Bruno Miguel Simões Luis

Physalis peruviana: ensaios de cultura *in vitro* e hibridação

Dissertação de Mestrado em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal, orientada pelo Prof. 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

· U C ·

Universidade de Coimbra

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Physalis peruviana: ensaios de cultura *in vitro* e hibridação

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 do Prof. Doutor Jorge Manuel Pataca Leal Canhoto (Faculdade de Ciências da Universidade de Coimbra).

Bruno Miguel Simões Luis

2016

Imagem de frutos de Physalis peruviana
da minha autoria

Agradecimentos

Ao meu orientador, Professor Doutor Jorge Canhoto por toda a orientação, apoio científico e revisão, bem como pela sua amizade e disponibilidade que teve ao longo de todo o trabalho.

Ao Dr. João Loureiro por toda a sua disponibilidade e ajuda na citometria de fluxo.

Ao colega João Martins por toda a sua ajuda, pelos ensinamentos, pela imensa paciência, disponibilidade e boa disposição. Porque sem ti, grande parte do trabalho não seria possível.

À Dª Isabel pela ajuda com o material laboratorial e constante boa disposição, nunca negando uma palavra amiga.

A todos os colegas de laboratório, por toda a ajuda, boa disposição e convívio durante este último ano.

Ao Xavier Albano, Stefan Ribeiro, Filipe Pereira e Joana Gonçalves, por todo o companheirismo e boa disposição que reinou entre nós, inclusive nos momentos em que gozaram com as minhas "calinadas".

Aos meus colegas de casa, porque tive a sorte de me cruzar com pessoas que me fizeram sentir em casa. Ao Tiago Pinto, Helena Aires, Rita Mendonça, Cláudia Almeida e, principalmente, ao André Ribau, porque te tornas-te aquele amigo de Coimbra.

A todos os membros do grupo da Ti'Alice, porque aproveitar a vida também é necessário e para isso vocês são os melhores companheiros. Um especial obrigado ao Gustavo Dinis pela companhia ao longo da escrita e pela paciência na edição de imagens.

E porque os últimos são os primeiros, um enorme agradecimento aos meus Pais, que me concederam o privilégio de estudar em Coimbra e me apoiaram incondicionalmente todos estes anos, apesar de todo o esforço pelo qual passaram. Obrigado.

Índice

Resumo……x

Abstract……xii

1. **Introdução**.....1

1.1. Biotecnologia vegetal – princípios e aplicações.....3

1.2. *Physalis peruviana*: realidade produtivo e económica em Portugal.....4

1.3. Importância do género *Physalis*.....5

1.4. Descrição botânica.....6

1.5. Espécies em estudo.....7

1.5.1. *Physalis peruviana* L.....7

1.5.2. *Physalis philadelphica* Lam.....8

1.6. Características e interesse do fruto.....9

1.6.1. Propriedades medicinais.....10

1.7. Cultura e propagação *in vitro*.....12

1.8. Melhoramento de Physalis.....13

1.8.1. Hibridação.....15

1.8.2. Poliploidia.....16

1.9. Objectivos.....20

2. **Materiais e Métodos**.....23

2.1. Estabelecimento in vitro

2.1.1. Material vegetal.....25

2.1.2. Germinação de sementes de Physalissp.....26

2.1.3 Proliferação de rebentos caulinares e organogénese em *Physalis peruviana*.27

2.2. Ensaios de melhoramento de *Physalis peruviana*.....28

2.2.1. Polinização artificial

2.2.1.1. Morfologia da flor.....28
2.2.1.2. Acetólise do pólen.....29
2.2.1.3. Germinação de pólen.....30
2.2.1.4. Ensaios de polinização artificial.....31
2.2.2. Obtenção de plantas poliplóides
2.2.2.1. Indução de poliploidia.....32
2.2.2.1. Análise do nível de ploidia por citometria de fluxo.....34
2.2.2.1. Quantificação de clorofilas a e b.....35
3. Resultados.....37
3.1. Estabelecimento in vitro
3.1.1. Germinação de sementes de *Physalis*sp.....39
3.1.2. Proliferação de rebentos caulinares e organogénese em *P. peruviana*…….43
3.2. Ensaios de melhoramento de *Physalis peruviana*
3.2.1. Polinização artificial.....49
3.2.1.1. Análise morfológica e germinação do pólen.....49
3.2.1.2. Cruzamentos intra e interespecíficos…..….....….....53
3.2.2. Poliploidização.....55
3.2.2.1. Indução e taxa de sobrevivência 55
3.2.2.2. Análise do nível de ploidia por citometria de fluxo 58
3.2.2.3. Estabelecimento e morfologia dos poliplóides.....62
3.2.2.4. Quantificação de clorofilas.....64
4. Discussão…….……...67
4.1. Estabelecimento *in vitro*.....69
4.1.1. Germinação de sementes e estabelecimento de *Physalis* sp.....69
4.1.2. Micropropagação de *Physalis peruviana*.....70
4.2. Ensaios de melhoramento de *Physalis peruviana*.....73
4.2.1. Polinização artificial.....74
4.2.2. Obtenção de plantas poliplóides.....76
4.2.2.1. Estabelecimento e morfologia dos poliplóides.....79
4.2.2.2. Quantificação de clorofilas.....80

5.Conclusão e Perspetivas futuras…….....83

6.Referências ……..……...……..87

Resumo

Physalis peruviana L. é uma espécie nativa dos Andes pertencente à família *Solanaceae*. Atualmente, é das frutas exóticas amplamente aceites no mercado nacional e internacional com um alto valor comercial, possuindo um elevado valor nutritivo e uma excelente fonte de bioativos, que pode melhorar a nossa saúde e o funcionamento do nosso organismo. A importância económica da *Physalis* tem atraído o interesse de investigadores em vários campos científicos, incluindo estudos de genética e melhoramento de plantas, agronomia e produção agrícola.

O principal objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo otimizado de micropropagação para *P. peruviana*, a fim de propagar esta espécie em larga escala e permitir estudos de poliploidia. Atualmente, a indução de poliploidia tem mostrado resultados muito promissores e tornou possível a criação de novos recursos de interesse em espécies comerciais de árvores fruteiras. Esta técnica apresenta uma possibilidade de obtenção de plantas melhoradas uma vez que as plantas resultantes possuem usualmente características gerais mais interessantes do que as plantas diplóides, obtendo-se geralmente um maior vigor, produção de frutos e metabolitos secundários. Foram também realizados estudos de hibridização através de cruzamentos interespecíficos entre *P. peruviana* e *P. philadelphica*. O cruzamento entre espécies similares pode promover o surgimento de características interessantes, como por exemplo frutos partenocárpicos, principalmente quando as espécies possuem um tamanho genómico diferente.

A existência de métodos de propagação eficazes é essencial quando se pretende melhorar uma espécie e proceder à sua produção em grande escala. Explantes apicais e segmentos nodais de *Physalis peruviana* foram utilizados em protocolos de proliferação de rebentos caulinares e organogénese, através da inoculação em meio MS, suplementado com diferentes concentrações de reguladores de crescimento (PGRs) como BAP, 2,4-D, GA_3 e NAA. A maior percentagem de rebentos meristemáticos foi obtida a partir de explantes em contacto com BAP (2 mg/L) + GA_3 (1,5 mg/L) + 2,4-D (1 mg/L), obtendo-se uma média de 4 novos rebentos por explante, resultando em média a produção de 13,7 ± 2,2 nós com o uso de um único explante. Com este meio, as plântulas não produzem raízes, como tal, estas são cultivadas em meio MS sem PGRs, a fim de desenvolver o seu sistema radicular, sendo ulteriormente estabelecida no solo.

A fim de promover poliploidia, segmentos nodais e sementes de *P. peruviana* foram inoculados durante diferentes intervalos de tempo, com concentrações de colquicina que variaram de 250 μM a 25000 μM, sendo os níveis de ploidia analisados posteriormente através de técnicas de citometria de fluxo. Em ambos os ensaios, as taxas de sobrevivência foram bastante elevadas (92%), sendo o tratamento em que explantes nodais foram tratados com colchicina na concentração de 1000 μM, a que registou a taxa de indução mais elevada (± 13,7%).

As plantas octoplóides resultantes são férteis e produtivas, contudo a viabilidade do pólen bem como o quantidade de clorofilas revelou ser menor em comparação com as plantas autotetraplóides utilizadas para a indução.

Nos cruzamentos interespecíficos realizados entre as duas espécies, apesar de baixa, foi conseguida uma compatibilidade *in vitro e in vivo.* Nos cruzamentos *in vitro* verificou-se uma baixa germinação do pólen de *P. philadelphica*, em conformidade com os ensaios de germinação realizados, no estigma de *P. peruviana*. No entanto, quando realizado o cruzamento inverso, não houve germinação do pólen de *P. peruviana*. Nos ensaios *in vivo* foi conseguida uma taxa de fecundação de 1,6% entre as duas espécies, tendo sido obtido um fruto completamente desenvolvido. Este fruto, apesar de dimensões reduzidas, apenas possuía uma semente hibrida completamente desenvolvida.

Os resultados obtidos, apesar de preliminares, abrem boas perspetivas no que diz respeito à micropropagação e melhoramento de *P. peruviana*. No entanto, alguns estudos necessitam de ser realizados com o intuito de serem analisados os resultados obtidos, mais precisamente os octoplóides e híbridos. Os resultados de hibridação interespecífica são especialmente interessantes, pois permitem num futuro o cruzamento de genótipos, no sentido de obter variedades com características vantajosas. Os frutos dos octoplóides poderão ser um avanço científico muito importante nesta espécie, podendo estes ter grande interesse comercial de acordo com as características que irão apresentar.

Palavras-chave: citometria de fluxo; cruzamentos interespecíficos; micropropagação; microscopia de fluorescência; plantas octoplóides; poliploidização; viabilidade polínica.

Abstract

Physalis peruviana L. is native of the Andes and belongs to the family of Solanaceae. Currently, this exotic fruit is widely accepted in national and international market with a high value, being very nutritious and an excellent source of bioactive compounds, what can improve our health and the functioning of our organism The economic importance of *Physalis* has attracted the interest of researchers in various scientific fields, including studies in genetics and plant breeding, agronomy and crop production.

The main objective of this work was to develop and to optimize in vitro micropropagation protocols to *P. peruviana*, in order to propagate this species in large scale and enable polyploidy studies. Currently, polyploidy induction has shown very promising results and made possible the creation of new features of interest in commercial fruit tree species. This technique presented a possibility to obtain improved plants since polyploid plants usually have most interesting general characteristics than diploid plants, typically yielding a greater fruit production and secondary metabolites. It was also performed hybridization studies through interspecific crosses between *P. peruviana* and *P. philadelphica*. The junction between similar species can promote the appearance of interesting characteristics, such as parthenocarpic fruit, especially when the species have a different genomic size.

The existence of effective propagation methods is essential when improving a species and provide a large scale production. Shoot tip and nodal explants of *Physalis peruviana* were used for direct multiple shoot induction and organogenesis protocols by inoculation on MS basal medium supplemented with different concentrations of PGRs like BAP, 2,4-D, GA_3 and NAA. The highest percentage of meristematic shoots was achieved from explants at BAP (2 mg/L) + GA_3 (1.5 mg/L) + 2,4-D (1 mg/L), resulting in an average of 4 new shoots per explant, resulting in an average of 13.7 ± 2.2 with the use of one nodal explant. With this medium, the explants did not produce roots, so they were then cultured on MS medium without PGRs in order to develop its root system, subsequently, to be established in the soil.

In order to promote polyploidy, nodal explants from young seedlings and seeds of *P. peruviana* were inoculated at various time intervals with colchicine in

concentrations ranging from 250 µM to 25000 µM and ploidy levels were tested by flow cytometry techniques. In both assays, survival rates were quite high (92%), being the plants treated with 1000µM of colchicine on nodal explants, the one that recorded the highest induction rate (±13.7%).

The octoploids resulting plants are fertile and productive, however pollen viability and the amount of chlorophyll was found to be lower in comparison with the plants autotetraploid used for induction. Despite not having been assessed, the octoploids plants appear to have a higher water resistance than autotetraploids plants.

The interspecific cross made between the two species *in vitro* and *in vivo* was achieved compatibility. *In vitro* pollen crosses was found low germination of *P. philadelphica* pollen on the stigma of *P. peruviana,* in accordance with the germination tests performed. However, when performed the reverse cross, germination of *P. peruviana* pollen was not observed. *In vivo* tests was reached one fertilization rate of 1.6% between the two species, having obtained a fruit fully developed. This fruit, in spite of reduced dimensions, had only a fully developed hybrid seed.

This preliminary results open good prospects in the micropropagation and improvement of *P. peruviana*. However, some studies need to be performed in order to analyze the results obtained, more precisely evaluate of octoploids and hybrids. The interspecific hybridisation results are particularly interesting because they allow a future crossing genotypes, in order to obtain varieties with interesting advantages. The fruits of octoploids may be a very important scientific advance in this species, can these have a great commercial interest in accordance with the characteristics that will present.

Keywords: fluorescence microscopy; flow cytometry; interspecific crosses; micropropagation; octoploids plants; pollen viability; polyploidy.

1. Introdução

1.1. Biotecnologia vegetal – princípios e aplicações

No decorrer dos últimos anos, com o aumento contínuo da população, a elevação dos padrões de vida de alguns países, diminuição da área de solos agrícolas e disponibilidade de água para irrigação, acentua-se as preocupações relativas às necessidades alimentares da espécie humana e ao facto de os métodos de melhoramento convencionais não conseguirem suportar o aumento requerido de bens alimentares (Borlaug & Dowswell, 2005). Estes fatores promovem o desenvolvimento de cultivares mais rentáveis, bem como o melhoramento de variedades já existentes (Khush, 2005).

A biotecnologia, resultante da integração das ciências da vida e da engenharia, tem como principal objetivo o desenvolvimento de novos produtos, com base nas potencialidades dos organismos, células ou mesmo organitos, para fins práticos ou industriais (Chawla, 2010). A Biotecnologia Vegetal tem como objetivo a manipulação de plantas, para a obtenção de novas características ou a sua utilização para a obtenção de determinados produtos e realização de determinadas funções (Leite & Munhoz, 2013).

A Biotecnologia Vegetal tem-se revelado crucial para o aumento da produção agrícola mundial, devido ao seu potencial de utilização e otimização dos recursos vegetais. O aperfeiçoamento e criação de novas tecnologias, bem como a sua aplicação no desenvolvimento de sistemas de propagação de plantas, apresenta-se como uma área com inúmeras potencialidades e possibilidades de exploração científica e socioeconómica (Canhoto, 2010).

Na Biotecnologia Vegetal inclui-se a cultura *in vitro*, que diz respeito ao estabelecimento e manutenção, em condições laboratoriais, de células, tecidos, órgãos vegetais, plantas ou massas de células, designadas por calos (Chawla, 2010). De entre as metodologias utilizadas na cultura *in vitro* destacam-se as técnicas de micropropagação que permitem a clonagem em larga escala de plantas de interesse. Os protocolos de micropropagação visam a rápida multiplicação de plantas geneticamente iguais à planta mãe, sendo induzida a proliferação de meristemas caulinares, a indução de novo de meristemas (organogénese) ou a formação de embriões somáticos (embriogénese somática) em resposta a tratamentos hormonais (Loyola-Vargas & Vázquez-Flota, 2006).

Os métodos de propagação *in vitro* possuem uma grande vantagem relativamente aos métodos convencionais, uma vez que a partir de um único indivíduo, permitem a produção de um grande número de plantas, num período de tempo relativamente curto. Em suma, as plantas micropropagadas, quando comparadas com as propagadas por semente, regra geral, apresentam maior vigor, qualidade mais uniforme e um crescimento e maturação mais rápidos (Pais, 2003). Para além disso, a qualidade fitossanitária destas plantas é superior à daquelas obtidas por outros métodos convencionais (Hartmann *et al*., 1997).

1.2. *Physalis peruviana*: realidade produtivo e económica em Portugal

Mais conhecida em Portugal por tomate-de-capucho, a *Physalis peruviana* L. é ainda um fruto pouco conhecido de grande parte da população portuguesa. O mercado nacional para este pequeno fruto ainda é limitado, tornando-se necessário divulgar este produto e os benefícios do seu consumo. De momento os maiores consumidores, no nosso país, são as indústrias de pastelaria, que utilizam a fisális como elemento decorativo (Manso, 2013).

Sendo esta uma espécie muito tolerante a diferentes tipos de climas, Portugal reúne as condições edafoclimáticas que possibilitam a produção desta espécie e, apesar de ser um fruto pouco conhecido a nível nacional, alguns pequenos produtores iniciaram a exploração desta espécie nos últimos anos. Dadas as limitações da produção, a quantidade de fruto produzida anualmente é insuficiente para assegurar a procura nacional, pelo que uma parte considerável dos frutos consumidos são importados (Almeida, 2014).

Numa análise SWOT realizada a este produto, destacaram-se a sua qualidade nutricional, inovação e facilidade de escoamento como os principais pontos fortes (Almeida, 2014). Para além disso, o facto de haver uma grande procura por parte dos países nórdicos, onde o poder de compra dos consumidores é elevado, bem como os apoios governamentais e o aproveitamento das condições naturais do país para produzir um fruto considerado tropical, torna a exploração desta espécie uma boa oportunidade de negócio. Contudo, a inexperiência de produção e o fraco conhecimento do mercado, associado aos preços elevados de venda do fruto e o facto de se estar dependente de um

reduzido número de clientes nacionais, poderá ser um obstáculo a uma produção em larga escala. Para além disso, a circunstância de ser um fruto "desconhecido" para a maioria da população, de existir tendência para que a concorrência aumente a médio/longo prazo e de poderem surgir produtos concorrentes semelhante poderão ser fortes ameaças à produção e comercialização deste pequeno fruto.

1.3. Importância do género *Physalis*

O género *Physalis* pertence à família Solanaceae, que inclui espécies muito importantes do ponto de vista económico como é o caso da batateira (*Solanum tuberosum*), pimenteiro (*Capsicum annuum*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), tamarilho (*Solanum betaceum*) e tomateiro (*Solanum lycopersicum*), entre muitas outras (Eich, 2008). Para além da perspetiva económica, esta família é também muito importante do ponto de vista científico, pois muitas descobertas importantes para a ciência foram conseguidas em plantas desta família (Kazi, 2015)

No caso particular do género *Physalis*, a vertente científica não se encontra muito explorada, no entanto, a vertente económica vem sendo cada vez mais explorada em alguns países, como o caso da Colômbia. De facto, a grande diversidade fenotípica deste género, associada à sua importância económica e distribuição mundial fazem deste género um alvo de interesse crescente por parte da comunidade científica e da indústria agrícola.

O género *Physalis* inclui várias espécies importantes do ponto de vista económico como é o caso de *P. peruviana* (cape gooseberry na língua inglesa). Esta espécie produz um fruto exótico muito apreciado pelo seu sabor único, textura e cor. Para além disso, investigações recentes mostraram que este fruto apresenta um elevado teor de compostos ativos benéficos à saúde (Puente *et al.*,2010). A diversidade de aplicações deste fruto, quer seja para consumo em fresco, produção de sumos e iogurtes ou na indústria pasteleira potenciam o seu valor comercial, tornando-o muito apelativo para os produtores (Manso, 2013). Na Colômbia, este fruto tem uma elevada relevância nos mercados de exportação, tendo-se verificado um aumento sustentado das exportações desde 1993 com um máximo em 2014, correspondente a cerca de 6000 toneladas no valor de cerca de 30 milhões de USD (Agronet, 2016), sendo os principais

países importadores a Holanda (43%) seguido de Espanha, Alemanha e Canadá (Altamirano, 2010).

Outra espécie importante é *P. philadelphica*, que produz frutos muito apreciados na cozinha tradicional mexicana devido à sua utilização na elaboração de diversos pratos, como é caso das famosas *salsas.* Para além disso, o fruto cozinhado ou cru, pode ser usado na preparação de purés e *picadillos* que servem de base e/ou complemento na preparação de diversos pratos (Hernández & Yañez, 2009). O consumo de *P. philadelphica* tem aumentado consistentemente, despertando o interesse de diversas empresas e agricultores.

Em função do potencial do género *Physalis*, o interesse científico tem também aumentado com o objetivo de melhorar a produção das culturas, recorrendo-se à investigação em várias disciplinas, tais como a genética molecular, cultura de tecidos e fitoquímica e identificação e extração de metabólitos secundários para utilização farmacológica (Bonilla *et al.*, 2003).

1.4. Descrição botânica

As plantas deste género são herbáceas, anuais ou perenes, arbustivas, possuíndo desde 20 cm até 2 m de altura, por vezes com o caule lenhificado na base (Fischer, 2000). As folhas são pecioladas, alternadas e com um limbo, oval. Uma característica marcante deste género é a presença de um cálice que se assemelha a uma campânula e que cobre por completo o fruto durante a frutificação. Este é uma baga suculenta, na maioria das vezes séssil, podendo ter várias colorações, desde verde, laranja, amarelo ou com tons púrpuras, medindo de 0,8 a 4 cm de diâmetro. O fruto contêm numerosas sementes, reniformes, de 1,2 - 2 mm de diâmetro, amarelas com uma tonalidade dourada (Martínez, 1999).

O gênero *Physalis* inclui de 70 a 90 espécies a nível global que se distribuem principalmente nos Estados Unidos, México, Colômbia, Argentina, Antilhas e Eurásia (Whitson & Manos, 2005). No México conhecem-se cerca de 50 espécies, sendo este país considerado o centro de origem e diversidade desta *taxa* (D´Arcy, 1991).

1.5. Espécies em estudo

1.5.1. *Physalis peruviana* L.

Esta espécie é capaz de crescer numa vasta gama de altitudes, sendo cultivada preferencialmente a partir dos 2000 m acima do nível do mar, desde que os níveis médios de humidade relativa não ultrapassem os 75% (Popova *et al*, 2010). O excesso de humidade pode beneficiar doenças, prejudicar polinização e causar amarelecimento e deiscência foliar (Muniz *et al*, 2014). Esta espécie suporta baixas temperaturas, contudo, sofre danos irreparáveis quando estas descem abaixo de 0 °C e, a temperaturas inferiores a 10 ºC o seu crescimento é afetado. A temperatura ótima de desenvolvimento é de 18 °C; temperaturas muito altas podem afetar a floração e consequente frutificação. Ventos fortes e luminosidade reduzida interferem também com a sua produtividade (Fries & Tapia , 2007).

P. peruviana é uma espécie com elevado potencial económico, possuindo também uma perspetiva ecológica, pois cresce em solos pobres, bem drenados e com baixas exigências de fertilização (Miranda *et al*, 2005) (Fig. 1A). A quantidade de água disponível deve ser abundante durante o desenvolvimento vegetativo, mas não durante o amadurecimento do fruto (Fig. 1B), sob pena de ocorrer rachamento e consequente diminuição da qualidade dos frutos e da produtividade. Esta espécie prefere solos com pH entre 5,5 - 7 e com bom teor de matéria orgânica (Miranda *et al*, 2005). Os solos argilosos não são adequados para a cultura desta espécie, uma vez que as suas raízes são superficiais (Fries & Tapia , 2007).

Esta espécie possui diferentes ecótipos que se diferenciam pelo tamanho, cor e sabor do fruto, forma da flor e tamanho da planta. Atualmente, os três ecótipos mais cultivados são os originários da Colômbia, Quénia e África do Sul (Almanza & Espinosa, 1995), havendo uma distribuição desta espécie por tudo o mundo (Fig. 1D). Destes, o ecótipo colombiano caracteriza-se pela produção de pequenos frutos (5 g), com cores mais vivas e maior teor de açúcar sendo o mais interessante para os mercados

e o mais explorado economicamente, também devido ao seu comportamento pós-colheita (Almanza & Espinosa, 1995).

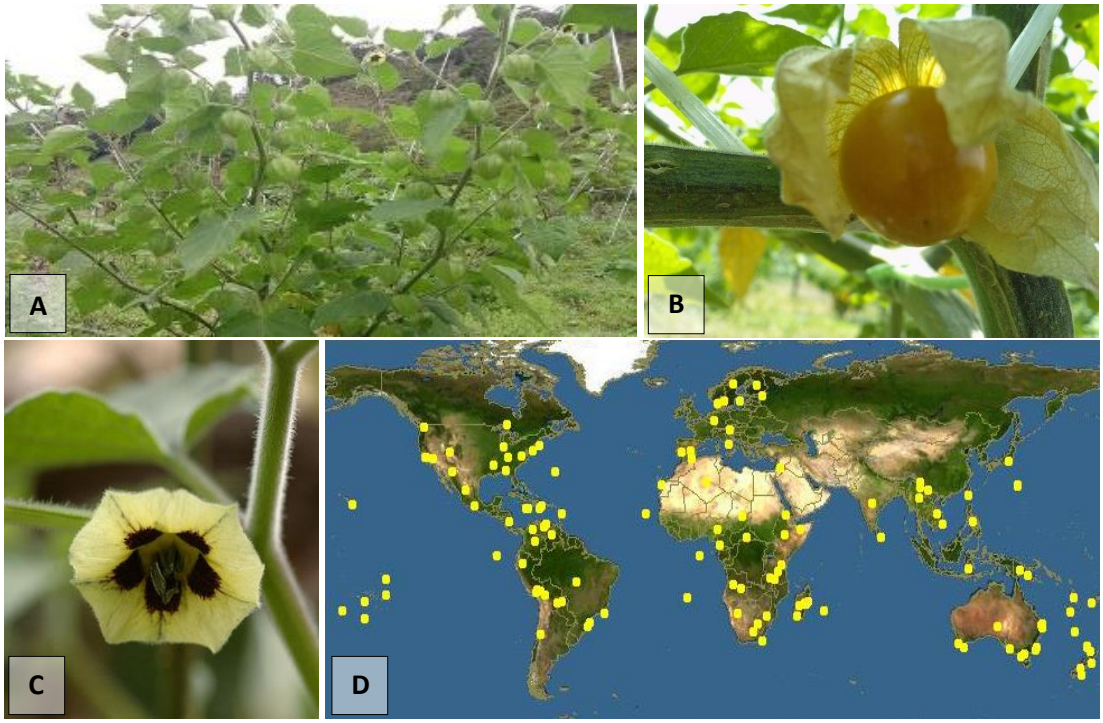

Figura 1. Morfologia da planta de *P. peruviana* (A), fruto (B), botão floral (C) e distribuição mundial (D). [imagens (A; D) retiradas de http://eol.org, acedido a 18 de Março de 2016].

1.5.2. *Physalis philadelphica* Lam.

Também conhecido como tomate-de-casca, tomate-verde ou tomatillo, era cultivado pelos Maias e Aztecas desde as épocas pré-Colombianas, sendo o México o seu centro de origem e domesticação (Fig. 2D), com ocorrência desde o nível do mar até 2300 m de altitude (Menzel, 1951). *Physalis philadelphica* é uma planta herbácea anual, ereta, ramificada, que alcança cerca de 1 m de altura (Fig. 2A). O fruto, do tipo baga (Fig. 2B), pode ser amarelo, verde ou roxo e é um componente constante da dieta mexicana (Villarreal, 1998).

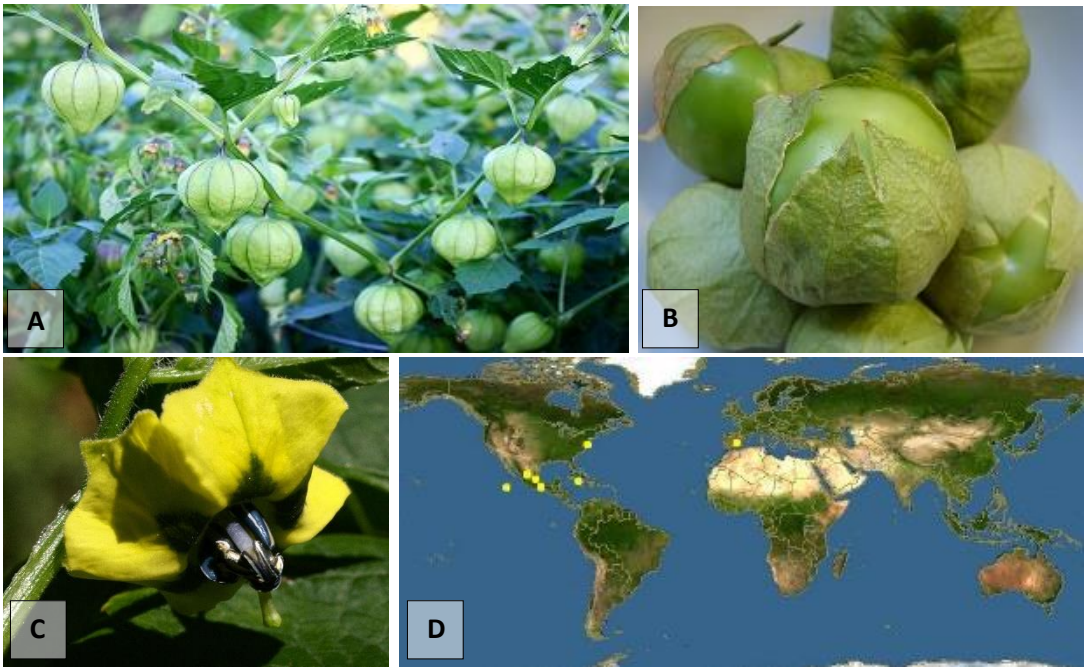

Figura 2. Morfologia da planta de *P. philadelphica* (A), fruto (B), botão floral (C) e distribuição mundial (D). [imagens retiradas de http://eol.org, acedido a 20 de Março de 2016].

1.6. Características e interesse do fruto

O fruto de muitas espécies deste género é um elemento importante na culinária tradicional dos povos da Mesoamérica e o cálice e folhas são usados desde há muito na medicina tradicional (Hernández & Yañez, 2009).

O fruto de *Physalis peruviana* é uma baga suculenta com um formato oval, possuindo um diâmetro entre 1,25-2,50 cm e 4 a 10 g de peso, contendo no seu interior uma polpa alaranjada e uma média de 100 a 200 pequenas sementes (Fig. 1B). Este fruto é protegido pelo cálice que cobre completamente o fruto ao longo do seu desenvolvimento e amadurecimento, protegendo-o contra factores bióticos e abióticos. Além disso, esta estrutura representa uma fonte essencial de carbohidratos durante os primeiros 20 dias de crescimento e desenvolvimento (Fries & Tapia , 2007)

A vida útil dos frutos de *P. peruvian*a, desde que o cálice esteja presente, é de um mês; no entanto, se este for removido os frutos mantêm-se apenas 4 a 5 dias (Cedeño & Montenegro, 2004). No entanto, os frutos sem cálice podem sofrer processos

de conservação, como por exemplo, desidratação e congelamento, sem que haja perca das suas propriedades.

O fruto, de sabor agridoce é geralmente consumido fresco. Além disso, pode ser usado em xaropes ou desidratado, adquirindo um sabor extremamente ácido, bem como em molhos para carnes e marisco. Nos mercados europeus, ele é muito apreciado como ornamento, saladas, sobremesas e bolos (Cedeño & Montenegro, 2004).

Os benefícios associados ao fruto de *P. peruviana* são principalmente devido à sua composição nutricional (Tabela 1). No entanto, para além de possuir boas características nutricionais, o fruto contém componentes biologicamente ativos que oferecem benefícios para a saúde e poderão reduzir o risco de surgirem certas doenças. Entre os seus principais componentes, estão os ácidos gordos polinsaturados, as vitaminas A, B, C, E e K1 e fitoesteróis, como as fisalinas fisalinas (Puente *et al.*,2011).

Tabela 1. Informação nutricional do fruto de diferentes ecótipos de *Physalis peruviana*

Composição	**Conteúdo (100g de fruta)**		
	National Research Council (1989)	Osorio & Roldan (2003)	Repo de Carrasco & Zelada (2008)
Energia (cal)	73,0	49,0	76,8
Água (g)	78,9	85,9	79,8
Proteínas (g)	0,3	1,5	1,9
Gorduras (g)	0,2	0,5	0,1
Carbohidratos (g)	19,6	11,0	17,3
Fibras	4,9	0,4	3, 6

1.6.1. Propriedades medicinais

Muitas propriedades medicinais são atribuídas ao fruto de *P. peruviana*, tais como um efeito diurético, antisséptico, sedativo, analgésico, problema de garganta e intestinais. Contudo, não há estudos que comprovem estes efeitos (Rodríguez & Rodríguez, 2007). Na medicina tradicional peruana, o fruto de *P. peruviana*, é utilizado empiricamente para o tratamento do cancro, hepatite, asma e malária, no entanto, estes efeitos não estão cientificamente provados (Zavala *et al.*, 2006). No entanto, estudos

indicam que a ingestão deste fruto reduz a glicose no sangue 90 min após o período pós-prandial em jovens adultos, causando um efeito hipoglicemiante. Este efeito é devido à grande quantidade de campesterol, que reduz a circulação do colesterol LDL (Rodríguez & Rodríguez, 2007).

O pequeno fruto de *P. peruviana* possui um elevado valor de vitaminas e flavonoides (Velasquez *et al*. 2007; Wu *et al*., 2009). Wu *et al*. (2009) demostrou que extratos deste fruto apresentam uma potente atividade antioxidante e elevados níveis de flavonoides e conteúdo fenólico, destacando-se a rutina, miricetina e canferol, compostos que podem ser encontrados tanto no fruto, como no cálice (Licodiedoff *et al.* 2013).

Em *P. philadelphica* extrações realizadas nos cálices dos frutos, a par da raiz, revelaram altos valores de rutina e quercetina (Pérez-Castorena *et al*. 2013), importantes flavonoides com propriedades farmacológicas passivas de ser exploradas.

Os produtos naturais têm sido uma opção viável devido às suas atividades farmacológicas. Embora exista uma variedade de drogas imunossupressoras atualmente disponível, para combater alergias e transplantes de órgãos, a sua utilização prolongada é muitas vezes acompanhada por efeitos indesejados. O recurso a pseudo-esteróides conhecidos como fisalinas, isolados a partir de *Physalis*, vem revelando uma atividade supressora em macrófagos, similar à medicação usualmente utilizada (Soares *et al*., 2006). Foram também descritos estudos onde ocorreu uma resposta inibitória no crescimento de células tumorais através do recurso a macerados de extratos foliares de *P. peruviana*, sendo os principais constituintes bioativos as fisalinas A, B, D, F e glicosídeos, que demostraram atividade anti-cancerígena. Isto sugere que alguns dos efeitos observados na medicina tradicional poderam ser em parte devido à ação destes pseudo-esteróides com ação imunoinflamatória. (Zavala *et al.*, 2006)

A grande quantidade de agentes antioxidantes, flavonoides e pseudo-esteróides, como as fisalinas, são algumas das propriedades que despertam o interesse da comunidade científica, podendo este género no futuro vir a ter um papel preponderante no tratamento de algumas doenças.

Uma vez que existe uma grande variação morfológica inter e intraespecífica neste género, os perfis fenóliticos podem ter um papel preponderante. Através da

identificação dos quimiomarcadores de maior destaque dentro de cada espécie, poder-se-ia estabelecer limites específicos no gênero, estudos que inclusive foram realizados em grupos de plantas semelhantes (Medina-Medrano *et al*., 2015).

1.7. Cultura e propagação *in vitro*

A utilização de métodos de cultura de tecidos para a seleção dos melhores cultivares e propagação clonal é primordial para a realização de micropropagação, especialmente quando se pretende melhorar uma espécie e produzi-la em larga escala (Rodrigues *et al*., 2013).

O principal método de propagação de fisális é através da semente, uma vez que as taxas de germinação rondam os 100% (Manso, 2015). No entanto, a germinação de sementes não assegura a uniformidade genética, o que faz com que não tenha utilidade quando o objetivo é a fixação de características mais vantajosas (García-Osuna *et al.*, 2015).

Técnicas de multiplicação vegetativa poderão ser uma opção para assegurar a multiplicação de plantas selecionadas. Neste contexto, a micropropagação poderá ser uma opção vantajosa, dado que proporciona uma rápida multiplicação das plantas, muitas vezes associada a uma precocidade de produção, devido à ausência de período juvenil em relação, por exemplo, à propagação por meio de sementes (Chawla, 2010).

Um dos maiores problemas da micropropagação reside na dificuldade de se obter tecidos livres de contaminação, principalmente por bactérias, pois nem sempre se consegue eliminá-las com recurso a antibióticos (Chave *et al*., 2005). O uso de germicidas à base de cloro, tais como o hipoclorito de sódio e de cálcio, é muito recorrente para um eficaz estabelecimento *in vitro* (Grattapaglia & Machado, 1998). A necessidade de instalações adequadas e mão-de-obra qualificada, possibilidade de ocorrência de variação somaclonal e vitrificação (Chawla, 2010) são também algumas limitações das técnicas de clonagem *in vitro*.

Vários meios básicos têm sido utilizados na multiplicação de plantas, sendo o meio MS (Murashige & Skoog, 1962) um dos mais usados. A adição de citocininas ao meio de cultura vem demonstrando ser indispensável nos processos de multiplicação,

uma vez que permite a quebra da dominância apical e indução da proliferação de gemas axilares (Hu & Wang, 1983). Porém, o uso em excesso deste regulador é tóxico e caracteriza-se principalmente pela falta de alongamento das culturas, redução do tamanho das folhas, encurtamento dos entrenós, engrossamento exagerado dos caules, e vitrificação generalizada, ocasionando sérios problemas na fase de enraizamento (Leshen *et al*., 1988).

As técnicas de micropropagação mais usadas na propagação de plantas são a embriogénese somática, a organogénese e a proliferação de meristemas axilares (Gomes & Canhoto, 2009), podendo estes últimos ser resultantes da cultura de ápices ou de segmentos nodais. De entre estas técnicas, a proliferação de rebentos caulinares a partir de gemas axilares é a mais usada na propagação de solanáceas (Chawla, 2010). Apesar de serem poucos os estudos feitos *in vitro*, a fisális é uma espécie que poderia beneficiar de tecnologias já desenvolvidas para outras solanáceas (Jordán & Botti, 1992).

A micropropagação é uma metodologia de utilização recente no género *Physalis* existindo alguns protocolos de cultura *in vitro*. Em *P. peruviana* existem estudos de várias vertentes da biotecnologia vegetal, como germinação de sementes *in vitro* (Moreira *et al*, 2010), cultura de meristemas (Chaves *et al*. 2005; Yucesan, *et al*. 2015) e organogénese (Ramar *et* al., 2014), contudo ainda pouco se conhece sobre o comportamento *in vitro* desta espécie e, para além disso, existe muita disparidade entre os resultados de alguns autores.

1.8. Melhoramento de Physalis

O melhoramento de plantas visa a obtenção de plantas com características vantajosas e, por isso, em qualquer programa de melhoramento é necessário identificar e/ou produzir variabilidade genética, relacionada com as características consideradas interessantes (Cagliari & Forster, 2012). A seleção de plantas com as características desejadas (selecção artificial) e o seu posterior cruzamento é o método mais convencional que pode ser usado com esse propósito (Cely *et al.*, 2015).

Assumindo um papel comercial cada vez maior, torna-se fundamental a obtenção de cultivares de fisális cujas características sejam comercialmente vantajosas para o produtor e consumidor final. Assim, em ambos os casos, é desejável a obtenção de plantas que produzam uma maior quantidade de frutos, mais saborosos e de maiores

dimensões. Para além disso, dadas as propriedades dos frutos, existe também interesse na obtenção de cultivares com determinadas qualidades químicas que possam ter aplicações industriais, farmacêuticas ou medicinais. É igualmente desejável uma melhoria da capacidade de resistência a condições ambientais adversas, tais como, geada, temperaturas extremas, seca prolongada, doenças e pragas, fatores que podem comprometer uma produção "saudável" deste fruto através de fenómenos de rachamento do fruto ou morte prematura das plantas (Manso, 2013).

As variedades mais comercializadas são geralmente propagadas vegetativamente e os híbridos, muitas vezes de origem desconhecida, têm sido selecionados pelos produtores. Apesar de em certos casos os métodos tradicionais de melhoramento serem eficientes na obtenção de um bom resultado, o moroso processo poderá ser um obstáculo para o melhoramento de uma espécie, devido aos longos períodos de tempo entre as diferentes gerações.

A maior vantagem da propagação vegetativa é que em qualquer fase do programa de melhoramento, plantas que apresentem características favoráveis, tanto de ordem qualitativa quanto quantitativas, podem ser fixadas geneticamente através da multiplicação e reproduzidas em larga escala indefinidamente. Estes clones podem ser utilizados como cultivares comerciais, avaliação em diferentes condições ou como fonte para posteriores hibridações (Cely *et al.*, 2015).

A estratégia mais imediata de melhoramento vegetal para a obtenção de variedades mais produtivas é a seleção de plantas pela natureza, como já foi referido; contudo é uma técnica demasiado limitada. O cruzamento entre plantas selecionadas é outra solução (Allard, 1999), mas que pode ser dificultada nos casos de reduzida variabilidade disponível ou de reduzidas taxas de germinação de sementes. Desta forma, torna-se necessária a utilização de estratégias mais rápidas e com maior eficácia - as estratégias biotecnológicas. Entre estes procedimentos alternativos pode destacar-se a micropropagação, a hibridização (Brown & Thorpe, 1995) e a indução de haploidia ou poliploidia (Pintos *et al*., 2007).

1.8.1. Hibridação

As flores de *P. peruviana* podem ser facilmente polinizadas por fatores bióticos e abióticos, ocorrendo frequentemente autopolinização (Puente *et al*. 2011), sendo que, estudos prévios obtiveram uma taxa de sucesso de 100% sustentando o facto que esta possui uma reprodução alógama e autógama, em conexão com os relatos de Lagos et al. (2008). Pelo contrário, no caso de *P. philadelphica* a autopolinização não ocorre, uma vez que esta espécie é autoincompatível, assim são necessárias pelo menos duas plantas para a formação dos frutos (Pandey, 1957)

A viabilidade do pólen em P. *peruviana* é relativamente elevada, rondando os 85% (Puente et al., 2011). Contudo, as percentagens de viabilidade do pólen desta espécie variam muito de variedade para variedade, indicando que dentro da espécie poderá haver alguma variabilidade genética relacionada com a distribuição geográfica. (Almanza & Espinosa, 1995). Assim, existe um particular interesse em selecionar genótipos de cultivo comercial adequados, bem com uma boa adaptabilidade ao local de cultivo, por forma assegurar uma viabilidade ótima do pólen.

A auto-polinização em *P. peruviana* é recorrente devido à grande quantidade de pólen libertado e grande compatibilidade para com o mesmo, contudo estudos indicam que frutos que derivam de gametas de diferentes plantas têm tendência a possuir uma maior tamanho e massa, sendo a presença de polinizadores como *A. mellifera*, fundamental para este processo (Chautá-Mellizo *et al.*, 2012).

Um dos melhoramentos ao nível do fruto que possui maior aceitação comercial, em espécies frutícolas, são as variedades sem sementes, uma vez que a ingestão destes frutos é facilitada. Os frutos de *P. peruviana* possuem um elevado número de sementes assim, este melhoramento seria muito benéfico nesta espécie.

Existem vários métodos para a obtenção de plantas sem sementes, como por exemplo a regeneração de plantas através do endosperma. Contudo, o método convencional, através de cruzamentos polínicos entre níveis diferentes de ploidia, é o mais rápido e económico (Ranney, 2006).

Em plantas triplóides (3n) verifica-se com frequência a formação de frutos partenocárpicos, podendo estes cultivares ser obtidos artificialmente através da hibridização de plantas tetraplóides com plantas diplóides, obtendo-se assim uma F1 triplóide (Acquaah, 2009).

O cruzamento de plantas com um número cromossómico diferente poderá ser uma opção à obtenção de triplóides, uma vez que diferentes variedades de *P. peruviana* variam no que se refere ao número de cromossomas.

Cruzamentos interespecíficos também podem levar à formação de plantas com tamanho genético diferente e/ou características interessantes. Ensaios interespecíficos realizados entre *P. floridana* e *P. peruviana*, revelaram 50% de viabilidade polínica entre as duas espécies, tendo sido obtidos frutos com algumas sementes hibridas viáveis, quando *P. floridana* era a recetora de pólen. Quando realizado o inverso, os frutos obtidos possuíam menores dimensões e não apresentaram sementes (Cely *et al.*, 2015).

Estudos prévios de citogenética, suportam que o número básico de cromossomas identificado para o género Physalis é de n = 12 (Menzel, 1951). Em *P. peruviana* foram detetadas variedades com 24 e 48 cromossomas (Noha & Rodriguez, 2006; Lagos, 2005) enquanto em *P. philadelphica* o número cromossómico é de 24 (Menzel, 1951; Liberato et al., 2014). A hibridação através de especiação natural em *P. peruviana* é muito recorrente, formando-se assim diversos ecótipos com tamanhos cromossómicos diferentes que, quando avaliados, demonstraram um desenvolvimento, morfologia e produtividade muito dispares entre si (Noha & Rodriguez, 2006).

1.8.2. Poliploidia

A poliploidia é um processo antigo que ocorre com alguma frequência de forma espontânea nas plantas, sendo considerado um fenómeno comum e fundamental durante a evolução das angiospérmicas (Zhang *et al*., 2008). Contudo, apesar da sua enorme importância a nível evolutivo, a frequência com que surgem poliplóides espontâneos na natureza é demasiado baixa considerando a celeridade associada às técnicas de melhoramento vegetal (Adams & Wendel, 2005).

A indução de poliplóides apresenta-se como uma das soluções possíveis para a obtenção de plantas melhoradas, uma vez que os poliplóides são geralmente tidos como superiores às plantas diplóides no que diz respeito às características em geral, apresentando habitualmente um maior vigor, fertilidade e produção (Shao *et al.*, 2003). Em termos agronómicos as plantas tetraplóides têm um interesse particular. Entre estas características, destacam-se a maior robustez, a presença de folhas e flores de maiores

dimensões e com cores mais intensas, o aumento do período de floração, a existência de caules e raízes mais espessas, o aumento da resistência a pestes e doenças e/ou uma maior tolerância a stresses ambientais (Shao *et al.*, 2003; Yang *et al*., 2006; Zhang *et al.*, 2008). Os indivíduos tetraplóides, em algumas espécies, apresentam um aumento na proporção da polpa do fruto bem como uma diminuição do número de sementes (Stanys et al., 2006). Para além disso, a atividade enzimática e, consequentemente, quantidade de metabolitos secundários geralmente aumenta nos poliplóides (Stanys *et al*., 2006). Apesar de existirem inúmeras vantagens neste processo, existem casos em que plantas com um nível de ploidia superior, ocorre uma diminuição considerável da viabilidade dos grãos de pólen e da fertilidade, como foi o caso em *Physalis ixocarpa*, que após ser realizada a duplicação do genoma, ocorreu uma perca de 22% de viabilidade (Ramírez-Godina *et al.* 2013).

A maneira mais eficaz de se produzir plantas poliplóides é através da interferência do seu ciclo mitótico, uma vez que este, pode ser interrompido através de compostos químicos, denominados agentes antimitóticos (Dhooghe *et al.*, 2011).

Os agentes antimitóticos mais eficazes são aqueles que atuam ao nível da metafase, como a colchicina, a classe das dinitroanilinas (onde se inclui a orizalina, trifluralina, ou dinitramina), a vinblastina, entre outros. Através da ligação aos dímeros de α- e β-tubulina, a polimerização dos microtúbulos é bloqueada e assim a migração dos cromossomas para os polos durante a anafase é impedida (Petersen *et al*., 2003). O resultado é a formação de um núcleo de restituição com o dobro do número de cromossomas. Obviamente, a manutenção do agente bloqueador por períodos mais longos pode levar à obtenção de níveis de ploidia mais elevados que podem tornar a viabilidade celular problemática.

O agente antimitótico mais frequentemente usado é a colchicina. O seu uso na indução de poliploidia deve-se principalmente às elevadas taxas de sucesso que se têm obtido com a sua utilização, e também por não perder a sua atividade após autoclavagem (Zhang, *et al*., 2007). No entanto, a toxicidade deste agente é muito elevada e, em algumas espécies, pode provocar um crescimento anormal, perdas de cromossomas, mutações ou infertilidade (Dhooghe *et al*., 2011).

Os fatores que influenciam a taxa de produção de tetraplóides *in vitro* são o genótipo (Petersen *et al.*, 2003); o tipo e nível de desenvolvimento do explante; e o modo de aplicação, concentração e tempo de exposição ao agente c-mitótico (Yang *et*

al., 2006; Dhooghe *et al.*, 2009). Na indução, podem ser usados diferentes tipos de explantes, como ápices, embriões zigóticos ou somáticos, sementes, plântulas, segmentos nodais ou rebentos caulinares. Para se encontrar o tipo de explante adequado à indução de poliploidia, é necessário testar vários tipos de explantes por espécie. A colquicina tem uma baixa afinidade pelas tubulinas das plantas, sendo necessária uma aplicação em concentrações elevadas (na ordem do milimolares). Assim, tempos de exposição e/ou concentrações baixas poderão ser insuficientes ou promover mixoploidia (diferentes níveis de ploidia em diferentes células ou órgãos do mesmo organismo). Por outro lado, concentrações e tempos mais elevados são, geralmente, letais (Dhooghe *et al.*, 2011).

Esta metodologia de duplicação cromossómica baseia-se largamente na exposição de tecidos cultivados *in vitro* a agentes c-mitóticos, havendo até à data uma elevada taxa de sucesso na indução de plantas tetraplóides de árvores de fruto (Petersen *et al.*, 2003).

No género *Physalis* apenas foram realizados ensaios de duplicação cromossómica em *Physalis ixocarpa* (Robledo-Torres *et al*., 2011). A duplicação cromossómica desta espécie teve grande sucesso através do uso de colchicina na variedade rendidora, tendo sido desenvolvida uma população tetraplóide (2n = 4x = 48), com uma taxa de cerca de 80% de indução. Após estabelecidos, os tetraplóides revelaram resultados muito positivos como, por exemplo, um aumento de produção de frutos por planta e calibre contudo, o peso de cada fruto foi inferior, derivado de uma menor densidade. Para além disso, verificou-se que houve uma ligeira alteração do sabor do fruto, sendo este menos ácido, e um aumento da produção de metabolitos secundários bem como o incremento de vitamina C, melhorando assim a qualidade nutricional do fruto (Robledo-Torres *et al*., 2011).

É conhecido que na poliploidização há um incremento no tamanho das células em quase todos os tecidos, no entanto, o tamanho dos cloroplastos normalmente não é alterado pelo fator ploidia (Landygin, 2004). Os pigmentos fotossintéticos são parte integral da função fisiológica das folhas sendo os teores de clorofilas e as suas proporções equilibradas fundamentais para que as plantas apresentem uma maior eficiência fotossintética, sendo que, quanto maior o teor de clorofila total, maior será a eficiência de produção de energia para a planta, desde que os fatores que contribuem para realização da fotossíntese também estejam em proporções adequadas. Devido à

importância dos pigmentos, pequenas variações no seu teor, podem ser traduzidas em grandes diferenças morfológicas e, indiretamente, podem interferir com o crescimento da planta (Sims & Gamon, 2002).

A produção de poliplóides em espécies alogâmicas (polinização cruzada), promove a recombinação genética, aumentando assim as hipóteses de se obter um genótipo equilibrado. Os poliplóides são caracterizados por possuírem elevadas taxas de infertilidade (Schifino-Sittmann, 2012) assim, a indução de poliploidia deve ser aplicada no melhoramento de espécies com capacidade de se reproduzir de forma vegetativa, que sejam perenes no seu habitat e cujo produto económico não seja a semente (ex. flores, vegetais, frutos), como é o caso do gênero *Physalis.*

Considerando que a indução *in vitro* de poliploidia não é totalmente eficiente e na duplicação cromossómica casos como a mixoploidia são frequentes, é necessário confirmar o nível de ploidia das plantas resultantes da exposição ao agente c-mitótico. Existem vários métodos que podem ser usados para determinar o nível de ploidia, como a observação dos caracteres morfológicos e anatómicos, a contagem dos cromossomas, ou ainda por determinação do tamanho de genoma por citometria de fluxo. (Rubuluza et al., 2007; Zhang et al., 2008).

As observações morfológicas e anatómicas são simples de realizar, porém apresentam um grau elevado de imprecisão. Os caracteres morfológicos visíveis a olho nu podem servir como critério primário de seleção de poliplóides, mas a sua confirmação por outros métodos é sempre necessária, pois a ocorrência de mixoploidia é impossível de detetar. Caraterísticas como o aumento do número e tamanho dos estomas bem como o aumento do número de cloroplastos, regra geral ocorre em plantas tetraploides. (Ladygin, 2004)

A contagem dos cromossomas é um método eficiente, uma vez que determina o número efetivo de cromossomas existente na planta através de tratamentos enzimáticos e coloração específica. Contudo é uma técnica muito trabalhosa que necessita da presença de células em divisão (geralmente células metafásicas do ápice de raízes jovens) e que muitas vezes não pode ser aplicada devido às reduzidas dimensões dos cromossomas de algumas espécies (Doležel et al., 2007).

Atualmente, a citometria de fluxo é a técnica mais comum para avaliar o nível de ploidia das plantas (Doležel et al., 2007). Com o recurso a um citómetro de fluxo é possível analisar o conteúdo de ADN presente em núcleos vegetais, quantificando o

número de células que se encontram nas diversas fases do ciclo celular (G_1, S e G_2), através do uso de plantas padrão, de nível de ploidia e conteúdo nuclear conhecido (Loureiro, 2007; Doležel et al., 2007).

Em comparação com os métodos referidos, a análise por citometria de fluxo é mais vantajosa, uma vez que permite a preparação de diversas amostras, sendo a sua análise simples e rápida, permitindo analisar uma grande quantidade de amostras num curto período de tempo. Para além disso, podem ser usados vários tipos de material vegetal na preparação das amostras (raízes, folhas, sementes, frutos, pétalas, entre outros) e em quantidades muito pequenas, não sendo necessário que as células se encontrem em divisão (Schifino-Sittmann, 2012). Uma vez que não é necessário aclimatizar plantas para se proceder à citometria, é possível realizar uma deteção precoce de poliploidia através de uma simples amostra obtida *in vitro*, permitindo assim uma poupança de tempo e recursos (Loureiro, 2007). A citometria de fluxo permite em diferentes tipos de tecidos, analisar uma enorme quantidade de células individuais, como tal, é muito eficaz na deteção de plantas mixoploides (Loureiro, 2007; Doležel et al., 2007).

Desta forma é de enorme relevância o desenvolvimento de metodologias eficientes para a indução de duplicação cromossómica em condições controladas e artificiais, por forma a verificar se a variação cromossómica promove melhorias nesta espécie, uma vez que as mudanças no genoma, na expressão génica e nos sistemas de reprodução, possibilitam aos poliploides inovar e melhorar as suas funções, permitindo atingir a especiação e o sucesso evolutivo.

1.9. Objectivos

Portugal possui excelentes condições climáticas para a produção de uma grande diversidade de frutos. O exemplo do kiwi, e mais recentemente do mirtilo, mostram que novas espécies podem ser introduzidas com sucesso no nosso país, estimulando assim o potencial agro alimentar. No que diz respeito ao género *Physalis*, têm sido feitas algumas tentativas de cultivo de espécies deste género no nosso território e os resultados têm demostrado que existem condições para a exploração deste fruto exótico. Para além disso, os consumidores parecem estar recetivos a este fruto sendo comum observar a sua presença em espaços comerciais. O interesse desta planta para o nosso país pode ser

importante não apenas em termos de consumo interno, mas também no que diz respeito à exportação, pois as nossas condições climatéricas permitem que o fruto seja produzido e chegue aos mercados mais competitivos e de maior valor (norte da Europa) em alturas do ano em que os frutos produzidos noutras regiões ainda não estão disponíveis. No entanto, a precocidade de produção não deve ser a única vantagem produtiva. Produzir precocemente frutos de qualidade reduzida não tem qualquer interesse. Deste modo, importa iniciar um programa de seleção e melhoramento de fisális com vista à produção de frutos de qualidade. Neste sentido, este trabalho é uma primeira abordagem ao melhoramento de fisális no nosso país, em particular da espécie *P. peruviana*. Um programa de melhoramento deve incidir sobre a obtenção de variabilidade, mas também sobre o desenvolvimento de técnicas que permitam fixar e multiplicar os genótipos obtidos. Assim, com o objetivo de contribuir para o melhoramento de fisális traçaram-se os seguintes objetivos:

1) Estabelecimento *in vitro* de linhas de *P. peruviana* obtidas a partir da germinação de sementes de plantas selecionadas pela sua produção em campo;

2) Otimização de métodos de micropropagação, em particular através da proliferação de meristemas axilares;

3) Indução de poliploidia após tratamento com colchicina com vista à obtenção de plantas octaplóides. Realização de ensaios de viabilidade polínica e quantidade de clorofilas destas plantas.

4) Ensaios de hibridação entre *P. peruviana* e *P. philadelphica* para obtenção de plantas com novas características para que possam ser testadas no campo em termos de produção. Neste contexto, foi ainda necessário estudar o comportamento do pólen em termos de germinação e potencial de hibridização.

2. Materiais e Métodos

2.1. Estabelecimento *in vitro*

2.1.1. Material vegetal

Neste trabalho, foram utilizados vários genótipos das duas espécies de fisális. No caso de *P. peruviana*, os genótipos foram provenientes de germinação de sementes selecionadas a partir de plantas com um grande vigor e interesse comercial, localizadas em Caranguejeira (Leiria) (39°45'06.7"N 8°41'35.0"W); utilizou-se também material colhido no campo (segmentos nodais, flores, folhas e frutos) proveniente de Maçãs de Dona Maria (39°52'30.9"N 8°20'01.9"W) e de plantas previamente germinadas no Jardim Botânico da Universidade de Coimbra (JBUC). As plantas de *P. philadelphica* foram todas elas obtidas através de germinação *in vitro* de sementes selecionadas. A proveniência dos diferentes materiais vegetais utilizados nos diversos ensaios está expressa na tabela 2.

Tabela 2. Proveniência do material vegetal usado nos diferentes procedimentos.

Procedimento	**Material vegetal**	***Origem***
Acetólise de pólen	Pólen (*P. peruviana/P. philadelphica)*	Maçãs D.Maria
Germinação de sementes	Sementes (*P. peruviana/P. philadelphica)*	Caranguejeira
Organogénese	Clones $PpAA_2$ $PpAT_2$ $PpBC_2$ $PpBG_2$	Linhas seleccionadas
Obtenção de poliploides	Clones $PpAT_2$/Sementes	*In vitro*
Quantificação de clorofilas	Clone $PpAT_2$ $PpBC_2$ $Poli_{ah1}$ $Poli_{ah6}$ $Mixo_{aj1}$	JBUC
Ensaios polinização	Plantas $PpAA_2$ $PpAT_2$	JBUC

2.1.2. Germinação de sementes de *Physalis* sp.

As sementes utilizadas na germinação *in vitro*, foram colocadas em embebição durante 12h, tendo sido ulteriormente lavadas com água destilada com 2 - 3 gotas de Tween 20, sob agitação. Procedeu-se, em seguida, a uma lavagem rápida, cerca de 30s, numa solução de etanol (70%), seguindo-se uma esterilização superficial durante 5 minutos numa solução de 5% (w/v) de hipoclorito de cálcio. Após realizadas 3 lavagens com água esterilizada, as sementes foram inoculadas em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 3% (w/v) de sacarose, 0,6% (w/v) de agar e com um pH ajustado para 5,8 antes de ser autoclavado a 121ºC durante 20 minutos. Foram inoculadas duas sementes por tubo de ensaio, num total de 30 réplicas para cada uma das espécies e mantidas a 24±1ºC sob um fotoperíodo de 16h luz (15-20 μmol m-2s1) / 8h escuro. A taxa de germinação foi registada ao longo de 30 dias e a percentagem de germinação foi calculada no final desse período. Cada linha foi cultivada durante 90 dias em meio MS, sendo posteriormente avaliada, por forma a selecionar as melhores 10 linhas de *P. peruviana*. No decorrer do ensaio, linhas que apresentavam menor capacidade de multiplicação e desenvolvimento, foram eliminadas gradualmente, sendo este processo realizado através da contagem de fitómeros, crescimento apical e formação/comprimento radicular. Posteriormente, as 4 melhores linhas mantiveram-se em cultura *in vitro* e as restantes 6 foram transferidas para recipientes com um substrato esterilizado à base de turfa e perlite (2:1 v/v). No caso de *P. philadelphica*, somente 5 linhas foram selecionadas, sendo que as melhores 4 foram transferidas para recipientes com substrato e uma das linha foi mantida *in vitro.* Os recipientes permaneceram numa câmara de cultura (Fitoclima 1000EHHF) durante 30 dias, a 20ºC, com cerca de 70% de humidade e fotoperíodo de 12h de luminosidade, sendo que, na primeira semana os mesmos se encontraram protegidos de exposição direta às condições, através da cobertura das plantas com um estufim plastificado. No final, a taxa de sobrevivência foi registada e as plantas transferidas para um novo substrato à base de terra, turfa e areia (2:2:1 v/v), tendo sido colocadas numa estufa exterior.

2.1.3 Proliferação de rebentos caulinares e organogénese em Physalis peruviana

Após o estabelecimento *in vitro*, foi testada a capacidade de multiplicação das várias linhas através da cultura sucessiva de ápices meristemáticos e segmentos nodais

(1-1,5 cm) em tubos de ensaio contendo meio MS com 3% (w/v) de sacarose e suplementado com diferentes concentrações hormonais (tabela 3). Para cada um dos tratamentos foram usados 30 explantes repartidos por 3 réplicas, sendo colocado 1 explante por cada tubo de ensaio. Para a cultura de *P. philadelphica* foi usado um meio MS com adição da hormona BAP (6-benzilaminopurina) na concentração de 0,25mg/l. A todos os meios de cultura referidos foi adicionado 0,6% (w/v) de agar e o pH foi ajustado para 5,6 - 5,8 antes da autoclavagem a 121ºC durante 20 min. Todas as culturas foram mantidas a 24±1ºC sob um fotoperíodo de 16h luz (15-20 µmol $m^{-2}s^{1}$) / 8h escuro. Todas as linhas estabelecidas foram subcultivadas a cada 3 - 4 semanas em meio de cultura fresco de composição idêntica ao usado inicialmente.

Tabela 3. Condições testadas na micropropagação de ápices meristemáticos e segmentos nodais de *P.peruviana. Os PGR's* utilizados, bem como a sua concentração, foram baseados em protocolos estabelecidos para *P. peruviana* (Chaves *et al*. 2005; Ramar *et al*., 2015), para outras espécies do género *Physalis*, como *P. angulata* (Kumar *et al.*, 2015) e *P. ixocarpa* (Khan & Bakht., 2015)

Meio	**PGR's (mg/L)**
Ms_0	Ø
$MsB_{(0,2/0,5/1/2)}$	BAP (0,2/0,5/1/2)
$MsN_{(0,5/1/1,5)}$	NAA (0,5/1/1,5)
$MsBN_1$	BAP (0,5) + NAA (1)
$MsBN_2$	BAP (2) + NAA (1)
$MsBG_1$	BAP (0.5) + GA_3 (1)
$MsBG_2$	BAP (2) + GA_3 (1)
$MsBGD_1$	BAP (1) + GA_3 (0,25) + 2,4-D (1)
$MsBGD_2$	BAP (1) + GA_3 (1) + 2,4-D (1)
$MsBGD_3$	BAP (2) + GA_3 (1) + 2,4-D (1)
$MsBGD_4$	BAP (2) + GA_3 (1,5) + 2,4-D (1)

(BAP) 6-benzilaminopurina; (NAA) ácido naftaleno-acético; (GA_3) ácido giberélico; (2,4-D) ácido 2,4- diclorofenoxiacético

No final do período de cultura foram avaliados os seguintes parâmetros: 1) formação radicular e percentagem de sobrevivência, após estabelecimento *ex vitro*, 2) o comprimento das plantas, 3) o número de fitómeros, 4) a formação de rebentos caulinares, e 5) a formação de calos.

2.2. Ensaios de melhoramento de *Physalis peruviana*

2.2.1. Polinização artificial

2.2.1.1. Morfologia da flor

Na realização dos protocolos polínicos é fundamental identificar o estado de desenvolvimento floral mais apropriado para o sucesso do mesmo, através de uma correlação entre a morfologia da flor e o estado de desenvolvimento das estruturas reprodutoras. Para isso, definiram-se cinco estádios de desenvolvimento caracterizados essencialmente pelo tamanho dos botões florais (Figura 3).

Figura 3. Fases do desenvolvimento floral em *P.peruviana*.

No estádio de desenvolvimento 1 (ED1) os botões florais possuem cerca de 1cm de comprimento. Neste estádio as sépalas envolvem toda a estrutura floral. As 5 anteras apresentam-se alaranjadas, com algumas zonas translúcidas e os filetes ainda muito pouco desenvolvidos e translúcidos, assim como o estilete. No estado de desenvolvimento 2 (ED2), a morfologia é semelhante. No entanto, tanto o estilete como os filetes apresentam-se mais desenvolvidos e as anteras adquirem uma tonalidade arroxeada. Verificou-se igualmente que nesta fase as sépalas começam o seu processo de abertura, deixando que a corola simpétala infundibuliforme, de tonalidade amarela, comece a irromper. No estado de desenvolvimento 3 (ED3) o botão floral possui cerca de 1,5cm de comprimento, havendo uma abertura do botão florar e libertação da corola . As anteras adquirem uma tonalidade mais intensa, no entanto o estilete e estigma ainda

não se encontram totalmente desenvolvidos. No estado de desenvolvimento 4 (ED4), a cor das anteras torna-se mais escura e o estilete apresenta o seu comprimento máximo (8mm). O estigma completa o seu desenvolvimento, sendo que, neste estádio já se encontra recetivo a um estímulo polínico. No estado de desenvolvimento 5 (ED5) a flor está completamente formada. As anteras já desenvolvidas, libertam o seu pólen. A corola, completamente desenvolvida, apresenta uma tonalidade amarela com manchas negras. Após fecundação, a corola irá entrar num processo de necrose e as sépalas voltarão a unir-se para se formar um cálice que irá envolver o fruto.

2.2.1.2. Acetólise do pólen

A análise polínica foi realizada utilizando flores colhidas de plantas de *P. peruviana* e *philadelphica,* instaladas em Maçãs de Dona Maria (Alvaiázere) (Tabela 2). As anteras de botões florais do estádio 4 foram isoladas e colocadas em caixas de Petri forradas com papel alumínio, ficando 24h à temperatura ambiente para que a antera abra e o pólen seja liberto. De seguida o pólen foi recolhido e submetido a uma lavagem com água destilada. O material polínico, depois de decantado foi transferido para um tubo *eppendorf*, centrifugado a 3000 rpm (795 g) durante 3 minutos e novamente decantado. De seguida, foi adicionado ácido acético glacial (2mL), seguido de uma breve agitação manual e centrifugação, nas mesmas condições, sendo de seguida decantado. Adicionou-se em seguida, até cerca de 2/3 do tubo, a mistura de acetólise clássica 9:1 (27 gotas de anidrido acético e 3 gotas de ácido sulfúrico; Erdtman, 1960). Após a adição, o tubo foi colocado em banho-maria, aberto, a uma temperatura de 100ºC, durante cerca de 2 min. Após nova centrifugação e decantação, o material foi lavado em acetona e novamente centrifugado e decantado, tendo estes últimos passos sido realizados duas vezes.

O pólen foi depois analisado em observações no Microscópio ótico. Para isso, aos grãos de pólen acetolizados adicionou-se glicerol a 50% e a mistura foi centrifugada e decantada. De seguida, adicionou-se 3 a 5 gotas de glicerol a 100%, retiraram-se algumas gotas desta mistura com o material polínico em suspensão, que foram colocadas em 3 lâminas de vidro e cobertas por uma lamela. As preparações foram observadas num Microscópio óptico Leica DM4000 B. Mediu-se o eixo polar do grão de pólen (P) e o eixo equatorial (E), calculando-se a razão entre a média do eixo polar e

eixo equatorial. A distância entre a exina, parede externa do grão de pólen (resistente a acetólise) e a intrina, parede interna do grão de pólen (sensível a acetólise) também foi avaliada. Foram medidas 10 mónades polínicas de cada uma das 3 preparações.

2.2.1.3. Germinação de pólen

A viabilidade do pólen destas duas espécies foi avaliada através da sua germinação *in vitro*, por forma a verificar se os genótipos em estudo possuem pólen com uma viabilidade elevada que não coloque em causa hibridações posteriores. Para tal, foi colocado pólen a germinar das linhas $PpAT_2$, $PpBC_2$ e de *P.philadelphica*, tendo por base o protocolo descrito por Lagos *et al*. (2005),

O meio base usado na germinação do pólen era constituído por H_3BO_3 (5mg/L), $CaCl_2$ (15mg/L) e KNO_3 (10mg/L) (Jahier, 1992), suplementado com sacarose. O pH foi ajustado a 5.8 e adicionou-se agar (0.6%). Foram realizados 7 meios diferentes, um deles só com água (controlo) e os restantes diferiam na concentração de sacarose utilizada sacarose (0, 3, 6, 9, 12 e 18 %). Após ter sido autoclavado, o meio foi distribuído em Caixas de Petri esterilizadas. Seguidamente, o pólen foi distribuído pelas respetivas caixas, tendo sido preparadas 3 caixas por tratamento (21 no total), correspondentes aos 3 períodos de tempo (3h, 6h e 9h) de espera para serem efetuadas as análises de germinação.

Após cessar cada período de tempo, foram retiradas, aleatoriamente, de cada caixa de Petri, cinco amostras de material com uma dimensão e forma semelhantes ($\pm 0{,}25 cm^2$). As amostras, individualizadas, foram colocadas em lâminas de microscópio, coradas com carmim acético 2% e aquecidas à chama ligeiramente, por forma a liquefazer o ágar. Quando preparada a amostra, procedeu-se a contagem ao microscópio ótico Leica DM4000 B com uma ampliação 400x

As mónades polínicas foram consideradas germinadas quando o comprimento do tubo polínico germinado se apresentava superior ao diâmetro do grão de pólen. A viabilidade foi analisada através da contagem de pelo menos 100 grãos de pólen por amostra, avaliando-se a percentagem de germinação.

Em conjunto com este ensaio, foi também verificado se a conservação do pólen no frio influencia a viabilidade do mesmo. Para tal, foi realizado o procedimento acima descrito contudo, o pólen utilizado passou por um pré-tratamento pelo frio. Assim, após recolhido, este foi conservado a 4ºC, -22ºC e -80º; durante 9, 30 e 60 dias. Foi também avaliado a resistência deste quando colocado em azoto líquido (- 196ºC). Depois destes tratamentos, a percentagem de germinação foi avaliada e comparada com os valores do pólen fresco, quando sujeito ao mesmo tratamento.

2.2.1.4. Ensaios de polinização artificial

Os ensaios de polinização *in vitro* e *in vivo*, numa primeira fase, foram realizados com o objetivo de determinar o grau de compatibilidade entre o pólen e o pistilo de diferentes plantas, flores da mesma árvore e parte masculina e feminina de uma flor, da mesma espécie. Posteriormente, realizaram-se ensaios com o objetivo de avaliar se existe compatibilidade interespecífica entre as duas espécies, *P. peruviana* e *P. philadelphica.*

Nestes ensaios utilizaram-se flores no estádio 4 de desenvolvimento (Figura 3). Depois de removidas as pétalas e estames, as flores foram colocadas em placas multialveolares com meio à base de água e ágar e polinizadas com pólen que poderia derivar; da mesma flor, flor diferente; planta diferente ou espécie diferente. Depois de polinizadas, as flores foram mantidas numa estufa, a 24ºC, no escuro, durante períodos de tempo variáveis (8 - 48h). Posteriormente, os pistilos foram fixados em FAA (formaldeído:ácido acético glacial:etanol 70%, 5:5:90 v/v/v) durante 24h, lavados em água destilada, amolecidos durante 4 – 6 h com NaOH 5N e novamente lavados em água destilada.

O resultado das polinizações foi observado num microscópio Leica DM4000 B com recurso a luz UV. Para tal, colocaram-se os estiletes em lâminas de vidro sobre uma gota de azul de anilina 0,1% (Chroma) preparado em K_3PO_4 0,1 N. Depois de colocar a lamela e efetuar uma leve pressão de forma a esmagar ligeiramente o tecido, as preparações foram observadas no microscópio de fluorescência.

Para a realização de polinizações *in vivo* foram usadas flores no estádio 4. O pólen de *P. philadelphica* usado nestes ensaios foi previamente recolhido procedendo-se à polinização de flores de. *P. peruviana* previamente emasculadas. Após a polinização,

a flor foi envolvida com recurso a uma bolsa, formada com papel poroso, para evitar contaminações com outro tipo de pólen. Os cruzamentos foram realizados em plantas que se encontravam em estufa com uma temperatura a rondar os 24 ºC. Algumas flores deste estádio, não polinizadas, foram recolhidas para serem observadas ao microscópio, por forma a servirem de controlo.

2.2. Ensaios de melhoramento de *Physalis peruviana*

2.2.2. Obtenção de plantas poliplóides

2.2.2.1. Indução de poliploidia

Nos ensaios de indução de poliploidia usaram-se diferentes explantes: ápices caulinares de plântulas e segmentos nodais (genótipo $PpAT_2$ e $PpBC_2$); e embriões zigóticos, através da germinação de sementes. Como agente c-mitótico utilizou-se a colchicina (Sigma) em diferentes concentrações (Tabela 4), sendo usado um meio sem colchicina como controlo.

A colchicina utilizada foi dissolvida em água destilada, adicionada aos meios e estes foram ulteriormente autoclavados nas condições já anteriormente referidas.

Inicialmente, procedeu-se à exposição de explantes de *P. peruviana* a diferentes concentrações de colchicina. Para cada tratamento em meio sólido foram usadas 30 réplicas, tendo sido utilizado uma estratégia em bloco, com iguais tempos de exposição, duração e meio de cultura. As culturas foram mantidas a uma temperatura de 25º ± 1ºC sob um fotoperíodo de 16h luz, durante o tempo estipulado para o tratamento. Após tratamento com colchicina, os explantes foram lavados em meio de cultura líquido (remoção da contaminação superficial de colchicina) e novamente inoculados em meio de cultura sólido MS, sem PGRs.

Após 4 semanas, a taxa de sobrevivência foi registada e os explantes transferidos para meio fresco, tendo sido recolhido um pequeno explante foliar para análise de nível de ploidia em citometria de fluxo.

Tabela 4. Composição dos meios, valores e tempo de exposição dos explantes à colchicina.

Explante	[Colc]uM	Tempo de exposição (horas/dias)
Germinação de sementes (20 por tratamento)	0	0
	1250	2h/4h/8h/12h/24h
	2500	2h/4h/8h/12h/24h
	5000	2h/4h/8h/12h/24h
	12500	2h/4h/8h/12h/24h
	25000	2h/4h/8h/12h/24h
Segmentos nodais e ápices caulinares (30 por tratamento)	0	7 dias
		15 dias
	125	7 dias
		15 dias
	250	7 dias
		15 dias
	500	7 dias
		15 dias
	1000	7 dias
		15 dias
	2000	7 dias
		15 dias
	2500	7 dias
		15 dias

Para além dos ensaios com segmentos nodais, sementes de *P. peruviana* foram também tratadas com colchicina. As sementes usadas foram previamente esterilizadas, como descrito anteriormente (secção 2.1.2) e de seguida colocadas a germinar em caixas de Petri esterilizadas, contendo algodão e papel de filtro, sendo adicionado água destilada a este recipiente. As caixas de Petri foram seladas e colocadas a uma temperatura de 25ºC ± 1 com um fotoperíodo 16h luz. Após surgirem as primeiras radículas (8-9 dias), as sementes foram sujeitas a tratamentos com diferentes concentrações de colchicina. As soluções usadas foram semelhantes às usadas na

indução de poliploidia em sementes de *P. ixocarpa* (Robledo-Torres *et al.*, 2011), descritas na tabela 4, tendo sido todas elas esterilizadas por autoclavagem. Os tratamentos com colchicina, realizados em caixas de Petri, variaram entre (2h – 24h).

Após o tratamento, as sementes foram lavadas numa solução contendo os componentes do meio MS e ulteriormente foram inoculadas em meio MS gelificado (6g/L), tendo sido mantidas a uma temperatura de 25 ± 1 ºC sob um fotoperíodo 16h luz. Após 35 dias, a taxa de sobrevivência foi registada e os explantes transferidos para meio fresco, tendo sido recolhido um pequeno explante foliar para análise de nível de ploidia através de citometria de fluxo.

2.2.2.1. Análise do nível de ploidia por citometria de fluxo

No decorrer das subculturas *in* vitro, as plântulas que mostraram um desenvolvimento apropriado, ou seja, desenvolvimento da parte aérea e número de folhas suficiente de forma a garantir a sobrevivência mesmo após a colheita do tecido foliar, foram selecionadas e o seu nível de ploidia determinado através de citometria de fluxo. Foram também realizadas tentativas de contar o número de cromossomas pela técnica de Feulgen. No entanto, as reduzidas dimensões dos cromossomas não permitiram que esta metodologia fosse utilizada com sucesso.

O tecido foliar colhido de cada plântula e uma proporção equivalente de planta padrão (*Pisum sativum* L., 2C = 9,09 pg ADN) foram colocados numa caixa de Petri contendo 1 mL de tampão de isolamento nuclear "Woody Plant Buffer" (WPB; 0,2 M Tris-HCl, 4 mM MgCl2·6H2O, 2 mM EDTA Na2·2H2O, 86 mM NaCl, 10 mM metabissulfito de sódio, 1 % (m/v) PVP-10, 1 % (v/v) Triton X-100, pH 7.5 (Loureiro *et al.*, 2007). O material vegetal (amostra e padrão) sofreram um *chopping* com uma lâmina seguindo a metodologia definida por Galbraith *et al.* (1983). Após esta técnica, procede-se a uma filtração num tubo de citometria através de uma rede de *nylon* com 50 µm de diâmetro, restando um preparado que contêm os núcleos libertos. A este preparado foi adicionado 50 µL/mL de iodeto de propídio (Sigma), para marcação do ADN existente e 50µL/mL de RNase (Fluka), para evitar a ligação do iodeto de propídio ao ARN. De seguida a amostra foi incubada durante 5 minutos à temperatura ambiente. Após este período, a amostra foi analisada num citómetro de fluxo CyFlow® Space da Partec.

A fluorescência relativa de cerca 1.200 núcleos por amostra foi analisada no software FloMax®. Para cada amostra foi calculado o índice de ADN (rácio entre a fluorescência média do pico G0/G1 da amostra e do padrão de referência interno) e o número de núcleos que se encontrava em cada um dos picos visíveis. De acordo com estes dois parâmetros, as plântulas foram subsequentemente classificadas segundo o seu número de ploidia.

As plântulas foram consideradas mixoplóides quando o pico que corresponde em exclusivo aos núcleos na fase G2 do ciclo celular de uma plântula tetraplóide apresentou mais do que 25 % dos núcleos totais da nossa amostra de estudo. A partir desta percentagem considerou-se que para além dos núcleos na fase G2, existem núcleos com o dobro da ploidia e que se encontravam na fase G0/G1, apresentando o tecido em estudo células com dois níveis de ploidia distintos, ou seja mixoploidia.

2.2.2.1. Quantificação de clorofilas *a* e *b*

Uma das possíveis diferenças fisiológicas, com a alteração do número de ploidia, é a variação da quantidade de clorofilas. Para a quantificação das mesmas, foram seguidos os passos da metodologia de Sims & Gamon (2002). Todos os passos abaixo referidos foram realizados de forma a que o material vegetal permanecesse sempre a 4ºC. O material foliar de 5 plantas foi recolhido de três zonas distintas da planta (base, meio e topo), para que o valor das clorofilas final seja uniforme para toda a planta. Cerca de 300 mg de material vegetal foi macerado em azoto líquido e de seguida repartido em réplicas com 50 mg cada uma, às quais foram adicionados 2ml de acetona:Tris 50mM *buffer* ph 7.8 (80:20). Cada amostra foi sujeita a 15s no vortex e de seguida centrifugada a 4800g, durante 12m, por forma a precipitar as partículas em suspensão. Posteriormente, o sobrenadante foi transferido para um recipiente coberto por papel de alumínio, por forma a manter a amostra no escuro; tendo-se adicionado ao precipitado 3ml de acetona:Tris 50mM *buffer* ph 7.8 (80:20). Após novo vortex e centrifugação nas mesmas condições, o segundo sobrenadante é adicionado ao primeiro e perfez-se o volume final de 6ml com acetona:Tris 50mM *buffer* ph 7.8 (80:20).

Para a leitura das amostras foi utilizado um espectrofotómetro Jenway a operar com o programa Jenway 73series. Os sobrenadantes foram lidos nas absorvâncias de

663nm (A_{663}), 537nm (A_{537}) e 647nm (A_{647}), sendo que o valor da concentração final de clorofilas foi obtido segundo a fórmula:

$$Chl_a = 0{,}01373 . A_{663} - 0{,}000897 . A_{537} - 0{,}003046 . A_{647}$$

$$Chl_b = 0{,}02405 . A_{647} - 0{,}004305 . A_{537} - 0{,}005507 . A_{663}$$

Figura 4. Fórmula descrita por Sims & Gamon (2002) para quantificação de clorofilas a e b.

Após quantificadas as clorofilas para cada planta analisada (Fig. 4), foram convertidos os valores para g/ml ($MChl_a$=893.5g/mol; $MChl_b$=907.5g/mol).

3. Resultados

3.1. Estabelecimento *in vitro*

3.1.1. Germinação de sementes de Physalis sp.

Neste ensaio, após efetuada uma prévia esterilização, foram colocadas a germinar 30 sementes de *P. peruviana* e *P. philadelphica*, em Meio MS e, ulteriormente, as plantas germinadas foram sucessivamente sub-cultivadas no mesmo meio, com o objetivo de selecionar as melhores linhas.

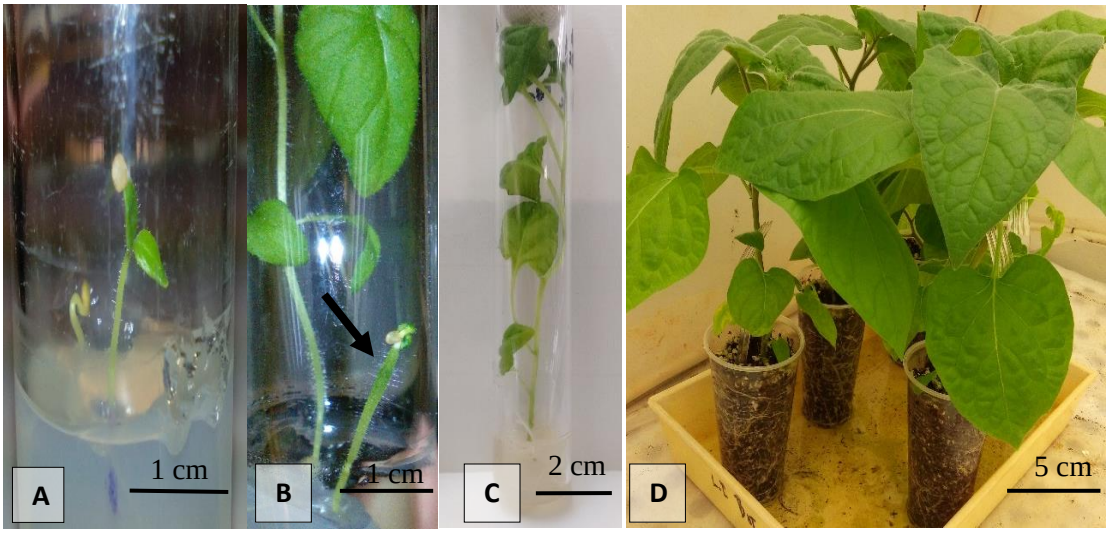

Figura 5. Diferentes fases de desenvolvimento de *P. peruviana* resultantes de germinação *in vitro* de sementes. (A) Plântulas com 8 dias de cultura. (B) Planta com desenvolvimento foliar anormal (seta). (C) Planta resultante da sub-cultura de um segmento nodal ($PpAT_2$), apresentando 7 fitómeros, 12 cm de comprimento da parte caulinar e cerca de 11 cm de comprimento radicular após 30 dias em Meio MS. (D) Plantas estabelecidas em substrato, após cultura *in vitro*, passados 50 dias

Algumas plântulas germinadas não apresentaram desenvolvimento foliar normal, apesar de possuir um crescimento caulinar e radicular acentuado (Fig. 5B). Estas plântulas, para efeitos estatísticos, contaram para os valores da taxa de germinação, contudo estas linhas foram eliminadas.

O resultado da taxa de germinação de *P. peruviana* teve valores muito próximos de 100% (96,6%) (Fig. 6). Os resultados mostram que a germinação é muito escalonada no tempo, tendo-se verificado que a primeira semente germinou na passagem do 4º dia e, de uma forma geral, a taxa foi aumentando com o decorrer do tempo, sendo obtido

valores máximos ao 7º dia, ocorrendo a ultima germinação na passagem do 10º dia (Fig. 5A). Somente uma semente não germinou. No caso de *P. philadelphica*, a taxa de germinação foi inferior, tendo-se verificado um resultado final de cerca de 70%. A primeira semente germinou no 7º dia, obtendo-se a maior taxa no 11º dia, com valores a rondar os 27%, inferior aos 38% registados em *P. peruviana* (Fig. 6).

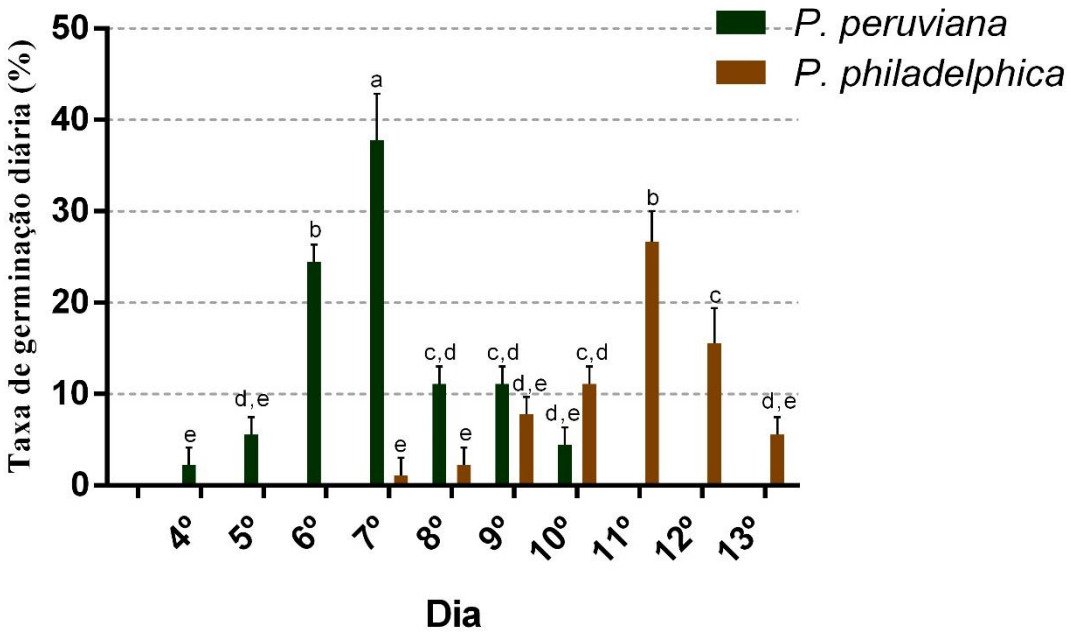

Figura 6. Taxa de germinação diária de sementes de *P. peruviana* e *P. philadelphica.* Cada valor corresponde à média da percentagem de germinação diária das 30 réplicas e correspondente desvio padrão. Os valores com a mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Após 90 dias e realizadas 3 sub-culturas, as plantas foram analisadas no que diz respeito ao seu desenvolvimento (Fig. 5C), com o objetivo de selecionar as melhores 10 linhas de *P. peruviana* e 5 de *P. philadelphica*. Uma vez que as plantas de *P. philadelphica* têm por fim ensaios de hibridação *ex vitro*, somente o desenvolvimento caulinar foi avaliado. Linhas com anomalias na germinação, alvo de contaminações ou apresentando um crescimento reduzido foram descartadas, tendo sido avaliadas no total 22 linhas de *P. peruviana* e 16 linhas de *P. philadelphica* (Tabela. 5 e 6).

Tabela 5. Desenvolvimento caulinar, número de nós e tamanho radicular formado por explantes de diferentes genótipos de *P. peruviana*. Os resultados foram obtidos após 30 dias de cultura, tendo sido realizadas 3 culturas (90 dias). Cada valor representa a média e o desvio padrão das 3 réplicas de cada genótipo. Valores com a mesma letra não são estatisticamente diferentes (p <0,05).

Genótipo Pp (P. *peruviana)*	**Parâmetros**		
	Desenvolvimento caulinar (cm)	Número de nós (unidades)	Tamanho radicular (cm)
AA_2	8,39 ± 0,86 *a*	5,67 ± 1,12 *a'*	9,01 ± 1,12 *a''*
AB_2	6,27 ± 0,80 *b*	4,27 ± 1,17 *b'*	7,04 ± 0,93 *b, c''*
AC_2	6,86 ± 0,87 *b*	3,97 ± 1,07 *b'*	7,38 ± 0,86 *b, c''*
AD_2	6,53 ± 0,96 *b*	4,07 ± 0,99 *b'*	7,11 ± 0,87 *b, c''*
AE_2	6,93 ± 0,86 *b*	4,4 ± 1,10 *b'*	7,51 ± 0,98 *b, c''*
AH_2	6,39 ± 0,84 *b*	4,07 ± 0,87 *b'*	6,81 ± 1,04 *c''*
AI_2	6,97 ± 0,92 *b*	3,87 ± 1,07 *b'*	7,52 ± 1,11 *b, c''*
AJ_2	6,07 ± 0,95 *b*	3,98 ± 1,13 *b'*	6,83 ± 1,16 *c''*
AL_2	6,33 ± 0,96 *b*	3,64 ± 1,19 *b'*	7,21 ± 1,02 *b, c''*
AM_2	6,30 ± 0,94 *b*	4,04 ± 1,16 *b'*	7,33 ± 1,08 *b, c''*
AO_2	6,55 ± 1,12 *b*	4,07 ± 1,34 *b'*	7,42 ± 1,10 *b, c''*
AP_2	6,83 ± 1,15 *b*	4,04 ± 1,27 *b'*	7,56 ± 0,93 *b, c''*
AR_2	6,52 ± 0,88 *b*	4,13 ± 1,3 *b'*	7,09 ± 0,82 *b, c''*
AT_2	8,58 ± 1,05 *a*	5,7 ± 1,09 *a'*	9,12 ± 1,08 *a''*
BA_2	7,52 ± 1,11 *a*	4,61 ± 1,28 *b'*	8,08 ± 1,04 *a,b''*
BB_2	7,13 ± 1,12 *a,b*	4,37 ± 1,38 *b'*	7,45 ± 0,91 *b, c''*
BC_2	7,71 ± 1,15 *a*	5.3 ± 1,30 *a'*	8,37 ± 1,29 *a''*
BD_2	7,50 ± 0,84 *a*	4,31 ± 1,24 *b'*	8,05 ± 0,74 *a,b''*
BE_2	7,09 ± 0,92 *a,b*	4,07 ± 1,44 *b'*	7,02 ± 1,14 *b, c''*
BF_2	7,59 ± 1,06 *a*	4,57 ± 1,17 *b'*	8,11 ± 0,74 *a,b''*
BG_2	8,11 ± 0,93 *a*	5,17 ± 1,32 *a'*	9,09 ± 0,93 *a''*
BH_2	7,26 ± 1,00 *a,b*	4,43 ± 0,94 *b'*	7,73 ± 1,02 *b, c''*

As quatro melhores linhas de *P. peruviana* ($PpAA_2$, $PpAT_2$, $PpBC_2$ e $PpBG_2$), foram novamente sub-cultivadas e utilizadas para a realização dos restantes ensaios, as restantes 6 ($PpBA_2$, $PpBB_2$, $PpBE_2$, $PpBD_2$, $PpBF_2$ e $PpBH_2$) foram estabelecidas *ex vitro* (Fig. 5D). As plantas de *P. philadelphica* selecionadas ($PhAN_1$, $PhAT_1$, $PhAH_1$, $PhAO_1$ e $PhAS_1$) foram sujeitas ao mesmo procedimento.

Tabela 6. Desenvolvimento caulinar de explantes de diferentes genótipos de *P. philadelphica.* Cada valor representa a média e o desvio padrão das 3 réplicas de cada genótipo. Valores com a mesma letra não são estatisticamente diferentes (p <0,05).

Genótipo Ph (*P. philadelphica*)	**Desenvolvimento caulinar**	**Genótipo Ph (*P. philadelphica*)**	**Desenvolvimento caulinar**
AA_1	4,74 ± 0,85 *a, b*	**AN_1**	6,14 ± 0,53 *a*
AB_1	5,06 ± 0,80 *a,b*	**AO_1**	5,47 ± 0,58 *a, b*
AC_1	4,39 ± 0,75 *b*	**AQ_1**	4,40 ± 0,86 *b*
AD_1	4,51 ± 0,61 *b*	**AS_1**	5,38 ± 0,91 *a, b*
AE_1	4,59 ± 0,86 *b*	**AT_1**	5,62 ± 0,62 *a, b*
AH_1	5,48 ± 0,66 *a, b*	**BB_1**	4,83 ± 0,84 *a, b*
AJ_1	4,78 ± 0,87 *a, b*	**BE_1**	4,66 ± 0,96 *a, b*
AL_1	5,07 ± 0,95 *a, b*	**BF_1**	5,25 ± 0,82 *a, b*

Apesar de alguma fragilidade, essencialmente ao nível do caule, registou-se uma taxa de sobrevivência de 89% após 40 dias em substrato em *P.peruviana* e de 90% em *P.philadelphica* (Tabela 7).

Tabela 7. Número de genótipos iniciais e finais estabelecidos *in vitro*, número médio de nós por planta (após 30 dias de sub-cultura) e taxa de sobrevivência (após 40 dias em substrato).

Espécie	**Nº inicial de genótipos/linhas**	**Nº final de genótipos/linhas**	**Nº médio de nós/planta**	**Taxa de sobrevivência**
P.peruviana	30	6 *ex vitro* 4 *in vitro*	7,06 ± 1,19	89% (27/24)
P.philadelphica	30	4 *ex vitro* 1 *in vitro*	5,02 ± 0,93	90% (20/18)

3.1.2. Proliferação de rebentos caulinares e organogénese em *Physalis peruviana*

Após o estabelecimento *in* vitro, explantes de 4 linhas selecionadas ($PpAA_2$, $PpAT_2$, $PpBC_2$ e $PpBG_2$) foram cultivados em meios de cultura com diferentes composições e concentrações de PGRs.

Por forma a avaliar o efeito da BAP em *P. peruviana*, 30 segmentos nodais de cada linha, foram submetidos a Meio MS suplementado com diferentes concentrações desta hormona (0,2/0,5/1/2 mg/L)(Tabela 8).

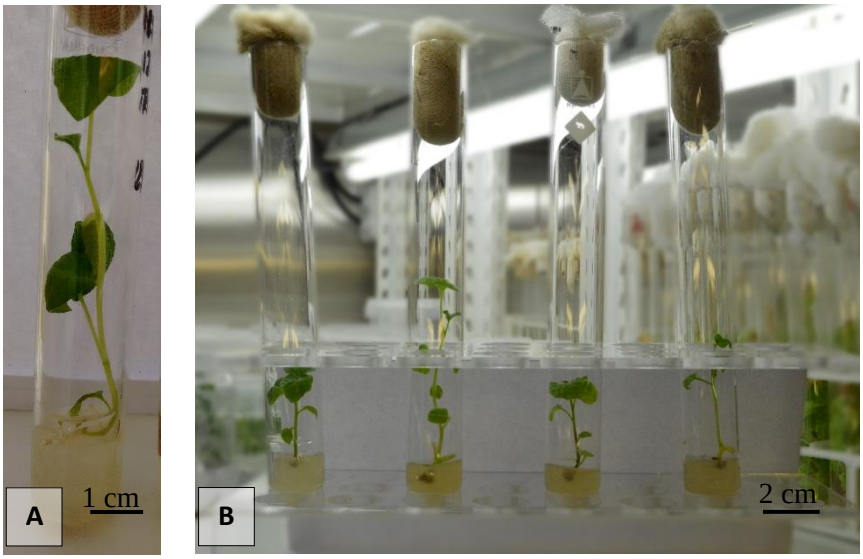

Figura 7. Cultura de segmentos nodais de *P. peruviana* ($PpAT_2$) em diferentes meios de cultura. Resultados obtidos após 30 dias de cultura. (A) Cultura em Meio MS (controlo). (B) Cultura em Meio MS com adição de BAP (*i)* 0,2mg/L; (*ii) 0*,5mg/L; (*iii*) 1mg/L; (*iv*) 2 mg/L (esquerda para a direita).

Em todos os ensaios realizados verificou-se desenvolvimento do explante utilizado (Fig.7B), contudo inferior aos resultados quando utilizado meio MS (controlo) (Fig. 7A) (Tabela 8). Com a utilização de BAP não houve formação de novos rebentos e o tamanho foliar das plântulas é inferior.

Ocorreu desenvolvimento radicular em quase todos os explantes utilizados, sendo este mais acentuado no meio de cultura com 0,5mg/L de BAP. As plantas com

um sistema radicular desenvolvido foram estabelecidas *ex vitro* obtendo-se uma taxa de sobrevivência de 100%. As plantas com raízes de tamanho reduzido ou inexistentes, foram inoculadas em meio MS sem agentes de crescimento, por forma a promover enraizamento, sendo posteriormente estabelecidas, obtendo-se taxas de sobrevivência a rondar os 80%.

Tabela 8. Número de nós formados por explante em quatro genótipos distintos após tratamento com BAP durante 30 dias. Cada valor corresponde à média, e o respetivo desvio padrão, das trinta réplicas. Valores com a mesma letra não são estatisticamente diferentes (p <0,05).

Genótipo / **Tratamento (mg/L)**	**Nº nós formados por explante**			
	$PpAA_2$	$PpAT_2$	$PpBC_2$	$PpBG_2$
MS_0 (Controlo)	8,39 ± 0,86 *a*	8,58 ± 1,0 *a*	7,71 ± 1,15 *a*	8,11 ± 0,93 *a*
$MsB_{0,2}$ (MS_0+ (0,2) BAP)	3,5 ± 1,18 *c*	3,9 ± 1,08 *c*	4,35 ± 1,22 *b, c*	4,10 ± 1,17 *c*
$MsB_{0,5}$ (MS_0+ (0,5) BAP)	4,90 ± 1,42 *b, c*	5,10 ± 1,17 *b, c*	5,55 ± 1,03 *b, c*	4,90 ± 1,22 *b, c*
MsB_1 (MS_0 + (1) BAP)	4,87 ± 1,12 *b, c*	4,75 ± 1,10 *b, c*	5,35 ± 0,98 *b, c*	4,85 ± 1,10 *b, c*
MsB_2 (MS_0+ (2) BAP)	4,13 ± 1,09 *b, c*	4,20 ± 1,02 *b, c*	4,24 ± 1,25 *b, c*	4,12 ± 1,08 *b, c*

O uso de auxinas como o ácido 1-naftalenoacético (NAA) também foi avaliado, sendo o Meio MS suplementado com adição de NAA (0,5/1/1,5 mg/L). A associação de citocininas e auxinas também foi avaliada em dois meios, através da adição de BAP e NAA ao meio MS (Tabela 9).

Os explantes que foram sujeitos aos tratamentos com NAA apresentaram todos eles um caule rígido, folhas com uma tonalidade verde claro e algumas vezes lívidas (Fig.8A). Para além disso, as raízes apresentaram-se curtas e rígidas com alguns pelos radiculares no tratamento com 1mg/L de NAA (Fig. 8B). No tratamento com 1,5 mg/L de NAA não houve desenvolvimento dos explantes usados, nem formação radicular, tendo-se verificado a formação de calo (Fig. 8C). Após algum tempo em cultura, estes explantes acabavam por degenerar.

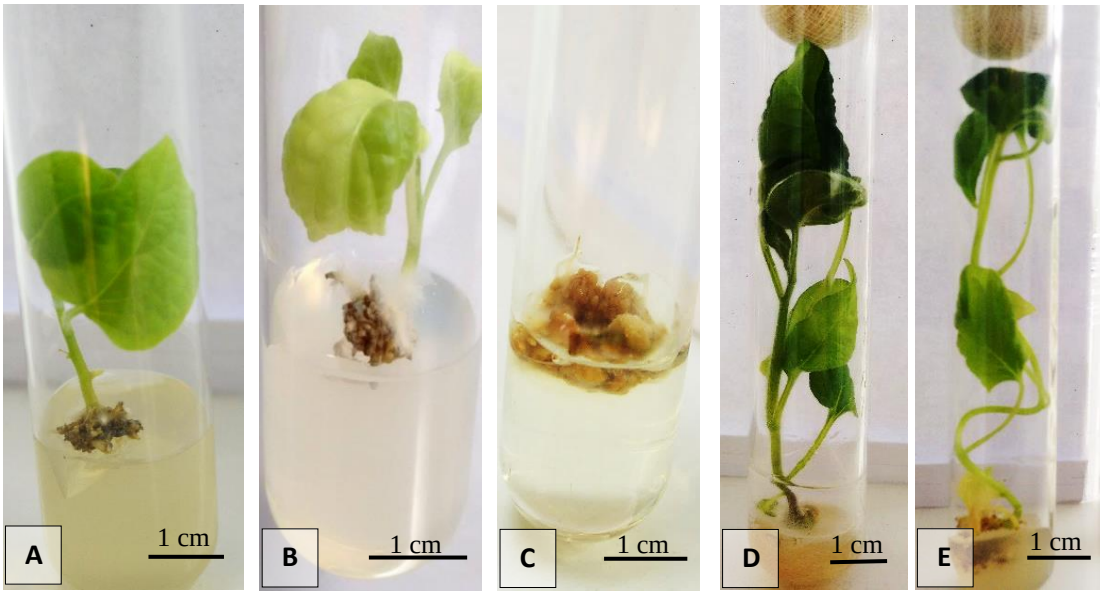

Figura 8. Cultura de explantes nodais de *P.peruviana* ($PpAT_2$) em diferentes meios de cultura. (A) Cultura em Meio MS + NAA (0,5mg/L). (B) Cultura em Meio MS + NAA (1mg/L). (C) Cultura em Meio MS + NAA (1,5mg/L). (D) Cultura em Meio MS com adição de NAA (1mg/L) e BAP (0,5mg/L). (E) Cultura em Meio MS com adição de NAA (1mg/L) e BAP (2mg/L).

Os explantes que foram inoculados em meio MS com a presença de BAP e NAA tiveram resultantes idênticos ao nível de crescimento e número de nós (Fig. 8D e 8E). A tonalidade das folhas, bem como a sua dimensão, é semelhante ao tratamento controlo.

Tabela 9. Número de nós formados por explante em quatro genótipos distintos após tratamento com NAA durante 30 dias. Cada valor corresponde à média, e respetivo desvio padrão, de trinta explantes. Valores com a mesma letra não são estatisticamente diferentes (p <0,05).

Genótipo / **Tratamento (mg/L)**	**Nº nós formados por explante**			
	PpAA2	PpAT2	PpBC2	PpBG2
MS_0 (Controlo)	8,39 ± 0,86 *a*	8,58 ± 1,05 *a*	7,71 ± 1,15 *a*	8,11 ± 0,93 *a*
$MsN_{0,5}$ (MS_0 + (0,5) NAA)	2,20 ± 1,56 *c*	2,40 ± 1,15 *c*	1,9 ± 1,10 *c*	2,10 ± 0,85 *c*
MsN_1 (MS_0+ (1) NAA)	1,33 ± 0,54 *c*	1,74 ±1,23 *c*	1,35 ± 1,07 *c*	1,50 ± 0,95 *c*
$MsN_{1,5}$ (MS_0+ (1,5) NAA)	----	----	----	----
$MsBN_1$ (MS_0+ (0,5) BAP + (1) NAA)	5,75 ± 0,95 *b*	6,15 ± 1,17 *b*	5,97 ± 1,06 *b*	6,10 ± 1,06 *b*
$MsBN_2$ (MS_0 + (2) BAP + (1) NAA)	6,15 ± 1,10 *b*	6,25 ± 1,2 *b*	6,10 ± 0,87 *b*	6,03 ± 1,09 *b*

A taxa de sobrevivência destes dois tratamentos foi ao encontro do desenvolvimento radicular formado. Quando adicionado baixas concentrações de BAP (0,5mg/L), o sistema radicular forma-se normalmente, havendo taxas de sobrevivência a rondar os 87%. No entanto, quando a concentração de BAP foi superior (2mg/L), formam-se estruturas radiculares rígidas e curtas, idênticas às obtidas no tratamento com NAA (0,5;1 mg/L), sendo a taxa de sobrevivência nula, quando as plântulas são estabelecidas *ex vitro*.

O efeito das giberelinas em cultura *in vitro* de *P.peruviana* também foi avaliado, através da adição de GA_3 ao meio de cultura, bem como a associação com outras hormonas como o BAP e 2,4-D (Tabela 10).

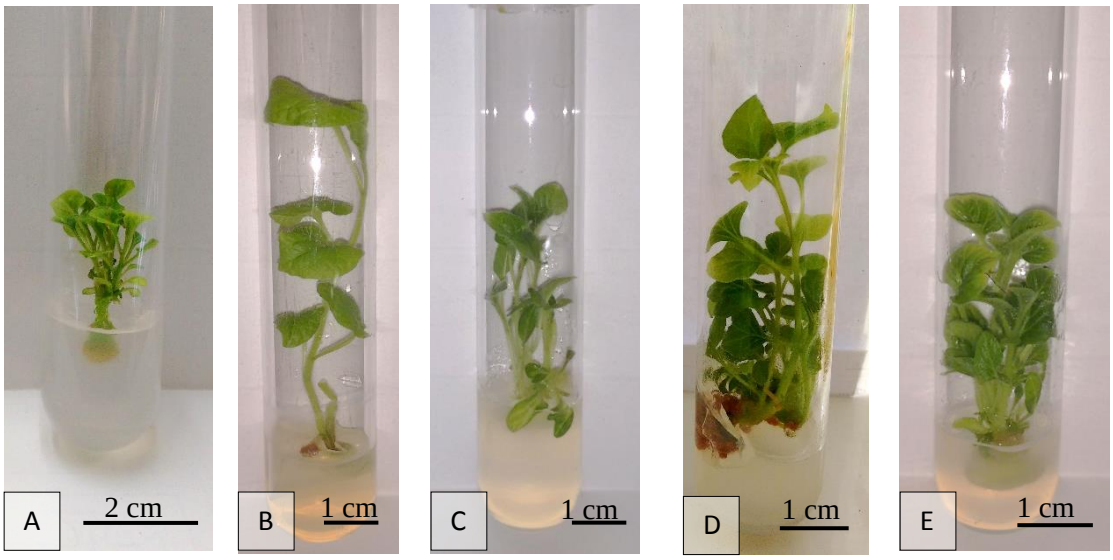

Figura 9. Cultura de explantes nodais de *P.peruviana* ($PpAT_2$) em diferentes meios de cultura. (A) Cultura em Meio Ms + BAP (2mg/L) + GA_3 (1mg/L). (B) Cultura em Meio Ms + BAP (1mg/L) + GA_3 (0,25mg/L) + 2,4-D (1mg/L). (C) Cultura em Meio Ms + BAP (1mg/L) + GA_3 (1mg/L) + 2,4-D (1mg/L). (D) Cultura em Meio Ms + BAP (2mg/L) + GA_3 (1mg/L) + 2,4-D (1mg/L). (E) Cultura em Meio Ms + BAP (2mg/L) + GA_3 (1,5mg/L) + 2,4-D (1mg/L).

Alguns explantes a crescer *in vitro* mostraram dois tipos de resposta. Por um lado, a formação de rebentos caulinares a partir dos meristemas axilares. Noutros casos, a formação de rebentos a partir de um calo previamente formado, onde se diferenciaram pequenas gemas. No primeiro caso verificou-se uma proliferação de rebentos, em número variável, geralmente na zona do explante onde se encontrava o meristema axilar (Fig. 9A e 9B). No segundo tipo de organogénese referido, ocorreu uma formação de rebentos por parte dos aglomerados de tecidos, em especial as gemas, originados nas plantas em cultura. Verificou-se que algumas destas gemas se desenvolvem formando rebentos (Fig. 9C,9D e 9E) e que, em alguns casos, se podem formar várias plantas (3-4). A multiplicação do calo não foi possível, quando seccionado e colocado em cultura não se desenvolveu, acabando por degenerar ao fim de algum tempo.

Tabela 10. Número de nós formados por explante em quatro genótipos distintos no tratamento com combinações hormonais na presença de GA_3 durante 30 dias. Cada valor corresponde à média, e o respetivo desvio padrão, das trinta réplicas. Valores com a mesma letra não são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Genótipo / **Tratamento (mg/L)**	**Nº nós por explante**			
	$PpAA_2$	$PpAT_2$	$PpBC_2$	$PpBG_2$
MS_0 (Controlo)	8,39 ±0,86 *c, d*	8,58 ±1,05 *c, d*	7,71 ± 1,15 *d, e*	8,11 ± 0,93 *c, d*
$MsBG_1$ (MS_0 + BAP (0.5) + GA_3 (1))	3,10 ±2,25 *f*	2,80 ±2,20 *F*	1,90 ± 2,10 *f*	1,96 ± 1,80 *f*
$MsBG_2$ (MS_0 + BAP (2) + GA3 (1))	9,7 ±2,20 *b, c*	10,73 ±2,62 *b, c*	11,20 ±3,10 *b, c*	9,90 ±1,97 *b, c*
$MsBGD_1$ (MS_0 + BAP (1) + GA3 (0,25) + 2,4-D (1))	5,10 ± 1,97 *e, f*	6,10 ± 1,95 *d, e*	4,97 ± 1,83 *e, f*	4,40 ± 2,36 *e, f*
$MsBGD_2$ (MS_0 + BAP (1) + GA3 (1) + 2,4-D (1))	11,85 ±1,89 *a, b*	11,23 ±1,98 *a, b*	10,33 ±2,34 *b, c*	9,97 ± 1,85 *b, c*
$MsBGD_3$ (MS_0 +BAP (2) + GA3 (1) + 2,4-D (1))	12,30 ± 1,82 *a, b*	14,30 ± 1,76 *a*	14,15 ± 2,30 *a*	13,46 ± 3,14 *a*
$MsBGD_4$ (MS_0 + BAP (2) + GA3 (1,5) + 2,4-D (1))	13,42 ± 1,20 *a*	13,33 ± 1,90 *a*	11,80 ± 2,97 *a, b*	10,96 ± 2,45 *b, c*

Em todos os ensaios em que foi inserido GA_3 no meio de cultura, não houve formação de raízes, com exceção no meio $MsBGD_1$, onde a concentração de GA_3 foi inferior (0,25 mg/L) em relação aos outros ensaios.

Os explantes inoculados em meio MS com a presença de BAP e GA_3 tiveram resultantes muito díspares de crescimento e número de nós. No meio $MsBG_{1,}$ o crescimento foi pequeno reflectindo-se no baixo número de nós e inexistência de novos rebentos, folhas lívidas e caule arroxeado. Pelo contrário, no meio $MsBG_2$ houve um crescimento mais acentuado, bem como existência de alguns novos rebentos (Fig. 9A).

Com a adição de 2,4-D a estas duas hormonas, a formação de novos rebentos foi mais frequente. Com exceção para o meio $MsBGD_{1,}$ onde ocorreu um menor crescimento em comparação com os outros 3 meios aos quais também foi adicionada a auxina. No geral, os meios com a presença de auxina são muito similares ao nível do número de nós, contudo o meio $MsBGD_{3,}$ demonstrou ser o melhor no que toca à formação de novos rebentos, formando em média 4 novos rebentos, resultando em média a 13,73 ± 2,21 nós por explante.

Meios com uma concentração igual ou superior a 1mg/L de GA_3 levou a uma senescência foliar após os 30 de cultura, acentuada com BAP na concentração de 2mg/L.

A capacidade de enraizamento das plantas formadas foi testada, tendo-se obtido uma taxa de enraizamento próxima de 90%, sendo que, os rebentos formados desprovidos de raízes, quando inoculados em meio MS, tiveram uma taxa de formação radicular de 100%.

3.2. Ensaios de melhoramento de *Physalis peruviana*

3.2.1. Polinização artificial

3.2.1.1. Análise morfológica e germinação do pólen

As formas polínicas segundo o índice P/E para *P. peruviana*, correspondem a um formato prolado (Fig. 10B) e, em *P. philadelphica* a um formato prolado-esferoidal (Fig. 10C).

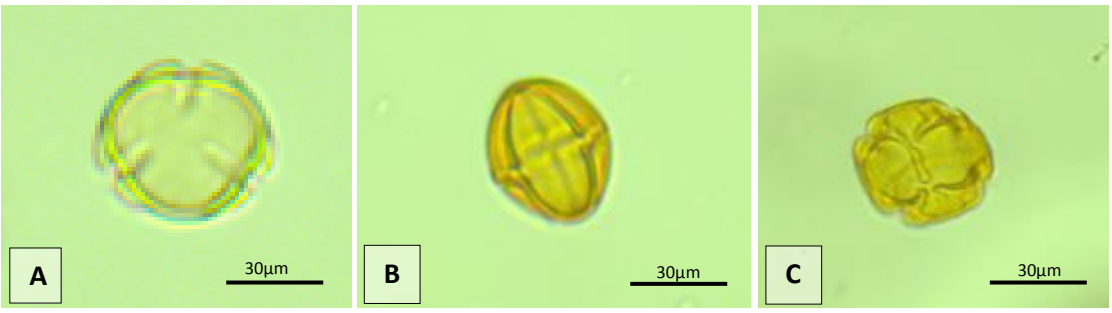

Figura 10. Pólen acetolisado de *P. peruviana;* A – Vista polar, B – vista equatorial. C – Pólen acetolisado de *P. philadelphica*.

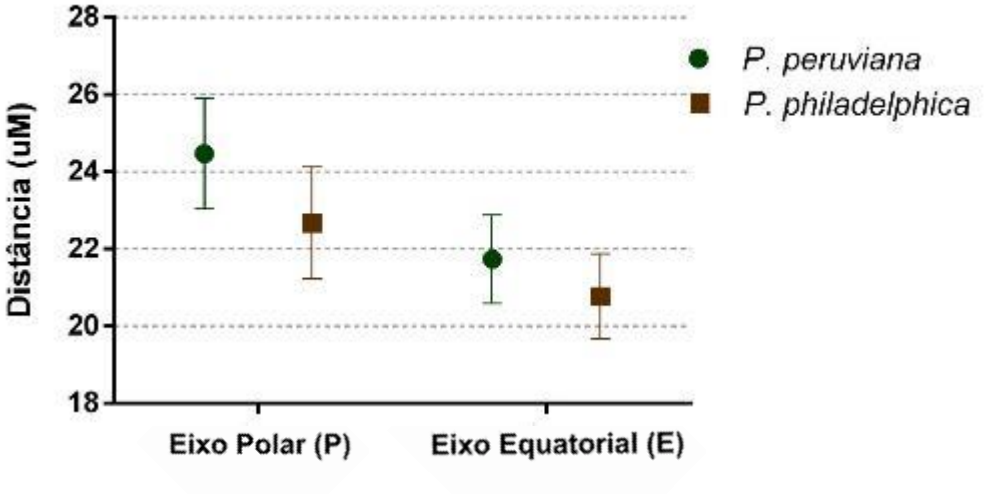

Figura 11. Distância de eixo polar (P) e eixo equatorial (E) do pólen de *P. peruviana* e *P. philadelphica* após acetólise e observação em microscópio ótico

O pólen de *P. peruviana* apresentou dimensões superiores ao pólen de *P. philadelphica* tanto no eixo polar (P) como no eixo equatorial (E) (Fig. 11). Para além disso, quando calculada a razão entre P e E, o valor de *P. peruviana* é superior, isto

porque existe uma diferença superior entre os dois eixos em comparação com *P. philadelphica*.

Foi também avaliada a distância entre a intrina e a exina, sendo que, neste parâmetro a média dos valores de *P. philadelphica* foi de 2,48 ± 0,29 (µM), valor superior ao obtido em *P.* peruviana que revelou ser de 2,2 ± 0,22 (µM).

Nos ensaios de germinação dos grãos de pólen *P. peruviana*, verificou-se um aumento da percentagem de germinação proporcional ao aumento da concentração de sacarose no meio de cultura e tempo de germinação, não havendo diferenças estatísticas entre os genótipos usados (Fig.12*iv*).

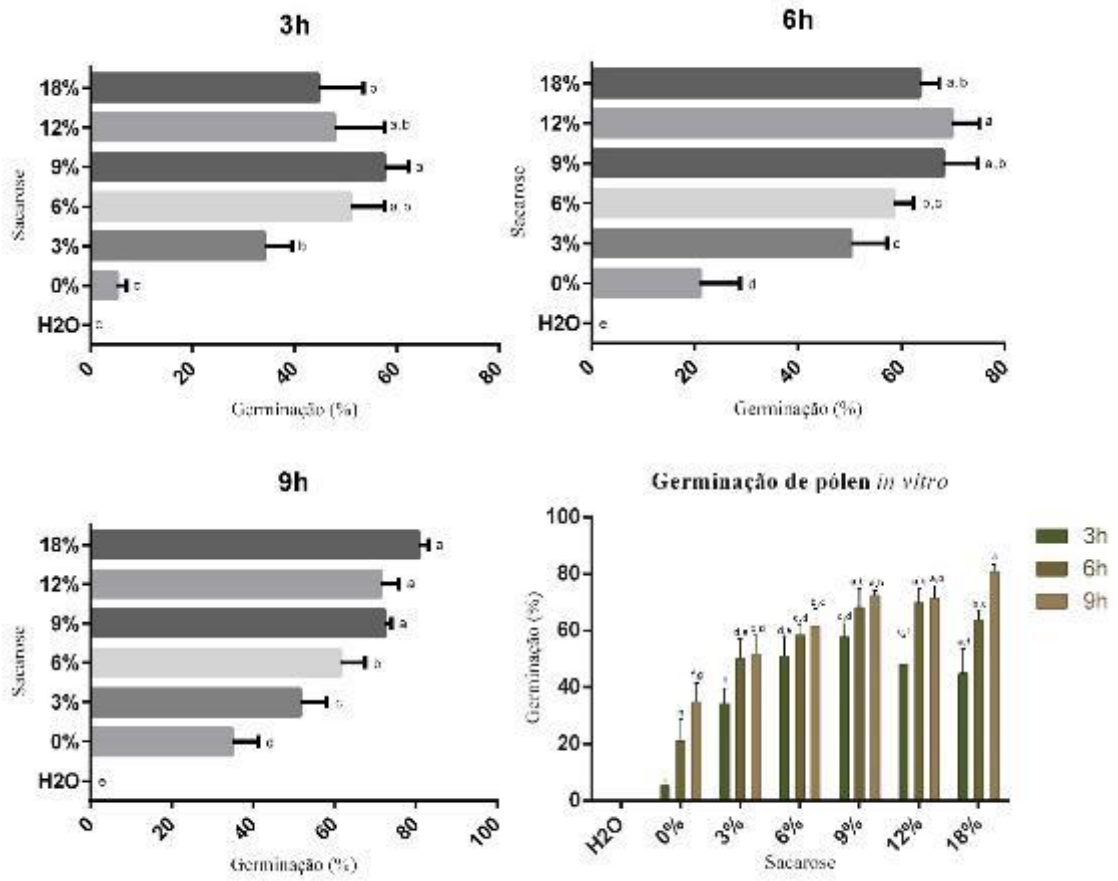

Figura 12. Percentagem de germinação dos grãos de pólen de *P. peruviana*, para diferentes concentrações de sacarose, no final de três períodos de tempo (*i*) 3 horas (*ii*) 6 horas (*iii*) 9 horas (*iv*) interações entre diferentes tratamentos. Cada valor corresponde à média dos dois genótipos usados ($PpAT_2$ e $PpBC_2$) em percentagem e o respetivo desvio padrão. Os valores com a mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0,05$) quando utilizado o teste de Tukey.

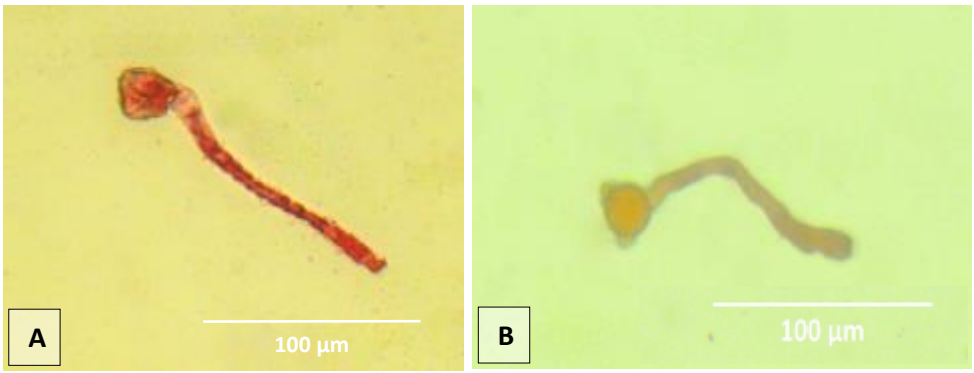

Figura 13. Pólen germinado; A - *P. peruviana*, B – *P. philadelphica*.

As maiores percentagens de germinação do pólen de *P. peruviana* (Fig. 13A) ocorreram nos três meios com maior concentração de sacarose no intervalo de tempo de 9h (Fig.x), com uma taxa de germinação superior a 80%, sem que se tenham verificado diferenças estatísticas significativas entre eles (Fig. 12*iii*). Contudo, para um intervalo de tempo menor (6h), concentrações médias de sacarose (9% e 12%) parecem ser o ideal, não havendo diferenças estatisticamente significativa entre tratamentos (Fig. 12*ii)*

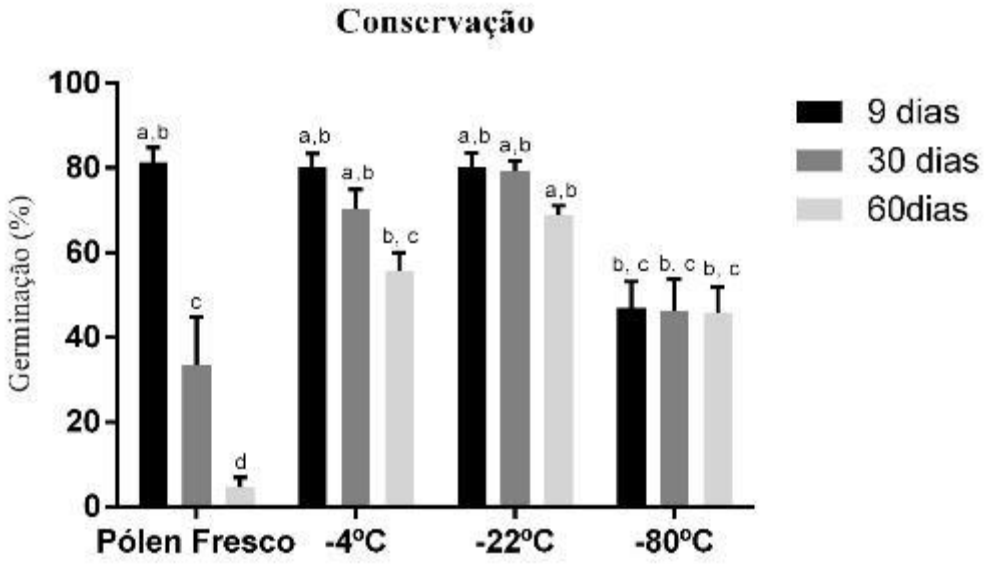

Figura 14. Percentagem de germinação dos grãos de pólen de *P. peruviana* ($PpAT_2$) após estar sujeito a diferentes tratamentos de conservação ao frio e três intervalos de tempo. Cada valor corresponde à média em percentagem e o respetivo desvio padrão. Os valores com a mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0,05$) quando utilizado o teste de Tukey.

No ensaio de germinação após conservação no frio a diferentes temperaturas (Fig. 14), verificou-se que quando germinado após 9 dias, não existem diferenças

significativas entre a conservação ao ar livre e a baixas temperaturas, contudo, quando submetido a -80ºC a taxa de germinação baixa drasticamente para cerca de 50%. Com o aumento do tempo de conservação para 30 e 60 dias, o pólen vai perdendo a sua viabilidade, baixando de uma forma geral, com exceção para a criopreservação a -80 ºC. A forma de conservação onde o fator tempo foi mais preponderante verificou-se na conservação ao natural, havendo uma diminuição em cerca de metade da taxa de germinação. Na conservação a 4ºC, o passar do tempo também levou a uma perda de viabilidade polínica acentuada, superior à registada no tratamento de -22 ºC, onde a perda de viabilidade não foi tão acentuada. No tratamento de -80ºC, apesar de a taxa de germinação ser relativamente baixa, não houve diferenças significativas nos três intervalos de tempo. O pólen que foi submetido a azoto líquido cerca de 1h obteve uma taxa de germinação a rondar os 75%.

A viabilidade do pólen de *P. philadelphica* (Fig. 13B) foi analisada para um intervalo de tempo de 6h e 9h e foram usadas concentrações elevadas de sacarose, uma vez que ensaios preliminares mostraram que o pólen só germinava nestas condições.

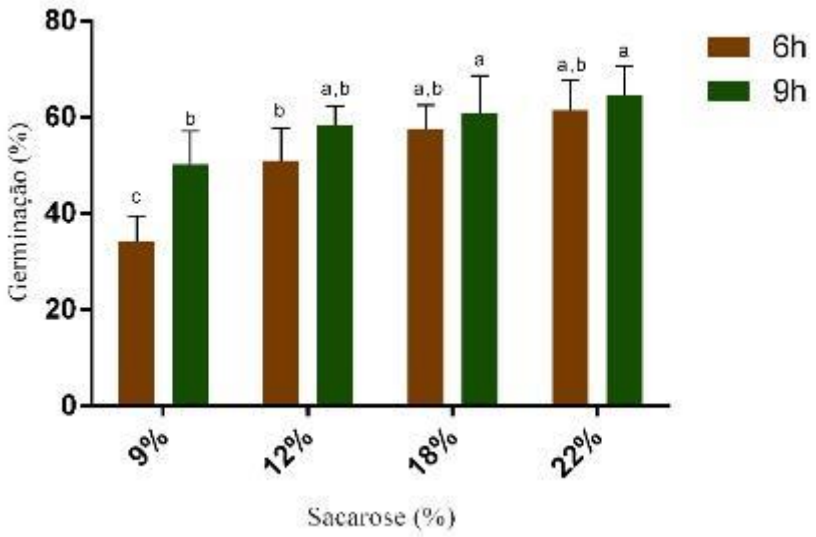

Figura 15. Percentagem de germinação dos grãos de pólen de *P. philadelphica* após estar sujeito a diferentes tratamentos. Cada valor corresponde à média em percentagem e o respetivo desvio padrão. Os valores com a mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0,05$) quando utilizado o teste de Tukey.

Não existiram grandes diferenças nos testes de germinação desta espécie em comparação com *P. peruviana*. Contudo a viabilidade é um pouco inferior, sendo que

para uma germinação com 22% de sacarose com um intervalo de 9h obteve-se um valor de cerca 65% de germinação (Fig.15)

3.2.1.2. Cruzamentos intra e interespecíficos

Na polinização artificial, o objetivo foi a avaliação do potencial polínico *in vitro* e *in vivo* em cruzamentos intra e interespecíficos. Na maioria dos cruzamentos intraespecíficos realizados, verificou-se a germinação do pólen (Figura 16B), sendo todo o comprimento do estilete (≈ 1cm) percorrido pelo tubo polínico, geralmente, em cerca de 20-24 h.

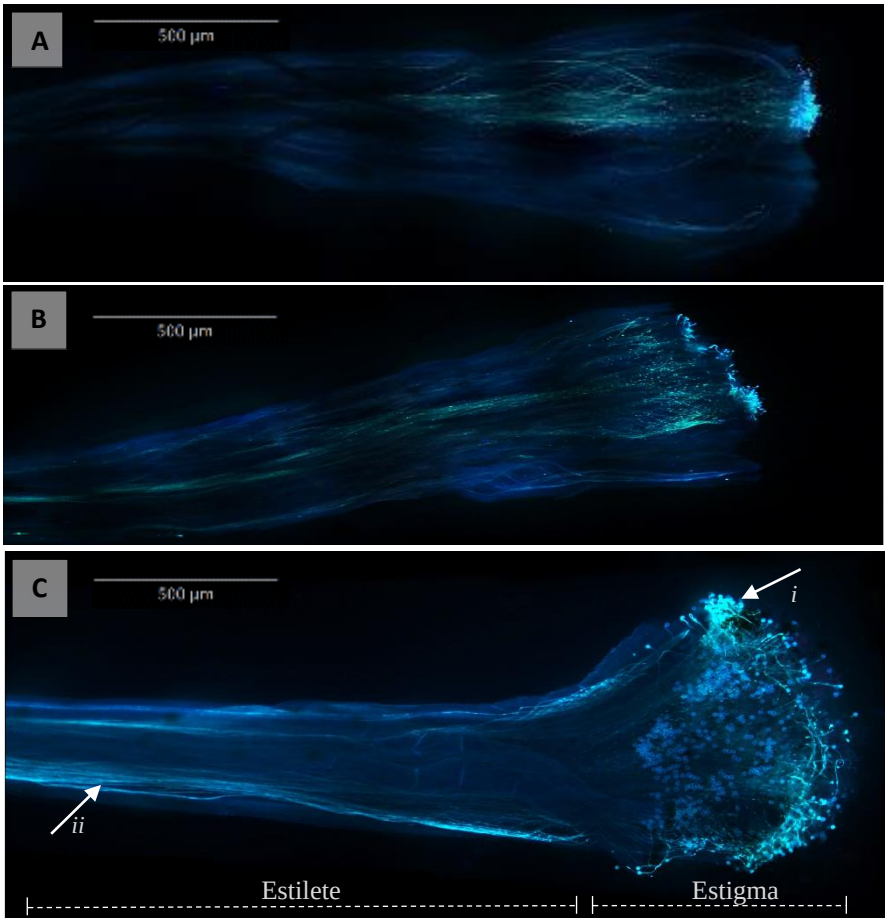

Figura 16. Polinização *in vitro* de cruzamentos intra e interespecificos; A – Controlo positivo de *P. peruviana*, B – Polinização *in vitro* intraespecífica de *P .peruviana;* C- Polinização *in vitro* interespecífica de *P. peruviana* (gineceu) e *P. philadelphica* (pólen). Nas três imagens o pólen (*i*) germina, formando o tubo polínico (*ii*) ao longo do estigma.

Em comparação com os teste de viabilidade polínica, a germinação dos grãos de pólen no estigma também é muito elevada, havendo casos onde a formação do tubo polínico ronda os 100%. Em todos os ensaios realizados com *P. peruviana*, não ocorreu qualquer tipo de incompatibilidade nos cruzamentos intraespecíficos, contudo, verificou-se *in vitro*, que quando utilizado pólen e pistilo de diferentes plantas, o crescimento do tubo polínico aparenta ser mais rápido, no entanto, este dado não foi avaliado. Em *P. philadelphica*, os ensaios *in vitro* e *in vivo* confirmaram a autoincompatibilidade desta espécie, sendo que, quando usado pistilos e pólen de plantas diferentes, a germinação do pólen ocorre, com taxas a rondar os 60%.

Nos cruzamentos interespecíficos *in vitro*, em que o pistilo pertencia a *P. philadelphica*, nunca se observou a germinação do pólen no estigma. Quando realizado o cruzamento inverso, apesar de muito pouco frequente, observou-se a germinação do pólen de *P. philadelphica* no pistilo de *P. peruviana* (Fig. 16C). Em 73 réplicas foi possível observar 6 vezes um resultado positivo.

Nos cruzamentos i*n vivo* somente foi realizado o ensaio onde o pistilo pertencia a *P. peruviana* e o pólen a *P. philadelphica*, uma vez que o contrário teve resultados negativos *in vitro*.

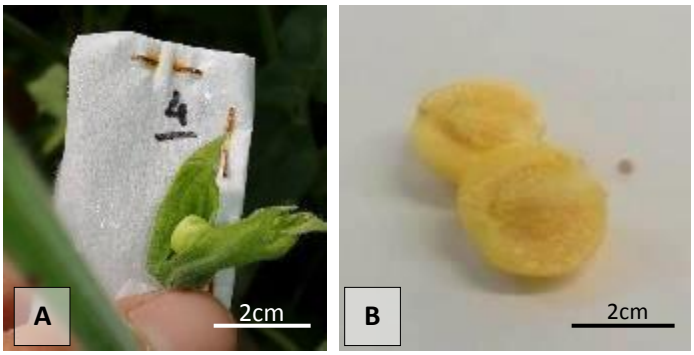

Figura 17. (A) Fruto resultante da polinização artificial com pólen de *P. philadelphica* e gineceu de *P. peruviana*. (B) Fruto maduro resultante da polinização artificial com pólen de *P. philadelphica* e gineceu de *P. peruviana*

As flores do estádio 4, após isoladas e emasculadas foram polinizadas com o pólen de interesse e envolvidas com a bolsa microporosa durante duas semanas. No ensaio realizado algumas flores polinizadas sofreram contaminações fúngicas e outras acabaram por cair. Contudo, após terminar as duas semanas e consequente remoção das bolsas microporosas, foi possível observar 3 resultados positivos de 54 réplicas realizadas de cruzamento interespecífico entre as duas espécies (Fig. 17A).

O único fruto que completou o amadurecimento (Fig. 17B) teve uma dimensão inferior aos obtidos naturalmente, sendo que, quando aberto, apenas foi possível verificar a existência de uma semente completamente desenvolvida.

3.2. Ensaios de melhoramento de *Physalis peruviana*

3.2.2. Poliploidização

3.2.2.1. Indução e taxa de sobrevivência

Após exposição dos explantes ao agente c-mitótico, analisaram-se as culturas quanto aos níveis de desenvolvimento e sobrevivência. Os explantes e sementes foram avaliados segundo o seu desenvolvimento e senescência, incluindo-se as amostras efetivamente senescentes e as que foram infetadas durante a cultura.

No ensaio de indução de ploidia em sementes, após inoculadas nas caixas de Petri, estas demoraram cerca de 11 dias até emergirem as primeiras radiculas, sendo um tempo superior ao esperado e um pouco maior comparado com a germinação *in vitro* (Fig. 18).

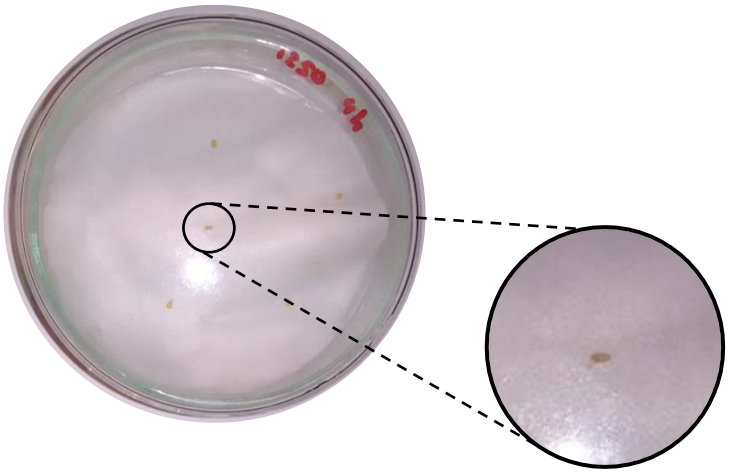

Figura 18. Sementes de *P. peruviana* germinadas após 11 dias de inoculação em caixas de Petri.

A taxa de mortalidade neste ensaio é praticamente nula, tendo-se verificado um valor de 3,8%. Contudo, o valor de senescência foi um pouco mais elevado (8,7%) devido às sementes que não germinaram e à ocorrência de contaminações. Para além disso, em 3,2% das plantas desenvolvidas após germinação em meio MS, verificou-se a ausência desenvolvimento foliar (secção 3.1.1).

As plantas desenvolvidas após germinação e que entraram em contacto com colquicina, não revelaram grandes variações no seu desenvolvimento caulinar nem radicular em comparação com o controlo (Fig. 19*i*).

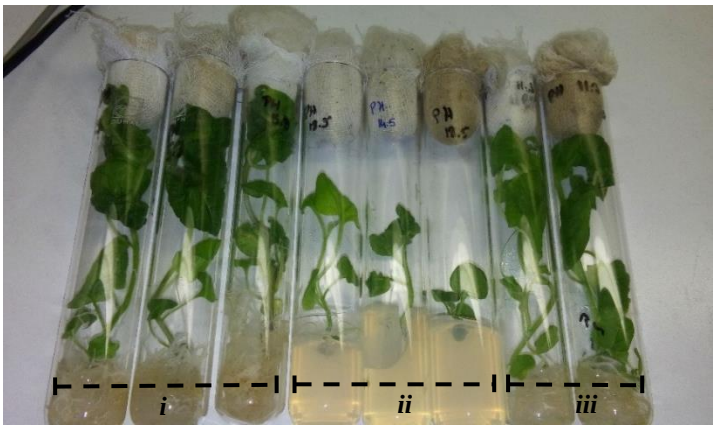

Figura 19. Plantas de *P. peruviana* ($PpAT_2$) obtidas após tratamento com colquicina; (*i*) plantas desenvolvidas após germinação de sementes; (*ii*) plantas desenvolvidas a partir de explantes meristemáticos; (*iii)* plantas controlo.

Analisando os resultados dos explantes meristemáticos, os grupos controlo e os tratamentos com as concentrações mais baixas de colquicina, apresentaram as taxas de desenvolvimento e sobrevivência mais elevadas, sendo que, com o aumento do tempo de exposição, verifica-se uma redução dos níveis de desenvolvimento em todos os ensaios (Fig. 20).

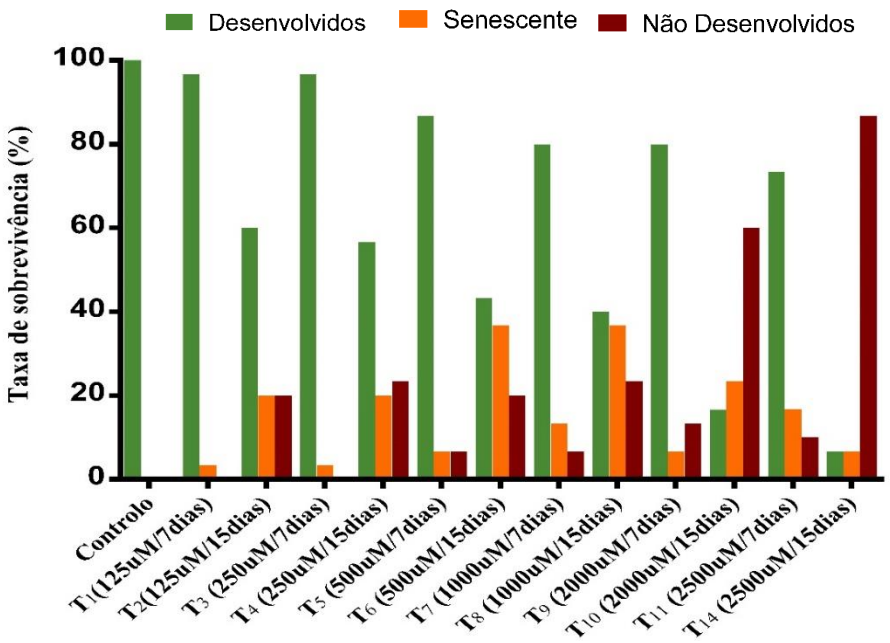

Figura 20. Taxa de sobrevivência dos explantes de *P. peruviana* ($PpAT_2$) após tratamento com diferentes concentrações de colquicina após dois períodos de tempo (*i*) 7 dias (*ii*) 15 dias. Cada valor corresponde à média em percentagem. Foram considerados senescentes todos os explantes que sofreram contaminações (fúngicas e bacterianas) e que após iniciarem o seu desenvolvimento, acabaram por morrer.

Nos tratamentos com uma concentração mais elevada de colquicina (2000 µM e 2500 µM) o fator tempo mostrou ser preponderante na sobrevivência dos explantes, havendo uma diminuição de cerca de 70% na taxa de sobrevivência quando os explantes foram sujeitos a um período 15 dias em contacto com a colquicina (Fig. 20).

Em geral, os explantes de *P. peruviana* desenvolveram-se bastante bem em todos os tratamentos para um intervalo de tempo de 7 dias, contudo, se este intervalo aumentar a taxa decai exponencialmente. Independentemente do tratamento a que foram sujeitas, a maioria das plantas sobreviventes revelou um crescimento mais lento que o normal e uma formação radicular praticamente nula (Fig.19*ii*). Para além disso, foram observadas algumas alterações morfológicas *in vitro* ao nível das folhas, fator que foi usado como parâmetro seletivo para análise em citometria.

Apesar de não estar explícito nos dados, alguns explantes submetidos ao tratamento com colquicina, revelaram anomalias durante o seu crescimento. Contudo, foram contabilizados como sobreviventes, e o nível de ploidia de alguns foi analisado por citometria de fluxo.

3.2.2.2. Análise do nível de ploidia por citometria de fluxo

O nível de ploidia das plantas resultantes dos tratamentos com colquicina foi analisado por citometria de fluxo, sendo no total analisadas 239 plantas, das quais 125 resultaram da germinação de sementes e 114 do desenvolvimento *in vitro* de meristemas axilares ou apicais, uma vez que nem todas as plantas, bem como alguns tratamentos foram alvo de análise (Tabela 11).

Tabela 11 Efeitos dos diferentes tratamentos com colquicina na indução de poliploidia em embriões zigóticos, através da germinação de sementes de *P. peruviana*. O parâmetro 4*x*, 8*x* e 4*x* + 8*x* significa tetraplóides, octoplóide e mixoplóides, respetivamente; os valores entre parêntesis representam a percentagem de ocorrência no respetivo grau de ploidia; (-) significa que estes tratamentos não foram analisados por citometria de fluxo.

Colquicina (µM)	**Duração (horas)**	**Sementes germinadas avaliadas (%)**		
		4x	8x	4x + 8x
0	0	5 (100)	0	0
1250	2 / 4 / 8 / 12 / 24	-	-	-
2500	2 / 4 / 8	-	-	-
	12	10 (100)	0	0
	24	8 (80)	0	2 (20)
5000	2 / 4 / 8	-	-	-
	12	9 (90)	0	1 (10)
	24	9 (90)	0	1 (10)
12500	2 / 4	-	-	-
	8	7 (70)	0	3 (30)
	12	8 (80)	0	2 (20)
	24	6 (60)	1 (10)	3 (30)
25000	2	10 (100)	0	0
	4	9 (90)	0	1 (10)
	8	6 (60)	0	4 (40)
	12	4 (40)	1 (10)	5 (50)
	24	3 (30)	1 (10)	6 (60)

Após indução e análise em citometria de fluxo das plantas resultantes de germinação verificou-se a ocorrência de um grande número de plantas mixoplóides e de algumas octoplóides, principalmente nos tratamentos com concentrações de colquicina mais elevados e com maior tempo de exposição. O tratamento onde se obtiveram os melhores resultados teve uma exposição de 24h a uma concentração de 25000 µM, ocorrendo seis plantas mixoplóides e uma octaplóide. Independentemente do tempo de exposição e da concentração do agente, foi obtida uma taxa de indução de plantas octoplóides de 1,2% e de plantas mixoplóides de 22,4%.

Tabela 12. Efeitos dos diferentes tratamentos com colquicina na indução de poliploidia de ápices caulinares e de segmentos nodais de *P. peruviana*. O parâmetro 4*x*, 8*x* e 4*x* + 8*x* significa tetraplóides, octoplóide e mixoplóides, respetivamente; os valores entre parêntesis representam a percentagem de ocorrência no respetivo grau de ploidia; (-) significa que estes tratamentos não foram analisados por citometria de fluxo.

Colquicina (µM)	**Duração (dias)**	**Segmentos nodais e ápices caulinares nº (%)**		
		4x	8x	4x + 8x
0	7	5 (100)	0	0
	15	5 (100)	0	0
125	7	-	-	-
	15	-	-	-
250	7	10 (100)	0	0
	15	10 (100)	0	0
500	7	9 (69,2)	3 (23,1)	1 (7,7)
	15	11 (100)	0	0
1000	7	9 (69,2)	3 (23,1)	1 (7,7)
	15	9 (90)	0	1 (10)
2000	7	9 (64,3)	5 (35,7)	0
	15	5 (83,3)	0	1 (16,7)
2500	7	8 (57,1)	3 (21,4)	3 (21,4)
	15	3 (100)	0	0

No ensaio de indução em ápices e segmentos nodais foi possível obter octoplóides, bem como alguns mixoplóides, nos quatro tratamentos com concentrações de colquicina superior a 500 µM, para um intervalo de 7 dias (Tabela 12). Pelo

contrário, para um intervalo de tempo de 15 dias, somente foi obtido um mixoplóide no tratamento com 2000 µM de colquicina. Uma exposição durante 7 dias a uma concentração de 2000 µM demonstrou ser o melhor tratamento para obtenção de octoplóides em *P. peruviana*. No total, independentemente da concentração de colquicina e tempo de exposição, a taxa de plantas octoplóides obtidas foi de 12,28% e 6,14% de mixoplóides.

A ploidia das plantas induzidas foi analisada em citometria de fluxo, sendo as plantas classificadas em tetraplóide (Fig. 21A), octoplóide (Fig. 21C) e mixoplóide (Fig. 21D) segundo o seu tamanho genómico. Para além disso, foi analisado uma planta de *P. philadelphica* por forma a comparar o tamanho genómico entre espécies.

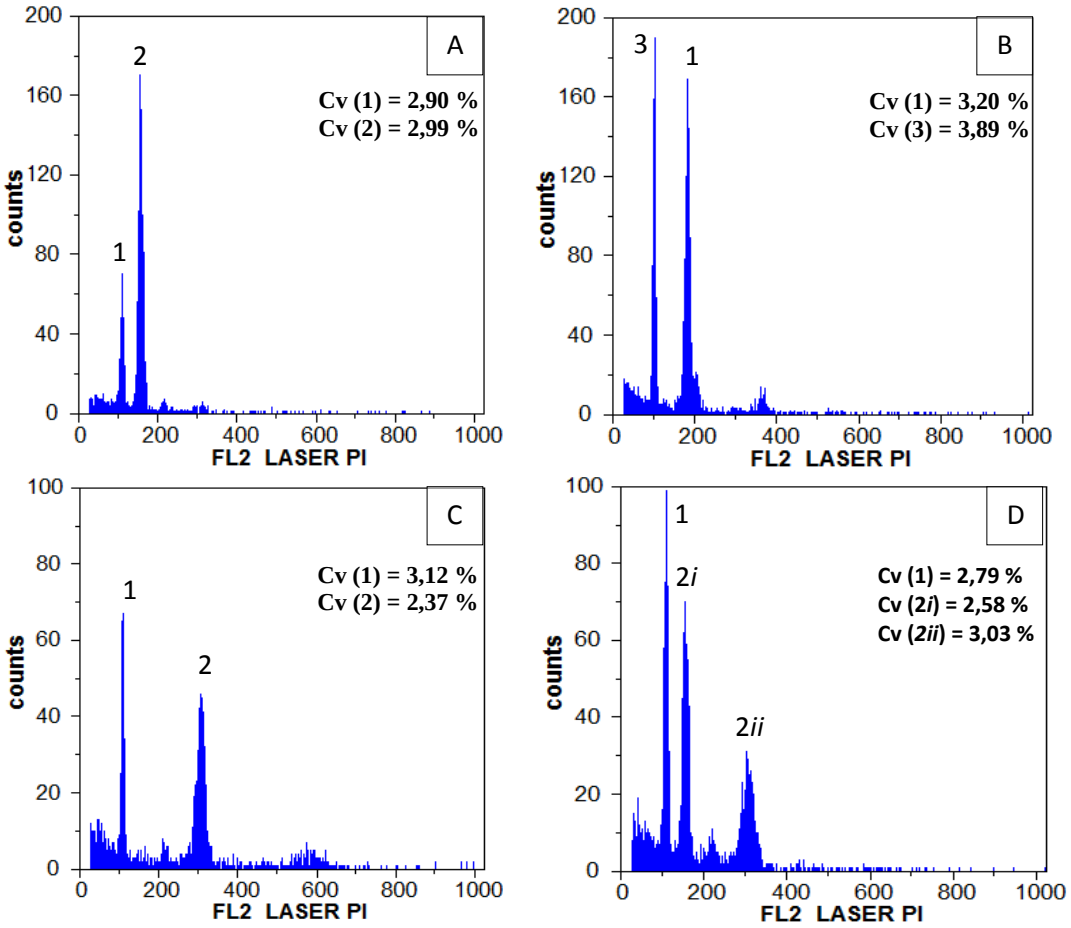

Figura 21. Histogramas de fluorescência obtidos após análise simultânea de núcleos isolados de *Pisum sativum* cv. Ctirad (pico 1; 2C = 9,09 pg ADN, como padrão de referência interno), *P. peruviana* (pico 2) e *P. philadelphica* (pico 3): A – *P. peruviana*, planta tetraplóide, B – *P. philadelphica*, planta diplóide, C – *P. peruviana*, planta octoplóide e D – *P. peruviana*, planta mixoplóide. CV = coeficiente de variação.

Em todos os histogramas (Fig. 21), o pico 1, localizado sensivelmente na posição 100 (em unidades arbitrárias, expressas em número de canais), corresponde à fase G0/G1 do ciclo celular da planta utilizada como padrão de referência (*Pisum sativum* cv. Ctirad, 2C = 9,09 pg ADN (Neumann *et al.*, 1998)), com exceção do histograma B, onde o pico se localiza na posição 200. O pico correspondente à fase G0/G1 das plantas tetraplóides de *P. peruviana* encontra-se aproximadamente na posição 150 (Fig. 21A, pico 2), enquanto o pico da fase G0/G1 das plantas octoplóides localiza-se sensivelmente no dobro da posição, ou seja, nos 300 (Fig. 21C, pico 2). Por sua vez, as plantas mixoplóides apresentam um pico na posição 150, e outro na posição 300 (Fig. 21D), correspondentes a núcleos tetraplóides na fase G0/G1 e a pelo menos 25% de núcleos octoplóides na mesma fase do ciclo celular.

No total, o índice de ADN médio para as plântulas tetraplóides foi de 1,44 ± 0,47 e de 2,82 ± 0,32 para as octoplóides. De referir que os coeficientes de variação (CV's) para as plantas tetraplóides variaram entre 2,13% e 3,67% e para as octoplóides entre 2% e 4,27%.

O nível de ploidia de 32 das plântulas que inicialmente provaram ser mixoplóides foi reanalisado após 2 meses em cultura. A reanálise dos mixoplóides demonstrou que, apesar da maior parte das plântulas permanecer mixoplóide, cerca de 10 % acaba por evoluir para a uma situação de ploidia superior (octoplóide). Aproximadamente 34% das plântulas reverte para o estado inicial de tetraploide (Fig. 22).

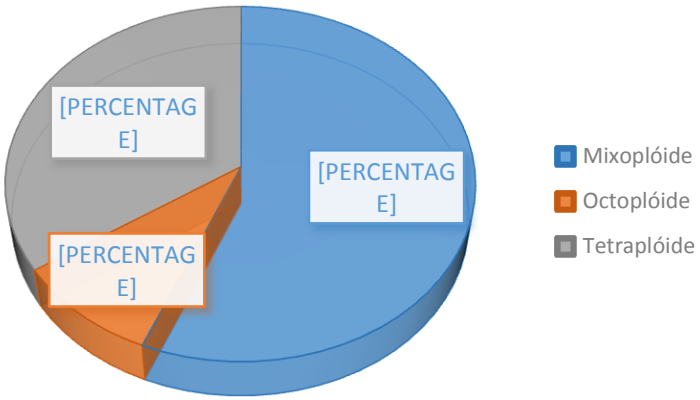

Figura 22. Níveis de ploidia das plântulas mixoplóides (n.º de ocorrências) após reanálise em citometria de fluxo 2 meses após os primeiros ensaios.

3.2.2.3. Estabelecimento e morfologia dos poliplóides

Após 38 dias em meio MS as plantas foram estabelecidas *ex vitro* e colocadas no fitoclima. Todas as plantas com um nível de ploidia superior estabelecidas foram submetidas às mesmas condições, contudo algumas plantas morreram e, na segunda semana ocorreu mais um pico de mortalidade, sobrevivendo somente 26% das 30 plantas estabelecidas.

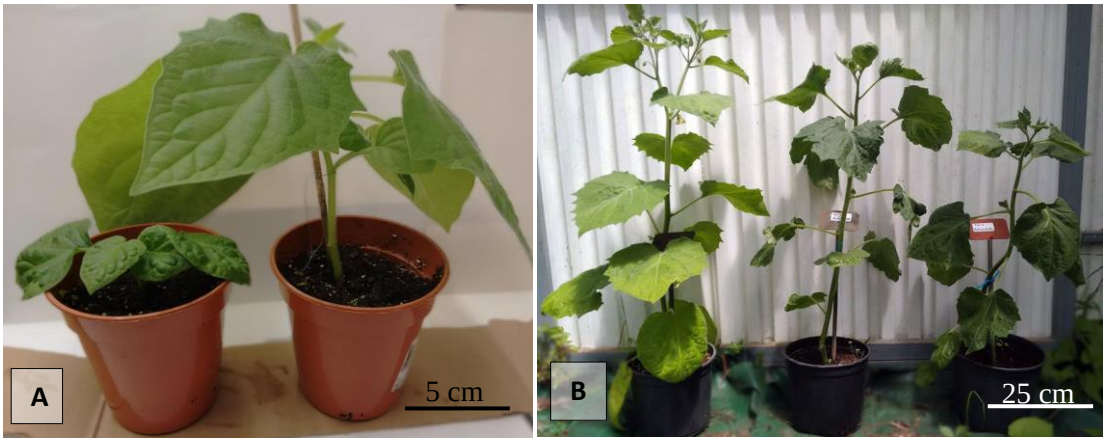

Figura 23. Diferentes fases de estabelecimento de *P. peruviana.* (A) Plantas com 18 dias, pós estabelecimento; (*i*) planta octoplóide, (*ii*) planta tetraplóide. (B) Planta com 74 dias, pós estabelecimento; (*i*) planta tetraplóide, (*ii*) planta octaplóide e (*iii*) planta mixoplóide,

Em relação às características morfológicas, as plantas octoplóides e mixoplóides apresentaram um desenvolvimento significativamente diferente das plantas tetraplóides, principalmente ao nível do crescimento apical (Fig. 23A).

Apesar de não terem sido registados valores de crescimento, as plantas com um nível de ploidia superior, revelaram um crescimento lento, acabando na maioria das vezes por não atingir o tamanho médio em adulto. Principalmente nos mixoplóides, o crescimento revelou-se muito mais lento (Fig. 23B*iii).*

Ao nível da coloração das folhas, plantas com nível de ploidia superiores possuem uma tonalidade de verde mais intenso, comparativamente aos tetraploides (Fig. 23). Para além disso, as folhas são de dimensão inferior e um pouco mais rugosas.

A época de floração demora mais tempo a surgir em comparação com as plantas tetraplóides, sendo que ao nível da coloração das flores e das estruturas reprodutoras formadas existem algumas diferenças (Fig. 24).

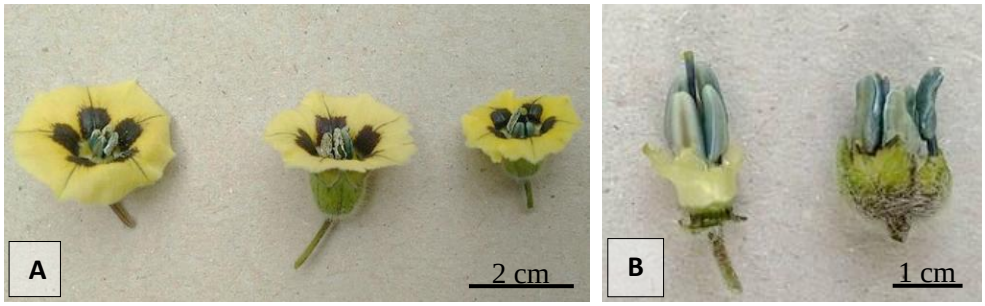

Figura 24. (A) Flores de *P. peruviana* de plantas com diferentes níveis de ploidia (*i*) tetraplóide, (*ii*) octoplóide e (*iii*) mixoplóide. (B) Estruturas reprodutoras de (*i*) tetraplóide e (*ii*) octoplóide.

O pólen destas plantas também foi avaliado sob forma de avaliar a viabilidade polínica em comparação com as plantas tetraplóides (Fig. 25).

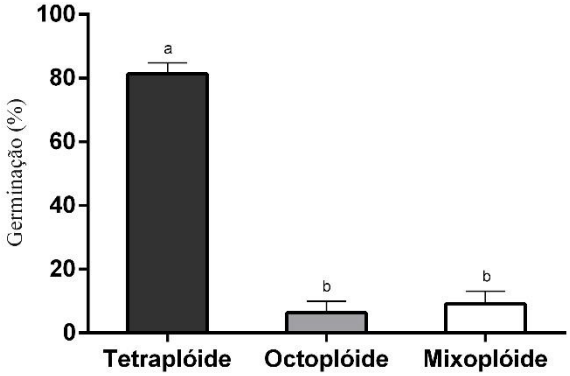

Figura 25. Percentagem de germinação dos grãos de pólen de *P. peruviana* com diferentes ploidias, para uma concentração de 12% sacarose, no final de 9h. Os valores com a mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0,05$) quando utilizado o

Os valores de germinação de pólen em plantas com ploidia superior é muito inferior às plantas tetraplóides. Verifica-se que as plantas mixoplóides, com 9,2 ± 3,96 (%) de germinação, possuem uma maior viabilidade do que os octoplóides, que registaram 6,4 ± 3,64.

3.2.2.4. Quantificação de clorofilas

Com a alteração de ploidia em plantas, geralmente, ocorrem alteração morfológias e /ou fisiológicas que podem alterar significativamente o crescimento e rendimento da planta.

Após indução e confirmação da ploidia das plantas em análise foi avaliado o conteúdo de clorofilas das mesmas, por forma a avaliar se existem diferenças significativas entre as plantas tetraplóides e plantas com um grau de ploidia superior (Fig. 26).

Após análise verifica-se que tanto os mixoplóides como os octoplóides possuem uma quantidade de clorofilas a e b inferior aos tetraplóides, sendo que essa diferença é mais acentuada nos mixoplóides.

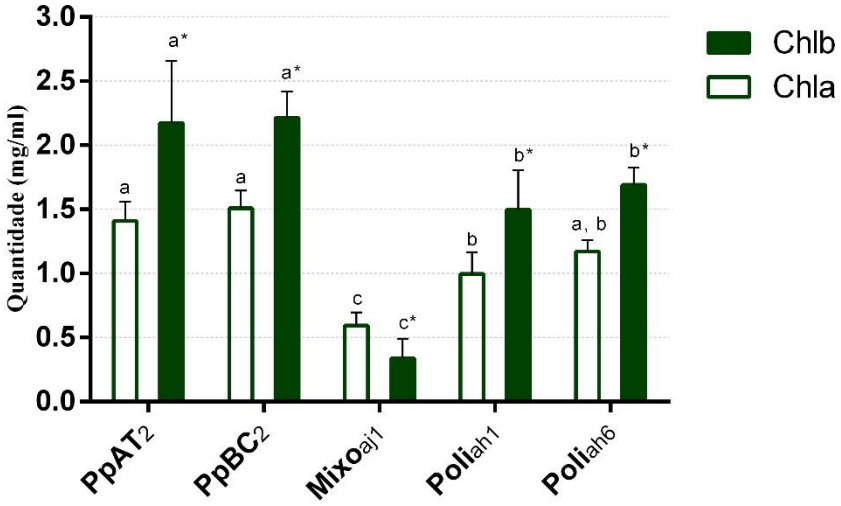

Figura 26. Média de valores de clorofilas para diferentes ploidias de *P peruviana* após análise em espectrofotómetro. Valores com a mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0,05$) quando utilizado o teste de Tukey.

Contudo, quando avaliada a relação entre clorofila *a*/*b*, verifica-se que não existe uma diferença significativa entre tetraplóides e octoplóides (Tabela 13). Pelo contrário, no caso dos mixoplóides, o valor da relação das duas clorofilas é muito superior aos restantes, uma vez que demonstraram ter uma maior quantidade de clorofila *a*.

Tabela 13. Relação entre valores de clorofila *a* e *b* para diferentes valores de ploidia de *P. peruviana*.

Relação clorofila a/b	
$PpAT_2$	0,66
$PpBC_2$	0,68
$Mixo_{aj1}$	2,37
$Poli_{ah1}$	0,67
$Poli_{ah6}$	0,70

4. Discussão

4.1. Estabelecimento *in vitro*

4.1.1. Germinação de sementes e estabelecimento de *Physalis* sp.

A germinação de sementes do género *Physalis* é um método fácil de se realizar, obtendo-se grandes taxas germinativas. Em *P. peruviana*, as sementes têm uma elevada percentagem de germinação, rondando os 85% a 90%, quando estas são recentes, (Miranda *et al*., 2005), não sendo necessário recorrer a escarificações e/ou aplicação de giberelinas (de Sousa *et al*., 2016). Quando se pretende conservar sementes e manter a mesma taxa germinativa, a estratificação de temperatura permite obter resultados idênticos (de Sousa *et al*., 2016).

No ensaio realizado não foi usada qualquer técnica de quebra de dormência das sementes, uma vez que estas foram recolhidas de frutos frescos, previamente colhidos de plantas selecionadas. Após inoculadas, foi obtida uma taxa germinativa de 96.6%, valor que se revelou superior a ensaios idênticos (Miranda *et al*., 2005), bem como ao valor de germinação *ex vitro* (Manso, 2015). Para além disso, o pico germinativo ocorreu ao 7º dia, valor inferior ao usualmente obtido nos ensaios *in vitro* (Miranda *et al*., 2005; de Sousa *et al*., 2016). O facto de serem usados ecótipos diferentes desta espécie poderá ser um fator preponderante para a disparidade dos resultados. Neste ensaio verificou-se que algumas plantas, apesar de ter ocorrido germinação, não tiveram um desenvolvimento foliar normal, não havendo relatos sobre este tipo de fenómeno em ensaios idênticos. De salientar que esta situação não ocorreu quando as sementes foram cultivadas *ex vitro.*

Os valores de germinação de *P. philadelphica* foram menores, tendo sido alcançada uma taxa germinativa de 69,3%, valor inferior ao registado em ensaios já realizados (Pichardo-González *et al*,. 2014). Todavia nesses ensaios as sementes foram sujeitas a um processo de hidratação de 24h e inoculadas em caixas de Petri. Pelo contrário, neste ensaio, as sementes foram embebidas durante 12h e inoculadas em meio MS. Apesar de em *P. peruviana* a inoculação em meio MS favorecer uma boa taxa de germinação, tal não ocorreu em *P. philadelphica.*

A maioria das plantas apresentou uma uniformidade fenotípica e um crescimento radicular bem desenvolvido, havendo em grande parte formação de raízes secundárias (64%). Embora não tenham sido recolhidos dados quantitativos no que respeita ao

crescimento das plantas *ex vitro*, todas elas se desenvolveram de forma considerável durante o período de aclimatização, não havendo grandes discrepâncias no crescimento.

As 22 linhas avaliadas de *P. peruviana* não revelaram grandes diferenças significativas entre si, sendo o principal critério de seleção os valores de crescimento apical e o número de nós formados por cada explante. As linhas $PpAT_2$ e $PpAA_2$ forneceram os melhores resultados em todas as vertentes, alcançando um crescimento apical e número de nós superior aos restantes genótipos, sendo que, a média dos resultados foi ao encontro de ensaios similares (Chave *et al*., 2005; Moreira *et al*, 2010).

Como referido, no caso de *P. philadelphica* somente foi avaliado o desenvolvimento caulinar dos explantes, uma vez que esta espécie foi estabelecida para posteriores ensaios de hibridação. No entanto, salienta-se que os valores registados de desenvolvimento em meio MS foram superiores a ensaios similares realizados, onde a média de crescimento ronda os 1.3 ± 0.52 cm (Khan & Bakht, 2015)

Apesar da fragilidade das plântulas, e de por vezes se ter verificado um enrolamento do caule, a aclimatização e crescimento das plântulas não se revelou um problema, tendo sido obtida uma taxa de sobrevivência de 89,4%. A mortalidade registada deveu-se essencialmente a um fraco desenvolvimento radicular de algumas plantas.

4.1.2. Micropropagação de *Physalis peruviana*

Apesar de ser possível manter e propagar plantas de *P. peruviana* em Meio MS sem a adição de hormonas, os explantes resultantes dessa multiplicação não são suficientes para uma possível cultura em larga escala (Chaves *et al*. 2005; Yucesan *et al*. 2015). Como tal, explantes das quatro linhas de *P. peruviana* foram submetidos a diferentes meios com adições hormonais, por forma a criar um meio ótimo de propagação, essencial para o melhoramento de uma espécie e uma rápida propagação em larga escala. O uso de citocininas, como o caso das benzilaminopurinas (BAP) é muito recorrente nestes ensaios, uma vez que estas têm um efeito direto no controlo da dominância apical, permitindo o desenvolvimento dos meristemas axilares (Chaves *et al*. 2005; Beyl, 2016).

Em todos os 4 meios os resultados foram muito idênticos, havendo desenvolvimento de todos os explantes, apesar de inferior às plantas controlo. O comprimento médio de cada planta neste ensaio foi proporcional ao aumento da concentração de BAP até ao valor crítico de 0,5 mg/L, a partir daí, o comportamento foi oposto, podendo este fator influenciar diretamente o número de nós formados. Esta situação corrobora os resultados de Singh & Arora (1995) e Chaves *et al*. (2005) que relataram que o aumento da concentração de BAP leva a uma diminuição no comprimento da parte aérea e aumento do número de novos rebentos por explante. Contudo, o aumento do número de rebentos não se verificou em nenhum dos tratamentos. Ramar *et al*. (2014) para concentrações de 0,5 e 1mg/L de BAP obteve a formação de novos rebentos, bem como um número de nós superior ao obtido no ensaio realizado. Mais uma vez se salienta, que a possibilidade de uso de um ecótipo diferente, poderá influenciar diretamente a resposta *in vitro* desta espécie.

Praticamente em todos os tratamentos ocorreu desenvolvimento radicular, sendo este mais acentuado nas concentrações até 0,5mg/L de BAP, traduzindo-se numa taxa de sobrevivência de 100%, situação que ocorreu em ensaios similares (Yucesan *et al*., 2015). Algumas plantas sujeitas a 1 e 2 mg/L de BAP, desprovidas de sistema radicular, foram inoculadas em meio MS numa tentativa de promover o enraizamento. Estas plantas após estabelecidas obtiveram uma taxa de sobrevivência de 80%.

Apesar de terem sido obtidos valores inferiores ao controlo e o efeito obtido não ser o esperado quando utilizada esta citocinina, existe potencial no uso de BAP na cultura de *P. peruviana*, uma vez que em Meio MS as plantas têm um crescimento muito acentuado nos primeiros 30 dias, tornando-se inviável mantê-las por muito mais tempo em cultura sem as cultivar de novo. Com a adição de BAP, o crescimento é mais lento, sendo que em 30 dias a média de desenvolvimento caulinar ronda os 5,65 cm, possibilitando um maior tempo de cultura e, consequentemente, maior número de nós.

O uso de auxinas sintéticas como o NAA e a sua associação com citocininas também foi avaliado, uma vez que são hormonas indispensáveis na cultura *P. philadelphica* (Garcia-Osuna *et al.,* 2015; Khan & Bakht, 2015). No entanto, os resultados obtidos não foram idênticos em ambas as espécies. O uso de NAA como consequência geral caracteriza-se pela formação de caules rígidos; folhas lívidas com uma tonalidade verde claro e estruturas radiculares amorfas rígidas e curtas com alguns pelos radiculares.

O uso de NAA não se encontra documentado nesta espécie e, perante os resultados obtidos, não parece ser o melhor PGR para a cultura de *P. peruviana.* De salientar que no meio com 1,5 mg/L de NAA apenas surgiu calo, como tal poderá ser um bom ponto de partida para futuros protocolos de embriogénese somática. A associação de NAA com BAP em baixas concentrações (0,5 mg/L) promoveu o desenvolvimento radicular normal, alcançando-se uma taxa de sobrevivência de 87%, sendo esta nula quando surgem as estruturas radiculares rígidas.

O uso de giberelinas em cultura *in vitro*, tem sido muito recorrente em espécies de fisális, como o caso de *P. angulata* (Kumar *et al.*, 2015),bem como em *P. peruviana* através do recurso a GA_3 (Ramar *et al*., 2015). A presença de citocininas quando utilizado GA_3 é indispensável para o desenvolvimento do explante em *P. angulata* (Kumar *et al.*, 2015). O mesmo resultado surgiu em ensaios preliminares com *P. peruviana*, sendo a presença da citocinina necessária para a resposta dos explantes.

No ensaio realizado verificou-se dois tipos distintos de organogénese: formação de rebentos a partir do caule e formação de rebentos a partir de um calo previamente formado. Em ambos os casos, o processo ocorreu de forma espontânea após as plantas se encontrarem no meio de cultura usado na sua multiplicação. Este fato vai ao encontro dos resultados obtidos na cultura de *P. peruviana* (Ramar *et al*., 2015) com o uso das mesmas hormonas. A taxa de enraizamento destes rebentos e a percentagem de sobrevivência das plantas originadas a partir dos mesmos foi de 100%, pelo que as fases de enraizamento e aclimatização não parecem constituir um fator limitante à propagação desta espécie.

Apesar dos bons resultados quando utilizado GA_3 em associação com BAP, a presença de 2,4-D demonstrou ser preponderante para a formação de novos rebentos. De uma forma geral, todas as linhas responderam de forma similar ao cultivo *in vitro* na presença destes três PGRs, sendo a maior taxa de formação de nós meristemáticos e novos rebentos, registada no meio $MsBGD_3$, apesar de o genótipo $PpAA_2$ ter respondido melhor a outro meio.

A formação radicular na presença de GA_3 foi praticamente nula, com exceção para o meio $MsBGD_1$, onde a concentração de GA_3 era inferior a BAP. A razão entre estas duas hormonas demonstrou ser preponderante para a resposta radicular.

4.2. Ensaios de melhoramento de *Physalis peruviana*

4.2.1. Polinização artificial

A determinação da viabilidade e taxa de germinação do pólen, bem como a sua compatibilidade são fatores essenciais para a realização de hibridações controladas (Salles *et al*., 2006). Deste modo, foram realizados ensaios de caracterização polínica de *P. peruviana* e *P. philadelphica*.

Após realizada a acetólise dos grãos de pólen verificou-se que os valores de P e E são inferiores aos descritos para ambas as espécies (Lagos et al., 2005), contudo os valores de P/E enquadram o pólen em estudo no mesmo formato polínico, ou seja, prolato para *P. peruviana* e prolato-esferoidal para *P. philadelphica.*

A germinação do pólen e o crescimento do tubo polínico são pré-requisitos para o processo de fertilização e a consequente formação de sementes. Por forma a determinar a viabilidade do pólen e, consequentemente, avaliar a sua fertilização, foram realizados testes de germinação *in vitro*. Na maioria das espécies, a germinação *in vitro* de pólen depende da composição do meio de cultura, especialmente da concentração de sacarose (Shivanna, 2003). No ensaio realizado, em ambas as espécies, verificou-se a influência da concentração de sacarose na germinação. Contudo, para diferentes intervalos de tempo germinativos, os valores de germinação do pólen, variam para a mesma percentagem de sacarose havendo diferenças bastantes significativas. Em *P. peruviana* as melhores taxas germinativas foram obtidas num intervalo de tempo de 9h, com uma média a rondar os 70% de germinação, sendo que o valor mais elevado (82%) foi obtido na concentração de 18% de sacarose. Em *P. philadelphica*, ensaios preliminares demonstraram que o pólen desta espécie não germina num intervalo de tempo inferior a 6h, nem com concentrações de sacarose inferiores a 9%. Tal facto poderá ser devido à maior espessura entre a exina e intina do pólen. O melhor ensaio de germinação polínico ocorreu para um intervalo de 9h com 22% de sacarose, obtendo-se

uma germinação de 63%. Os valores de viabilidade obtidos foram inferiores aos registados por Lagos et al. (2005), contudo, o autor avaliou a viabilidade através da coloração com carmim acético 2%.

A capacidade de armazenar pólen viável por longos períodos permite a realização de ensaios polinização cruzada de variadas espécies em diferentes momentos ou locais, através da conservação de germoplasma num espaço mínimo (Erik & Dina, 1996). O armazenamento do pólen a baixas temperaturas é um método eficaz de armazenamento a longo prazo. Sob estas condições, todos os processos metabólicos nos sistemas biológicos, estão praticamente parados, permitindo assim a manutenção da viabilidade polínica (Bhat *et al*,. 2012).

No ensaio de conservação de pólen, este foi colocado a germinar tendo em linha de conta os resultados de viabilidade polínica, como tal, foi utilizado meio de germinação com adição de 18% de sacarose, num intervalo de tempo de 9 horas. Após o armazenamento de pólen de *P. peruviana* a -4º C e -22º C, verificou-se um efeito significativo na viabilidade do pólen durante os vários intervalos de tempo, quando comparado com pólen armazenado à temperatura ambiente. Em algumas espécies, como por exemplo *Carica papaya* L. (Anjum *et al.*, 2007), ocorre um aumento de viabilidade do pólen quando sujeito a estas temperaturas, contudo, tal não sucedeu em *P. peruviana*, havendo perda de viabilidade nestes dois tratamentos, apesar de inferior ao armazenamento à temperatura ambiente.

No tratamento de criopreservação, os valores de germinação de pólen diminuíram drasticamente logo após o 9º dia. No entanto, os valores mantiveram-se inalterados nos restantes intervalos de tempo, permanecendo uma germinação de cerca 50% ao longo de 60 dias. Este grande défice de germinação poderá dever-se ao facto de somente ter sido usado glicerina como meio protetor às baixas temperaturas quando, geralmente, são usados crioprotectores (Bhat *et al*,. 2012; Rajasekharan *et al.*, 2013). Quando sujeito a azoto liquido a taxa de germinação apenas diminuiu para 75%, comparado com os valores de pólen fresco. A perda gradual de germinação a baixas temperaturas (-4 ℃, -22 °C e -80 ℃) observada no presente estudo pode ser atribuída à diminuição gradual de temperatura, levando à formação de gelo intracelular, morte celular e, consequentemente, a perda de germinação (Bhat *et al*,. 2012).

A polinização cruzada é um mecanismo de extrema importância na criação de sementes hibridas e consequente produção de plantas hibridas. Ensaios de cruzamentos intraespecíficos anteriormente realizados com diferentes flores de *P. peruviana* revelaram uma compatibilidade e taxa de sucesso de 100%, tendo inclusive sido obtidos frutos de maior tamanho e massa em comparação com frutos derivados de autopolinização (Lagos *et al*., 2008; Chautá-Mellizo *et al.,* 2012). As polinizações intraespecíficas efetuadas *in vitro* e posteriormente avaliadas em microscopia de fluorescência, não revelaram qualquer tipo de incompatibilidade, havendo uma formação do tubo polínico a rondar os 100%. Contudo, quando utilizado estruturas reprodutoras de flores diferentes, verificou-se um crescimento do tubo polínico num menor espaço de tempo, sustentando a ideia de que a própria planta, promove variabilidade genética. Como seria de esperar, em *P. philadelphica,* os resultados confirmaram a autoincompatibilidade desta espécie, uma vez que não foi observado a germinação do pólen no pistilo da mesma flor, sendo que quando usado um pistilo diferente, a taxa de formação do tubo polínico vai ao encontro dos testes de viabilidade do pólen para esta espécie (Escobar-Guzmán *et al.,* 2009).

Nos cruzamentos *in vitro* interespecíficos verificou-se que somente existe viabilidade no cruzamento das duas espécies, quando o recetor de pólen é *P. peruviana*, uma vez que em nenhuma réplica onde o recetor era um estigma de *P. philadelphica* ocorreu formação de tubo polínico. Este fenómeno é designado de incompatibilidade unilateral, sendo geralmente desenvolvida em processos de especiação, causando um isolamento reprodutivo que se reflete na incompatibilidade dos gametas sexuais, tendo ocorrido resultados idênticos em ensaios realizados entre *P. floridana* e *P. philadelphica* (Cely *et al.,* 2015).

Os resultados dos cruzamentos *in vivo* foram ao encontro dos obtidos *in vitro.* Apesar da baixa taxa de fecundação, senescências florais e ocorrência de uma elevada taxa de contaminação, foi possível registar 3 cruzamentos interespecíficos positivos entre as duas espécies. Apenas um dos frutos completou o seu amadurecimento, tendo no seu interior somente uma semente completamente desenvolvida e algumas disformes e lívidas. Ao nível do fruto não foram observadas diferenças significativas. Geralmente, os frutos resultantes destes ensaios, apresentam dimensões inferiores (Cely *et al.,* 2015), no entanto a dimensão do fruto obtido não foi inferior à média de *P. peruviana*. De salientar que devido ao facto de só ter sido obtido um fruto não foi possível realizar

análises nutritivas e químicas, contudo foram realizados testes de citometria de fluxo com as sementes disformes por forma a avaliar o tamanho genómico. Não foi possível chegar a uma conclusão quanto à ploidia das sementes, uma vez que estas não possuíam material nuclear suficiente passível de ser analisado, não sendo possível a confirmação de obtenção de alotriploides. A única semente desenvolvida foi colocada a germinar para que, posteriormente, o híbrido seja analisado.

4.2.2.1. Obtenção de plantas poliplóides

Através da indução de poliploidia é possível obter plantas com características distintas da planta que lhes deu origem, como frutos sem sementes, frutos e flores significativamente maiores, maior resistência a pragas, tolerância a stresse físico, e ainda superar possíveis barreiras de hibridização (Predieri, 2001).

Os poliplóides são caracterizados por possuírem elevadas taxas de infertilidade assim, a indução de poliploidia deve ser aplicada no melhoramento de espécies com capacidade de se reproduzir de forma vegetativa, que sejam perenes no seu habitat e cujo produto económico não seja a semente (ex. flores, vegetais, frutos), como é o caso do género *Physalis.*

As técnicas de cultura *in vitro* permitiram aumentar a eficiência de indução de poliploidia, permitindo ainda uma rápida propagação dos poliplóides formados (Predieri, 2001). Contudo, estes efeitos podem variar de acordo com a espécie, o grau de heterozigotia e ainda o nível de ploidia (Zhang *et al.*, 2008).

Em *P. peruviana* existem diferentes ecótipos que variam no seu tamanho genético, havendo plantas diplóides e tetraplóides na mesma espécie (Liberato *et al*., 2014). Estas plantas alopoliplóides, decorrem de hibridação interespecífica e poliploidia, causando "choques genómicos" (McClintock, 1993), desencadeando um conjunto de mudanças genéticas como expressão diferencial de genes, rearranjos cromossómicos e mudanças epigenéticas (Leitch & Leitch, 2008).

O inexistência de estudos de tamanho genómico de *P. peruviana* (Kew, Royal Botanic Garden), levou à necessidade de comparação de ploidia com *P. philadelphica*, uma vez que a variedade colombiana de *P. peruviana* pode assumir vários níveis de ploidia (Nohra *et al*, 2006). Verificou-se que o tamanho genómico de *P. peruviana* é sensivelmente o dobro do genótipo de *P. philadelphica* (2n=24) e como tal, apesar dos

valores de Cv's não serem similares, assumiu-se a variedade em análise como tetraplóide.

Existem vários fatores que podem influenciar a eficiência da duplicação cromossómica *in vitro* como o tipo de agente c-mitótico e a sua concentração, a duração do tratamento, o solvente utilizado, o modo de aplicação e o tipo de explantes usados (McCarthy *et al*., 2015).

A colchicina foi o agente realizado na indução de poliploidia, uma vez que a sua utilização tem permitido a obtenção de poliplóides com sucesso em inúmeras espécies vegetais, algumas delas pertencentes à família das solanáceas (Kazi, 2015). Todavia, estudos recentes, têm demonstrado que, para algumas espécies, a orizalina pode ser tanto ou mais eficaz do que a colquicina (Dhooghe *et al*., 2009), devido a possuir uma maior afinidade com as tubulinas, podendo ser usada em menores quantidades e, por isso, é tida como menos tóxica para os explantes (Pintos *et al*., 2007).

Os resultados obtidos revelaram uma correlação negativa entre o desenvolvimento dos explantes e a concentração e tempo de exposição. A exposição dos explantes durante 15 dias à colchicina levou a uma taxa inferior de sobrevivência relativamente aos explantes expostos durante 7 dias, principalmente em concentrações de colchicina mais elevadas. Quando expostos durante 7 dias, os explantes apresentaram taxas de sobrevivência superiores a 75%, inclusive para as concentrações usadas mais elevadas. Na indução de tetraploidia em *Solanum lycopersicum* (tomateiro) foram obtidos resultados idênticos de taxa de sobrevivência para as mesmas concentrações de colchicina, no entanto, o tempo de exposição foi inferior (Cola *et al*., 2014).

Nos indução em embriões zigóticos, através de germinação de sementes, a taxa de sobrevivência e, consequente taxa de desenvolvimento foi mais elevada. Tal facto deriva de a superfície de contacto com a colchicina ser muito inferior, havendo proteção do tegumento, sendo o tempo de exposição também ele muito inferior. Na indução de poliploidia de *P. philadelphica* foi usado um protocolo semelhante, contudo não houve qualquer mortalidade nesta espécie (Robledo-Torres *et al*., 2011).

Dependendo da concentração e da duração do tratamento, ocasionalmente ocorrem desenvolvimentos anormais, bem como atrasos no crescimento das plantas (Shao *et al*., 2003). Em termos comparativos, as plantas derivadas da indução em embriões zigóticos apresentaram um crescimento sem diferenças significativas relativamente ao controlo. Pelo contrário, nas plantas desenvolvidas no tratamento de

indução de meristemas, ocorreu um crescimento desfasado e inferior ao controlo, só sendo possível registar um desenvolvimento similar passados 2 meses, após estabelecimento *ex vitro*. Apesar de tudo foi possível obter um número aceitável de explantes desenvolvidos e passíveis de serem analisados por citometria de fluxo, tendo sido analisados os tratamentos onde ocorriam alterações morfológicas e mal formações nas plantas por forma a tornar o ensaio economicamente e logisticamente viável, havendo assim tratamentos, onde foi utilizada baixa concentração de colchicina, que não foram analisados em citometria.

O sucesso na indução de poliploidia foi diferente nos diferentes tratamentos. Das 125 plantas resultantes da indução em embriões zigóticos somente se obteve uma taxa de indução de 2,4%, enquanto que na indução em explantes meristemáticos foi obtida uma taxa de indução de 12,28% num total de 114 plantas, obtendo-se assim um maior sucesso neste procedimento. Apesar de não ter sido avaliado, verificou-se uma melhor indução em segmentos nodais do que em ápices meristemáticos em conformidade com os ensaios realizados em tamarilho (Reis, 2013).

Os resultados alcançados sugerem a necessidade de utilizar concentrações de colchicina mais elevadas para obter um maior número de plantas octoplóides, uma vez que o número de plantas tetraplóides foi bastante elevado, bem como o número de plantas mixoplóides, principalmente no ensaio de indução em embriões. Resultados idênticos foram conseguidos por Praça et al., (2009), em que através da regeneração de ápices caulinares de *Solanum lycopersicum* expostos a concentrações mais baixas de colchicina provocou um baixo número de tetraplóides e um número elevado de diplóides e mixoplóides.

A presença de mixoplóides foi uma constante em praticamente todos os tratamentos avaliados. Se por um lado, os mixoplóides indicam condições de indução insuficientes, por outro são importantes como indicadores de um efeito positivo no tecido exposto, podendo mesmo vir a evoluir para o grau de ploidia preterido. Este tipo de plantas possuem um valor reduzido na agricultura, pois possuem diferentes níveis de ploidia nas suas células, originando complicações a nível morfológico e fisiológico nas plantas, uma vez que as células tetraplóides possuem uma taxa de proliferação maior do que as células com outros níveis de ploidia superior, havendo uma tendência a reversão parcial ou totalmente para triplóide (Mergen & Lester, 1961). De facto, no tamarilho, verificou-se esta estabilização de ploidia, havendo plantas que após 2-3 meses

revelaram-se tetraplóides após reanálise do nível de ploidia das plantas (Reis, 2013). A reanálise em *P. peruviana* passados 2 meses demonstrou também que uma grande percentagem (34%) das plantas reverteu para o estado tetraplóide, sendo que somente 10% das plantas reanalisadas se estabilizaram como octoplóides. Possivelmente, em *P. peruviana* é necessário um maior intervalo de tempo para plantas mixoplóides se estabilizarem, uma vez que a maioria das plantas permaneceram nesta ploidia.

4.2.2.1. Estabelecimento e morfologia dos poliplóides

Ao nível do desenvolvimento radicular, plantas mixoplóide revelaram um enraizamento muito mais acentuado do que as octoplóides. Análises de cariótipo de plantas mixoplóide de tamarilho (Reis, 2013) demonstraram que as células analisadas da coifa eram todas elas diplóides, sugerindo-se que o desenvolvimento radicular ocorre a partir de sectores diplóides da coifa. Devido à fragilidade radicular e/ou carências de estabelecimento desconhecidas para estes poliploides, algumas plantas octoplóides morreram.

Existem algumas diferenças morfológicas a assinalar entre os três níveis de ploidia. Apesar de não ter sido registado, as plantas tetraplóides apresentaram uma taxa de crescimento maior do que as plantas octoplóides e mixoplóides, podendo este facto ocorrer devido à reduzida taxa de divisão celular (Shao *et al*., 2003). As folhas das plantas com a ploidia alterada para além de ser um pouco mais pequenas, apresentaram uma tonalidade de verde mais intensa e escura. Todavia, não parece existir uma relação nítida entre as alterações verificadas e o nível de ploidia, principalmente a nível foliar, uma vez que seria de esperar um aumento na sua dimensão, como ocorre em ensaios idênticos, inclusive em *P. philadelphica* (Robledo-Torres *et al*., (2011).

A época de floração dos poliplóides demorou cerca de mais um mês a surgir em comparação com plantas tetraplóides, muito devido aos atrasos de crescimento das plantas. A cor das flores é a mesmas nos três estados de ploidia, contudo, nos mixoplóides o amarelo é mais intenso, sendo a flor de dimensões inferiores em comparação com as restantes. A morfologia da flor não se alterou, no entanto, as anteras das plantas octoplóides de algumas flores adquiriram um formato rugoso que

normalmente não ocorre. Será preciso um maior número de estabelecimentos de plantas octoplóides para ser feito análise estatística a este evento.

À semelhança de *P. ixocarpa (*Ramírez-Godina *et al.,* 2013) após indução de poliploidia, a viabilidade do pólen diminuiu drasticamente. Apesar de existirem inúmeras vantagens neste processo, a diminuição considerável da viabilidade dos grãos de pólen e consequente fertilidade das plantas octoplóides poderá ser um obstáculo produtivo destas plantas. Contudo, novos testes de viabilidade polínica deverão ser realizados, uma vez que as condições testadas poderão não ser as ideais para o pólen testado. À semelhança da falta de germinação do pólen de *P. philadelphica* para alguns meios testados, o pólen octaplóide poderá exigir diferentes condições que o pólen de plantas tetraplóides.

Ao nível do fruto, não foi possível recolher dados fenotípicos, uma vez que estes se encontravam em estado muito prematuro de desenvolvimento quando terminado o ensaio. No entanto, foi possível registar a formação de quatro frutos no genótipo $Poli_{ah6}$, desconhecendo-se a origem do pólen que lhes deu origem, podendo-se tratar de auto-polinização ou polinização cruzada com outras plantas, uma vez que a planta não se encontrava isolada.

4.2.2.2. Quantificação de clorofilas

A alteração de ploidia pode levar a alterações significativas nos parâmetros fisiológicos como; folhas como maior condutividade estomática, maior concentração intercelular de CO2 e menor eficiência do uso da água, aumento do número e tamanho dos estomas bem como a alteração da quantidade de clorofilas existentes. A variação de só um destes fatores pode ter um efeito impactante no desenvolvimento da planta.

Em plantas com um número de ploidia superior, geralmente, há um incremento no tamanho das células em praticamente todos os tecidos, contudo o tamanho do cloroplasto normalmente não é alterado pelo fator ploidia, porém o número destes aumenta nas folhas (Ladygin, 2004).

As clorofilas são grupos de pigmentos verdes absorventes de luz, ativos na fotossíntese, fundamentais na absorção e transferência da luz solar à cadeia de produção de energia (Zeiger *et al.,* 2002). A clorofila *b* é a grande responsável por esta absorção e, como analisado, está presente em maior quantidade nas plantas de *P. peruviana*.

As plantas tetraplóides apresentaram uma maior quantidade de clorofilas *a* e *b* em comparação com as restantes, sendo a diferença para com os mixoplóides muito acentuada. Contudo quando avaliada a relação clorofila *a/b* verifica-se que esta é igual para plantas tetraplóides e octaplóides, não havendo assim um impacto tão acentuado nos processos de transferência de energia nos cloroplastos. Todavia, em plantas mixoplóides verificou-se que a quantidade de clorofila *a* é superior à clorofila *b*, levando a uma relação clorofila *a/b* muito superior à obtida para plantas tetraplóides. Estas diferenças podem afetar diretamente o ciclo fotossintético, havendo repercussões diretas no desenvolvimento da planta. De facto, as plantas mixoplóides foram as que revelaram um desenvolvimento mais lento de todos os estabelecimentos realizados.

5. Conclusão e perspetivas futuras

A existência de métodos de propagação eficazes é parte integral em programas de melhoramento. Os resultados obtidos mostram que o *P. peruviana* tem uma elevada capacidade de resposta *in vitro* tendo ocorrido proliferação dos explantes usados em praticamente todos os meios, contudo verificou-se que a associação dos três PGRs (BAP, GA_3 e 2,4-D) reúne as melhores condições de micropropagação nesta espécie. Este trabalho possibilitou o conhecimento dos métodos de propagação em *P. peruviana*, bem como o seu comportamento *in vitro*, sendo a análise das concentrações dos PGRs, principalmente de GA_3 e 2,4-D, os próximos estudos a realizar nesta vertente. Para além disso, o uso de outros explantes, como explantes foliares seria pertinente de ser avaliado.

O protocolo de germinação de sementes demonstrou ser eficaz, podendo ser especialmente importante na germinação de sementes híbridas resultantes dos cruzamentos interespecíficos.

Os ensaios de polinização intraespecíficos de *P. peruviana* demostraram não existirem barreiras de incompatibilidade entre o pólen e a parte feminina de diferentes plantas, possibilitando assim a realização de cruzamentos com o objetivo de produzir novas combinações genéticas interessantes do ponto de vista comercial. Os ensaios interespecíficos entre *P. peruviana* e *P. philadelphica* não revelaram incompatibilidade, quando usado o pistilo de *P. peruviana*, sendo que no ensaio inverso, o pólen de *P. peruviana* não se desenvolveu. A análise desta incompatibilidade unilateral poderá ser um passo fundamental para a obtenção de uma maior taxa de sucesso nestes ensaios entre as duas espécies. Novas metodologias de polinização e isolamento dos botões florais também deverão ser testadas, por forma a diminuir a deiscência floral. Futuramente, dever-se-ia proceder à replicação deste ensaio para se obter uma maior quantidade de sementes hibridas e, posteriormente avaliar as plantas resultantes, uma vez que estas poderão apresentar características económicas interessantes. A confirmação do tamanho genómico destas plantas também deverá ser analisada, uma vez que se podem tratar de plantas alotriplóides.

A obtenção de plantas octoplóides de *P. peruviana* a partir dos genótipos selecionados foi conseguida, se bem que com taxas de indução distintas. De acordo com os resultados foi possível avaliar que o factor tempo de exposição é preponderante na

indução de ploidia nesta espécie, sendo que, quando demasiado elevado a toxicidade da colquicina leva à mortalidade dos explantes. Na indução em sementes houve a ocorrência de um grande número de mixoplóides, concluindo-se que neste ensaio a concentração usada deverá ser aumentada. O uso de orizalina como agente c-mitótico e a realização de ensaios de indução em meio líquido deverão ser parâmetros a ter em linha de conta em futuros ensaios.

Apesar do sucesso na indução de poliploidia em explantes autotetraplóides é ainda prematuro tirar conclusões sobre as vantagens das plantas octoplóides de fisális, uma vez que a deteção de possíveis alterações que ocorram no desenvolvimento destas plantas é insuficiente apenas com as observações que foram efetuadas, sendo necessário avaliar o crescimento, produção e características do fruto.

5. Referências

Aanjum, P. S., Ali, K. & Rubina, A. (2007). Maintenance of pollen germination capacity of *Carica papaya* L., (Caricaceae). Pak. J. Bot., 39(5): 1403-1406.

Acquaah, G. (2009). Principles of plant genetics and breeding. John Wiley & Sons.

Adams, K. L., & Wendel, J. F. (2005). Polyploidy and genome evolution in plants. Current Opinion in Plant Biology, 8(2), 135-141.

Agronet Disponível em: http://www.agronet.gov.co.. Red de información y comunicación del sector agropecuario. Colombia, 2016. Acesso: Janeiro, 2016.

Allard, R. W. (1999). Principles of plant breeding. John Wiley & Sons.

Almanza, P., & Espinosa, C. (1995). Desarrollo morfológico y análisis físico químico de frutos de uchuva *Physalis peruviana* L. para identificar el momento óptimo de cosecha. Facultad de Ciencias Agropecuarias, vol. Especialista en frutales en clima frío (pp. 83). Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (Dissertação de doutoramento).

Almeida, C. F. G. D. (2014). O empreendedorismo e a criação de um negócio: *Physalis peruviana* (Tese de doutoramento).

Altamirano Caicedo, M. A. (2010). Estudio de la cadena productiva de uvilla (*Physalis peruviana L.*) en la Sierra norte del Ecuador (Dissertação de Mestrado).

Beyl, C. A. (2016). 4 PGRs and Their Use in Micropropagation. Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology, 33.

Bhat, Z. A., Dhillon, W. S., Shafi, R. H. S., Rather, J. A., Mir, A. H., Shafi, & Wani, T. A. (2012). Influence of storage temperature on viability and in vitro germination capacity of pear (*Pyrus* spp.) pollen. Journal of Agricultural Science, 4(11), 128.

Bonilla, M., Espinosa, K., Muñoz, J. E., Vásquez, H., & POSSO, A. (2003). Colección, caracterización fenotípica y molecular de poblaciones de uchuva (*Physalis peruviana L.*). Universidad Nacional de Colombia, Palmira (Dissertação de Mestrado).

Borlaug, N. E., & Dowswell, C. R. (2003, May). Feeding a world of ten billion people: a 21st century challenge. In Proceedings of the international congress in the

wake of the double helix: From the green revolution to the gene revolution (pp. 27-31).

Brown, D. C. W., & Thorpe, T. A. (1995). Crop improvement through tissue culture. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 11(4), 409-415.

Cagliari, P. D., & Forster, B. P. (2012). Plant breeding and crop improvement. eLS 1(11)

Cedeño, M. M., & Montenegro, D. M. (2004). Plan exportador, logistico y de comercilizacion de uchuva al mercado de estados unidos. Universidad Javeriana, Bogotá (Dissertação de doutoramento).

Cely, J. A. B., Rodriguez, F. E., Almario, C. G., & Meneses, L. S. B. (2015). Genetic variability of parentals and inter and interspecific f1 populations of *Physalis peruviana* L. and *P. floridana* Rydb. Revista Brasileira de Fruticultura, 37(1), 179-192.

Chautá-Mellizo, A., Campbell, S. A., Bonilla, M. A., Thaler, J. S., & Poveda, K. (2012). Effects of natural and artificial pollination on fruit and offspring quality. Basic and Applied Ecology, 13(6), 524-532.

Chaves, A., Schuch, M. W., & Erig, A. C. (2005). Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana* L. Ciênc. agrotec., 29(6), 1281-1287.

Chawla, H. S. (2010) Introduction to Plant Biotechnology (3ª Ed). Science Publishers, Inc Enfield, NH, USA.

Cola, G. P. A., Marques, A. M., Damasceno, S., Carvalho, C. R., & Clarindo, W. R. (2014). In Vitro Polyploidization in *Solanum lycopersicum* Mill. Cytologia, 79(3), 351-358.

D´Arcy, W.G. (1991). The Solanaceae since 1976, with a review of its biogeography. In: Hawkes, J.G., R.N. Lester, M. Nee, N. N. Estrada. (Eds) *Solanaceae III:* Taxonomy, Chemistry, Evolution. Royal Botanic Gardens, Kew. Richmond, London. 75-138.

De Souza, C. L., Souza, M. O. D., Oliveira, R. S., & Pelacani, C. R. (2016). *Physalis peruviana* seed storage. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, 20(3), 263-268.

Dhooghe, E., Grunewald, W., Leus, L., & Van Labeke, M. C. (2009). In vitro polyploidisation of *Helleborus* species. Euphytica, 165(1), 89-95.

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(3), 359-373.

Doležel, J., Greilhuber, J., & Suda, J. (2007). Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. Nature protocols, 2(9), 2233-2244.

Eich, E. (2008). *Solanaceae* and *Convolvulaceae*: Secondary metabolites: Biosynthesis, chemotaxonomy, biological and economic significance. Springer Science & Business Media, Germany

Erik, J. S. & Dina, A. St. C. (1996). Cryogenic storage of tomato pollen: effect on fecundity. Hortsciece 31(3):447-448.

Escobar-Guzmán, R. E., Hernández-Godínez, F., de la Vega, O. M., & Ochoa-Alejo, N. (2009). In vitro embryo formation and plant regeneration from anther culture of different cultivars of Mexican husk tomato (*Physalis ixocarpa* Brot.).Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 96(2), 181-189.

Fischer, G. (2000) Crecimiento y desarrollo. In: Producción, poscosecha y exportación de la uchuva (*Physalis peruviana* L.). Universidad Nacional de Colombia (Dissertação de Mestrado)

Fries, A. M., & Tapia, M. E. (2007). Guía de campo de los cultivos andinos. FAO, ANPE-Perú.

García-Osuna, H. T., Bocardo, L. E., Robledo-Torres, V., Mendoza, A. B., & Godina, F. R. (2015). Germinación y micropropagación de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*) tetraploide. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 12(1), 2301-2311.

Gomes, F., & Canhoto, J. M. (2009). Micropropagation of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) from adult plants. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 45(1), 72-82.

Grattapaglia, D. & Machado, M. A. (1998). Micropropagação. In: Torres, A. C.; Caldas, L. S. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília, DF: ABCTP/EMBRAPA/CNPH, p. 183-260.

Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies, F. T., & Geneve, R. L. (1997). Plant propagation: principles and practices (No. Ed. 6). Prentice-Hall Inc..

Hernández J. & S. Yáñez. 2009. Aprovechamiento tradicional de las especies de *Physalis* en México. *R Geog Agr.* 43, 81-86.

Hu, C. Y., & Wang, P. J. (1983). Meristem, shoot tip and bud cultures. Handbook of plant cell culture (USA). p. 117-227.

Jahier, J. (1992). Techniques de cytogénétique végétale. INRA editors, Paris.

Jordan, M., Botti, C., Hammerschlag, F. A., & Litz, R. E. (1992). Tropical and subtropical small fruits. Biotechnology of perennial fruit crops., 513-531.

Kazi, N. A. (2015). Polyploidy in solanaceous crops. Asian Journal of Multidisciplinary Studies, 3(4), 69-73.

Kew, Royal Botanic Garden. http://data.kew.org/cvalues. Acedido: Julho, 2016.

Khan, W., & Bakht, J. (2015). Development of efficient and optimized protocol for rapid micropropagation of *Physalis ixocarpa*, a medicinal herb. Pakistan Journal of Weed Science Research, 21(3), 381-391.

Khush, G. S. (2003). Green revolution: challenges ahead. In International Congress 'In the wake of the double helix: From the Green Revolution to the Gene Revolution. Bologna, Italy.

Kumar, O. A., Ramesh, S., & TATA, S. S. (2015). Establishment of a Rapid Plant Regeneration System in *Physalis* angulate L. through axilarry meristems. Notulae Scientia Biologicae, 7(4), 471-474.

Ladygin, V. G. (2004). Photosystem damage and spatial architecture of thylakoids in chloroplasts of pea chlorophyll mutants. Biology Bulletin of the Russian Academy of Sciences, 31(3), 268-276.

Lagos, T. C., Caetano, C. M., Vallejo, F. A., Criollo, H., & Olaya, C. (2005*). Physalis peruviana* L. and *Physalis philadelphica* Lam. palynological characterization and pollen viability. Agronomía Colombiana, 23(1), 55-61.

Lagos, T. C., Vallejo, F. A., Criollo, H., & Muñoz, J. E. (2008). Biología reproductiva de la uchuva. Acta Agronómica, 57(2), 81-87.

Leitch, A. R., & Leitch, I. J. (2008). Genomic plasticity and the diversity of polyploid plants. Science. 320(5875), 481-483.

Leite, D. S., & Munhoz, L. L. (2013). Biotechnology and Improvement of Plant Varieties: Cultivars and Transgenic. Veredas do Direito: Direito Ambiental e Desenvolvimento Sustentável, 10(19), 23.

Leshem, B., Werker, E., & Shalev, D. P. (1988). The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. Annals of Botany, 62(3), 271-276.

Liberato, S. A., Sánchez-Betancourt, E., Argüelles, J. H., González, C., Núñez, V. M., & Barrero, L. S. (2014). Citogenética de genotipos de uchuva, *Physalis peruviana* L., y *Physalis floridana* Rydb., con respuesta diferencial a Fusarium oxysporum. Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria, 1(15), 51-61.

Licodiedoff, S., Koslowski, L. A. D., & Ribani, R. H. (2013). Flavonol rates of gosseberry fruits *Physalis peruviana* determined by HPLC through the optimization and validation of the analytic method. International Journal of Food Science and Nutrition Engineering, 3(1), 1-6.

Loureiro J. (2007). Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal. Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Aveiro, 248 pp (Dissertação de doutoramento).

Loyola-Vargas, V. M., & Vázquez-Flota, F. (2006). An introduction to plant cell culture. Plant cell culture protocols, 318, 3-8.

Manso, Luís (2013) Manual Técnico: Produção comercial de *Physalis* em Portugal. Leiria

Martínez, M. (1999). Infrageneric Taxonomy of Physalis. In: *Solanaceae* IV: Advances in biology and utilization. Nee, M., D. E. Symon, R. N. Lester & J. P. Jessop. The Royal Botanical Gardens, Kew. Richmond, London. 275-284.

McCarthy, E. W., Arnold, S. E., Chittka, L., Le Comber, S. C., Verity, R., Dodsworth, S. & Kovařík, A. (2015). The effect of polyploidy and hybridization on the evolution of floral colour in *Nicotiana* (Solanaceae). Annals of botany, 115(7), 1117-1131.

McClintock, B. (1993). The significance of responses of the genome to challenge (pp. 180-199). Singapore: World Scientific Pub. Co.

Medina-Medrano, J., Aviña-Martínez,G. & Garcia-Pereyra,J. (2015). Flavonoids identified from *Physalis* gender (Solanaceae), its antioxidant capacity and importance as chemical markers: A review. Naturaleza y desarrollo, 12(1), 16-27.

Menzel, Y. M. (1951). The Cytotaxonomy and genetics of *Physalis*. Proceedings of the American Philosophical Society, 95(2), 123-183.

Mergen, F., & Lester, D. T. (1961). Colchicine-induced polyploidy in Abies. Forest Science, 7(4), 314-319.

Miranda, D., Piedrahita, W., & Romero, J. (2005). Avances en cultivo, poscosecha y exportaciņ de la uchuva (*Physalis peruviana* L.) en Colombia. (Ed.). Universidad Nacional de Colômbia, 222 p., Dissertação de doutoramento.

Moreira, R., Maidana, F., Liana V., Santos, A. & Martins, M. (2010) Avaliação de germinação e contaminação de *Physalis* sp. em diferentes concentrações de meio MS *in vitro* - INTEC/URCAMP (Dissertação de doutoramento).

Muniz, J., Kretzschmar, A. A., Rufato, L., Pelizza, T. R., Rufato, A. D. R., & Macedo, T. A. D. (2014). General aspects of physalis cultivation. Ciência Rural, 44(6), 964-970.

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15(3), 473-497.

National Research Council (NRC) (1989). Goldenberry (Cape Gooseberry). Lost crops of the incas: Little-known plants of the andes with promise for worldwide cultivation (pp. 240−251). Washington D.C.: National Academy Press.

Neumann, P., Lysák, M., Doležel, J., & Macas, J. (1998). Isolation of chromosomes from *Pisum sativum* L. hairy root cultures and their analysis by flow cytometry. Plant Science, 137(2), 205-215.

Nohra, C., & Rodriguez, C. (2006). Study of the cytogenetic diversity of *Physalis peruviana* L.(Solanaceae). Acta Biológica Colombiana, 11(2), 75-85.

Osorio Diaz, D. L., & Roldan, J. C. (2003). Volvamos al campo: manual de la uchuva (No. C047. 085). Grupo Latino LTDA.

Pais M. S. S. (2003) Biotecnologia Vegetal. In: Lima N, Mota M (Eds.) Biotecnologia – Fundamentos e Aplicações. Lidel. Lisboa. pp. 401-427.

Pandey, K. K. (1957). Genetics of Self-Incompatibility in *Physalis ixocarpa* Brot. A New System. American Journal of Botany, 44(10), 879-887.

Pérez-Castorena, A. L., Hernández, I. Z., Martínez, M., & Maldonado, E. (2013). Chemical study of calyxes and roots of *Physalis solanaceous*. Rec Nat Prod, (7)230-233.

Petersen, K. K., Hagberg, P., & Kristiansen, K. (2003). Colchicine and oryzalin mediated chromosome doubling in different genotypes of *Miscanthus sinensis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 73(2), 137-146.

Pichardo-González, J. M., Ayala-Garay, Ó. J., González-Hernández, V. A., & Flores-Ortiz, C. M. (2014). Fatty acids and physiological quality of tomatillo (*Physalis philadelphica* Lam.) seed during natural ageing. Chilean journal of agricultural research, 74(4), 391-396.

Pintos, B., Manzanera, J. A., & Bueno, M. A. (2007). Antimitotic agents increase the production of doubled-haploid embryos from cork oak anther culture. Journal of plant physiology, 164(12), 1595-1604.

Popova, A., Panayotov, N., & Kouzmova, K. (2010). Evaluation of the development of Cape Gooseberry (*Physalis peruviana* L.) plant under the environmental conditions of South Bulgaria. In Proceeding of the Fourth International Conference on Water Observation and Information System for Decision Support, Balwois (pp. 1-10).

Praça, M. M., Carvalho, C. R., & Clarindo, W. R. (2009). A practical and reliable procedure for in vitro induction of tetraploid tomato. Scientia horticulturae, 122(3), 501-505.

Predieri, S. (2001). Mutation induction and tissue culture in improving fruits. Plant cell, tissue and organ culture, 64(2), 185-210.

Puente, L. A., Pinto-Muñoz, C. A., Castro, E. S., & Cortés, M. (2011). *Physalis peruviana* Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: A review.Food Research International, 44(7), 1733-1740.

Rajasekharan, P. E., Ravish, B. S., Kumar, T. V., & Ganeshan, S. (2013). Pollen cryobanking for tropical plant species. In Conservation of Tropical Plant Species (pp. 65-75). Springer New York.

Ramar, K., Ayyadurai, V., & Arulprakash, T. (2014). In vitro shoot multiplication and plant regeneration of *Physalis peruviana* L. An important medicinal plant.International. Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 3(3), 456-464.

Ramírez-Godina, F., Robledo-Torres, V., Pournabav, R. F., Benavides-Mendoza, A., Hernández-Piñero, J. L., Reyes-Valdes, M. H., & Alvarado-Vázquez, M. A. (2013). Yield and fruit quality evaluation in husk tomato autotetraploids (*Physalis ixocarpa*) and diploids. Australian Journal of Crop Science, 7(7), 933-940.

Ranney, T. G. (2006). Polyploidy: From evolution to new plant development. InCombined Proceedings International Plant Propagators' Society (56), 137-142.

Reis, D. T. N. (2013). Ensaios de poliploidização in vitro em vários explantes de tamarilho (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt). Faculdade de ciências e tecnologia Universidade de coimbra (Dissertação de Mestrado).

Repo de Carrasco, R., & Encina Zelada, C. R. (2008). Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos bioactivos de frutas nativas peruanas. Revista de la Sociedad Química del Perú, 74 (2), 108-124.

Robledo-Torres, V., Ramírez-Godina, F., Foroughbakhch-Pournavab, R., Benavides-Mendoza, A., Hernández-Guzmán, G., & Reyes-Valdés, M. H. (2011).

Development of tomatillo (*Physalis ixocarpa* Brot.) autotetraploids and their chromosome and phenotypic characterization. Breeding Science, 61(3), 288-293.

Rodrigues, F. A., dos Santos Penoni, E., Soares, J. D. R., & Pasqual, M. (2013). Different concentrations of the ms medium and bap on multiplication in... Bioscience Journal, 29(1), 77-82.

Rodríguez Ulloa, S. L., & Rodríguez Ulloa, E. M. (2007). Efecto de la ingesta de *Physalis peruviana* (aguaymanto) sobre la glicemia postprandial en adultos jóvenes. Revista Médica Vallejania, 4 (1), 43-53.

Rubuluza, T., Nikolova, R. V., Smith, M. T., & Hannweg, K. (2007). In vitro induction of tetraploids in *Colophospermum mopane* by colchicine. South African Journal of Botany, 73(2), 259-261.

Salles L.A., Ramos J.D., Pasqual M., Junqueira K.P. y Bortolotti da Silva A. (2006). Sacarose e pH na germinação in vitro de grãos de pólen de citros. Ciência e Agrotecnológia 30:170-174.

Schifino-Sittmann, M. T. (2012). Poliploidia e seu impacto na origem e evolução das plantas silvestres e cultivadas. Current Agricultural Science and Technology, 10(2) 23-29.

Shao, J., Chen, C., & Deng, X. (2003). In vitro induction of tetraploid in pomegranate (*Punica granatum*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 75(3), 241-246.

Shivanna, K. R. (2003). Pollen biology and biotechnology. Science Publishers, Inc.

Sims, D. A., & Gamon, J. A. (2002). Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. Remote sensing of environment, 81(2), 337-354.

Singh, K. and J.S. Arora. 1995. In vitro multiplication of *Chrysanthemum morifolium* Ramat cv. Riot. J. Ornam. Hort. 2: 63-68.

Soares, M. B. P., Brustolim, D., Santos, L. A., Bellintani, M. C., Paiva, F. P., Ribeiro, Y. M. & Dos Santos, R. R. (2006). Physalins B, F and G, seco-steroids purified from *Physalis angulata* L., inhibit lymphocyte function and allogeneic transplant rejection. International Immunopharmacology, 6(3), 408-414.

Stanys, V., Weckman, A., Staniene, G., & Duchovskis, P. (2006). In vitro induction of polyploidy in Japanese quince (*Chaenomeles japonica*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 84(3), 263-268.

Velasquez, C., José, H., Buitrago Giraldo, O. H., & Pérez Arango, S. A. (2007). Estudio preliminar de la resistencia mecánica a la fractura y fuerza de firmeza para fruta de uchuva (*Physalis peruviana* L.). Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín, 60 (1), 3785-3796.

Villarreal, J. Á. (1998). Reseña de Manual de malezas del Valle de México de Espinosa-García, FJ y J. Sarukhán. Acta Botánica Mexicana, (43), 67-68.

Whitson, M. & P.S. Manos. (2005). Untangling *Physalis* (*Solanaceae*) from the physaloids: A two-gene phylogeny of the Physalinae. Syst Bot. 30, 216-230.

Wu, S. J., Chang, S. P., Lin, D. L., Wang, S. S., Hou, F. F., & Ng, L. T. (2009). Supercritical carbon dioxide extract of *Physalis peruviana* induced cell cycle arrest and apoptosis in human lung cancer H661 cells. Food and Chemical Toxicology, 47(6), 1132-1138.

Yang, X. M., Cao, Z. Y., An, L. Z., Wang, Y. M., & Fang, X. W. (2006). In vitro tetraploid induction via colchicine treatment from diploid somatic embryos in grapevine (*Vitis vinifera* L.). Euphytica, 152(2), 217-224.

YÜCESAN, B. B., Mohammed, A., Arslan, M., & GÜREL, E. (2015). Clonal propagation and synthetic seed production from nodal segments of Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.), a tropical fruit plant. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 39(5), 797-806.

Zavala, D., Mauricio, Q., Pelayo, A., Posso, M., Rojas, J., & Wolach, V. (2006). Citotoxic effect of *Physalis peruviana* (capuli) in colon cancer and chronic myeloid leukemia. In Anales de la Facultad de Medicina, 67(4), 283-289).

Zeiger, E., Talbott, L. D., Frechilla, S., Srivastava, A., & Zhu, J. (2002). The guard cell chloroplast: a perspective for the twenty‐first century. New Phytologist, 153(3), 415-424.

Zhang, J., Zhang, M., & Deng, X. (2007). Obtaining autotetraploids *in vitro* at a high frequency in *Citrus sinensis*. Plant cell, tissue and organ culture, 89(2-3), 211-216.

Zhang, Z., Dai, H., Xiao, M., & Liu, X. (2008). In vitro induction of tetraploids in *Phlox subulata* L. Euphytica, 159(1-2), 59-65.