwifruit”. *Tree Genet Genomes* 6:801–813.
- Loberant, B.; Altman, A. (2010) “Micropropagation of Plants”. *Retirado de Encyclopedia of Industrial Biotechnology*: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470054581.eib442/full>.

- Loureiro, J., Castro, M., de Oliveira, J. M., Antunes, P., Canhoto, J., & Castro, S. (2012) APLICAÇÕES DA CITOMETRIA DE FLUXO EM HORTICULTURA. Revista da APH N., 108: 25-28.
- Loureiro, J., Rodriguez, E., Dolezel, J., Santos, C. (2007) “Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: a test with 37 species”. Annals of Botany 100: 875-888.
- Ludvova, A. und M. G. Ostrolucka (1998) “Morphogenic processes in callus tissue cultures and de novo regeneration of plants in *Actinidia chinensis* Planch”. Acta-Societatis-Botanicorum-Poloniae. 67 (3-4): 217-222.
- Mainland, C.M., Fisk, C. (2006) “Kiwifruit”. NCSU HIL 208.
- Malik, C. P., Chhabra, N. (1976). “Hormonal regulation of pollen germination and pollen tube elongation in *Arachis hypogea* Reitz”. In Proceedings of the Indian Academy of Sciences-Section B 84(3): 101-108).
- Marsh, K. B., Friel, E. N., Gunson, A., Lund, C., & MacRae, E. (2006) “Perception of flavour in standardised fruit pulps with additions of acids or sugars”. Food Quality and Preference 17: 376-386.
- Masterson, J. (1994) “Stomatal size in fossil plants: Evidence for polyploidy in majority of angiosperms”. Science 264: 421–423.
- McNeilage, M.A., Considine, J.A. (1989) “Chromosome studies in some *Actinidia* taxa and implications for breeding”. New Zealand Journal of Botany 27:71–81.
- Meyer, E.M., Touchell, D.H., Ranney, T.G. (2009) “*In vitro* shoot regeneration and polyploid induction from leaves of *Hypericum* species”. Hortscience 44(7):1957–1961.
- Morejohn L.C., Bureau T.E., Tocchi L.P., Fosket D. E. (1987) “Resistance of *Rosa* microtubule polymerization to colchicine results from low-affinity interaction of colchicine and tubuline”. Planta 170: 230 – 241.
- Murashige T., Nakano, R. (1966) “Tissue culture as a potencial tool in obtaining polyploid plants”. Journal of Heredity 57: 115-118.

- Murashige T., Skoog F (1962) "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures". *Physiology Plant* 15:473-497.
- Nelson, B. J.; Asare, P.A; Ransford, A.J.(2015) "*In vitro* Growth and Multiplication of Pineapple under Different Duration of Sterilization and Different Concentrations of Benzylaminopurine and Sucrose". *Biotechnology* 14.1 : 35-40.
- Newton, D. E. (2015) "Cloning: A reference Handbook". Santa Barbara: ABC-CLIO, LLC.
- Panda, D., Goode, B.L., Feinstein, S.C., Wilson, L. (1995) "Kinetic stabilization of microtubule dynamics at steady state by tau and microtubule-binding domains of tau". *Biochemistry (Washington)* 34: 11117–11127.
- Pedroso, C. Oliveira, M. Pais. S.S. (1992) "Micropropagation and simultaneous rooting of *Actinidia deliciosa* ar. Hayward". *Horticultural Science* 27: 443-445.
- Predieri, S. (2001) "Mutation induced and tissue culture in improving fruits". *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 64:185-210.
- Ramsey, J., Schemske, D.W. (1998) "Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants". *Annual Review of Ecology, Evolution & Systematics* 29: 467-501.
- Rani, V., Raina, S. (2000) "Genetic fidelity of organized meristemderived micropropagated plants: a critical reappraisal". *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 36:319–330
- Ranney, T.G. (2006) "Polyploidy: from evolution to new plant development". *Proceedings International Plant Propagators' Society* 56:137–142.
- Setia, N., Setia, R.C., Chabra, N. (1994). "Interactive effects of growth hormones and calcium antagonists on germination and tube elongation of groundnut pollen". *Plant Cell Incompatibility Newsletter* 26, 70–80.
- Singh, D. P., Jermakow, A. M., Swain, S. M. (2002) "Gibberellins are required for seed development and pollen tube growth in *Arabidopsis*". *Plant Cell* 14(12): 3133-47.

- Skirvin, R.M., McPheeters, K.D., Norton, M. (1994) “Sources and frequency of somaclonal variation”. *Horticultural Science*. 29: 1232–1246.
- Soltis, D. E., Soltis, P.S., Tate, J.A. (2003) “Advances in the study of polyploidy since plant speciation”. *New Phytologist* 161: 173–191.
- Song, C., Liu, S.J., Xiao, J., He, W.G., Zhou, Y., Qin, Q., Zhang, C., Liu, Y. (2012) “Polyploid organisms”. *Science China Life Sciences* **55**: 301–311.
- Spasenoski M., Neskovic M. (1985). “*In vitro* vegetative propagation of *Achinensis chinensis* Planch”. From Juvenile and Adult Plant Segments. UDC 581:144:582.76./77.
- Srivastava, L.M. (2002) “Plant Growth and Development: Hormones and Environment”. Academic Press ISBN: 978-0-12-660570-9.
- Swain, S.M., Reid, J.B., and Ross, J.J. (1993) “Seed development in *Pisum*: The *lhi* allele reduces gibberellin levels in developing seeds, and increases seed abortion”. *Planta* 191, 482–488.
- Swain, S.M., Reid, J.B., Kamiya, Y. (1997) “Gibberellins are required for embryo and seed development in pea”. *The Plant Journal* 12, 1329–1338.
- Tate, J. A., Joshi, P., Soltis, K.A., Soltis, P.S., Soltis, D.E. (2009) “On the road to diploidization? Homoeolog loss in independently formed populations of the allopolyploid *Tragopogon miscellus* (Asteraceae)”. *BMC Plant Biology*. DOI: 10.1186/1471-2229-9-80.
- Uematsu, C., Murase, M., Ichikawae, H., Imamura, J. (1991) “Agrobacterium-mediated transformation and regeneration of Kiwi fruit”. *Plant Cell Reports* 10: 286-290.
- Van Harten, A.M. (1998) *Mutation Breeding: Theory and Practical Applications*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Vattiprolu, N.M.R., Woolley, D.J. and van Hooijdonk, B.M. (2011). “Effect of gibberellins and anti-gibberellins on the vegetative growth of 'hayward' kiwifruit (*Actinidia deliciosa*)”. *Acta Horticulturae* 913, 433-439

- Wang, T., Gleave, A.P. (2012) “Applications of Biotechnology in Kiwifruit (*Actinidia*)”. Agbo EC, ed. Innovations in Biotechnology 1-30.
- Watson, M., Gould, K.S. (1994). “Development of flat and fan-shaped fruit in *Actinidia chinensis* var. *chinensis* and *Actinidia deliciosa*”. Annals of Botany 1994;74:59-68.
- Wu J-H, Datson PM, Manako KI, Murray BG (2015) “Meiotic chromosome pairing behaviour of natural tetraploids and induced autotetraploids of *Actinidia chinensis*”. Theoretical and Applied Genetics 127:549–557. DOI:10.1007/s00122-013-2238-y
- Wu J-H, Ferguson AR, Murray BG (2011) “Manipulation of ploidy for kiwifruit breeding: *in vitro* chromosome doubling in diploid *Actinidia chinensis* Planch”. Plant Cell Tissue and Organ Culture 106:503–511
- Wu, J. H., Ferguson, A. R., & Murray, B. G. (2011). “Manipulation of ploidy for kiwifruit breeding: *in vitro* chromosome doubling in diploid *Actinidia chinensis* Planch”. Plant Cell Tissue and Organ Culture (PCTOC) 106: 503-511.
- Wu, J-H, Ferguson, A.R., Murray, B.G. Jia, Y, Datson P.M., Zhang, J. (2012) “Induced polyploidy dramatically increases the size and alters the shape of fruit in *Actinidia chinensis*”. Annals of Botany 109:169–179.
- Yan, G., J. Yao, A. R. Ferguson, M. A. McNeilage, A. G. Seal, and B. G. Murray. (1997) “New reports of chromosome numbers in *Actinidia* (Actinidiaceae)”. New Zealand Journal of Botany 35:181–186.
- Yang, X., Ye, C., Cheng, Z., Tschaplinski, T.J., Wullschleger, S.D., Yin, W., Xia, X., Tuskan, G.A. (2011) “Genomic aspects of research involving polyploid plants”. Plant Cell Tissue and Organ Culture 104: 387-397. doi:10.1007/s11240-010-9826-1
- Yemets, A.I., Blume, Y.B (2008) “Progress in plant polyploidization based on antimicrotubular drugs”. The Open Horticulture Journal 1:15–20.