

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

Christiane do Valle Ribeiro

**INDUÇÃO DE POLIPLOIDIA EM *Lippia alba* (MILL.) N. E. Br.
(VERBENACEAE)**

JUIZ DE FORA
2015

2015

PGCBIO

Christiane do Valle Ribeiro

ICB/UFJF

CHRISTIANE DO VALLE RIBEIRO

**INDUÇÃO DE POLIPLOIDIA EM *Lippia alba* (MILL.) N. E. Br.
(VERBENACEAE)**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Genética e Biotecnologia.

Professor Doutor José Marcello Salabert de Campos

Juiz de Fora
2015

A Deus
Aos meus pais, Eliana e José Geraldo

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão de bolsa de apoio financeiro, à Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio ao laboratório de genética.

À Embrapa Cenargen, por ter cedido acessos de plantas da espécie *Lippia alba*, sem os quais este trabalho não seria possível.

À Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), pelas oportunidades e pela formação desde o ensino médio até a pós-graduação.

Ao laboratório de genética e biotecnologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, a todos os professores e alunos, por cada dia de convivência, pelo aprendizado e pelos momentos de descontração.

Ao Laboratório de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Juiz de Fora, na pessoa do Prof. Dr. Paulo Pereira Peixoto, por disponibilizar sem restrições o uso do espaço e dos recursos de trabalho necessários para essa pesquisa e por ser atencioso nos momentos de dúvidas e dificuldades. Também aos alunos do laboratório, que sempre se mostraram solícitos e prestaram auxílio quando necessário.

Aos professores da pós-graduação em Ciências Biológicas, pelos valiosos conhecimentos transmitidos, em especial ao meu orientador, Prof. Dr. José Marcello Salabert de Campos por ter me concedido a oportunidade de ingressar no meio acadêmico e por todo conhecimento científico a mim transmitido.

Aos cientistas que estiveram mais próximos a mim nesse percurso, Sirlei, Cristiano e Aline, me auxiliando mais diretamente em todo o meu trabalho. Agradeço por todas as dicas, conselhos, pela atenção e também pelos trabalhos braçais, repicando plantas, lavando tubos (e muitos eram os tubos), preparando meio de cultura, etc. Obrigada pela convivência, que não poderia ter sido melhor. Posso dizer que não encontrei somente bons parceiros para trabalhos futuros, mas o que é ainda mais valioso, bons amigos.

Às duas amigas queridas. À Ana Paula, por ser exemplo de vida e de pessoa humana, por seus valiosos conselhos, suas risadas, pelos almoços na sua casa, pelas longas conversas ao telefone e pelas rosas vermelhas no meu jardim. À

Cynthia, por compartilharmos tantos anos de convívio tão intenso e tão saudável, por entender minhas maluquices e minhas frases sem contexto, pelas marmitas compartilhadas, bananas e biscoitos e pelos diálogos em inglês fluente. Agradeço às duas pela amizade de valor inestimável. Com vocês, a caminhada foi branda e prazerosa.

Por último, mas de maneira primordial, agradeço à minha família, sem a qual não seria possível realizar esse sonho.

À minha mãe, Eliana, por todo carinho, atenção, preocupação; por cada detalhe e cada mimo que somente dela podem advir. Pelas surpresas nas marmitas, pelos conselhos, pelas longas conversas na cozinha, por me ouvir todas as vezes e por ser minha maior professora.

Ao meu pai, José Geraldo, pelo apoio, incentivo, carinho e por me proporcionar tudo o que sempre precisei para alcançar meus sonhos. Agradeço pelas caronas, pela preocupação, pelo zelo e pelo exemplo de determinação que é para mim.

À minha irmã, Natália, pelo exemplo e inspiração; pelas conversas, conselhos, dicas e desabafos sobre a vida acadêmica. Ao meu irmão, Gustavo, pelo carinho, doçura e pelo orgulho que nos proporciona. Aos dois, pelo amor único.

A Deus.

RESUMO

Lippia alba é uma planta medicinal que pertence à família Verbenaceae e é conhecida popularmente como erva cidreira. A espécie possui duas características que merecem destaque, é rica em óleos essenciais de interesse econômico e apresenta-se como um complexo poliploide, com números cromossômicos de $2n=30, 38, 45, 60$ e 90 . Dessa maneira, *L. alba* é uma espécie interessante, tanto para a ciência aplicada, quanto para a ciência básica. Este trabalho teve como objetivo produzir plantas poliploides artificiais de *L. alba* para serem utilizadas em futuros estudos de melhoramento e evolução. Foi utilizado o acesso BGEN02 ($2n=2x=30$) para a produção de plantas autotetraploides ($2n=4x=60$). As plantas foram propagadas em meio de cultura MS livre de hormônios e a exposição à colchicina foi realizada misturando-a ao meio MS e inoculando os segmentos nodais. As plantas foram lavadas 3 vezes em água destilada e reinoculadas em meio MS livre de colchicina para posterior análise de nível de ploidia por citometria de fluxo. Foram realizados três experimentos de indução de poliploidia: experimento 1, experimento 2 e experimento 3. Nos dois primeiros, a análise de ploidia foi feita após a organogênese do explante (40 DAI) e no terceiro, a citometria de fluxo foi feita imediatamente após a exposição à colchicina, em curtos intervalos de tempo, para monitorar as alterações de ploidia nesse período. No experimento 1, foram utilizadas diversas concentrações de colchicina, para obter informações sobre as melhores concentrações para realizar os experimentos seguintes. A concentração de melhor resultado (0,2%) juntamente com uma concentração 10 vezes menor (0,02%) foram utilizadas no experimento 2 de indução de poliploidia, para comparar efeitos de baixa e alta concentração. Essas duas concentrações foram utilizadas também no experimento 3, no qual se utilizou dos percentuais de células em 4C e 8C para inferir a ploidia. Poliploides com aproximadamente 6 cm de comprimento foram aclimatizados utilizando substrato para plantio BioPlant®. No experimento 1, as análises por citometria de fluxo revelaram poliploides nas concentrações de 0,2% e 0,5%, sendo que a primeira produziu maior número de plantas com ploidia alterada. Embora os tratamentos mais fortes tenham causado maior alteração de ploidia, os mesmos causaram maior mortalidade. Com os resultados do experimento 3, foi possível concluir que a concentração 0,2% aumentou os percentuais de células em 4C e 8C, ou seja, produziu células poliploides. Esse resultado corrobora os achados nos experimentos 1 e 2, em que o tratamento de 0,2% foi o que mais produziu plantas poliploides e mixoploides. Portanto, conclui-se que (1) o presente estudo obteve êxito em induzir autotetraploides artificiais de *L. alba* utilizando a colchicina e as técnicas de cultura de tecidos vegetais *in vitro*; (2) que as concentrações de 0,2% e 0,5% de colchicina foram capazes de produzir plantas autotetraploides nessa espécie e (3) que as concentrações altas apresentaram maior efeito de alteração de ploidia nos explantes de *L. alba*.

Palavras-chave: poliploides artificiais, citometria de fluxo, colchicina, cultura de tecidos vegetais.

ABSTRACT

L. alba is an important medicinal plant that belongs to the family Verbenaceae and is popularly known as falsa melissa or erva cidreira. This species has two features that are very important, it is rich in essential oils of economic interest and is a polyploid complex, with chromosome numbers $2n = 30, 38, 45, 60$ and 90 . Thus, *L. alba* is an interesting species, for both the applied and basics research, for plant breeding (improving essential oils) and for evolutionary studies. The aim of this work was to induce artificial polyploid *L. alba* plants for improvement and evolutionary studies. Biological material was constituted by an accession of *L. alba* (BGEN02 $2n=2x=30$). This accession was employed to produce autotetraploid plants ($2n=4x=60$). Plants were propagated by *in vitro* tissue culture in MS hormone free culture medium. For the colchicine treatment, colchicine solution was mixed with MS medium and the nodal segments were inoculated. The explants were washed three times in distilled water and inoculated in MS medium colchicine free to after ploidy analysis by flow cytometry. Three polyploidy induction experiments were made: experiment 1, experiment 2 and experiment 3. In 1 and 2 experiments the ploidy analysis were made after explant organogenesis (40 DAI) and in experiment 3, flow cytometry was made immediately after colchicine exposure at short time intervals to monitoring the ploidy changes in this initial period. In experiment 1, several colchicine concentrations were used to obtaining information about the best concentrations to perform following experiments. The best result was obtained by 0,2%. This concentration and a ten times low concentration (0,02%) were used in experiment 2, to compare the effects of high and low concentrations. These two colchicine concentrations were used also in experiment 3 in which 4C and 8C percentiles were used to inferring the ploidy level. Polyploids with a length of approximately 6 cm were acclimatized in substrate for planting BioPlant®. In experiment 1, the ploidy analysis by flow cytometry of polyploidy induction experiments revealed polyploids in treatments with colchicine at concentrations of 0.2% and 0.5%, and the concentration that produced a greater number of plants with altered ploidy was 0.2%. Although the strongest treatments caused more ploidy changes, they caused higher mortality too. From the results of experiment 3, we concluded that 0.2% concentration caused increasing in the percentage of cells in 4C and 8C, which means polyploidy. This result corroborates the findings in experiment 1 and 2, in which the treatment of 0.2% produced more polyploids and mixoploids plants. Therefore, it is concluded that (1) this study was successful in inducing *L. alba* artificial autotetraploids using colchicine and the plant tissue culture techniques; (2) the concentrations of 0.2% and 0.5% colchicine were able to produce autotetraploids plants of this species, and (3) the high concentrations exhibited higher ploidy change effect on the explants *L. alba* than the low concentrations.

Keywords: artificial polyploids, flow cytometry, colchicine, plant tissue culture.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplar de <i>L. alba</i> em floração.....	17
Figura 2. Esquema das alterações genômicas que podem ocorrer em organismos poliploides. Adaptação do trabalho de Yang et al. (2011)	29
Figura 3. Exemplos de <i>L. alba</i> (acesso BGEN02) estabelecidos in vitro.....	31
Figura 4. Esquema ilustrativo da metodologia de exposição à colchicina e análise de ploidia após organogênese.....	33
Figura 5. Aclimatização de plantas poliploides e mixoploides de <i>L. alba</i> induzidas artificialmente. (A) Plantas poliploides e mixoploides 4 dias após o plantio em estufa de aclimatização. (B) Plantas poliploides e mixoploides após retirada da estufa (7 dias após o plantio).....	35
Figura 6. Planta autotetraploide ($2n=4x=60$) obtida a partir do acesso BGEN02 de <i>L. alba</i> , através de experimento de indução de poliploidia utilizando colchicina.....	38
Figura 7. Regressão Linear entre concentração de colchicina e sobrevivência. C = controle; T1 até T6 = Tratamentos com colchicina nas concentrações de 0,001563% (T1); 0,003125% (T2); 0,05% (T3); 0,1% (T4); 0,2% (T5) e 0,5% (T6).	38
Figura 8. Histogramas obtidos em análise por citometria de fluxo das plantas sobreviventes nos experimentos de indução de poliploidia. (a) planta diploide; (b) planta poliploide.	40

Figura 9. Variação temporal nos níveis de ploidia celulares após exposição dos explantes à colchicina. (a) Tratamento controle. Percentual de células 4C = 7,53%; (b) Tratamento com 0,2% de colchicina por 4h. Percentual de células 4C = 20,32% sem detecção de células 8C; (c) Tratamento com 0,2% de colchicina por 4h. Percentual de células 4C=18,76% com detecção de células 8C (2,21%); (d) Tratamento com 0,2% de colchicina por 72h. Percentual de células 4C = 2,34%.....

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tratamentos realizados no experimento 1 de indução de poliploidia no acesso BGEN02 de <i>L. alba</i>	33
Tabela 2. Tratamentos realizados no experimento 2 de indução de poliploidia no acesso BGEN02 de <i>L. alba</i>	34
Tabela 3. Tratamentos de colchicina aplicados a segmentos nodais de <i>L. alba</i> e tempos de recuperação em que foram feitas as análises por citometria de fluxo.....	36
Tabela 4. Sobrevivência e nível de ploidia de plantas do acesso BGEN02 de <i>L. alba</i> tratadas com colchicina em diferentes concentrações e tempos de exposição no experimento 1.....	37
Tabela 5. Sobrevivência e nível de ploidia de plantas do acesso BGEN02 de <i>L. alba</i> tratadas com colchicina em diferentes concentrações e tempos de exposição no experimento 2.	39
Tabela 6. Variação temporal nos níveis de ploidia celulares após exposição dos explantes à colchicina.	42

LISTA DE ABREVIATURAS

DAI – Dias após a inoculação.

DNA – “Deoxyribonucleic Acid”

Ácido Desoxirribonucleico.

IRGA – “Infrared gas analyzer”

Analisador de gases no infravermelho.

ISSR – “Inter Simple Sequence Repeats”

Inter Sequências Simples Repetidas.

MS – meio de cultura Murashige e Skoog.

RAPD – “Random Amplified Polymorphic DNA”

Polimorfismo do DNA Amplificado ao Acaso.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 <i>Lippia alba</i>	15
1.2 Poliploidia.....	18
1.3 Indução de poliploidia.....	20
1.4 Metodologias utilizadas para a indução e detecção de poliploidia.....	22
1.4.1 Cultura de tecidos vegetais <i>in vitro</i>	25
1.4.2 Citometria de fluxo.....	26
1.5 Poliploides artificiais - potencial de estudo e aplicações.....	27
2 OBJETIVOS.....	30
2.1 Objetivo geral.....	30
2.2 Objetivos específicos.....	30
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 Material vegetal.....	31
3.2 Manutenção e multiplicação do acesso <i>in vitro</i>	31
3.3 Indução de poliploidia.....	32
3.3.1 Experimento 1.....	32
3.3.2 Experimento 2.....	34
3.4 Análise do nível de ploidia.....	34
3.5 Aclimatização.....	35
3.6 Monitoramento do nível de ploidia após exposição à colchicina.....	35
4 RESULTADOS.....	37
4.1 Indução de poliploidia – experimento 1.....	37
4.2 Indução de poliploidia – experimento 2.....	39
4.3 Monitoramento do nível de ploidia após exposição à colchicina.....	40
5 DISCUSSÃO.....	44
6 CONCLUSÃO.....	49
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
8 ANEXO.....	62

1 INTRODUÇÃO

Lippia alba é uma planta medicinal que pertence à família Verbenaceae e é conhecida popularmente como falsa melissa ou erva cidreira. Habitando praticamente todas as regiões do Brasil, é muito empregada como planta medicinal pelas suas inúmeras propriedades terapêuticas (MAMUN-OR-RASHID et al., 2013).

Uma das características mais relevantes de *L. alba* é que a espécie é rica em óleos essenciais, que constituem um dos mais importantes grupos de matéria prima para a indústria alimentícia, farmacêutica, perfumaria e afins. O Brasil exporta óleos essenciais de diversos tipos e para diferentes países e possui potencial para aumentar a produção de tais matérias primas (BIZZO, HOVELL e REZENDE, 2009). *L. alba* possui diversos componentes em seu óleo essencial, tendo potencial para essa indústria e podendo ser uma alternativa para a produção de linalol (SOARES e TAVARES-DIAS, 2013).

Além das características econômicas, *L. alba* também possui aspectos genéticos interessantes. Essa espécie apresenta-se como um complexo poliploide, com números cromossômicos de $2n=30, 38, 45, 60$ e 90 (REIS et al., 2014). Além disso, apresenta variações na composição dos óleos essenciais em função do nível de ploidia (VICCINI et al., 2014).

Essas características fazem de *L. alba* uma espécie interessante tanto para a ciência básica quanto para a aplicada. Mas estudos feitos com poliploides naturais, ainda que recentemente formados, têm resultados frequentemente obscurecidos por processos de seleção e recombinação que ocorreram no decorrer das gerações, desde a duplicação do genoma, dificultando a separação entre as contribuições provenientes da poliploidia daquelas advindas de outros fatores (HEGARTY et al., 2013). Nesse sentido, tem surgido uma nova tendência por parte dos pesquisadores: a produção de poliploides sintéticos. Com isso, é possível fornecer material para se estudar as respostas e mudanças que se dão imediatamente após a poliploidização (YANG et al., 2011).

Poliploides sintéticos têm origens conhecidas, ou seja, é possível saber de que genótipo ele se originou e quando isso ocorreu, diferente do que ocorre com poliploides naturais, dos quais não é simples descobrir origem e idade. Além

disso, com aqueles é possível acompanhar a sucessão de eventos que ocorrem num organismo poliploide desde sua gênese.

No caso de *L. alba*, a indução de poliploides artificiais possui duas aplicações paralelas. A primeira delas é obter plantas com potencial para produzir maior quantidade de óleos essenciais. A segunda é gerar material biológico para os estudos evolutivos da espécie. Tais estudos podem ajudar a elucidar alterações genéticas e epigenéticas, mudanças morfológicas, metabólicas e fisiológicas, dentre outros fenômenos que podem ocorrer no processo evolutivo dos poliploides.

Embora seja de grande utilidade para a ciência e venha sendo estudada há décadas, a indução de poliploidia não é um processo simples. Dessa forma, a ciência ainda precisa unir informações a respeito de como se dá o processo de duplicação cromossômica *in vitro*.

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo produzir *in vitro* plantas tetraploides a partir de um acesso diploide de *L. alba* cultivado na Universidade Federal de Juiz de Fora, a fim de fornecer material biológico com potencial para o melhoramento e para posteriores estudos evolutivos da espécie. Além disso, este trabalho visa contribuir com informações sobre o processo de duplicação cromossômica em *L. alba*, apresentando dados sobre os tratamentos utilizados e sobre a dinâmica de poliploidização no decurso do ciclo celular utilizando citometria de fluxo.

1.1 *Lippia alba*

O gênero *Lippia* L. pertence à família Verbenaceae (BRANDÃO, 2003) e possui espécies distribuídas desde os Estados Unidos até o Uruguai (SALIMENA, 2000a). O Brasil é o país que abriga maior número de espécies (cerca de 150 até o ano de 2000), sendo que as maiores ocorrências são nos campos rupestres e cerrados (SALIMENA, 2000a). *Lippia* possui grande importância econômica, pois de suas espécies representantes podem ser extraídos óleos essenciais com diversas utilidades. Além disso, muitas delas são utilizadas como medicinais, devido às suas propriedades (SALIMENA, 2000b; PASCUAL et al., 2001).

As espécies medicinais do gênero são comumente usadas para combater resfriados, gripe, tosse e outros problemas respiratórios; para abrir o apetite; para aliviar problemas gastrointestinais, como dor de estômago, má digestão e excesso de gases; para tratar problemas hepáticos; externamente, para tratar doenças cutâneas, queimaduras, feridas e úlceras, dentre muitas outras propriedades popularmente conhecidas (PASCUAL, et al. 2001).

Pertencendo a esse gênero, *L. alba* é uma planta medicinal, conhecida popularmente como falsa melissa ou erva cidreira (figura 1). Trata-se de um subarbusto de morfologia variável, alcançando medidas de até dois metros de altura, com ramos finos de coloração esbranquiçada, exibindo folhas de largura variável, com bordos serrados e ápice agudo (MATOS, 2000). Está amplamente distribuída pelo Brasil, estando presente também na América Central, África, Índia e Austrália (SALIMENA, 2000a; SINGH et al., 2000; DAY e MC ANDREW, 2003). Possui propriedades sedativa, carminativa, analgésica, espasmolítica e emenagoga (VALE et al., 1999; ZÉTOLA et al., 2002). Também pode ser usada para combater dores de estômago, dores de cabeça – inclusive enxaqueca –, erupções cutâneas e até mesmo sarampo (PASCUAL, et al. 2001; NOGUEIRA et al., 2007). *L. alba* também possui atividades farmacológicas antibacterianas, antifúngicas, antivirais, antiprotozoários, neurosedativa, analgésica, anti-inflamatória, antioxidante, ansiolítica, dentre outras (HENNEBELLE et al., 2008; MAMUN-OR-RASHID et al., 2013). Tais propriedades farmacológicas de *L. alba* são oriundas dos seus constituintes ativos, presentes no óleo essencial (JULIÃO et al., 2003).

O óleo essencial de *L. alba* é bastante usado pelas indústrias farmacêuticas, possuindo atividade antimicrobiana e sendo promissor no desenvolvimento de novos fármacos (TEIXEIRA, 2009). A espécie apresenta uma grande variabilidade química, podendo ser dividida em diferentes quimiotipos. Segundo Mamun-Or-Rashid et al. (2013), pelo menos 12 quimiotipos tem sido descritos, de acordo com o componente químico majoritário: citral, linalol, carvona, limoneno, γ -terpineno, citral-mirceno, citral-limoneno, citral- β -cariofileno, citral-germacreno-D, carvona-limoneno, 1,8-cineol-canfora, 1,8-cineollimoneno e limoneno-piperitona, sendo que geralmente há predominância de compostos do tipo monoterpeno, como citral, β -mirceno e limoneno.



Figura 1. Exemplar de *L. alba* em floração.

Essa gama de quimiotipos existentes em *L. alba* ocorre graças à grande variabilidade genética presente na espécie (VICCINI et al., 2014). Manica-Cattani et al. (2009) revelaram grande diversidade genética entre acessos de *L. alba* através estudos com marcadores moleculares do tipo RAPD e ISSR. No entanto, a variabilidade genética de *L. alba* vai além. Dentro da espécie, existem grandes variações de ploidia que ocorrem em ambiente natural.

Inicialmente, acreditava-se que o número cromossômico da espécie era $2n=30$ (BOSE e CHOUDHURY, 1960; BRANDÃO et al., 2007). Todavia, em 2011, Pierre et al. publicaram um trabalho apresentando, pela primeira vez, números cromossômicos diferentes para *L. alba*. O trabalho revelava três diferentes citótipos para três diferentes quimiotipos da espécie. Para o quimiotipo citral, foi encontrado número cromossômico $2n=30$; para o quimiotipo carvona, $2n=60$ e, para o quimiotipo linalol, os números cromossômicos variaram de $2n=12$ a $2n=60$ em células pertencentes a um único indivíduo. Esses resultados sugeriam a ocorrência de poliploidia dentro da espécie. Alguns anos depois, Reis et al. (2014) investigaram 106 acessos de *L. alba* utilizando citometria de fluxo, análises citomoleculares. Foram encontrados 5 citótipos diferentes: $2n=30$, $2n=38$, $2n=45$, $2n=60$, $2n=90$. As análises revelaram que se trata de um complexo poliploide.

Em um trabalho recente publicado por Viccini et al. (2014), investigou-se a relação entre ploidia e composição dos óleos essenciais em *L. alba*. Foram estudados 37 acessos da espécie provenientes de diversas regiões do Brasil. As análises revelaram que os acessos diploides e tetraploides possuíam óleos essenciais ricos em neral e geranial, enquanto acessos triploides eram ricos em linalol, o que sugere que o nível de ploidia pode estar relacionado com a composição dos óleos essenciais.

Em síntese, a variação de ploidia natural em *L. alba* representa fonte de estudo de grande valor tanto para o campo evolutivo – uma vez que é um modelo natural de evolução por poliploidia – quanto para o melhoramento dessa espécie, tendo como foco os óleos essenciais, já que apresenta grande variação genética natural.

1.2 POLIPLOIDIA

A definição de poliploide hoje é bastante complexa, uma vez que, há alguns anos, as pesquisas têm mostrado que a maioria dos organismos apresentou poliploidia em algum momento de sua história evolutiva (SOLTIS, SOLTIS e TATE, 2003). Contudo, para o presente estudo, adotaremos a definição clássica, segundo a qual, poliploides são organismos ou células que possuem mais de dois conjuntos completos de cromossomos compondo seu genoma (MADLUNG, 2013).

A poliploidização pode ocorrer de duas maneiras na natureza, por poliploidização sexual ou poliploidização somática. A poliploidização sexual é resultado da junção de gametas não reduzidos, o que dá origem a um organismo com mais de dois conjuntos cromossômicos no mesmo núcleo. Já a poliploidização somática é a falha na divisão mitótica, quando a célula duplica seu material genético, mas não completa a mitose, voltando à intérfase com o material genético duplicado (SOLTIS, SOLTIS e TATE, 2003).

Estabelecendo uma classificação bastante simples, os organismos poliploides podem ser classificados, basicamente, em autopoliploides e aloploides. Os primeiros são constituídos por cromossomos de uma única espécie e espera-se alta frequência de multivalentes na meiose. Os aloploides são formados pela duplicação de genomas diferentes em híbridos,

o pareamento cromossômico ocorre apenas entre os cromossomos do mesmo genoma, e se espera herança dissômica. Um tipo intermediário são os poliploides segmentares, formados pela duplicação dos genomas de espécies aparentadas, que ainda mantêm homologia suficiente entre seus cromossomos para permitir um pareamento parcial, e que podem exibir formas variadas e intermediárias de herança, ou seja, dissômica para algumas características e polissômica para outras (STEBBINS, 1971; SYBENGA, 1992).

Diversos grupos de organismos têm a poliploidia como responsável pela sua especiação e evolução, dentre esses, alguns grupos animais, mas é nas plantas que a poliploidia se mostra mais frequente (WHITE, 1940; SACHS, 1952; PEER, MAERE e MEYER, 2009). Acredita-se que a maior ocorrência de poliploidia em plantas que em animais se deve ao fato de as plantas produzirem compostos secundários, como nicotina e colchicina. Na natureza, esses compostos servem de defesa contra herbivoria, mas podem agir também nas próprias plantas, inibindo a formação do fuso mitótico das mesmas. Além disso, as plantas têm poucos mecanismos de controle de temperatura, assim, estão frequentemente sujeitas a choques térmicos, o que também pode promover poliploidia pela inibição da formação do fuso mitótico (CRONK, 2001).

De acordo com Hegarty et al. (2013), a poliploidia é a maior força evolutiva para as plantas superiores, pois a duplicação do genoma dentro de um único organismo se torna uma fonte de inovação genética e tem potencial para gerar especiação através de barreiras reprodutivas com o genótipo progenitor. As estimativas encontradas na literatura de ocorrência de poliploidia nas plantas com flores variam. Para Stebbins (1971), de 30 a 35%; para Masterson (1994), 70% e para Cui et al. (2006), 90% das angiospermas podem ser poliploides.

Muitas plantas amplamente cultivadas e, inclusive, presentes no dia a dia das pessoas possuem genomas poliploides. Dentre elas, pode-se citar o trigo, o algodão, a canola, a aveia, o milho, a batata, a soja e a cana-de-açúcar (GOTTLIEB, 2003; CHEN, 2010).

Muitas plantas poliploides possuem características vantajosas em relação às diploides da mesma espécie. Elas podem exibir traços evolutivamente vantajosos, sendo pioneiras na conquista de novos habitats, aos quais as diploides não se mostram adaptadas (DE WET, 1980). Poliploides podem vir a ser maiores e mais robustos (STEBBINS, 1971); são capazes de produzir em

maior quantidade um determinado produto gênico ou sintetizar uma nova substância desde que os genes parentais produzam a substância original normalmente (MAYO, 1970).

Assim como no caso de *L. alba*, existem relatos na literatura sobre variação de ploidia intraespecífica, como no trabalho de Rohollahi et al. (2015), em que foram encontradas evidências de ocorrência de poliploidia em *Festuca arundinacea*, uma espécie forrageira. Também na espécie *Spergularia diandra* existem pelo menos dois níveis de ploidia, diploides ($2x=2n=18$) e tetraploides ($4x=2n=36$) (KAUR e SINGHAL, 2012). Para a espécie *Ranunculus parnassifolius*, foram descritos três níveis de ploidia (diploide, triploide e tetraploide) por Cires et al. (2010). Também com três níveis de ploidia se mostrou *Andropogon gerardii* (KEELER, 2004).

1.3 INDUÇÃO DE POLIPLOIDIA

Devido à sua grande importância evolutiva e ao seu potencial agrônomo, as plantas poliploides vem sendo objeto de interesse da ciência há muitos anos, sendo frequentemente produzidas artificialmente. De acordo com Hegarty, et al. (2013), em sua revisão sobre poliploides artificiais, os primeiros poliploides induzidos artificialmente remontam às primeiras décadas do século passado. Criados acidentalmente por Winkler em 1916, os primeiros poliploides artificiais eram células provenientes de calos de *Solanum*. Mas foi na década de 1930 que foram relatadas as primeiras aplicações da poliploidização na agricultura, por Blakeslee e Avery (1937).

Como já dito anteriormente, pode-se considerar que a indução de poliploidia em plantas tem duas principais aplicações: os estudos evolutivos e os estudos de melhoramento genético. Trabalhos dessa natureza têm sido feitos há anos e envolvido inúmeras espécies.

Embora venha sendo estudada há tanto tempo e em diversas espécies, a indução de poliploidia é, em geral, um processo laborioso e pouco eficiente. Antes de entrar nessa problemática, porém, é preciso abordar os fundamentos do processo de duplicação cromossômica.

Para se induzir poliploidia é necessário fazer uso de um agente, seja ele químico ou físico, que interfira na formação do fuso mitótico. Esse é formado por microtúbulos que, por sua vez, são constituídos basicamente por heterodímeros de α -tubulina e β - tubulina que se alinham e formam uma estrutura cilíndrica (QUADER, 1998). Os microtúbulos exercem importantes funções celulares durante o crescimento e ciclo mitótico, participam de diversos processos relacionados à migração dos cromossomos, estruturação celular, orientação e disposição das microfibrilas de celulose, formação da parede celular, movimento intracelular e diferenciação celular (MOREJOHN e FOSKET 1991; JORDAN e WILSON, 1999), sendo, portanto, fundamentais para o processo de divisão e sobrevivência da célula.

Os agentes químicos usados para induzir poliploidia são chamados, de forma geral, de antimitóticos. Eles atuam na célula após a fase S e antes da citocinese e funcionam inibindo a formação das fibras do fuso mitótico, que é responsável pelo alinhamento dos cromossomos homólogos e posterior separação das cromátides irmãs (DEWITTE e MURRAY, 2003). Assim, após a replicação do DNA, a célula tem o dobro do material genético inicial, mas não se divide, devido à falta das fibras do fuso, retornando ao estágio de intérfase com o dobro do número de cromossomos. Tem-se, portanto, uma célula poliploide.

Voltando agora aos problemas envolvidos na poliploidização artificial, é preciso entender que, por detrás desse fundamento teórico, há uma série de parâmetros metodológicos que precisam ser adequados à espécie estudada e às condições experimentais disponíveis. Geralmente, trata-se uma quantidade muito grande de indivíduos com antimitótico e se obtêm percentuais baixos de poliploides. Além disso, os resultados podem variar em função do antimitótico usado, do tipo de tecido vegetal e do citótipo.

No trabalho de Tel-Zur et al. (2011), tem-se um exemplo da influência desses fatores nos resultados da duplicação cromossômica. Dentre 524 gemas laterais de plantas de *Hylocereus monacanthus*, *H. megalanthus* e de híbridos entre as duas espécies tratadas com colchicina e orizalina, apenas 2 indivíduos apresentaram-se como poliploides, e dentre 1550 sementes das duas espécies tratadas com os mesmos antimitóticos, 27 poliploides foram obtidos. Quando sementes de *Hylocereus monacanthus* foram tratadas com colchicina e orizalina, poliploides só foram obtidos a partir dos tratamentos com colchicina. Por outro lado, para a outra

espécie, *Hylocereus megalanthus*, tanto a colchicina quanto a orizalina produziram poliploides.

Portanto, percebe-se que não há uma “receita” para a produção artificial de poliploides. A indução de poliploidia, principalmente quando feita pela primeira vez numa espécie, é baseada em tentativa e erro, pois não há um protocolo eficiente para um grande número de espécies. Geralmente, são testadas diferentes concentrações, explantes e tempos de exposição até que se encontre algum tratamento com bons resultados. Isso ocorre porque, apesar de não ser um assunto novo para a ciência, existindo trabalhos que remontam à década de 1930, ainda faltam informações sobre o processo de duplicação cromossômica *in vitro*, sobre os mecanismos celulares envolvidos, sobre como a interação entre concentração e tempo de exposição pode interferir no ciclo celular etc. Enfim, informações que podem contribuir para tornar o processo de duplicação cromossômica *in vitro* mais eficiente.

Alguns trabalhos têm caminhado no sentido de elucidar essas questões, como o de Lazareva et al. (2003), que investigou a relação entre a dinâmica dos microtúbulos e o tempo de exposição à colchicina. Caperta et al. (2006) usaram técnicas de hibridização *in situ* e imuno-deteção para acompanhar a progressão das estruturas contendo tubulina no processo de divisão celular. Plantas da espécie *Secale cereale* foram submetidas a tratamentos com colchicina e os dados de duplicação foram correlacionados com os de imuno-deteção, fornecendo valiosos *insights*. Mas ainda são necessários estudos que visem esclarecer como se dá o processo de poliploidização artificial, a fim de que, somando-se cada vez mais informações a respeito da dinâmica da poliploidização, a pesquisa nessa área possa dar passos maiores, tornando o processo mais eficiente.

1.4 METODOLOGIAS UTILIZADAS PARA A INDUÇÃO E DETECÇÃO DE POLIPLÓIDIA

A poliploidia *in vitro* pode ser induzida por duas vias: poliploidização mitótica, que é baseada na duplicação de tecidos somáticos e poliploidização meiótica, que produz gametas não reduzidos $2n$ (RAMSEY e SCHEMSKE,

1998). Aqui, porém, nos ocuparemos somente da poliploidização mitótica, por ser a utilizada no presente estudo e na maioria dos trabalhos atuais.

A indução de poliploidia *in vitro* envolve diversas etapas que influenciam os resultados obtidos. Estas etapas envolvem, de forma geral: escolha do tecido vegetal, escolha do antimitótico, método de exposição do tecido vegetal ao antimitótico e detecção de ploidia. Portanto, o sucesso da indução depende da maneira como cada procedimento é realizado em cada uma das fases e do resultado final da interação entre as etapas.

Começando pelos tipos de tecido vegetal utilizados para poliploidização, estes variam bastante, mas o que há em comum entre todos é a alta taxa de divisão celular (WITTMANN & DALL'AGNOL, 2003). Essa característica é necessária, uma vez que os agentes antimitóticos atuam sobre a formação do fuso mitótico durante a fase M do ciclo celular (DHOOGHE et al., 2011). Assim, é comum o uso de tecidos meristemáticos.

Quanto aos agentes indutores de poliploidia, eles podem ser de natureza física, como temperatura e pressão atmosférica (DERMEN, 1938; HÄNTZSCHEL e WEBER, 2010). Mas, na maioria dos casos, a duplicação cromossômica é feita por agentes químicos que interferem no ciclo celular, conhecidos como antimitóticos.

Existe uma gama de antimitóticos usados atualmente. Alguns herbicidas são utilizados para esse fim. Eles têm maior especificidade para células vegetais que outros antimitóticos (HÄNTZSCHEL E WEBER, 2010). Isso é vantajoso, pois é possível usar concentrações mais baixas e a manipulação precisa de menos precauções. Os herbicidas mais frequentemente usados são trifluralina e orizalina. Mas o agente antimitótico mais antigo e de uso mais difundido é a colchicina (BLAKESLEE e AVERY, 1937). Trata-se de um alcaloide derivado da planta *Colchicum autumnale* cuja capacidade antimitótica foi descoberta em 1889 (MALKINSON, 1982). Segundo Dhooghe et al. (2011), esse composto ainda é o mais amplamente usado na poliploidização *in vivo* e *in vitro*, principalmente de frutos e plantas de cultivo agrícola. De acordo com Niel e Scherrmann (2006), a inibição da polimerização dos microtúbulos é o principal mecanismo de ação da colchicina, sendo que cada molécula deste composto se liga a uma molécula de tubulina, impedindo-a de ser incorporada ao polímero.

Segundo os autores, o alongamento dos microtúbulos para, o fuso mitótico é desfeito e a divisão celular não pode prosseguir.

Sobre as formas de aplicação do agente poliploidizante, nos casos de indução de poliploidia *in vivo*, ou em que são utilizadas sementes (em germinação ou não), a aplicação do antimitótico pode ser feita por gotejamento nos meristemas ou por embebição no antimitótico. Já na duplicação cromossômica *in vitro*, o antimitótico geralmente é colocado em meio de cultura.

A grande maioria dos trabalhos utiliza a indução de poliploidia *in vitro*, em vez da indução *in vivo*. O método *in vitro* é realizado através da técnica de cultura de tecidos vegetais, que oferece vantagens por proporcionar condições ideais de assepsia, nutrição e fatores ambientais como luz, temperatura, O₂ e CO₂. Essa técnica foi empregada no presente estudo para a indução de poliploidia em *L. alba* e será abordada adiante neste texto.

A última etapa é a avaliação do nível de ploidia das plantas tratadas. Um dos métodos mais tradicionais de detecção de ploidia é a contagem de cromossomos através de análise citológica (MEDINA et al. 1972; MANARA et al. 1973). Geralmente, são confeccionadas lâminas de tecidos meristemáticos da planta (por exemplo, meristema da raiz), que são analisadas por microscopia de luz (CUCO et al., 2003). Mas esse é um procedimento que exige certa experiência do pesquisador e demanda bastante tempo. O tamanho e o número de estômatos de uma planta também pode indicar seu nível de ploidia e esse critério é costumeiramente utilizado (MASTERSON, 1994; ARYAVAND et. al, 2003). Porém, essa característica pode ser influenciada pelo ambiente, além de estar sujeitas a subjetividade no momento da análise individual (SOUZA e QUEIRÓZ, 2004). A análise morfométrica das folhas também se mostrou eficiente para detecção de ploidia no trabalho de Vichiato et al. (2006), mas nem sempre é possível utilizar essa abordagem.

Mas outro método mais recente tem sido amplamente utilizado para detecção de ploidia, a citometria de fluxo. É uma metodologia rápida e confiável, que é amplamente aplicada para estudos do genoma vegetal (DOLEŽEL, 1997). Essa técnica foi utilizada no presente estudo e será abordada à frente neste texto.

1.4.1 CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS *IN VITRO*

Para a realização deste trabalho, foi utilizada a micropropagação, também conhecida como cultura de tecidos vegetais *in vitro*. Essa técnica consiste em cultivar células, tecidos ou organismos completos em um meio sintético sob condições assépticas e controladas de luz, temperatura e umidade (DAGLA, 2012).

As tentativas de se cultivar plantas em meio artificial já eram realizadas desde antes de 1900, mas foi com a teoria celular, postulada por Schleiden e Schwann, que se iniciou a cultura de células e tecidos vegetais (ILIEV, 2008). Pode-se considerar que as bases teóricas da micropropagação começaram a ser esclarecidas com os experimentos de Gottlieb Haberlandt, que forneceram alguns *insights* sobre as propriedades e potencialidades que a célula possui como menor unidade funcional do ser vivo. Gottlieb contribuiu muito para o desenvolvimento da técnica, propondo claramente o conceito de totipotencialidade. Por tanto, foi reconhecido, mais tarde, como pai da cultura de tecidos vegetais (THORPE, 2007).

Em 1962, Murashige e Skoog deram um grande passo que permitiria que a cultura de tecidos avançasse significativamente nos anos seguintes. Eles foram capazes de formular um meio de cultura muito mais eficiente que os já descritos anteriormente, com concentrações mais altas de nitrogênio e micronutrientes (MURASHIGE e SKOOG, 1962), o que permitiu que um grande número de espécies pudesse ser cultivado *in vitro*. A formulação dos sais do meio de cultura de Murashige e Skoog é, até hoje, amplamente usada nos trabalhos de cultura de tecidos e esse meio ficou conhecido como meio de cultura MS (THORPE, 2007; GULL et al., 2014; KWON, CHO e KIM, 2014).

A cultura de tecidos é hoje uma técnica aplicável em diferentes áreas da ciência. Ela é utilizada como ferramenta para conservação de espécies, estudos de melhoramento, engenharia genética, fisiologia vegetal, dentre outros. Guo et al. (2015) utilizaram a cultura de tecidos *in vitro* como uma das ferramentas de um estudo que investigou a expressão de um transgene em *Arabidopsis* e sua relação com maior tolerância à salinidade e à seca, assim como alterações no níveis hormonais. Hill et al. (2015) conseguiram realizar a micropropagação de *Astragalus holmgreniorum*, uma espécie ameaçada de extinção, para a qual a cultura de tecidos tem grande potencial de conservação.

A micropropagação de *L. alba* também já é realizada, já que é uma importante planta medicinal. Gupta, Khanuja e Kumar (2001) obtiveram sucesso na cultura de tecidos de *L. alba*.

1.4.2 CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo é uma técnica que envolve propriedades físicas como a dispersão da luz, a fluorescência e partículas fluindo numa suspensão líquida em alta velocidade. A amostra contendo as partículas a serem analisadas é introduzida no centro da câmara de fluxo, que se encontra preenchida por um fluido que apresenta uma velocidade muito superior à da suspensão líquida contendo as partículas. Através de um fenômeno físico conhecido como focagem hidrodinâmica, as partículas são forçadas a moverem-se, num fluxo laminar, uma a uma, no centro do fluxo (DOLEŽEL 1997). O citômetro de fluxo possui fontes de luz, geralmente lasers, que incidem nessas partículas, uma a uma, ocorrendo um processo de dispersão fotônica e/ou de emissão de fluorescência, cuja intensidade é dependente das características das partículas (CÔRTE-REAL et al. 2002). A partir desse processo de dispersão de luz, o citômetro de fluxo é capaz de fornecer parâmetros como quantidade de DNA, granulosidade, dentre outros (LOUREIRO, 2007).

A citometria de fluxo apresenta grandes vantagens em relação a métodos tradicionais como a contagem de cromossomos. A preparação das amostras é fácil, rápida e apresenta alta reprodutibilidade, além de não necessitar de grandes custos para manter o equipamento e processar as amostras. É possível ler número suficiente de núcleos em poucos minutos. Além disso, não são necessárias grandes quantidades de material vegetal para o preparo das amostras, evitando danos à planta. A citometria de fluxo é especialmente útil para os casos de endopoliploidia e mixoploidia, em que é necessária a detecção de populações celulares pequenas (LOUREIRO, 2007).

A citometria de fluxo vem sendo amplamente usada no estudo do genoma vegetal e pode ter inúmeras aplicações, como estimativa do tamanho do genoma e quantidade de DNA (DOLEŽEL e BARTOŠ, 2005; PINTO et al., 2010; BAI et al., 2012; GALBRAITH e LAMBERT, 2012), estabilidade do genoma (LARGIA, et al.,

2015) estudos do ciclo celular (GALBRAITH et al., 1983), análise de ploidia (OUMAR et al., 2011; PELLICER e LEITCH, 2014), dentre outras.

1.5 POLIPLÓIDES ARTIFICIAIS - POTENCIAL DE ESTUDO E APLICAÇÕES

Organismos poliploides são alvo de vastos estudos a respeito de seu funcionamento genético, de sua fisiologia e ecologia, uma vez que apresentam características únicas, muitas vezes vantajosas, que os tornam especialmente interessantes. Além disso, como já dito anteriormente, a poliploidia é a maior força evolutiva nas plantas superiores, o que torna os poliploides protagonistas dos estudos evolutivos nesse campo.

Poliploides podem apresentar inúmeras características metabólicas, genéticas, fisiológicas e morfológicas com potencial para amplos estudos e com aplicações diversas. Eles podem apresentar atividade genética mais intensa, maior diversidade de enzimas, menor transpiração, maior índice fotossintético, maior tolerância a estresse nutricional e maior resistência a doenças (LEVIN, 1983). Alterações genômicas também podem ocorrer em alguns poliploides, como redução do tamanho do genoma e alteração do perfil de expressão gênica por mecanismos genéticos e epigenéticos (SOLTIS, SOLTIS e TATE, 2003).

No campo do melhoramento genético, experimentos de duplicação cromossômica já foram feitos com diversas espécies e obtiveram resultados amplamente variados. Tetraploides induzidos a partir de diploides de rosa da variedade Thérèse Bugnet apresentaram duas vezes mais pétalas que os indivíduos diploides (KERMANI et al., 2003); a duplicação cromossômica de espécies de *Miscanthus* foi realizada com o objetivo de aumentar a produção de biomassa, já que tais espécies, sendo plantas C₄, possuem grande interesse agrônomo (GŁOWACKA, JEZOWSKI e KACZMAREK et al., 2010).

O aumento do genoma pode conferir melhoramento quantitativo e/ou qualitativo de metabólitos secundários produzidos pelas plantas. A abordagem da indução de poliploidia é um meio rápido de se obterem tais vantagens, seja para compostos de interesse farmacêutico, aromático etc. (AZOUSH, KAZEMITABAR e HEIDARI, 2014). A poliploidização também pode servir para restaurar a fertilidade de híbridos interespecíficos, e como ponte para a transferência gênica entre plantas

com níveis de ploidia diferentes (DEWEY, 1980; SOUZA-KANESHIMA et al., 2010). Em estudos evolutivos, os poliploides artificiais podem ser utilizados na comparação e elucidação de diversos processos e características próprias desse tipo de organismo (HEGARTY et al., 2013).

Através da comparação de parâmetros entre autopoliploides artificiais e genótipos naturais, é possível proporcionar valiosos *insights* sobre a influência da ploidia no funcionamento de espécies vegetais.

As mudanças de ploidia estão frequentemente acompanhadas de notáveis mudanças no metabolismo secundário, tanto em termos de concentração quanto de perfil químico. Especialmente nas espécies em que os produtos de interesse econômico são extraídos dos órgãos vegetativos, como é o caso de *L. alba*, a duplicação cromossômica pode causar aumento tanto da biomassa quanto da concentração de metabólitos secundários por unidade de matéria seca, representando uma via de melhoramento para plantas medicinais. É conhecido, todavia, que o aumento de biomassa, também conhecido como efeito “gigas”, é dependente tanto do genótipo quanto da espécie em questão (LAVANIA, 2005), além da influência do quimiotipo (LAVANIA, 2012).

A partir desse fundamento teórico, *L. alba* se mostra uma espécie com potencial para o melhoramento por duplicação cromossômica. Autotetraploides, nesse caso, podem fornecer informações a respeito das alterações químicas e morfológicas que ocorrem em decorrência exclusivamente da ploidia. Além disso, há a possibilidade de se compararem rendimento e composição dos óleos essenciais de autotetraploides artificiais e naturais.

Outra característica que se encontra frequentemente alterada em poliploides é o perfil proteico. Testes simples como a quantificação de proteínas totais e solúveis – correspondendo as últimas às proteínas metabólicas funcionais – fornecem informações interessantes sobre o perfil metabólico dos organismos, uma vez que podem indicar alterações de expressão gênica.

No aspecto fisiológico, consideráveis dados podem ser obtidos pela comparação de autotetraploides artificiais e os diploides originais. É possível analisar dados como: CO₂ consumido, temperatura da folha, taxa de transpiração, taxa fotossintética, eficiência do uso da água, relação entre as concentrações interna e ambiente de CO₂, além de outros parâmetros, que podem ser medidos por meio de um analisador de gases no infravermelho (IRGA) (MANABE, 2014).

No âmbito da genômica, em que se concentram a maioria dos trabalhos mais recentes com poliploides, é possível investigar os processos que ocorrem após a formação desses organismos. A figura 2, adaptação da figura apresentada na revisão de Yang et al. (2011), resume bem quais acontecimentos genômicos podem suceder.

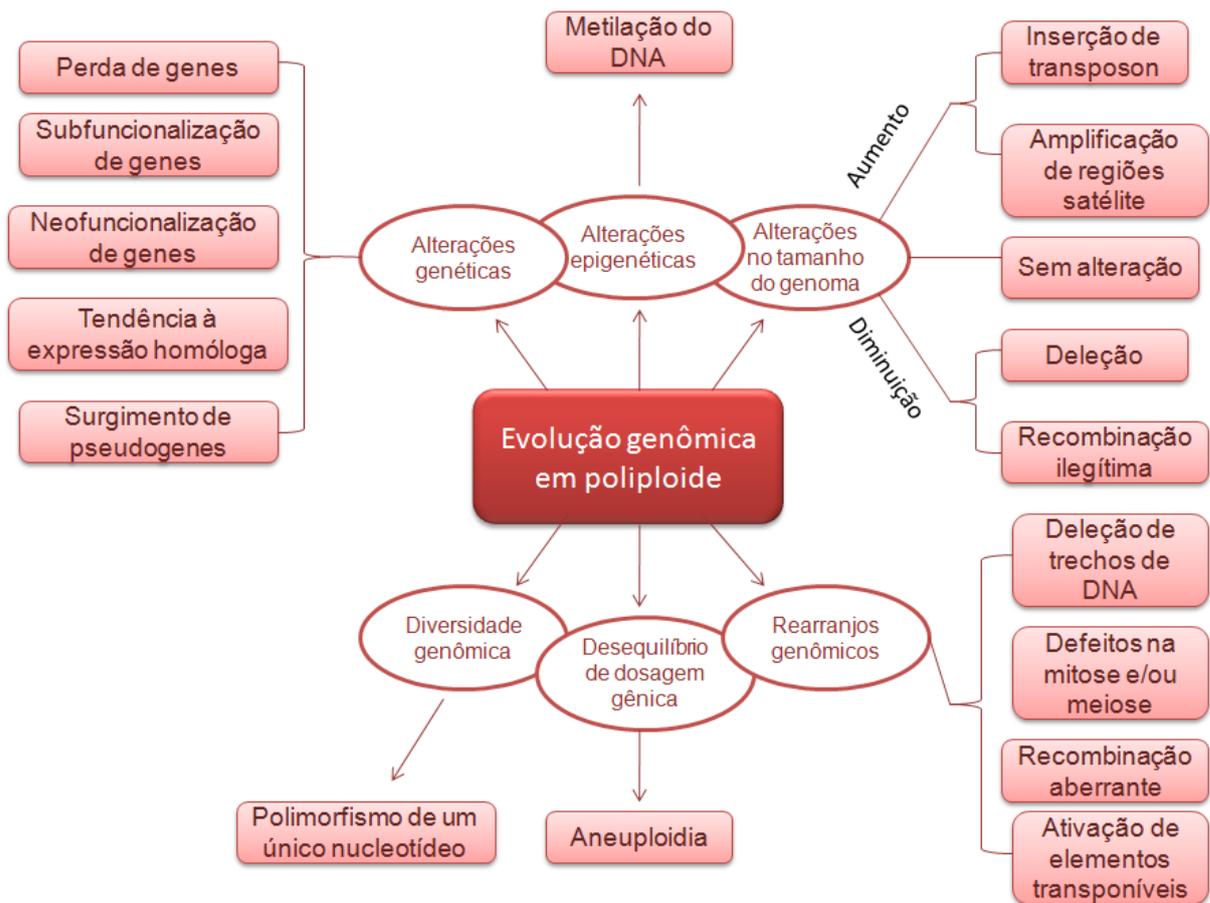


Figura 2. Esquema das alterações genômicas que podem ocorrer em organismos poliploides. Adaptação do trabalho de Yang et al. (2011).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Induzir poliploidia artificial em um acesso diploide de *L. alba*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar concentrações e tempos de exposição à colchicina eficientes para a indução de poliploidia em *L. alba*.
- Acompanhar temporalmente a resposta celular dos explantes após exposição a diferentes concentrações de colchicina e seus respectivos tempos de exposição.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

O material de estudo do presente trabalho constituiu-se de um acesso de *L. alba* presente na estação experimental da Universidade Federal de Juiz de Fora (BGEN02). Esse acesso é proveniente da cidade de Araguaiana (TO) e foi cedido pela Embrapa Cenargen. Segundo análises prévias feitas no Laboratório de Genética e Biotecnologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, BGEN02 tem número cromossômico $2n=2x=30$ e tem como componente majoritário do seu óleo essencial o geranial (VICCINI et al., 2014). Este acesso foi escolhido por ser diploide e por já encontrar-se estabelecido *in vitro* (figura 3).



Figura 3. Exemplos de *L. alba* (acesso BGEN02) estabelecidos *in vitro*.

3.2 MANUTENÇÃO E MULTIPLICAÇÃO DO ACESSO *IN VITRO*

As plantas foram propagadas em meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) livre de hormônios e enriquecido com sacarose 30 gL^{-1} , vitaminas 10 mL^{-1} ; glicina 10 mL^{-1} e ágar 7 gL^{-1} . O pH foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$.

As plantas foram propagadas vegetativamente através de segmentos nodais e as repicagens foram feitas em intervalos de aproximadamente 40 dias. As plantas

ficaram acondicionadas em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas, no Laboratório de Fisiologia Vegetal da UFJF, para obtenção de um grande número de explantes.

3.3 INDUÇÃO DE POLIPLOIDIA

Foram realizados 3 experimentos de indução de poliploidia. No experimento 1, foram testadas diversas concentrações de colchicina, a fim de obter informações sobre os efeitos dos tratamentos sobre os explantes e, a partir disso, conduzir os experimentos seguintes. No experimento 2, foi utilizada a concentração que mostrou melhores resultados no experimento 1 (0,2%) e uma concentração 10 vezes mais baixa (0,02%), a fim de comparar os efeitos de altas e baixas concentrações sobre os explantes. Nesses dois primeiros experimentos, a análise de ploidia foi realizada 40 DAI. Sendo assim, não foi possível acompanhar o que aconteceu, a nível de ploidia, nas primeiras horas e dias após a exposição à colchicina. Com o objetivo de chegar a essa informação, foi conduzido o experimento 3. Nele, foram utilizadas novamente as concentrações de 0,2% e 0,02%, porém, análises de ploidia por citometria de fluxo foram realizadas imediatamente após a exposição à colchicina e ao longo de cinco dias, a fim de monitorar as alterações de ploidia ocorridas no período.

Para a condução dos experimentos aqui descritos, foi escolhida a colchicina como antimitótico para a indução de poliploidia. Tal escolha baseou-se na maior eficiência desta substância na obtenção de duplicação cromossômica assim como relatado pela literatura (FOSCHI et al. 2013).

3.3.1 EXPERIMENTO 1

Para a determinação inicial dos tratamentos mais eficientes (concentrações e tempos de exposição à colchicina), um primeiro experimento foi realizado. Os tratamentos foram escolhidos baseados em dados disponíveis na literatura (dados não mostrados). Uma combinação entre altas concentrações e curtos tempos de

exposição e baixas concentrações e longos tempos de exposição foi adotada como estratégia para se encontrar uma faixa de tratamentos efetivos na indução de poliploidia. Estes tratamentos são mostrados na tabela 1.

Tabela 1. Tratamentos realizados no experimento 1 de indução de poliploidia no acesso BGEN02 de *L. alba*.

Concentração de colchicina (%)	Tempos de exposição
0	2, 4, 16 e 72 horas e 34 dias
0,5	2 e 4 horas
0,2	4 e 16 horas
0,1	16 horas
0,05	72 horas
0,003125	72 horas e 34 dias
0,001563	34 dias

A exposição à colchicina Sigma CAS 6486-8 (figura 4) foi feita em meio de cultura MS preparado conforme descrito no item 4.3. Ao meio de cultura foi adicionada colchicina diluída em água destilada e a mistura foi, então, autoclavada por 20 minutos a 1 atm. Segmentos nodais foram inoculados nesse meio contendo colchicina. Ao fim do tempo de exposição, os explantes foram lavados pelo menos três vezes com água destilada autoclavada e inoculados em meio MS livre de colchicina para se desenvolverem. Vinte explantes foram inoculados em cada tratamento (delineamento inteiramente ao acaso composto de quatro repetições obtidas da análise de cinco explantes). A sobrevivência foi analisada 20 dias após a inoculação em meio livre de colchicina.

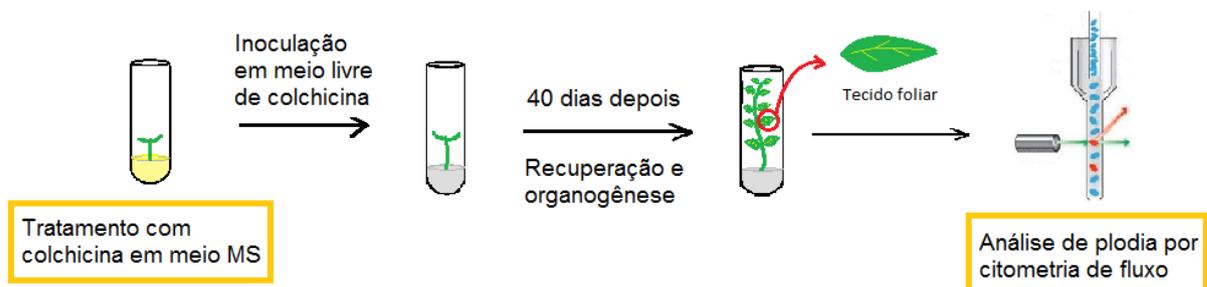


Figura 4. Esquema ilustrativo da metodologia de exposição à colchicina e análise de ploidia após organogênese (40 DA).

3.3.2 EXPERIMENTO 2

Para o experimento 2 foram escolhidos os tratamentos apresentados na tabela 2. O tratamento com 0,2% de colchicina com 4h de exposição foi escolhido por se apresentar teoricamente como o tratamento mais eficiente no experimento 1. Em contraposição foi escolhido o tratamento com colchicina 0,02% (CAPERTA et. al, 2006), dez vezes menor, em combinação com o tempo de exposição de 72 horas (tabela 2).

Tabela 2. Tratamentos realizados no experimento 2 de indução de poliploidia no acesso BGEN02 de *L. alba*.

Concentração de colchicina (%)	Tempos de exposição
0	4 e 72 horas
0,2	4 e 72 horas
0,02	4 e 72 horas

A exposição à colchicina (figura 4) e o desenvolvimento dos explantes após o tratamento foram realizados com os mesmos procedimentos descritos no item 4.3.1. Cem explantes foram inoculados em cada tratamento (delineamento inteiramente ao acaso composto de quatro repetições compostas de vinte e cinco explantes).

3.3.3 EXPERIMENTO 3

Na condução deste experimento foram utilizados também explantes oriundos do acesso BGEN02. Estes foram submetidos aos mesmos tratamentos descritos no item 4.3.2. Após o tratamento com colchicina, os meristemas dos segmentos nodais tiveram seu nível de ploidia monitorado durante 5 dias em diferentes tempos de recuperação. No primeiro dia, as análises foram feitas de 2 em 2 horas. Nos dias subsequentes, a cada 24 horas (tabela 3). Cinquenta e um segmentos nodais foram expostos a cada tratamento, sendo 3 para cada tempo de recuperação (delineamento inteiramente casualizado). Dessa forma, após a exposição à colchicina, os explantes foram lavados e inoculados em meio MS livre de colchicina. A cada tempo de recuperação, 3 explantes de cada tratamento eram retirados e submetidos a análise de ploidia por citometria de fluxo.

A região meristemática do segmento nodal foi separada do caule do explante com a ajuda de uma lâmina cortante. Os meristemas foram, então, macerados sobre gelo em uma placa de Petri contendo 500µL de tampão de extração nuclear LB01. A solução contendo os núcleos meristemáticos foi filtrada em membrana de 45µM, para a obtenção de uma suspensão de núcleos. Essa suspensão foi corada com 50µL de iodeto de propídeo na concentração de 10mg/mL e analisada por citometria de fluxo no citômetro de fluxo FacsCanto. O nível de ploidia foi determinado pela posição do pico G1 das amostras analisadas.

Tabela 3. Tratamentos de colchicina aplicados a segmentos nodais de *L. alba* e tempos de recuperação em que foram feitas as análises por citometria de fluxo.

Tratamentos		Tempos de recuperação (horas)
Concentração	Tempo de exposição	
Controle	4h	
0,02%	4h	
0,2%	4h	0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20,
Controle	72h	22, 24, 48, 72, 96, 120
0,02%	72h	
0,2%	72h	

Os percentuais de células em 4C e 8C foram utilizados como indicadores de ocorrência de poliploidia. Quando houve aumento nas frequências de 4C em relação ao controle, essa informação foi interpretada como a existência de células diploides em G2 e de células poliploides em G1, constituindo um só pico em 4C. E o aparecimento de um pico em 8C foi interpretado como a existência de células poliploides (4C) em G2.

3.4 ANÁLISE DO NÍVEL DE PLOIDIA

Quando as plantas atingiram tamanhos suficientes para retirada de folhas, cerca de 40 DAI, elas foram submetidas a análise por citometria de fluxo no citômetro de fluxo Facs Canto (Becton Dickinson - BD). Uma folha de cada planta foi retirada para obtenção de suspensão de núcleos (figura 4). O tecido foi macerado sobre gelo em uma placa de Petri contendo 1 mL de tampão de extração nuclear

LB01 e a solução obtida foi primeiramente filtrada em gaze e depois em membrana com poros de $45\mu\text{M}$. A suspensão de núcleos obtida foi corada com $50\mu\text{L}$ de iodeto de propídeo na concentração de 10mg/mL . O nível de ploidia foi determinado pela posição do pico G1 das amostras analisadas.

3.5 ACLIMATIZAÇÃO

As plantas poliploides e mixoploides obtidas nos experimentos de indução de poliploidia foram propagadas *in vitro* para a obtenção de maior número de plantas. Posteriormente, elas foram submetidas à aclimatização.

Plantas com 3 a 7 cm de altura foram selecionadas para a aclimatização. Elas foram retiradas dos tubos de ensaio e suas raízes foram lavadas com água para a retirada dos resquícios de meio de cultura. Após a lavagem, elas foram plantadas em recipiente plástico contendo aproximadamente 200 mL de substrato para plantio BioPlant® e ficaram acondicionadas em uma pequena estufa de aclimatização por 7 dias (figura 5). Durante esse período, as plantas foram molhadas com borrifador de duas a três vezes ao dia, dependendo da necessidade. Depois de 7 dias, a estufa foi removida e, aproximadamente 30 dias depois da remoção, as plantas foram transplantadas para vasos de 10 Litros.



Figura 5. Aclimatização de plantas poliploides e mixoploides de *L. alba* induzidas artificialmente. (A) Plantas poliploides e mixoploides 4 dias após o plantio em estufa de aclimatização. (B) Plantas poliploides e mixoploides após retirada da estufa (7 dias após o plantio).

4 RESULTADOS

4.1 INDUÇÃO DE POLIPLOIDIA – EXPERIMENTO 1

Os resultados do experimento 1 são mostrados na tabela 4. Percebe-se uma relação entre o aumento da concentração de colchicina utilizada/redução do tempo de exposição e a diminuição da taxa de sobrevivência. Através da figura 7 é possível perceber que estes dados ajustam-se a uma regressão linear múltipla ($R^2=0,72$).

Tabela 4. Sobrevivência e nível de ploidia de plantas do acesso BGEN02 de *L. alba* tratadas com colchicina em diferentes concentrações e tempos de exposição no experimento 1.

Tratamento	Sobrevivência (%)*	Poliploides (%)	Mixoploides (%)
Controle 2h	18 (90%)	-	-
0,5% 2h	3 (15%)	1	-
Controle 4h	20 (100%)		
0,5% 4h	7 (35%)	-	1
0,2% 4h	10 (50%)	3	2
Controle 16h	16 (80%)		
0,2% 16h	13 (66%)	-	-
0,1% 16h	14 (70%)	-	1
Controle 72h	17 (85%)		
0,05% 72h	20 (100%)	-	-
0,003125 72h	18 (90%)	-	1
Controle 34 dias	18 (90%)		
0,003125% 34 dias	16 (80%)	-	1
0,001563% 34 dias	12 (60%)	-	1

*A sobrevivência foi calculada 20 dias após a inoculação em meio livre de colchicina.

Através das análises por citometria de fluxo, foram revelados 4 poliploides (figura 6), sendo a maioria deles (3) identificados no tratamento com colchicina 0,2% por 4h de exposição. Adicionalmente foram identificados 7 mixoploides distribuídos em 6 tratamentos. Um aspecto interessante dos resultados é que se estabelecermos as concentrações de 0,5% e 0,2% como concentrações altas e as demais (0,1%, 0,05%, 0,003125% e 0,001563%) como concentrações baixas, 100% dos poliploides

foram encontrados em concentrações altas. Contrariamente, a maioria dos mixoploides (aproximadamente 57%) foram encontrados em concentrações baixas.



Figura 6. Planta autotetraploide ($2n=4x=60$) obtida a partir do acesso BGEN02 de *L. alba*, através de experimento de indução de poliploidia utilizando colchicina.

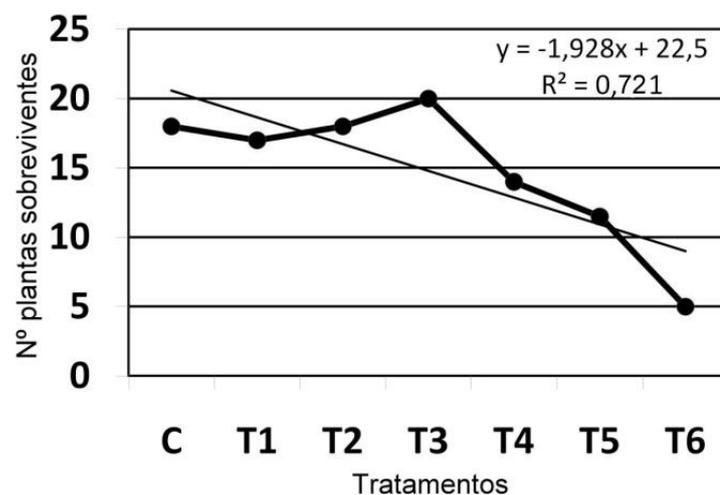


Figura 7. Regressão Linear entre concentração de colchicina e sobrevivência. C = controle; T1 até T6 = Tratamentos com colchicina nas concentrações de 0,001563% (T1); 0,003125% (T2); 0,05% (T3); 0,1% (T4); 0,2% (T5) e 0,5% (T6).

4.2 INDUÇÃO DE POLIPLOIDIA – EXPERIMENTO 2

Com o objetivo de ampliar a amostragem utilizada no experimento 1 (20 explantes) um experimento foi realizado com 100 explantes em cada tratamento. Foi

escolhido como tratamento a ser investigado, neste caso, a concentração de 0,2% de colchicina por 4h de exposição. Como contraponto, foi utilizada uma concentração 10X menor, de 0,02% por 72h de exposição. Controles para estes tratamentos também foram investigados. Os resultados do experimento 2 são mostrados na tabela 5. Do mesmo modo como discutido anteriormente, percebe-se uma redução da sobrevivência com o aumento da concentração e/ou tempo de exposição à colchicina.

O tratamento de 0,2% de colchicina à 4h de exposição que havia produzido 3 poliploides no experimento 1 não repetiu os mesmos resultados no experimento aqui discutido. Entretanto, este tratamento apresentou novamente o maior efeito em modificar os níveis de ploidia das plantas sobreviventes. Cinco mixoploides (aproximadamente 13% das plantas sobreviventes) foram encontrados após exposição a este tratamento.

Apenas 1 poliploide foi encontrado após exposição por 72h à colchicina 0,2%.

Histogramas representativos das análises por citometria de fluxo são demonstrados na figura 8.

Tabela 5. Sobrevivência e nível de ploidia de plantas do acesso BGEN02 de *L. alba* tratadas com colchicina em diferentes concentrações e tempos de exposição no experimento 2.

Tratamento	Sobrevivência (%)*	Poliploides (%)	Mixoploides (%)
Controle 4h	78 (78%)	-	-
0,02% 4h	58 (58%)	-	3
0,2% 4h	38 (38%)	-	5
Controle 72h	64 (64%)	-	-
0,02% 72h	44 (44%)	-	-
0,2% 72h	11 (11%)	1	-

*A sobrevivência foi calculada 20 dias após a inoculação em meio livre de colchicina.

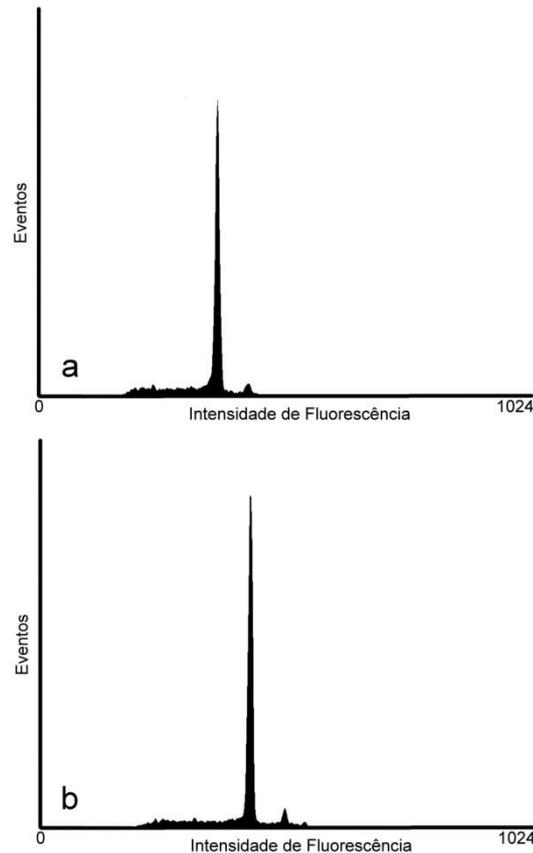


Figura 8. Histogramas obtidos em análise por citometria de fluxo das plantas sobreviventes nos experimentos de indução de poliploidia. (a) planta diploide; (b) planta poliploide.

As plantas aclimatizadas encontram-se estabelecidas em campo, na estação experimental da Universidade Federal de Juiz de Fora para os estudos de melhoramento e alguns indivíduos tetraploides permanecem estabelecidos *in vitro*, disponíveis para estudos evolutivos, de organogênese, de desempenho *in vitro* e outros mais. Essas plantas serão acompanhadas periodicamente quanto à manutenção de ploidia, uma vez que poliploides recém formados podem passar por rearranjos genômicos, retornando à condição diploide após alguns anos (BLASCO, BADENES e NAVAL, 2015).

4.3 MONITORAMENTO DO NÍVEL DE PLOIDIA APÓS EXPOSIÇÃO À COLCHICINA

Os resultados da análise temporal nos níveis de ploidia celulares após exposição dos explantes à colchicina são mostrados na tabela 6.

Após exposição ao tratamento controle por 4h a média de células no pico 4C (correspondente ao G2 do ciclo celular) foi de $7,26 \pm 0,58$, considerando todos os tempos de recuperação. No controle não foram detectadas células com 8C de DNA.

A exposição à colchicina 0,2% por 4h aumentou este percentual (células 4C) após 16h de recuperação até 5 dias de recuperação (tabela 6). Considerando todos esses tempos de recuperação, esse aumento foi em média de 87,28%, variando de 19,28% após 16h de recuperação a 170,80% após 3 dias de recuperação (tabela 6). Estes aumentos possivelmente representam a detecção de células poliploidizadas que conjuntamente com células em G2 do ciclo celular são detectadas dentro de um mesmo pico, representando o que chamamos aqui de pico 4C (figura 9). Essa evidência é corroborada pela presença também de células com 8C de DNA em alguns destes tratamentos (tabela 6). Após 5 dias de recuperação o percentual de células com 8C de DNA chega a 2,67%. Esse percentual representa células em G2 do ciclo celular e que originalmente são poliploides em G1 (figura 9).

O tratamento com 0,02% de colchicina por 72h de exposição também apresentou o mesmo efeito, porém em menor intensidade. Aumento de células em 4C foi detectado após 22h de recuperação. Considerando todos os tempos de recuperação a partir de 22h o aumento foi em média de 38,12%. Do mesmo modo, em alguns tratamentos foram detectados núcleos com 8C de DNA (tabela 6, figura 9). Adicionalmente, esse tratamento induz uma diminuição de células em G1 (Pico 4C) para alguns tratamentos após 2 a 16h de recuperação. Em média esta redução foi de 31,66% (tabela 6). O mesmo efeito foi amplamente evidente após exposição à colchicina 0,2% por 72h. Nesse caso, foram percebidas reduções nos percentuais de células em 4C após todos os tempos de recuperação (média de 81,54%) (tabela 6). Esse efeito também foi percebido após exposição à colchicina 0,02% por 4h (de 2 a 16h de recuperação, exceto para 4 e 6h). Neste caso a redução foi em média de 22,05%.

Tabela 6. Variação temporal nos níveis de ploidia celulares após exposição dos explantes à colchicina.

Tratamentos /Tempos de recuperação	Controle 4h		0,2 4h		0,02 4h		Controle 72h		0,2 72h		0,02 72h	
	% 4C	% 8C	% 4C	% 8C	% 4C	% 8C	% 4C	% 8C	% 4C	% 8C	% 4C	% 8C
0h	7,28 Aa	0,00 Aa	7,23 Aa	0,00 Aa	6,78 Ba	0 Aa	7,67 Aa	0,00 A	3,21 Bb	0,00 Aa	7,23 Ba	0,00 Aa
2h	7,91 Aa	0,00 Aa	7,45 Aa	0,00 Aa	6,89 Bb	0 Aa	8,91 Ba	0,00* A	3,21 Bc	0,00 Aa	6,32 Bb	0,00 Aa
4h	6,72 Aa	0,00 Aa	7,89 Aa	0,00 Aa	6,78 Ba	0 Aa	7,65 Aa	0,00 A	3,56 Bb	0,00 Aa	5,32 Ab	0,00 Aa
6h	6,99 Aa	0,00* Aa	7,54 Aa	0,00 Aa	6,89 Ba	0 Aa	7,12 Aa	0,00 A	2,56 Bb	0,00 Aa	5,67 Ab	0,00 Aa
8h	6,54 Aa	0,00 Aa	7,89 Aa	0,00 Aa	5,32 Ab	0 Aa	7,89 Aa	0,00 A	1,34 Ac	0,00 Aa	4,56 Ab	0,00 Aa
10h	6,89 Aa	0,00 Aa	7,56 Aa	0,00 Aa	5,42 Ab	0 Aa	7,34 Aa	0,00 A	1,21 Ac	0,00 Aa	4,67 Ab	0,00 Aa
12h	7,11 Aa	0,00 Aa	8,12 Aa	0,00 Aa	5,23 Ab	0 Aa	7,45 Aa	0,00 A	1,09 Ac	0,00 Aa	3,21 Ad	0,00 Aa
14h	8,10 Aa	0,00 Aa	8,90 Aa	1,21 Bb	4,78 Ab	0 Aa	8,00 Aa	0,00 A	1,72 Ac	0,00 Aa	5,67 Ab	0,00 Aa
16h	7,83 Aa	0,00* Aa	9,34 Bb	0,00 Aa	6,89 Bb	0 Aa	7,43 Aa	0,00 A	1,11 Ac	0,00 Aa	6,78 Bb	0,00 Aa
18h	7,63 Aa	0,00 Aa	10,35 Bb	0,00 Aa	7,32 Ba	0 Aa	7,56 Aa	0,00 A	0,78 Ac	0,00 Aa	7,11 Ba	0,00 Aa
20h	7,54 Aa	0,00 Aa	11,34 Bb	1,34 Bb	8,78 Ca	0 Aa	7,32 Aa	0,00 A	0,65 Ac	0,00 Aa	8,99 Ca	0,00 Aa
22h	7,53 Aa	0,00* Aa	13,98 Bb	1,45 Bb	7,79 Ba	0 Aa	7,23 Aa	0,00 A	0,32 Ac	0,00 Aa	10,11 Dd	0,00* Aa
24h	7,42 Aa	0,00 Aa	9,85 Bb	1,99 Bb	9,23 Db	1,01 Bb	8,11 Aa	0,00* A	0,12 Ac	0,00 Aa	10,12 Dd	0,00* Aa
2 dias	8,23 Aa	0,00 Aa	16,32 Cb	0,00* Aa	9,34 Db	0* Aa	8,02 Aa	0,00 A	0,21 Ac	0,00 Aa	11,23 Dd	1,11 Bb
3 dias	6,78 Aa	0,00 Aa	18,36 Cb	1,11 Bb	9,32 Db	0 Aa	7,89 Aa	0,00* A	0,78 Ac	0,00 Aa	10,78 Dd	1,18 Bb
4 dias	6,89 Aa	0,00 Aa	15,78 Cb	1,45 Bb	7,89 Ba	0 Aa	7,65 Aa	0,00 A	1,11 Ac	0,00 Aa	10,87 Dd	1,21 Bb
5 dias	6,11 Aa	0,00 Aa	16,11 Cb	2,67 Cb	7,90 Ba	0 Aa	7,34 Aa	0,00 A	1,23 Ac	0,00 Aa	10,67 Dd	0,00* Aa

* As médias seguidas por uma mesma letra maiúscula na mesma coluna são estatisticamente iguais; as médias seguidas por uma mesma letra minúscula na linha são estatisticamente iguais.

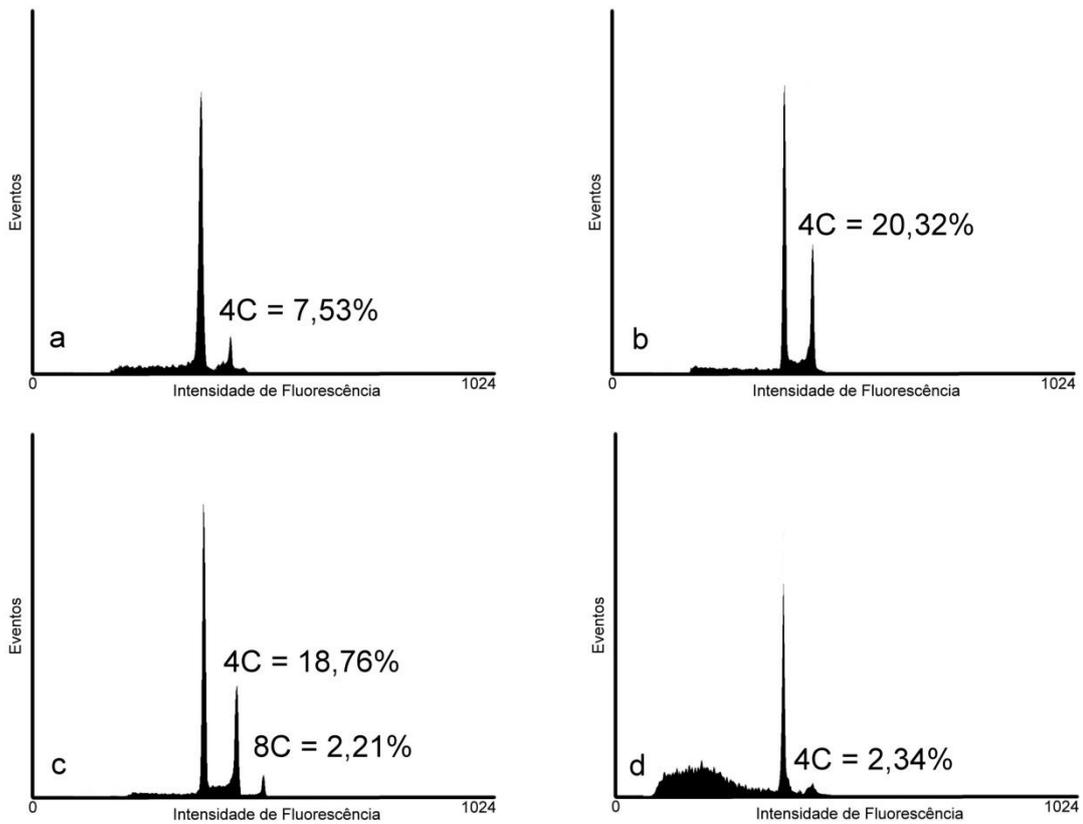


Figura 9. Variação temporal nos níveis de ploidia celulares após exposição dos explantes à colchicina. (a) Tratamento controle. Percentual de células 4C = 7,53%; (b) Tratamento com 0,2% de colchicina por 4h. Percentual de células 4C = 20,32% sem detecção de células 8C; (c) Tratamento com 0,2% de colchicina por 4h. Percentual de células 4C = 18,76% com detecção de células 8C (2,21%); (d) Tratamento com 0,2% de colchicina por 72h. Percentual de células 4C = 2,34%.

5 DISCUSSÃO

A duplicação do número de cromossomos tem sido uma estratégia rotineiramente utilizada em estudos envolvendo aspectos do melhoramento de plantas. Inúmeras aplicações são descritas, dentre elas, o desenvolvimento de materiais com variação fenotípica como o aumento de biomassa ou alteração na produção de compostos do metabolismo secundário em plantas medicinais. Também em estudos evolutivos, a indução de poliploidia tem sido utilizada no entendimento de alterações genômicas que ocorrem após a produção de híbridos e poliploides.

Embora constitua uma estratégia importante, a duplicação cromossômica em plantas ainda está associada a um processo com baixa eficiência e um alto percentual de produção de plantas mixoploides e aneuploides.

O presente trabalho teve como objetivo pioneiro a indução de poliploidia em *L. alba*, uma espécie medicinal, importante economicamente.

A cultura *in vitro* tem sido o processo mais utilizado para a indução de poliploidia. Diferentes explantes têm sido utilizados com sucesso e de modo geral eles são expostos a soluções de antimetabólitos que interferem no ciclo celular de plantas. Durante a metáfase, os microtúbulos do fuso emergem dos centros organizadores de microtúbulos. Este fuso formado por dímeros de tubulina é essencial para a correta migração dos cromossomos para os pólos durante a fase de anáfase (DEWITTE e MURRAY, 2003). Conseqüentemente a inibição da formação do fuso e a não separação das cromátides irmãs na anáfase pode resultar em células com o número cromossômico duplicado (DHOOGHE et al., 2011). Um grupo de moléculas bloqueia em metáfase através da sua associação com os dímeros de tubulina e, assim impedindo que novos dímeros sejam acrescentados no processo de alongamento dos microtúbulos, não afetando o processo de desmontagem dos microtúbulos já formados. Deste modo como o processo de desmontagem acontece em detrimento da montagem, os microtúbulos são despolimerizados (DHOOGHE et al., 2011). Pertence a essa classe de moléculas, a colchicina, o antimetabólito mais comumente utilizado. Entretanto, a colchicina liga-se fracamente a tubulina de plantas, e por isso ela é utilizada em algumas ocasiões em concentrações altas, geralmente conduzindo a efeitos adversos. Concentrações e

tempos de exposição são importantes parâmetros para o sucesso na obtenção de poliploides e existe uma evidente interação entre estes fatores. Em uma análise de 63 artigos publicados, Dhooghe et al (2011) demonstra que a colchicina é utilizada como agente antimitótico em 34 trabalhos em concentrações variando entre 25 μ M (SHAO et al., 2003) e 10mM (SUN et al., 2009). Os tempos de exposição variaram entre 2h (HAMIL et al., 1992) a 8 semanas (WU e MOONEY, 2002).

Entretanto, uma análise sistemática das interações entre concentrações e tempos de exposição para o entendimento do efeito da colchicina sobre células vegetais é rara na literatura.

O presente trabalho procurou no experimento 1 realizar uma avaliação de interações entre concentrações e tempos de exposição à colchicina. Concentrações variando de 0,001563 a 0,5% e tempos de exposição de 2h a 34 dias foram testados. Como relatado nos resultados, houve uma correlação entre estes parâmetros testados e a taxa de sobrevivência das plantas. As taxas de sobrevivência apresentaram-se menores, quanto maiores as concentrações de colchicina e mais longos os tempos de exposição. Esse efeito é conhecido em trabalhos utilizando colchicina para duplicação cromossômica, já que a colchicina é sabidamente tóxica para a célula (NIEL e SCHERRMANN, 2006). Também nos trabalhos de Sajjad et al. (2013) e de Lehrer, Brand e Lubell (2008) com as espécies *Tagetes erecta* e *Berberis thunbergii*, respectivamente, observou-se diminuição da sobrevivência com o aumento das concentrações de colchicina.

Com relação aos resultados de indução de duplicação cromossômica, praticamente em todos os tratamentos investigados foram obtidos efeitos de indução de poliploidia. Entretanto, na maioria dos tratamentos este efeito manifestou-se no que chamamos de mixoploidia, o que pode ser definida como a presença, em uma mesma planta, de células poliploidizadas juntamente com células diploides. Plantas apenas poliploides foram identificadas somente nos tratamentos com colchicina 0,5% por 2h de exposição e 0,2% por 4h de exposição. Neste último, das 10 plantas sobreviventes, 3 apresentaram-se como poliploides e 2 como mixoploides.

Em um dos poucos trabalhos que objetivou estudar o efeito da colchicina sobre células vegetais, Caperta et al (2006) apresentaram aspectos interessantes do efeito poliploidizante da colchicina sobre células de *Secale cereale*. Segundo estes autores, baixas concentrações (em torno de 0.5mM) induzem a despolimerização

dos microtúbulos. Em contraste, altas concentrações (em torno de 5mM), após induzirem despolimerização dos microtúbulos e a formação de c-metáfases, provocaram uma resposta celular e o aparecimento de estruturas contendo novas tubulinas nestas células. Os resultados demonstraram que somente esta alta concentração de colchicina foi efetiva na indução de células poliploides. Os autores sugerem que apenas a desintegração do aparato de microtúbulos é insuficiente para a indução de células poliploides e que o aparecimento desta nova estrutura contendo tubulina seria a responsável pela duplicação do número de cromossomos. Segundo estes autores, as baixas concentrações acabam por gerar uma enorme quantidade de células com anormalidades e conduzem a um processo de morte celular. Estes resultados são interessantes, uma vez que grande parte dos trabalhos utiliza concentrações inferiores às que estes autores demonstraram como eficientes.

Interessantemente, a concentração demonstrada como a mais efetiva na indução de poliploidia no experimento 1, 0,2%, é a mesma evidenciada por Caperta et al. (2006), 5mM.

Corroborando estes resultados, o experimento 2 foi realizado com uma amostragem maior de plantas. Nesta fase escolhido primeiramente o tratamento mais eficiente no experimento anterior (0,2% de colchicina à 4h de exposição). Paralelamente foi utilizada uma concentração 10X menor de colchicina (0,02% por 72h). Do mesmo modo como discutido anteriormente, neste experimento também existiu uma relação entre dosagem/tempo de exposição à colchicina com sobrevivência das plantas. Entretanto, os resultados de indução de poliploidia não mostraram-se de acordo com o esperado em relação ao experimento 1. Mas do mesmo modo, a única planta evidenciada como poliploide neste experimento foi proveniente novamente do tratamento com colchicina 0,2% (5mM). Nota-se, portanto, que em ambos os experimentos aqui realizados, as plantas poliploides foram obtidas com concentrações altas de colchicina (0,2% e 0,5%). Concentrações altas de colchicina também foram efetivas na indução de poliploidia para outras espécies, como *Chaenomeles japônica* (0,3% a 0,9%) (STANYIS et al., 2006); *Brassica campestris* (0,6%) (KUMAR e DWIVEDI, 2014); *Echium moenum* (1%) (AZOUSH, KAZEMITABAR e HEIDARI, 2014); *Cannabis sativa* (0,2%) (BAGHERI e MANSOURI, 2015). O trabalho de Blasco, Badenes e Naval (2015) também apoia os resultados aqui encontrados. Os autores concluem que a concentração de 0,5%,

uma das que produziram poliploides no experimento 1 com *L. alba*, foi a mais eficiente na indução de poliploidia, e que isso não dependeu do tempo de exposição, assim como para *L. alba*, em que a concentração de 0,2% produziu poliploides tanto em tempo curto quanto em tempo longo (4 e 72 horas). Além disso, os autores constataram que tratamentos mais agressivos, apesar de causarem alta mortalidade, tem a capacidade de gerar uma maior porcentagem de poliploides estáveis, ou seja, aqueles que mantem a ploidia com o passar dos anos.

Esses mesmos tratamentos empregados no experimento 2 foram investigados no experimento 3. Neste experimento, os meristemas dos explantes expostos aos tratamentos com colchicina foram avaliados por citometria de fluxo em intervalos regulares de recuperação, com o objetivo de averiguar as modificações de ploidia. A presença de células poliploides após exposição à colchicina 0,2% por 4h pode ser observada após 14h de recuperação. Este efeito é evidenciado pela presença de um pico 8C de quantidade de DNA, o que evidencia a presença de células em G2 do ciclo celular, mas que originalmente apresentam 4C de DNA em G1. Para praticamente todos os tratamentos, após 14h de recuperação, este efeito foi observado. Um aumento do percentual de células com 4C de DNA em relação ao controle também foi adotado como um critério da identificação de células poliploides. Para nenhum dos outros tratamentos investigados este efeito foi tão evidente, novamente corroborando a observação de que a concentração de 0,2% de colchicina representou o tratamento mais efetivo na indução de poliploidia neste trabalho.

Um efeito evidente quando observamos os demais tratamentos é a diminuição de células em 4C, ou seja, uma diminuição das células entrando em mitose após os tratamentos. Este efeito é observado em paralelo com o aumento de partículas sub-G1. A diminuição do percentual de células em 4C nos tratamentos de 0,02% 4 e 72 horas pode também ser indício de que concentrações baixas, independente do tempo de exposição, causam morte celular, concordando com as conclusões de Caperta et al. (2006).

Um aspecto interessante dos resultados foi percebido após 2 meses da indução de poliploidia, quando as plantas obtidas nestes experimentos foram aclimatizadas. Neste estágio uma nova análise por citometria de fluxo (dados não mostrados) foi realizada a fim de confirmar o estado poliploide e mixoploide das

plantas. As plantas poliploides mantiveram a ploidia, mas as plantas mixoploides, que antes possuíam células diploides e tetraploides, revelaram-se com quantidade de DNA intermediária entre diploide e triploide, o que é um indício de que estejam retornando à condição de diploidia.

Uma outra observação foi o crescimento lento e o insatisfatório desempenho *in vitro* das plantas poliploides. Elas se mostraram mais lentas em crescimento que as plantas diploides e, antes de atingirem tamanho razoável, já se mostravam carentes de nova repicagem, o que pode ser consequência de um genoma muito grande e replicação do DNA mais lenta. Esses resultados são contrários aos de El-Naby et al. (2012), em que os pesquisadores relatam que, em todos os genótipos em que foi induzida a poliploidia, as plantas se mostraram mais vigorosas. Por outro lado, os resultados com *L. alba* são coerentes com os obtidos por de Sajjad et al. (2013) com a espécie *Tagetes erecta*, em que o crescimento dos brotos também foi retardado e, quanto mais forte o tratamento com colchicina, mais esse efeito se acentuava. Isso mostra que a colchicina pode gerar essa consequência na regeneração dos explantes.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo obteve êxito em induzir autotetraploides artificiais de *L. alba* utilizando a colchicina e as técnicas de cultura de tecidos vegetais *in vitro*.

A concentração de 0,2% e 0,5% de colchicina foi capaz de produzir plantas autotetraploides de *L. alba*.

As concentrações altas apresentaram maior efeito de alteração de ploidia nos explantes de *L. alba* tratados.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, J. C.; DAVIDE, L. C.; PEREIRA, A. V.; BARBOSA, S. 2006. Mixoploidia em híbridos de capim elefante X milho tratados com agentes antimitóticos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. **41**: 1629-1635.
- ARYAVAND, A.; EHDAIE, B.; TRAN, B.; WAINES, J. G. 2003. Stomatal frequency and size differentiate ploidy levels in *Aegilops neglecta*. **Genetic Resources and Crop Evolution**. **50**:175-182.
- AZOUSH, S.; KAZEMITABAR, S. K.; HEIDARI, P. 2014. Polyploidy induction in Iranian Borage (*Echium amoenum* L.) by colchicine treatment. **Biharean Biologist**. **8(2)**: 87-89.
- BAGHERI, M.; MANSOURI, H. 2015. Effect of induced polyploidy on some biochemical parameters in *Cannabis sativa* L. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. **175**: 2366–2375.
- BAI, C.; ALVERSON, W. S.; FOLLANSBEE, A.; WALLER, D. M. 2012. New reports of nuclear DNA content for 407 vascular plant taxa from the United States. **Annals of Botany**. **110**: 1623–1629.
- BARBOSA, S.; DAVIDE, L. C.; PEREIRA, A. V.; ABREU, J. C. 2007. Duplicação cromossômica de híbridos triploides de capim-elefante e milho. **Bragantia**. **66**: 365-372.
- BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. 2009. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**. **32 (3)**: 588-594.
- BLAKESLEE, A.F.; AVERY, A.G. 1937. Methods of inducing doubling of chromosomes in plants: By Treatment With Colchicine. **Journal of Heredity**. **28(12)**:393-411.
- BLASCO, M.; BADENES, M. L.; NAVAL, M. M. 2015. Colchicine-induced polyploidy in loquat (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. **120**:453–461.
- BOSE R. B., CHOUDHURYJ. K. 1960. Cytological studies in *L. alba* (Mill) N. E. Br. **Bulletin of the Botanical Society of Bengal**. **14**: 71–72.
- BRANDÃO, A. D. 2003. **Citogenética comparativa dos gêneros Lippia, Lantana e Aloysia (Verbenaceae, Lamiales)**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Brasil, Campinas. 128p.
- BRANDÃO, A. D.; VICCINI, L. F.; SALIMENA, F. R. G.; VANZELA, A. L. L.; RECCO-PIMENTEL, S. M. 2007. Cytogenetic characterization of *Lippia alba* and *Lantana camara* (Verbenaceae) from Brazil. **Journal of Plant Research**. **120**: 317–321.

CAMPOS, J. M. S.; DAVIDE, L. C.; SALGADO, C. C.; SANTOS, F. C.; COSTA, P. N.; SILVA, P. S.; ALVES, C. C. S.; VICCINI, L. F.; PEREIRA, A. V. 2009. *In vitro* induction of hexaploid plants from triploid hybrids of *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum*. **Plant Breeding**. **128**: 101-104.

CAPERTA, A.D; DELGADO, M.; RESSURREIÇÃO, F.; MEISTER, A.; JONES, R. N.; VIEGAS, W.; HOUBEN, A. 2006. Colchicine-induced polyploidization depends on tubulin polymerization in c-metaphase cells. **Protoplasma**. **227**: 147–153.

CARVALHO, J. F. R. P.; CARVALHO, C. R.; OTONI, W. C. 2005. *In vitro* induction of polyploidy in annatto (*Bixa orellana*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. **80**: 69-75.

CHAKRABORTI, S. P.; VIJAYAN, K.; ROY, B. N.; QADRI, S. M. H. 1998. *In vitro* induction of tetraploidy in mulberry (*Morus alba* L.). **Plant Cell Reports**. **17**: 799-803.

CHEN, Z.J. 2010. Molecular mechanisms of polyploidy and hybrid vigor. **Trends in Plant Science**. **15**: 57- 71.

CIRES, E.; CUESTA, C.; REVILLA, M. A.; PRIETO, J. A. F. 2010. Intraspecific genome size variation and morphological differentiation of *Ranunculus parnassifolius* (Ranunculaceae), an Alpine–Pyrenean–Cantabrian polyploid group. **Biological Journal of the Linnean Society**. **101**: 251–271.

CÔRTE-REAL, M.; SANSONETTY, F.; LUDOVICO, P.; PRUDÊNCIO, C.; RODRIGUES, F.; FORTUNA, M.; SOUSA, M.; SILVA, M. E LEÃO, C. 2002. Contributos da citologia analítica para estudos de biologia de leveduras. **Boletim de Biotecnologia**. **71**: 19-33.

CRONK, Q.C.B. 2001. Plant evolution and development in a post-genomic context. **Nature Reviews**. **2**:607-619.

CUCO, S. M.; MONDIN, M.; VIEIRA, M. L. C.; AGUIAR-PERECIN, M. L. R. 2003. Técnicas para a obtenção de preparações citológicas com alta frequência de metáfases mitóticas em plantas: Passiflora (Passifloraceae) e Crotalaria (Leguminosae). **Acta Botanica Brasilica**. **17(3)**: 363-370.

CUI, L.; KERR WALL, P.; LEEBENS-MACK, J. H.; LINDSAY, B. G.; SOLTIS, D. E.; DOYLE, J. J.; SOLTIS, P. S.; CARLSON, J. E.; ARUMUGANATHAN, K.; BARAKAT, A.; ALBERT, V. A.; MA, H.; PAMPHILIS, C. W. 2006. Widespread genome duplications throughout the history of flowering plants. **Genome Research**. **16**: 738–749.

DAGLA, H. R. 2012. Plant Tissue Culture Historical Developments and Applied Aspects. **Resonance**. **17(8)**: 759-767.

DAY, M. D.; MC ANDREW, T. D.; 2003. The biology and host range of *Falconia intermedia* (Hemiptera: Miridae), a potential biological control agent for *Lantana*

- camara* (Verbenaceae) in Australia. **Biocontrol Science and Technology**. **13**: 13–22.
- DE WET, J.M.J. 1980. **Origins of polyploids**. In: LEWIS, W.H. Polyploidy: biological relevance. New York: Plenum. p. 3-15.
- DERMEN, H. 1938. A cytological analysis of polyploidy induced by colchicine and by extremes of temperature. **Journal of Heredity**. **29 (6)**: 211-229.
- DEWEY, D.R. 1980. Some Applications and misapplications of induced polyploidy to plant breeding. **Basic Life Sciences**. **13**:445-470.
- DEWITTE, W. E MURRAY, J.A.H. 2003. The plant cell cycle. **Plant Biology**. **54**: 235-264.
- 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**:359–373.
- DOLEŽEL, J. 1997. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics**. **38 (3)**: 285-302.
- DOLEŽEL, J. e BARTOŠ, J. 2005. Plant DNA Flow Cytometry and Estimation of Nuclear Genome Size. **Annals of Botany**. **95**: 99–110.
- DUTT, M.; VASCONCELLOS, M.; SONG, K. J.; GMITTER JR., F. G.; GROSSER, J. W. 2010. *In vitro* production of autotetraploid Ponkan mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) using cell suspension cultures. **Euphytica**. **173**: 235-242.
- EL-NABY, Z. M. A.; MOHAMED, N. A.; RADWAN, K. H.; EL-KHISHIN, D. A. 2012. Colchicine induction of polyploidy in egyptian clover genotypes. **Journal of American Science**. **8(10)**: 221-227.
- ESCANDÓN, A. S.; HAGIWARA, J. C.; ALDERETE, L. M. 2006. A new variety of *Bacopa monnieri* obtained by *in vitro* polyploidization. **Electronic Journal of Biotechnology**. **9(3)**: 181-186.
- FOSCHI, M. L.; MARTÍNEZ, L. E.; PONCE, M. T.; GALMARINI, C. R.; BOHANEK, B. 2013. Effect of colchicine and amiprofos-methyl on the production of *in vitro* doubled haploid onion plants and correlation assessment between ploidy level and stomatal size. **Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias**. **45(2)**: 155-164.
- GALBRAITH, D. W.; HARKINS, K. R.; MADDOX, J. M.; AYRES, N. M.; SHARMA, D. P.; FIROOZABADY, E. 1983. Rapid flow cytometric analysis of the cell-cycle in intact plant-tissues. **Science** **220 (4601)**: 1049-1051.

GALBRAITH, D. W.; LAMBERT, G. M. 2012. High-Throughput Monitoring of Plant Nuclear DNA Contents Via Flow Cytometry. **Methods in Molecular Biology**. **918**: 311-325.

GEOFFRIAU, E; KAHANE, R; BELLAMY, C; RANCILLAC, M. 1997. Ploidy stability and *in vitro* chromosome doubling in gynogenic clones of onion (*Allium cepa* L.). **Plant Science**. **122**: 201-208.

GŁOWACKA, K.; JEZOWSKI, S.; KACZMAREK, Z. 2010. *In vitro* induction of polyploidy by colchicine treatment of shoots and preliminary characterisation of induced polyploids in two *Miscanthus* species. **Industrial Crops and Products**. **Industrial Crops and Products**. **32**: 88–96.

GOTTLIEB, L.D. 2003. Plant polyploidy: gene expression and genetic redundancy. **Heredity**. **91**: 91–92.

GU, X. F.; YANG, A. F.; MENG, H.; ZHANG, J. R. 2005. *In vitro* induction of tetraploid plants from diploid *Zizyphus jujuba* Mill. Cv. Zanhua. **Plant Cell Report**. **24**: 671-676.

GULL, I.; NOREEN, A.; ASLAM, M. S.; ATHAR, M. A. 2014. Comparative effect of different phytohormones on the micropropagation of *Allium sativum*. **Pakistan Journal of Biochemistry and Molecular Biology**. **47(1-2)**: 121-124.

GUO, R.; ZHAO, J.; WANG, X.; GUO, C.; LI, Z.; WANG, Y.; WANG, X. 2015. Constitutive expression of a grape aspartic protease gene in transgenic *Arabidopsis* confers osmotic stress tolerance. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. **121**:275–287.

GUPTA, S. K.; KHANUJA, S. P. S.; KUMAR, S. 2001. *In vitro* micropropagation of *Lippia alba*. **Current Science**. **81(2)**: 206-210.

HAMILL, S.; SMITH, M.; DODD, W. 1992. *In vitro* induction of banana autotetraploids by colchicine treatment of micropropagated diploids. **Australian Journal of Botany**. **40**:887–896.

HANSEN, N.J.P.; ANDERSEN, S.B. 1996. *In vitro* chromosome doubling potential of colchicine, oryzalin, trifluralin, and APM in *Brassica napus* microspore culture. **Euphytica**. **88**: 159-164.

HÄNTZSCHEL, K. R.; WEBER, G. 2010. Blockage of mitosis in maize root tips using colchicine-alternatives. **Protoplasma**. **241**: 99-104.

HEGARTY, M.; COATE, J.; SHERMAN-BROYLES, S.; ABBOTT, R.; HISCOCK, S.; DOYLE, J. 2013. Lessons from Natural and Artificial Polyploids in Higher Plants. **Cytogenetic and Genome Research**. **140**:204–225.

- HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; JOSEPH, H.; BAILLEU, F. 2008. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. **Journal of Ethnopharmacology**. **116**:211–222.
- HILL, P.; GUTIERREZ, B.; CARMACK, L.; KOPP, O. R. 2015. Micropropagation of *Astragalus holmgreniorum* (Holmgren milkvetch), an endemic and endangered species. 2015. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. **121**: 381–387.
- ILIEV, I. 2008. E. F. George, M. A. Hall, and G.-J. De Klerk (eds), Plant propagation by tissue culture. Volume 1. The background 3rd edn. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. **93**:353–355.
- JORDAN, M.A.; WILSON, L. 1999. The use and action of drugs in analyzing mitosis. **Methods in Cell Biology**. **61**:267-295.
- JULIÃO, L.S.; TAVARES, E.S.; LAGE, C.L.S.; LEITÃO, S.G. 2003. Cromatografia em camada fina de extratos de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill) N. E. Br. (erva-cidreira). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. **13(1)**:36-38.
- KADOTA, M.; NIIMI, Y. 2002. *In vitro* induction of tetraploid plants from a diploid Japanese pear cultivar (*Pyrus pyrifolia* N. cv. Hosui). **Plant Cell Report**. **21**: 282-286.
- KATO, A. 2002. Chromosome doubling of haploid maize seedlings using nitrous oxide gas at the flower primordial stage. **Plant Breeding**. **121**: 370-377.
- KAUR, D.; SINGHAL, V. K. 2012. Phenomenon of Cytomixis and Intraspecific Polyploidy (2x, 4x) in *Spergularia diandra* (Guss.) Heldr. & Sart. in the Cold Desert Regions of Kinnaur District (Himachal Pradesh). **Cytologia** **77(2)**: 163–171.
- KEELER, K. H. 2004. Impact of Intraspecific Polyploidy in *Andropogon gerardii* (Poaceae) Populations. **The American Midland Naturalist**. **152(1)**:63-74.
- KERMANI, M. J.; SARASAN, V.; ROBERTS, A. V.; YOKOYA, K.; WENTWORTH, J.; SIEBER, V. K. 2003. Oryzalin-induced chromosome doubling in *Rosa* and its effect on plant morphology and pollen viability. **Theoretical and Applied Genetics**. **107(7)**: 1195-1200.
- KHOSRAVI, P.; KERMANI, M. J.; NEMATZADEH, G. A.; BIHAMTA, M. R.; YOKOYA, K. 2007. Role of mitotic inhibitors and genotype on chromosome doubling of *Rosa*. **Euphytica**. **160**: 267-275.
- KUMAR, G.; DWIVEDI, K. 2014. Induced polyploidization in *Brassica campestris*. **Cytology and Genetics**. **48(2)**: 103–110.
- KWON, S. J.; CHO, K. Y.; KIM, H. H. 2014. Medium composition and growth regulator on organogenesis *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC. With yellow green petals. **Korean Journal of Plant Resources**. **27(1)**: 043-050.
- LARGIA, M. J. V.J.; SHILPHA, A.; POTHIRAJ, G.; RAMESH, M. 2015. Analysis of nuclear DNA content, genetic stability, Bacoside A quantity and antioxidant potential

of long term *in vitro* grown germplasm lines of *Bacopa monnieri* (L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 120(1):** 399-406.

LATTIER, J. D.; TOUCHELL, D. H.; RANNEY, T. G.; 4, SMITH, J. C. 2013. Micropropagation and polyploid induction of *Acer platanoides* crimson sentry. **Journal of Environmental Horticulture. 31(4):**246–252.

LAVANIA, U. C. 2005. Genomic and ploidy manipulation for enhanced production of phyto-pharmaceuticals. **Plant Genetic Resources. 3(2):** 170–177.

LAVANIA, U. C.; SRIVASTAVA, S.; LAVANIA, S.; BASU, S.; MISRA, N. K.; MUKAI, Y. 2012. Autopolyploidy differentially influences body size in plants, but facilitates enhanced accumulation of secondary metabolites, causing increased cytosine methylation. **The Plant Journal. 71:** 539–549.

LAZAREVA, E.M.; POLYAKOV, V.Y.; CHENTSOV, Y.S.; SMIRNOVA, E.A. 2003. Time and cell cycle dependent formation of heterogeneous tubulin arrays induced by colchicine in *Triticum aestivum* root meristem. **Cell Biology. 27:** 633–646

LEHRER, J.M.; BRAND, M.H.; LUBELL, J.D. 2008. Induction of tetraploidy in meristematically active seeds of Japanese barberry (*Berberis thunbergii* var. *atropurpurea*) through exposure to colchicine and oryzalin. **Scientia Horticulturae. 119:**67–71.

LEVIN, D. A. 1983. Polyploidy and novelty in flowering plants. **The American Naturalist. 122:** 1–25.

LIU, S.; CHEN, S.; CHEN, Y.; GUAN, Z.; YIN, D.; CHEN, F. 2011. *In vitro* induced tetraploid of *Dendranthema nankingense* (Nakai) Tzvel. shows an improved level of abiotic stress tolerance. **Scientia Horticulturae. 127:** 411-419.

LIU, Z.; GAO, S. 2007. Micropropagation and induction of autotetraploid plants of *Chrysanthemum cinerariifolium* (Trev.) Vis. **In vitro Cell. 43:** 404-408.

LOUREIRO, J.C.M. 2007. **Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal.** Tese, Universidade de Aveiro, Portugal, Aveiro, 246p.

LU, C. E BRIDGEN, M.P. 1997. Chromosome doubling and fertility study of *Alstroemeria aurea* X *A. caryophyllaea*. **Euphytica. 94:** 75-81.

MADLUNG, A. 2013. Polyploidy and its effect on evolutionary success: old questions revisited with new tools. **Heredity. 110:** 99–104.

MALKINSON, F.D. 1982. Colchicine: New Uses of an Old, Old Drug. **Archives of Dermatology. 118(7):**453-457.

MAMUN-OR-RASHID, A.N.M.; SEN, M.K.; JAMAL, M.A.H.M.; NASRIN, S. 2013. A comprehensive ethno-pharmacological review on *Lippia alba* M. **International Journal of Biomedical Materials Research**. **1(1)**: 14-20.

MANABE, P. M. S.; MATOS, C. C.; FERREIRA, E. A.; SILVA, A. A.; SEDIYAMA, T.; MANABE, A.; SILVA, A. F.; ROCHA, P. R. R.; GALON, L. 2014. Características fisiológicas de feijoeiro em competição com plantas daninhas. **Bioscience Journal**. **30(6)**: 1721-1728.

MANARA, W.; MANARA, N. T. F.; MAGNAVACA, R.; VALOIS, A. C. C.; SAMPAIO, H. S. V. 1973. **Centro Ciências Rurais**. **3**: 51- 56.

MANICA-CATTANI, M. F.; ZACARIA, J.; PAULETTI, G.; ATTI-SERAFINI, L.; CHEVERRIGARAY, S. 2009. Genetic variation among South Brazilian accessions of *Lippia alba* Mill. (Verbenaceae) detected by ISSR and RAPD markers. **Brazilian Journal of Biology**. **69(2)**: 375-380.

MASTERSON, J. 1994. Stomatal size in fossil plants: Evidence for polyploidy in majority of angiosperms. **Science**. **264**: 421- 424.

MATOS, F.J.A. 2000. **Plantas Medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil**. 2ªed. Fortaleza: Imprensa Universitária. 346 p.

MAYO, O. 1970. The role of duplications in evolution. **Heredity**. **25**: 543-553.

MEDINA, D.M.; LONGO, C.R.L.; CRUZ, N.D.; AZZINI, L.E.; USBERTI FILHO, J.A. 1972. Poliploidização em berinjela (*Solanum melogena* L.) - I. tratamento de sementes pela colquicina. **Bragantia**. **31**: 275-287.

MOREJOHN, L.C.; FOSKET, D.E. 1991. The biochemistry of compounds with anti-microtubule activity in plant cells. **Pharmacology & Therapeutics**. **51**: 217–230.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, **15**:473–497.

NASSAR, N. M. A. 2006. Chromosome doubling induces apomixis in a *Cassava* X *Manihot anomala* hybrid. **Hereditas**.**143**: 246-248.

NIEL, E.; SCHERRMANN, J. M. 2006. Colchicine today. **Joint Bone Spine**. **73**: 672–678.

NIMURA, M.; KATO, J.; HORAGUCHI, H.; MII, M.; SAKAI, K.; KATOH, T. 2006. Induction of fertile amphidiploids by artificial chromosome-doubling in interespecific hybrid between *Dianthus caryophyllus* L. and *D. japonicus thunb*. **Breeding Science**. **56**: 303-310.

NOGUEIRA, M.A.; DIAZ, G.; SAKUMO, L.; TAGAMI, P.M. 2007. Antibacterial Activity of *Lippia alba* (Lemon Herb). **Latin American Journal of Pharmacy. 26 (3):** 404-406.

OUMAR, D.; SAMA, A. E.; ADIOBO, A.; ZOK, S. 2011. Determination of ploidy level by flow cytometry and autopolyploid induction in cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*). **African Journal of Biotechnology. 10(73):** 16491-16494.

PASAKINSKIENE, I. 2000. Culture of embryos and shoot tips for chromosome doubling in *Lolium perene* and sterile hybrids between *Lolium* and *Festuca*. **Plant Breeding. 119:** 185-187.

PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; MATA, D.S.; VILLAR, A. 2001. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology. 76:**201–214.

PEER, Y.V.P.; MAERE, S.; MEYER, A. 2009. The evolutionary significance of ancient genome duplications. **Nature Reviews. 10:** 725-732.

PELLICER, J. e LEITCH, I.J. 2014. The Application of Flow Cytometry for Estimating Genome Size and Ploidy Level in Plants. **Molecular Plant Taxonomy-Methods in Molecular Biology. 1115:** 279-307.

PETERSEN, K. K.; HAGBERG, P.; KRISTIANSEN, K. 2002. *In vitro* chromosome doubling of *Miscanthus sinensis*. **Plant Breeding. 121:** 445-450.

PIERRE, P. M. O.; SOUSA, S. M.; DAVIDE, L. C.; MACHADO, M. A.; VICCINI, L. F. 2011. Karyotype analysis, DNA content and molecular screening in *Lippia alba* (Verbenaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências. 83(3):** 993-1005.

PINHEIRO, A. A.; POZZOBON, M. T.; VALLE, C. B.; PENTEADO, M. I. O.; CARNEIRO, V. T. C. 2000. Duplication of the chromosome number of diploid *Brachiaria brizantha* plants using colchicine. **Plant Cell Reports. 19:** 274-278.

PINTO, D.L.P.; BARROS, B.A.; VICCINI, L.F. CAMPOS, J.M.S.; SILVA, M.L.; OTONI, W.C. 2010. Ploidy stability of somatic embryogenesis-derived *Passiflora cincinnata* Mast. plants as assessed by flow cytometry. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 103(1):** 71-79.

QUADER, H. 1998. Cytoskeleton: Microtubules. **Progress in Botany. 59:** 375-395.

QUESENBERRY, K. H.; DAMPIER, J. M.; LEE, Y. Y.; SMITH, R. L.; ACUÑA, C. A. 2010. Doubling the chromosome number of bahiagrass via tissue culture. **Euphytica. 175:** 43-50.

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

- REIS, A. C.; SOUSA, S. M.; VALE, A. A.; PIERRE, P. M. O.; FRANCO, A. L.; CAMPOS, J. M. S.; VIEIRA, R. F.; VICCINI, L. F. 2014. *Lippia alba* (Verbenaceae): A new tropical autopolyploid complex?. **American Journal of Botany**. **101(6)**: 1002-1012.
- ROHOLLAHI, I.; KHOSHKHOLGHESIMA, N. A.; YAMADA, T.; KAFI, M.; HOSHINO, Y.; LIAGHAT, A.; JAFARI, A. A. 2015. Evaluation of seedling emergence and relative DNA content under dry soil conditions of wild *Festuca arundinacea* populations collected in Iran. **Grassland Science**. **61**:6–14.
- ROSE, J. B.; KUBBA, J.; TOBUTT, K. R. 2000a. Chromosome doubling in sterile *Syringa vulgaris* X *S. pinnatifolia* hybrids by *in vitro* culture of nodal explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. **63**: 127-132.
- ROSE, J. B.; KUBBA, J.; TOBUTT, K. R. 2000b. Induction of tetraploidy in *Buddleia globosa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. **63**: 121-125.
- ROY, A. T.; LEGGETT, G.; KOUTOULIS, A.. 2001. *In vitro* tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in hop (*Humulus lupulus* L.). **Plant Cell Report**. **20**: 489-495.
- 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**: 259-261.
- SACHS, L. 1952. Polyploid evolution and mammalian chromosomes. **Heredity**. **6**: 357-364.
- SAJJAD, Y.; JASKANI, M. J.; MEHMOOD, A.; AHMAD, I.; ABBAS, H. 2013. Effect of colchicine on *in vitro* polyploidy induction in african marigold (*Tagetes erecta*). **Pakistan Journal of Botany**. **45(3)**: 1255-1258.
- SALIMENA, F. R. G. 2000a. **Revisão taxonômica de *Lippia* L. sect. *Rhodolippia Schauer* (Verbenaceae)**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Brasil, São Paulo. 208p.
- SALIMENA, F. R. G. 2000b. Novos sinônimos e tipificações em *Lippia* sect. *Rhodolippia* (Verbenaceae). **Darwiniana**. **40(1-4)**: 121-125.
- SALON, P. R.; EARLE, E. D. 1998. Chromosome doubling and mode of reproduction of induced tetraploids of eastern gamagrass (*Tripsacum dactyloides* L.). **Plant Cell Reports**. **17**: 881-885.
- SHAO, J; CHEN, C; DENG, X. 2003. *In vitro* induction of tetraploid in pomegranate (*Punica granatum*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. **75**: 241-246.
- SHI, Q.; LIU, P.; LIU, M.; WANG, J.; XU, J. 2015. A novel method for rapid *in vivo* induction of homogeneous polyploids via calluses in a woody fruit tree (*Ziziphus jujuba* Mill.). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. **121**: 423–433.

- SILVA, P. A. K. X. M.; CALLEGARI-JACQUES, S.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. 2000. Induction and identification of polyploids in *Cattleya intermedia* Lindl. (Orchidaceae) by *in vitro* techniques. **Ciência Rural**. **30(1)**: 105-111.
- SIMIONI, C.; VALLE, C. B. 2011. Meiotic analysis in induced tetraploids of *Brachiaria decumbens* Stapf. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**. **11**: 43-49.
- SINGH, G., RAO, G.P., KAPOOR, P.S., SINGH, O.P., 2000. Chemical constituents and antifungal activity of *Lippia alba* Mill. leaf essential oil. **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences**. **22**: 701–703.
- SOARES, B.V.; TAVARES-DIAS, M. 2013. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. **Biota Amazônica**. **3**: 109-123.
- SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; TATE, J. A. 2003. Advances in the study of polyploidy since *Plant speciation*. **New Phytologist**. **161**: 173–191.
- SOUZA, F. F.; QUEIRÓZ, M. A. 2004. Avaliação de caracteres morfológicos úteis na identificação de plantas poliplóides de melancia. **Horticultura Brasileira**. **22**: 516-520.
- SOUZA-KANESHIMA, A.M; SIMIONI, C.; FELISMINO, M.F.; MENDES-BONATO, A.B.; RISSO-PASCOTTO, C.; PESSIM, C.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. 2010. Meiotic behaviour in the first interspecific hybrids between *Brachiaria brizantha* and *Brachiaria decumbens*. **Plant Breeding**. **129(2)**:186-191.
- 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**: 236-268.
- STEBBINS, G.L. 1971. **Chromosomal evolution in higher plants**. Reading: Addison-Wesley. 216.
- SUN, Q. R.; SUN, H. S.; LI, L. G.; BELL, R. L. 2009. *In vitro* colchicine-induced polyploid plantlet production and regeneration from leaf explants of the diploid pear (*Pyrus communis* L.) cultivar 'Fertility'. **Journal Horticultural Science and Biotechnology**. **84(5)**:548–552.
- SYBENGA, J. 1992. **Cytogenetics in plant breeding**. Berlin: Springer. 469.
- TAMBONG, J. T.; SAPRA, V. T.; GARTON, S. 1998. *In vitro* induction of tetraploids in colchicine-treated cocoyam plantlets. **Euphytica**. **104**: 191-197.
- TANG, Z. O.; CHEN, D. L.; SONG, Z. J.; HE, Y. C.; CAI, D. T. 2010. *In vitro* induction and identification of tetraploid plants of *Paulownia tomentosa*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. **102**: 213-220.

- TEIXEIRA, A. B. 2009. **Avaliação agrônômica e identificação de quimiotipos de erva cidreira no Distrito Federal**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Ceará, Brasil, Fortaleza. 139p.
- TEL-ZUR, N.; DUDAI, M.; RAVEHC, E.; MIZRAHI, Y. 2011. In situ induction of chromosome doubling in vine cacti (Cactaceae). **Scientia Horticulturae**. **129**: 570 – 576.
- THORPE, T. A. 2007. History of plant tissue culture. Molecular. **Biotechnology**. **37**:169–180.
- URWIN, N. A. R.; HORSNELL, J.; MOON, T. 2007. Generation and characterisation of colchicine-induced autotetraploid *Lavandula angustifolia*. **Euphytica**. **156**: 257-266.
- VAINOLA, A. 2000. Polyploidization and early screening of Rhododendron hybrids. **Euphytica**. **112**: 239-244.
- VALE, T.G.; MATOS, F.J.A.; LIMA, T.C.M.; VIANA, G.S.B. 1999. Behavioral effects of essential oils from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown chemotypes. **Journal of Ethnopharmacology**. **167**:127-133.
- VICCINI, L. F.; SILVEIRA, R. S.; VALE, A. A.; CAMPOS, J. M. S.; REIS, A. C.; SANTOS, M. O.; CAMPOS, V. R.; CARPANEZ, A. G.; GRAZUL, R. M. 2014. Citral and linalool content has been correlated to DNA content in *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae). **Industrial Crops and Products**. **59**: 14-19.
- VICHIATO, M. R. M.; VICHIATO, M.; CASTRO, D. M.; DUTRA, L. F.; PASQUAL, M.; MARCHIORI JÚNIOR, W.; LIMA, C. D. F.; SALGADO, C. C. 2006. Análises estomática e morfométrica de folhas de plantas diplóides e tetraplóides de *Dendrobium nobile* Lindl. **Ceres**. **53(310)**: 541-548.
- WANG, C.; LEI, J. 2012. *In vitro* induction of tetraploids from immature embryos through colchicine treatments in *Clivia miniata* Regel. **African Journal of Agricultural Research**. **7(25)**: 3712-3718.
- WHITE, M.J.D. 1940. Evidence for polyploidy in the hermaphrodite groups of animals. **Nature**. **146**: 132-133.
- WITTMANN, M. T. S.; DALL'AGNOL, M. 2003. Indução de poliploidia no melhoramento de plantas. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**. **9**: 155-164.
- WU, J. H.; MOONEY, P. 2002. Autotetraploid tangor plant regeneration from *in vitro* citrus somatic embryogenic callus treated with colchicine. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. **70**:99–104.

- 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**: 217-224.
- YANG, X.; YE, C.; CHENG, Z.; TSCHAPLINSKI, T. J.; WULLSCHLEGER, S. D.; YIN, W.; XIA, X.; TUSKAN, G. A. 2011. Genomic aspects of research involving polyploid plants. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. **104**:387–397.
- YANG, Z.; SHEN, Z.; TETREAU, H.; JOHNSON, L.; FRIEBE, B.; FRAZIER, T.; HUANG, L.; BURKLEW, C.; ZHANG, X.; ZHAO, B. 2014. Production of autopolyploid lowland switchgrass lines through *in vitro* chromosome doubling. **Bioenergy Research**. **7**: 232–242.
- YETISIR, H. e SARI, N. 2003. A new method for haploid muskmelon (*Cucumis melo* L.) dihaploidization. **Scientia Horticulturae**. **98**: 277-283.
- YU, C. Y.; KIM, H. S.; RAYBURN, A. L.; WIDHOLM, J. M.; JUVIK, J. A. 2009. Chromosome doubling of the bioenergy crop, *Miscanthus X giganteus*. **GCB Bioenergy**. **1**: 404-412.
- ZAHUMENICKA, P.; SYSOVA, B.; HOLIK, A.; FERNANDEZ C., E. 2013. *In vitro* induced mitotic polyploidy in *Drosera capensis* L. **Agricultura tropica et subtropica**. **46(4)**: 107-110.
- ZÉTOLA, M.; DE LIMA, T. C. M.; SONAGLIO, D.; GONZÁLEZ-ORTEGA, G.; LIMBERGER, R.P.; PETROVICK, P.R.; BASSANI, V.L. 2002. CNS activities of liquid and spray-dried extracts from *Lippia alba* - Verbenaceae (Brazilian false melissa). **Journal of Ethnopharmacology**. **82**:207-215.
- ZHANG, J; ZHANG, M; DENG, X. 2007b. Obtaining autotetraploids *in vitro* at high frequency in *Citrus sinensis*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. **89**: 211-216.
- ZHANG, Z.; DAI, H.; XIAO, M.; LIU, X. 2007a. *In vitro* induction of tetraploids in *Phlox subulata* L. **Euphytica**. **159**: 59-65.
- ZLESAK, D. C.; THILL, C. A.; ANDERSON, N. O. 2005. Trifluralin-mediated polyploidization of *Rosa chinensis minima*(Sims) Voss seedlings. **Euphytica**. **141**: 281-290.

8 ANEXO – Tabela de revisão bibliográfica sobre os métodos utilizados para duplicação cromossômica em plantas.

ESPÉCIE	TRATAMENTO	DETECÇÃO DE PLOIDIA	MÉTODO DE MAIOR SUCESSO	REFERÊNCIA
<i>Solanum melongena</i>	colchicina	contagem de cromossomos e análise estomática	Antes da germinação: col 0,4% 48 h, col 0,6% 24h e 48 h. Depois da germinação: col 0,1% 36 h, col 0,2% 24 h, col 0,4% 24 h.	Medina et al. (1972)
<i>Brassica napus</i>	colchicina, orizalina, trifluralina, APM (amiprofos-metil)	porcentagem de plantas férteis	Resultados muito semelhantes	Hansen e Andersen (1996)
Híbridos <i>Alstroemeria aurea</i> <i>X A. caryophyllaea</i>	colchicina	análise morfológica, contagem de cromossomos	*	Lu e Bridgen (1997)
<i>Allium cepa</i>	colchicina e orizalina	citometria de fluxo	colchicina 2,5 mM e orizalina 50 µM	Geoffriau et al. (1997)
<i>Tripsacum dactyloides</i>	colchicina e APM (amiprofos-metil)	contagem de cromossomos e citometria de fluxo	*	Salon e Earle (1998)
<i>Xanthosoma sagittifolium</i>	colchicina	contagem de cromossomos, citometria de fluxo e análise estomática	1,25mM e 2,5Mm	Tambong et al. (1998)

ESPÉCIE	TRATAMENTO	DETECÇÃO DE PLOIDIA	MÉTODO DE MAIOR SUCESSO	REFERÊNCIA
<i>Morus Alba</i>	colchicina	contagem de cromossomos, análise estomática e análise de cloroplastos	colchicina 0,1% 1 a 30 dias	Chakraborti et al. (1998)
Híbridos <i>Syringa vulgaris</i> X <i>S. pinnatifolia</i>	colchicina	contagem de cromossomos, análise morfológica e citometria de fluxo	*	Rose et al. (2000 ^a)
<i>Lolium perene</i> ; <i>Lolium</i> X <i>Fetusca</i>	colchicina	contagem de cromossomos	colchicina c/ sacarose 100g/L a 10° C	Pasakinskiene (2000)
<i>Brachiaria brizantha</i>	colchicina	contagem de cromossomos e citometria de fluxo	colchicina 0,01% 48 horas	Pinheiro et al. (2000)
<i>Cattleya intermédia</i>	colchicina	contagem de cromossomos e análise estomática	acesso CL 114: colchicina 0,05% 8 dias; acesso CL 121: colchicina 0,1% 8 dias	Silva et al. (2000)
<i>Buddleia globosa</i>	colchicina	citometria de fluxo e contagem de cromossomos	colchicina 0,1% 3 dias	Rose et al. (2000b)

ESPÉCIE	TRATAMENTO	DETECÇÃO DE PLOIDIA	MÉTODO DE MAIOR SUCESSO	REFERÊNCIA
Híbridos de Rhododendron	colchicina e orizalina	citometria de fluxo	orizalina 0,005%	Vainola (2000)
<i>Humulus lupulus</i>	colchicina	citometria de fluxo e análise estomática	colchicina 0,05% 48 horas	Roy et al. (2001)
<i>Zea mays</i>	gás óxido nitroso	*	*	Kato (2002)
<i>Miscanthus sinensis</i>	colchicina	*	*	Petersen et al. (2002)
<i>Pyrus pyrifolia</i>	colchicina	citometria de fluxo, análise estomática	colchicina 0,01% 2 dias	Kadota e Niimi (2002)
<i>Cucumis melo</i>	*	*	*	Yetisir e Sari (2003)
<i>Punica granatum</i>	colchicina	citometria de fluxo, contagem de cromossomos e análise morfológica (raiz, folha, flor)	*	Shao et al. (2003)
<i>Rosa</i>	orizalina	citometria de fluxo	orizalina 5 μ M em meio de cultura semisólido	Kermani et al. (2003)

ESPÉCIE	TRATAMENTO	DETECÇÃO DE PLOIDIA	MÉTODO DE MAIOR SUCESSO	REFERÊNCIA
<i>Bixa orellana</i>	colchicina e orizalina	contagem de cromossomos e nº de pares de marcadores heterocromáticos no maior cromossomo	15µM orizalina 15 dias	Carvalho et al. (2005)
<i>Zizyphusjuba</i>	colchicina	citometria de fluxo e contagem de cromossomos	colchicina 0,05% (48 horas e 72 horas) e colchicina 0,1% (24 horas e 48 horas)	Gu et al. (2005)
<i>Rosa chinensis minima</i>	colchicina e trifluralina	análise estomática, diâmetro do grão de pólen e contagem de cromossomos	trifluralina 0,0086%	Zlesak et al. (2005)
<i>Bacopa monnieri</i>	colchicina	citometria de fluxo e análise morfológica	*	Escandón et al. (2006)
Híbridos <i>Cassava X Manihot anomala</i>	colchicina	contagem de cromossomos	*	Nassar (2006)
<i>Chaenomeles japonica</i>	colchicina e orizalina	citometria de fluxo, análise estomática, análise de fruto	para microshoots: orizalina 30 a 40 µM e colchicina 0,05% a 0,9%; para cotilédones: colchicina 0,3% a 0,6% e orizalina 20 a 40µM	Stanys et al. (2006)

ESPÉCIE	TRATAMENTO	DETECÇÃO DE PLOIDIA	MÉTODO DE MAIOR SUCESSO	REFERÊNCIA
<i>Vitis vinifera</i>	colchicina	contagem de cromossomos, citometria de fluxo e análise estomática	colchicina 20 mg/L 1 dia	Yang et al. (2006)
<i>Dianthus caryophyllus X D. japonicus</i>	colchicina (para plantas <i>in vivo</i>) e APM (amiprofosmetil) e colchicina (para plantas <i>in vitro</i>)	citometria de fluxo e contagem de cromossomos	colchicina 2000 mg. 1-1 , 5 dias	Nimura et al. (2006)
<i>Pennisetum purpureum X P. glaucum</i>	colchicina e ciclohexamida: hidroxiquinoleína	contagem de cromossomos	colchicina e CHX:HQ apresentaram resultados semelhantes em diferentes tecidos	Abreu et al. (2006)
<i>Pennisetum purpureum X P. glaucum</i>	colchicina	contagem de cromossomos	colchicina 0,1% 24 horas	Barbosa et al. (2007)
<i>Lavandula angustifolia</i>	colchicina	*	*	Urwin et al. (2007)
<i>Colophospermum mopane</i>	colchicina	citometria de fluxo	colchicina 0,05% e 0,1% 48 horas	Rubuluza et al. (2007)

ESPÉCIE	TRATAMENTO	DETECÇÃO DE PLOIDIA	MÉTODO DE MAIOR SUCESSO	REFERÊNCIA
<i>Phlox subulata</i>	colchicina	contagem de cromossomos e análise morfológica	colchicina 0,05% 20 dias	Zhang et al. (2007 ^a)
<i>Chrysanthemum cinerariifolium</i>	colchicina	contagem de cromossomos e análise estomática	*	Liu e Gao (2007)
<i>Citrus sinensis</i>	colchicina	citometria de fluxo	colchicina autoclavada 1000 mg l ⁻¹ , 6 e 4 dias	Zhang et al. (2007 ^b)
Rosa	orizalina, trifluralina, APM (amiprofos-metil)	citometria de fluxo	dependente do genótipo	Khosravi et al. (2007)
<i>Miscanthus X giganteus</i>	colchicina e orizalina	citometria de fluxo e análise morfológica	Orizalina	Yu et al. (2009)
<i>Pennisetum purpureum X P. glaucum</i>	colchicina	citometria de fluxo, contagem de cromossomos e análise morfológica	*	Campos et al. (2009)
<i>Paspalum notatum</i>	colchicina, orizalina, trifluralina	contagem de cromossomos, análise estomática e citometria de fluxo	orizalina 20µM	Quesenberry et al. (2010)

ESPÉCIE	TRATAMENTO	DETECÇÃO DE PLOIDIA	MÉTODO DE MAIOR SUCESSO	REFERÊNCIA
<i>Zea mays</i>	tratamento físico (temperatura, elevada pressão do ar, corrente elétrica); antimitóticos (griseofulvina, APM, orizalina, pronamida, trifluralina, cafeína) e combinação dos dois métodos	contagem de cromossomos e citometria de fluxo	APM, pronamida e orizalina	Häntzschel e Weber (2010)
<i>Paulownia tomentosa</i>	colchicina	citometria de fluxo, contagem de cromossomos e análise morfológica	0,05% colchicina 48 horas	Tang et al. (2010)
<i>Citrus reticulata</i>	colchicina	citometria de fluxo e contagem de cromossomos	1g 1 ⁻¹ colchicina 4 dias	Dutt et al. (2010)
<i>Brachiaria decumbens</i>	colchicina	contagem de cromossomos	*	Simioni e Valle (2011)
<i>Dendranthema nankingense</i>	colchicina	citometria de fluxo e análise morfológica e contagem de cromossomos	*	Liu et al. (2011)

ESPÉCIE	TRATAMENTO	DETECÇÃO DE PLOIDIA	MÉTODO DE MAIOR SUCESSO	REFERÊNCIA
<i>Trifolium alexandrinum</i>	colchicina	contagem de cromossomos	0,1% colchicina	EI-Naby et al. (2012)
<i>Clivia miniata</i>	colchicina	contagem de cromossomos, análise estomática e análise morfológica	Colchicina 0,01% 30 dias e 0,03% 20 dias	Wang e Lei (2012)
<i>Tagetes erecta</i>	colchicina	contagem de cromossomos	*	Sajjad et al. (2013)
<i>Acer platanoides</i>	orizalina	citometria de fluxo	Orizalina em meio suplementado com 4µM BAP + 1µM AIA	Lattier et al. (2013)
<i>Drosera capensis</i>	orizalina	citometria de fluxo	40 µM 48 horas ; 60 µM 24 horas ; 80 µM 12 horas	Zahumenicka et al. (2013)
<i>Brassica campestris</i>	colchicina	análise estomática e contagem de cromossomos	0,6% 12 horas	Kumar e Dwivedi (2014)
<i>Echium amoenum</i>	colchicina	Contagem de cromossomos e análise de marcadores moleculares do tipo ISSR	1% colchicina 48 horas	Azoush et al. (2014)

ESPÉCIE	TRATAMENTO	DETECÇÃO DE PLOIDIA	MÉTODO DE MAIOR SUCESSO	REFERÊNCIA
<i>Panicum virgatum</i>	colchicina	Citometria de fluxo	0,02% colchicina 6 dias	Yang et al. (2014)
<i>Ziziphus jujuba</i>	colchicina	Citometria de fluxo, análise estomática, análise morfológica das folhas e contagem de cromossomos	0,05% colchicina 3 aplicações	Shi et al. (2015)
<i>Eriobotrya japonica</i>	colchicina	citometria de fluxo, contagem de cromossomos, análise morfológica	0,05% colchicina; uma gota a cada dia, durante 3 dias, no meristema apical.	Blasco et al. (2015)
<i>Cannabis sativa</i>	colchicina	Citometria de fluxo	0,2% colchicina 24 horas	Bagheri e Mansouri (2015)

* Dados ausentes no artigo

