



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

OBTENÇÃO DE POLIPLOIDES *IN VIVO* E *IN VITRO* DE *BRASSOLAELIOCATTLEYA*

JOE ABDUL VILCHERREZ ATOCHE

Araras

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

OBTENÇÃO DE POLIPLOIDES *IN VIVO* E *IN VITRO* DE *BRASSOLAELIOCATTLEYA*

JOE ABDUL VILCHERREZ ATOCHE

ORIENTADOR: PROF. DR. JEAN CARLOS CARDOSO
CO-ORIENTADOR: PROF. DR. MATEUS MONDIN

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados como requisito parcial à obtenção do título de MESTRE EM PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

Araras

2022

Vilcherrez Atoche, Joe Abdul

Obtenção de poliploides in vivo e in vitro de
Brassolaeliocattleya / Joe Abdul Vilcherrez Atoche --
2022.

110f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São
Carlos, campus Araras, Araras

Orientador (a): Jean Carlos Cardoso

Banca Examinadora: Monalisa Sampaio Carneiro,
Francisco de Assis Alves Mourão Filho

Bibliografia

1. Floricultura. 2. Melhoramento genético de plantas. 3.
Cultura de tecidos vegetais. I. Vilcherrez Atoche, Joe
Abdul. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Helena Sachi do Amaral - CRB/87083



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Agrárias

Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Joe Abdul Vilcherrez Atoche, realizada em 28/06/2022.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Jean Carlos Cardoso (UFSCar)

Profa. Dra. Monalisa Sampaio Carneiro (UFSCar)

Prof. Dr. Francisco de Assis Alves Mourão Filho (ESALQ/USP)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por sempre acompanhar-me e dar-me as forças para nunca me rendi ante todo os desafios encontrados nesta etapa.

Aos meus pais Alex e Graciela, pelo grande amor, pelo apoio incondicional, pelos grandes valores inculcados, por sempre confiar em mim ante toda situação, por estar sempre motivando-me, por ser meus maiores exemplos de perseverança, esforço e superação.

Ao meu irmão David pelo companheirismo e a motivação constante para poder cumprir esta nova etapa de aprendizagem.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jean Carlos Cardoso por aceitar ser meu orientador, por toda a confiança depositada em mim, pela maravilhosa orientação neste trabalho, pela grande paciência, pelos grandes conselhos, pelo apoio constante, pela grande oportunidade de poder realizar este trabalho ao lado de uma pessoa que considero de grande importância no ambiente acadêmico e um referente para meu crescimento profissional.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Mateus Mondin por aceitar ser meu coorientador, pela grande paciência, pelos ensinamentos, pelas grandes orientações, pela confiança, pela grande oportunidade de poder trabalhar no seu laboratório permitindo-me conhecer e aprender o vasto mundo da Citogenética Vegetal a partir de uma pessoa com uma grande experiência nessa linha pesquisa, sendo outro dos meus importantes referentes na minha vida acadêmica.

Ao Laboratório de Fisiologia Vegetal e Cultura de Tecidos Vegetais (LFVCTV), a todos os amigos e amigas que fiz nele, a Ana pela grande paciência, pelos ensinamentos, pelos treinamentos e pelas diversas ajudas durante o desenvolvimento do projeto.

A minha amiga Carla que partilhou o trabalho dentro do laboratório durante o desenvolvimento do meu projeto de mestrado e ajudou na coleta de amostras, pela paciência e pelo companheirismo e amizade dentro e fora do laboratório.

Ao Laboratório de Citogenética e Epigenética Molecular (CYNGELA), a Silvia pela infinita paciência, pelos maravilhosos treinamentos, pelas orientações e pelo importante ajuda durante a minha estância no laboratório.

Ao Laboratório de Citogenética e Citometria da Universidade Federal de Viçosa (UFV) pelo auxílio nas análises de citometria de fluxo.

Ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados (PPGPVBA), a Coordenação pela ajuda e suporte necessário; e seu corpo docente por todos os conhecimentos que tive a sorte de aprender durante as aulas.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”. A Simon Johannes Steltenpool e outros pelo suporte no fornecimento de reagentes, materiais e bolsa de pesquisa ao estudante.

SUMÁRIO

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 OBJETIVOS.....	04
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	05
3.1 Generalidades da família <i>Orchidaceae</i>	05
3.2 Taxonomia e Filogenia em <i>Orchidaceae</i>	07
3.3 Citogenética e conteúdo de DNA nuclear em <i>Orchidaceae</i>	08
3.4 Gênero <i>Cattleya</i>	09
3.5 Poliploidias.....	12
3.6 Cultivo <i>in vitro</i>	14
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1 Material vegetal e cultivo <i>in vitro</i> da progênie de <i>Blc.</i> Haw Yuan Beauty x <i>Blc.</i> Goldenzelle Lemon “Chiffon”.....	22
4.2 Estagio I: Indução de poliploidização.....	24
4.2.1 Experimento 1: Concentrações e tempos de exposição da colchicina.....	24
4.2.2 Experimento 2: Exposição dos diferentes tipos de explantes da progênie de <i>Blc.</i> Haw Yuan Beauty x <i>Blc.</i> Goldenzelle Lemon “Chiffon” à colchicina.....	25
4.2.3 Metodologia utilizada para os tratamentos com colchicina nos experimentos.....	25
4.2.4 Avaliações dos explantes tratados com colchicina.....	26
4.3 Estagio II: Análise de ploidia das plântulas regeneradas.....	26
4.3.1 Análise citológico.....	26
a Obtenção de raízes para análise citogenética.....	26
b Análise de citometria de fluxo das plântulas da progênie de <i>Blc.</i> Haw Yuan Beauty x <i>Blc.</i> Goldenzelle “LC” obtidas da regeneração dos explantes tratados e não tratados.....	27
c Exibição e contagem de cromossomos.....	28

5	FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	31
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
7	CONCLUSÕES.....	88
8	LITERATURA CITADA.....	89

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1. ANOVA e Teste de médias para os parâmetros avaliados nas sementes da progênie de <i>B/c.</i> Haw Yuan Beauty x <i>B/c.</i> Goldenzelle “LC”	39
Tabela 2. Interações entre as concentrações de colchicina (%) e os tempos de exposição (h) na porcentagem de germinação de sementes da progênie de <i>B/c.</i> Haw Yuan Beauty x <i>B/c.</i> Goldenzelle “LC”	40
Tabela 3. Interações entre as concentrações de colchicina (%) e os tempos de exposição (h) de sementes da progênie de <i>B/c.</i> Haw Yuan Beauty x <i>B/c.</i> Goldenzelle “LC”. A. Desenvolvimento em protocormos (%). B. Desenvolvimento em plântulas (%)	41
Tabela 4. ANOVA e Teste de médias para os parâmetros avaliados nos protocormos da progênie de <i>B/c.</i> Haw Yuan Beauty x <i>B/c.</i> Goldenzelle “LC”	46
Tabela 5. Interações entre as concentrações de colchicina (%) e os tempos de exposição (h) na porcentagem de sobrevivência de protocormos da progênie de <i>B/c.</i> Haw Yuan Beauty x <i>B/c.</i> Goldenzelle “LC”	47
Tabela 6. ANOVA e Teste de médias para os parâmetros avaliados nas plântulas da progênie de <i>B/c.</i> Haw Yuan Beauty x <i>B/c.</i> Goldenzelle “LC”	56
Tabela 7. Efeitos das interações entre as concentrações de colchicina (%) e os tempos de exposição (h) na porcentagem de morte de plântulas da progênie de <i>B/c.</i> Haw Yuan Beauty x <i>B/c.</i> Goldenzelle “LC”	57
Tabela 8. Interações entre as concentrações de colchicina (%) e os tempos de exposição (h) na massa fresca total (g) de plântulas da progênie de <i>B/c.</i> Haw Yuan Beauty x <i>B/c.</i> Goldenzelle “LC”	59
Tabela 9. Interações entre as concentrações de colchicina (%) e os tempos de exposição (h) de plântulas da progênie de <i>B/c.</i> Haw Yuan Beauty x <i>B/c.</i> Goldenzelle “LC”. A. Regeneração de plântulas em PLBs (%). B. Regeneração de plântulas em plântulas (%)	62
Tabela 10. Obtenção de poliploides na progênie de <i>B/c.</i> Haw Yuan Beauty x <i>B/c.</i> Goldenzelle “LC”	68

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. A. cultivar <i>B/c.</i> Haw Yuan Beauty; B. cultivar <i>B/c.</i> Goldenzelle “Lemon Chiffon”	23
Figura 2. Explantes provenientes do cruzamento entre <i>B/c.</i> Haw Yuan Beauty x <i>B/c.</i> Goldenzelle “LC”. A. Semente. B. Protocormo. C. Plântula.	24
Figura 3. Explantes da progênie de <i>B/c.</i> Haw Yuan Beauty x <i>B/c.</i> Goldenzelle “LC” utilizados para realizar a indução artificial de poliploidias. A. Sementes. B. Protocormos. C. Plântula	25
Figura 4. Metodologia usada para a indução artificial de poliploides da progênie de (<i>B/c</i> HYB x <i>B/c</i> GIH). <i>B/c</i> HYB: <i>B/c.</i> Haw Yuan Beauty. <i>B/c</i> GLC: <i>B/c.</i> Goldenzelle “LC”. CF: Citometria de fluxo. CC: Contagem de cromossomos. CA: Características anatômicas. CM: Características morfológicas.....	31
Figura 5. Sementes do cruzamento entre <i>B/c.</i> Haw Yuan Beauty x <i>B/c.</i> Goldenzelle ‘LC’. A. Semente com embrião. B. Semente sem embrião	32
Figura 6. Efeitos do tempo de exposição à colchicina de sementes da progênie de <i>B/c.</i> Haw Yuan Beauty x <i>B/c.</i> Goldenzelle “LC”. A. Germinação (%). B. Desenvolvimento em protocormos (%). C. Desenvolvimento em plântulas (%). D. Massa fresca total (g)..	33
Figura 7. Efeitos das concentrações de colchicina de sementes da progênie de <i>B/c.</i> Haw Yuan Beauty x <i>B/c.</i> Goldenzelle “LC”. A. Germinação (%). B. Desenvolvimento em protocormos (%). C. Desenvolvimento em plântulas (%). D. Massa fresca total (g)..	34
Figura 8. Efeitos de diferentes tempos de exposição e concentrações de colchicina no desenvolvimento <i>in vitro</i> de sementes da progênie de <i>B/c.</i> Haw Yuan Beauty x <i>B/c.</i> Goldenzelle “LC”	36
Figura 9. Efeitos da colchicina sobre a sobrevivência de protocormos <i>in vitro</i> da progênie de <i>B/c.</i> Haw Yuan Beauty x <i>B/c.</i> Goldenzelle “LC”. A. Protocormos cultivados em meio MS Orquídea por 120 dias após o tratamento com colchicina na concentração 0.08% e tempo de exposição 24 horas, demonstrando os tecidos mortos (*), a regeneração de PLBs (seta amarela) e plântulas (seta vermelha); B. Protocormos do tratamento controle em regeneração.....	42
Figura 10. Efeitos do tempo de exposição à colchicina nos protocormos da progênie de <i>B/c.</i> Haw Yuan Beauty x <i>B/c.</i> Goldenzelle “LC”. A. Sobrevivência (%). B. Morte (%). C. Massa fresca de proliferação de PLBs (%). D. Massa fresca de regeneração em plântulas (%). E. Massa fresca total (g)	43

- Figura 11. Efeitos das concentrações de colchicina nos protocormos da progênie de *Blc.* Haw Yuan Beauty x *Blc.* Goldenzelle “LC”. A. Sobrevivência (%). B. Morte (%). C. Massa fresca de proliferação de PLBs (%). D. Massa fresca de regeneração em plântulas (%). E. Massa fresca total (g)..... 44
- Figura 12. Efeitos de diferentes tempos de exposição e concentrações de colchicina na sobrevivência e morte de protocormos da progênie de *Blc.* Haw Yuan Beauty x *Blc.* Goldenzelle “LC”. A. 6 horas / 0,00 a 0,08%. B. 12 horas / 0,00 a 0,08%. C. 18 horas / 0,00 a 0,08%. D. 24 horas / 0,00 a 0,08%..... 48
- Figura 13. Efeitos da colchicina sobre as porcentagens de massa fresca de proliferação de PLBs e regeneração a plântulas de protocormos *in vitro* da progênie de *Blc.* Haw Yuan Beauty x *Blc.* Goldenzelle “LC”. Protocormos cultivados em meio MS Orquídea por 180 dias após o tratamento com colchicina na concentração 0.08% e tempo de exposição 24 horas, demonstrando os tecidos mortos (*), a regeneração de PLBs (seta vermelha) e plântulas (seta amarela) 51
- Figura 14. Efeitos de diferentes tempos de exposição e concentrações de colchicina na desenvolvimento *in vitro* de protocormos da progênie de *Blc.* Haw Yuan Beauty x *Blc.* Goldenzelle “LC”. A. 6 horas / 0,00 a 0,08%. B. 12 horas / 0,00 a 0,08%. C. 18 horas / 0,00 a 0,08% . D. 24 horas / 0,00 a 0,08%..... 51
- Figura 15. Efeitos das concentrações de colchicina em plântulas da progênie de *Blc.* Haw Yuan Beauty x *Blc.* Goldenzelle “LC”. A. Sobrevivência (%). B. Morte (%). C. Regeneração de plântulas em PLBs (%). D. Regeneração de plântulas em plântulas (%). E. Massa fresca total (g)..... 53
- Figura 16. Efeitos do tempo de exposição à colchicina em plântulas da progênie de *Blc.* Haw Yuan Beauty x *Blc.* Goldenzelle “LC”. A. Sobrevivência (%). B. Morte (%). C. Regeneração de plântulas em PLBs (%). D. Regeneração de plântulas em plântulas (%). E. Massa fresca total (g)..... 54
- Figura 17. Efeitos da colchicina sobre a sobrevivência de plântulas *in vitro* da progênie de *Blc.* Haw Yuan Beauty x *Blc.* Goldenzelle “LC”. A. Plântulas cultivadas em meio MS Orquídea por 120 dias após o tratamento com colchicina na concentração 0.08% e tempo de exposição 24 horas, demonstrando os tecidos mortos (seta vermelha), a regeneração de plântulas (seta amarela); B. Plântulas do tratamento controle em regeneração..... 55
- Figura 18. Efeitos da colchicina sobre a regeneração das plântulas *in vitro* da progênie de *Blc.* Haw Yuan Beauty x *Blc.* Goldenzelle “LC”. A. Regeneração de PLBs na parte basal e apical (seta azul) B. Plântulas cultivadas em meio MS Orquídea por 120 dias após o tratamento com colchicina na concentração 0,06% e tempo de exposição 18 60

horas, demonstrando os tecidos mortos (*), a regeneração de PLBs (seta vermelha) e plântulas (seta amarela)	
Figura 19. Efeitos de diferentes tempos de exposição e concentrações de colchicina no desenvolvimento de plântulas da progênie de <i>Blc. Haw Yuan Beauty</i> x <i>Blc. Goldenzelle</i> "LC". A. 6 horas / 0,00 a 0,08%. B. 12 horas / 0,00 a 0,08%. C. 18 horas / 0,00 a 0,08%. D. 24 horas / 0,00 a 0,08%	61
Figura 20. Efeitos da colchicina sobre a regeneração das plântulas <i>in vitro</i> da progênie de <i>Blc. Haw Yuan Beauty</i> x <i>Blc. Goldenzelle</i> "LC". A e B. Plântulas cultivadas em meio MS Orquídea por 180 dias após os tratamentos com colchicina nas concentrações 0,06% e 0,08% e tempo de exposição 24 horas, demonstrando regeneração de plântulas. C. Plântulas do tratamento controle em regeneração	63
Figura 21. Comparações entre as análises de citometria de fluxo. a cultivar <i>Blc. Haw Yuan Beauty</i> (círculo laranja). a cultivar <i>Blc. Goldenzelle</i> "LC" (círculo verde). Individuo de <i>Blc. Haw Yuan Beauty</i> x <i>Blc. Goldenzelle</i> "LC" sem tratamento com colchicina (círculo preto)	65
Figura 22. Análises de citometria de fluxo. A. Individuo de <i>Blc. Haw Yuan Beauty</i> x <i>Blc. Goldenzelle</i> "LC" sem tratamento com colchicina. B. Individuo de <i>Blc. Haw Yuan Beauty</i> x <i>Blc. Goldenzelle</i> "LC" com tratamento com colchicina	65
Figura 23. Desenvolvimento e enraizamento <i>in vitro</i> das plântulas regeneradas a partir de partir de explantes tratados e não tratados com colchicina. A. Indivíduos poliploide de <i>Blc. Haw Yuan Beauty</i> x <i>Blc. Goldenzelle</i> "LC". B. Indivíduos de <i>Blc. Haw Yuan Beauty</i> x <i>Blc. Goldenzelle</i> "LC" não tratadas com colchicina.....	66
Figura 24. Frequências de poliploidias nos explantes da progênie de de <i>Blc. Haw Yuan Beauty</i> x <i>Blc. Goldenzelle</i> "LC". A. Sementes. B. Protocormos. C. Plântulas	69
Figura 25. Frequências de mixoploidias nas plântulas da progênie de de <i>Blc. Haw Yuan Beauty</i> x <i>Blc. Goldenzelle</i> "LC"	79
Figura 26. Cromossomos prometafasicos. A. Individuo da progênie de <i>Blc. Haw Yuan Beauty</i> x <i>Blc. Goldenzelle</i> "LC" sem tratamento com colchicina. B. a cultivar <i>Blc. Haw Yuan Beauty</i> . C e D. Individuo da progênie <i>Blc. Haw Yuan Beauty</i> x <i>Blc. Goldenzelle</i> "LC" tratados com colchicina.....	81

OBTENÇÃO DE POLIPLÓIDES *IN VIVO* E *IN VITRO* DE *BRASSOLAELOCATTLEYA*

Autor: JOE ABDUL VILCHERREZ ATOCHE

Orientador: Prof. Dr. JEAN CARLOS CARDOSO

Co-orientador: Prof. Dr. MATEUS MONDIN

RESUMO

Cattleya é um dos gêneros de orquídeas tropicais com grande importância para o mercado de flores pelo tamanho e cores de suas flores. No entanto, problemas como seu longo período vegetativo e juvenil, assim como também o reduzido tempo de prateleira de suas flores dificultam sua inserção comercial, quando comparado a outros gêneros de orquídeas de maior importância comercial. A indução artificial de poliploides pode resultar na incorporação de características agrônômicas e ornamentais de interesse em híbridos de *Cattleya*, à exemplo de *Brassolaeliocattleya*. A colchicina é o alcaloide mais comumente utilizado para gerar poliploidias em plantas devido a suas propriedades antimitóticas, mas ao mesmo tempo produz efeitos fitotóxicos no material vegetal, requerendo estudos específicos para diferentes genótipos de plantas. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo eficiente para a produção de plantas poliploides da progênie de *Blc. Haw Yuan Beauty* x *Blc. Goldenzelle "LC"* tendo como fatores os tipos de explantes, as concentrações e os tempos de exposição à colchicina. Além disso, também estudamos os efeitos da exposição à colchicina nos diferentes tipos de explantes na progênie de *Blc. Haw Yuan Beauty* x *Blc. Goldenzelle "LC"*. A colchicina produziu diversos efeitos no desenvolvimento *in vitro* de sementes, protocormos e plântulas da progênie de *Blc. Haw Yuan Beauty* x *Blc. Goldenzelle "LC"*, onde as diferentes respostas dos explantes frente ao alcaloide dependeram das concentrações, tempos de exposição e das interações entre ambos os fatores. Sementes, protocormos e plântulas da progênie de *Blc. Haw Yuan Beauty* x *Blc. Goldenzelle "LC"* resultaram em eficiência de poliploidização de 3,21%; 13,46% e 22,08%, respectivamente, analisado por citometria de fluxo. Em relação as frequências de poliploidia em sementes os tratamentos 6 h/0,08%, 18h/0,04% e 18 h/0,06% tiveram frequências de poliploidias de 13%, 25% e 25% respectivamente. Para os protocormos os tratamentos 6 h/0,04% e 18 h/0,08% resultaram nas maiores frequências de poliploides de 46% e 44%, respectivamente. Além disso, foram obtidos poliploides em protocormos sem tratamento com colchicina, com frequências de 8% à 20%. Para as plântulas os tratamentos 6 h/ 0,04%, 12 h/ 0,04%, 24 h/0,02% e 24 h/0,08% geraram frequências iguais ou superiores a 50%. As estimativas de análise cromossômica mostraram que as cultivares *Blc. Haw Yuan Beauty* e *Blc. Goldenzelle "LC"* e a progênie de *Blc. Haw Yuan Beauty* x *Blc. Goldenzelle "LC"* tinham 70 cromossomos, enquanto a progênie de *Blc. Haw Yuan Beauty* x *Blc. Goldenzelle "LC"* poliploidizada tinha 140 cromossomos. De acordo com os resultados a colchicina teve efeitos sobre o desenvolvimento e crescimento *in vitro* das sementes, protocormos e plântulas da progênie de *Blc. Haw Yuan Beauty* x *Blc. Goldenzelle "LC"* e permitiu a produção de plantas poliploidizadas.

Palavras-chave: *Orchidaceae*, *Cattleya*, melhoramento genético, colchicina, eficiência de poliploidização, citometria de fluxo, cromossomos.

OBTAINING POLYPLUIDS *IN VIVO* AND *IN VITRO* FROM *BRASSOLAEIOCATTLEYA***Author: JOE ABDUL VILCHERREZ ATOCHE****Adviser: Prof. Dr. JEAN CARLOS CARDOSO****Co-adviser: Prof. Dr. MATEUS MONDIN****ABSTRACT**

Cattleya is one of the genera of tropical orchids with great importance for the flower market due to the size and color of its flowers. However, problems such as its long vegetative and juvenile period, as well as the short shelf life of its flowers, make it difficult for its commercial insertion, when compared to other orchid genera of greater commercial importance. The artificial induction of polyploids can result in the incorporation of agronomic and ornamental characteristics of interest in *Cattleya* hybrids, such as *Brassolaeliocattleya*. Colchicine is the most commonly used alkaloid to generate polyploidy in plants due to its antimitotic properties, but at the same time it produces phytotoxic effects on plant material, requiring specific studies for different plant genotypes. Thus, the present work aimed to develop an efficient protocol for the production of polyploid plants from the progeny of *Blc. Haw Yuan Beauty* x *Blc. Goldenzelle "LC"* having as factors the types of explants, concentrations and exposure times to colchicine. In addition, we also studied the effects of colchicine exposure on different types of explants in *Blc. Haw Yuan Beauty* x *Blc. Goldenzelle "LC"* progeny. Colchicine produced several effects on the *in vitro* development of seeds, protocorms and seedlings of the progeny of *Blc. Haw Yuan Beauty* x *Blc. Goldenzelle "LC"*, where the different responses of explants to the alkaloid depended on concentrations, exposure times and interactions between both factors. Seeds, protocorms and seedlings of the progeny of *Blc. Haw Yuan Beauty* x *Blc. Goldenzelle "LC"* resulted in a polyploidization efficiency of 3.21%; 13.46% and 22.08%, respectively, analyzed by flow cytometry. Regarding the frequencies of polyploidy in seeds, the treatments 6 h/0.08%, 18 h/0.04% and 18 h/0.06% had polyploidy frequencies of 13%, 25% and 25% respectively. For the protocorms, treatments 6 h/0.04% and 18 h/0.08% resulted in the highest frequencies of polyploids of 46% and 44%, respectively. For seedlings, treatments 6 h/0.04%, 12 h/0.04%, 24 h/0.02% and 24 h/0.08% generated frequencies equal to or greater than 50%. Chromosomal analysis estimates showed that *Blc. Haw Yuan Beauty* and *Blc. Goldenzelle "LC"* and the progeny of *Blc. Haw Yuan Beauty* x *Blc. Goldenzelle "LC"* had 70 chromosomes, while the progeny of *Blc. Haw Yuan Beauty* x *Blc. Goldenzelle "LC"* polyploidized had 140 chromosomes. According to the results, colchicine had effects on the *in vitro* development and growth of seeds, protocorms and seedlings of the progeny of *Blc. Haw Yuan Beauty* x *Blc. Goldenzelle "LC"* and allowed the production of polyploidized plants.

Key-words: *Orchidaceae*, *Cattleya*, genetic improvement, colchicine, polyploidization efficiency, flow cytometry, chromosomes.

1. INTRODUÇÃO

Orchidaceae é considerada uma das maiores famílias de plantas com flores (DRESSLER, 1993), representando cerca de 70% do total de epífitas vasculares encontradas em florestas tropicais e subtropicais (RAMALHO; PIMENTA, 2010).

De acordo com THE PLANT LIST (2020) existem cerca de 27,801 espécies e 899 gêneros com ampla distribuição geográfica, principalmente em áreas tropicais e subtropicais, com ausência apenas em áreas polares ou de calor extremo (GUIMARÃES *et al.*, 2016). Em relação à família *Orchidaceae* no Brasil, foram registradas cerca de 2.692 espécies e 251 gêneros de orquídeas (FLORA DO BRASIL, 2020), que habitam e são mais abundantes em áreas arborizadas ou com formações vegetais, incluindo aquelas áreas que foram antropogênicamente afetadas (DE BARROS *et al.*, 2018).

A grande maioria das orquídeas são plantas herbáceas e entre suas características vegetativas e reprodutivas exclusivas da família estão o velame associado às suas raízes, os caules em formato de pseudobulbos, além do labelo, coluna e das políneas alocadas em suas flores, entre outras; permitindo que elas sejam identificadas e separadas das demais famílias de plantas (DE BARROS *et al.*, 2018)

Dentro das angiospermas a família *Orchidaceae* forma parte do grupo de plantas com uma alta especialização floral permitindo atrair seus polinizadores específicos (a maioria são pássaros e insetos) assim como também por possuir diferentes mecanismos de polinização para garantir o sucesso reprodutivo (KRAHL *et al.*, 2015).

O gênero *Cattleya* está localizado dentro da família *Orchidaceae*, que foi descrita e estabelecida por John Lindley em 1819 (GÓMEZ, 2007) com 104 espécies registradas para o Brasil (VAN DEN BERG, 2020). As orquídeas do gênero *Cattleya* são comumente chamadas de “rainhas das orquídeas” (AOS, 2013) e possuem importância comercial devido às suas elevadas características genéticas e ornamentais (GALDIANO *et al.*, 2017).

Em *Cattleya*, a maioria das plantas comercializadas atualmente são constituídas de híbridos. A hibridização é um fenômeno comum e eficiente utilizado nos programas convencionais de melhoramento genético de *Cattleya*, que pode ser realizada de

forma natural ou artificial, permitindo a geração de uma grande variedade de híbridos interespecíficos e intergenéricos (CARDOSO; MARTINELLI; TEIXEIRA DA SILVA, 2016). Os híbridos de *Cattleya* apresentam uma ótima qualidade ornamental, obtendo assim boa aceitação no mercado de flores de vaso (TAKANE; YANAGISAWA; PIVETTA, 2010) mas devido a certas limitações hortícolas das plantas, sendo as principais o longo período juvenil e a baixa durabilidade de suas flores bem como outras dificuldades no seu cultivo, essas limitam o interesse e desenvolvimento da produção em larga escala (CARDOSO; ONO; RODRIGUES, 2010).

Nesse contexto, poucos são os estudos que investigam os efeitos da poliploidização em *Cattleya* e seus híbridos, especialmente visando a obtenção de plantas superiores em relação aos fatores que limitam a expansão comercial desse grupo de orquídeas.

O fenômeno da poliploidização em flores é caracterizado por gerar mudanças no desenvolvimento, arquitetura e estruturas florais, épocas de floração e número de flores (CHUNG *et al.*, 2014). Os organismos poliploides, devido à duplicação do número básico de cromossomos, permitem a expansão dos bancos de germoplasma, aumentando a variabilidade genética e o número de indivíduos que poderiam ser utilizados em programas de melhoramento genético em plantas (CHUNG *et al.*, 2014).

Atualmente, técnicas de cultivo *in vitro* aliadas a modernas ferramentas biotecnológicas estão sendo utilizadas para o melhoramento genético de orquídeas (CARDOSO, 2010, 2012; CARDOSO; MARTINELLI; TEIXEIRA DA SILVA, 2016; FRITSCHÉ, 2012). Dentre as técnicas de melhoramento genético, aquelas utilizadas para alterações nos níveis de ploidia nas células tem sido aplicadas com sucesso para a formação de novas cultivares de orquídeas (FRITSCHÉ, 2012).

Organismos poliploides podem ser obtidos naturalmente ou artificialmente por meio do uso de substâncias antimitóticas, entre elas a mais comum e utilizada em plantas é a colchicina (DHOOGHE *et al.*, 2011; MONDIN; NETO, 2006), que atua nas subunidades de microtúbulos do fuso cromático evitando a orientação e agregação deles durante a divisão celular (BORISY; TAYLOR, 1967).

A indução artificial de poliploidias pode também ser utilizada para resolver problemas de fertilidade em híbridos interespecíficos e intergenéricos, uma vez que muitas vezes apresentam desequilíbrios cromossômicos gerando falhas no

pareamento de seus cromossomos durante a meiose (RANNEY, 2006). Para realizar a duplicação cromossômica *in vitro* é necessário seguir um protocolo que inclui uma metodologia com uma série de etapas. Cada protocolo é específico para cada tipo de planta e apresenta variações no tipo de agente antimitótico, tipo de explante, concentração do agente antimitótico, tempo de exposição, método de indução e confirmação de poliploides (DHOOGHE *et al.*, 2011).

Para a geração artificial de plantas poliploides existem três tipos de sistemas de poliploidização: *in vivo*, *in vitro* e *ex vitro*; dos quais o sistema *in vitro* é o mais utilizado por apresentar algumas vantagens sobre outros sistemas como o rápido desenvolvimento e multiplicação de poliploides em ambiente fechado e com controle de parâmetros ambientais e assepsia do meio ambiente (ENG; HO, 2019). Uma vez realizada a indução da poliploidia, é necessário confirmar os níveis de ploidia das plantas regeneradas a partir do material tratado, para isso existem dois tipos de métodos para a identificação de poliploides: direto e indireto. Os métodos diretos incluem análise do número de cromossomos e métodos indiretos incluem citometria de fluxo e características morfo-anatômicas (ENG; HO, 2019).

Diante do exposto anteriormente, faz-se necessário o desenvolvimento de protocolos eficientes para a obtenção artificial de poliploides em orquídeas do gênero *Cattleya* e seus híbridos, bem como saber se plantas poliploides poderiam solucionar algumas limitações intrínsecas ao gênero, como: desuniformidade do florescimento observadas mesmo em plantas clonais; diminuição do tempo necessário para a floração que normalmente ultrapassa os quatro anos, e; aumento da durabilidade de suas flores ou da sua vida de prateleira, comumente menor que 20 dias. Atualmente, esses são os principais entraves de seu cultivo, especialmente comparado a outras orquídeas exóticas cultivadas no país e no Mundo, como nas orquídeas dos gêneros *Phalaenopsis* e *Dendrobium*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolver uma metodologia para a produção *in vitro* de plantas poliploides da progênie de *B/c. Haw Yuan Beauty* x *B/c. Goldenzelle "LC"*, testando como fatores o tipo de explante, além de concentrações e tempos de exposição a colchicina.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar os efeitos da concentração, do tempo de exposição e da interação concentração x tempo de exposição da colchicina aplicados aos tecidos vegetais da progênie de *B/c. Haw Yuan Beauty* x *B/c. Goldenzelle "LC"* em cultivo *in vitro*.
- Determinar o efeito dos tipos de tecidos tratados, sementes, protocormos e plântulas, sobre a eficiência na obtenção de plantas poliploides da progênie de *B/c. Haw Yuan Beauty* x *B/c. Goldenzelle "LC"*.
- Determinar a ploidia das plantas usadas como parentais, controle não tratadas e daquelas tratadas com colchicina, utilizando-se as análises de citometria de fluxo e a contagem de cromossomos.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Generalidades da família *Orchidaceae*

As orquídeas são plantas herbáceas perenes cuja principal característica são as flores, que apresentam grande diversidade de tamanhos, formas e cores (ACKERMAN; CASTILLO, 1992; RIVAS ROSSI; WARNER, 1998). A família *Orchidaceae* é um dos principais grupos dentro das angiospermas cujo centro de diversidade são os trópicos e representa cerca de 10% das plantas com flores em todo o mundo (RASMUSSEN, 1985; ROBERTS; DIXON, 2008; THE PLANT LIST, 2020).

As orquídeas possuem uma diversidade de hábitos que variam dependendo da zona climática onde se desenvolvem. Nas zonas temperadas são principalmente terrestres, enquanto nas zonas tropicais podem ser rupícolas até crescerem em áreas de corpos de água ou em árvores (epífitas), sendo o epifitismo a forma mais comum na família (ACKERMAN; CASTILLO, 1992; DRESSLER, 1981).

No Brasil, as orquídeas estão distribuídas por todo o país, ocorrendo em vários domínios fitogeográficos como Amazônia, Catinga, Cerrado, Pampa, Pantanal e Mata Atlântica (FLORA DO BRASIL, 2020). As florestas atlântica e amazônica são os domínios fitogeográficos com maior diversidade de orquídeas no Brasil onde predomina o habitat epifítico nas espécies (DE BARROS *et al.*, 2018). O Cerrado é outro dos ambientes com considerável quantidade de espécies de orquídeas, sendo o habitat terrestre predominante devido às condições climáticas de baixa umidade (DE BARROS *et al.*, 2018).

Orchidaceae apresenta uma diversidade de adaptações eco fisiológicas como a eficácia de suas raízes em maximizar a absorção de água, nutrientes e até mesmo apoiar a fotossíntese para certas espécies sem folhas. Apresenta também órgãos modificados para o armazenamento de água e nutrientes além do metabolismo do ácido crassuláceo, sendo dois fatores importantes, pois permitem que sobrevivam durante os meses sem chuva (ROBERTS; DIXON, 2008).

As orquídeas, ao contrário de outras famílias de plantas, apresentam modelos nutricionais específicos onde envolvem ou se relacionam diretamente com microrganismos, como bactérias e fungos. As associações com fungos, principalmente com endo micorrizas, são as mais importantes e seu grau de

dependência varia de acordo com a espécie, pois além de permitirem a germinação e o desenvolvimento das mudas naturalmente, são essenciais para a existência de algumas espécies de orquídeas que perderam a sua capacidade fotossintética denominadas mico heterotrófica, que são totalmente dependente do fungo para sua nutrição (ROBERTS; DIXON, 2008).

O processo de polinização em orquídeas é complexo e seu sucesso depende de algumas estratégias e mecanismos como néctar, decepção sexual (pseudo-copulação), fragrâncias, entre outros, bem como da combinação de características florais como cor, forma e geometria que permitem a atração de polinizadores específicos para as flores (RIVAS ROSSI; WARNER, 1998).

De acordo com seu eixo de crescimento, as orquídeas podem ser simpodiais e monopodiais. Normalmente as plantas simpodiais possuem rizomas que originam órgãos de reserva denominados pseudobulbos, que podem ser ovoides, globosos, cilíndricos, elipsoides, entre outros (FREULER, 2008). As folhas são típicas de monocotiledôneas apresentando uma grande variedade de formas e texturas onde o arranjo pode ser alternado ou oposto. As raízes podem ser grossas ou finas, apresentando um tecido esponjoso espesso denominado velamen, o que lhes permite aumentar a capacidade de absorção de água e nutrientes do meio, além de possuir capacidade fotossintética em espécies epifíticas (FREULER, 2003).

A morfologia floral é um dos traços característicos das orquídeas que as tornam exóticas. As flores são zigomórficas e são formadas por três sépalas e três pétalas, onde a pétala dorsal se modifica e recebe o nome de labelo, estando muitas vezes em posição inferior devido ao fenômeno da ressupinação. As partes férteis (estilo, estigma e estames) são fundidas em um único órgão chamado coluna (ACKERMAN; CASTILLO, 1992). O pólen forma massas chamadas polínias e possui algumas estruturas associadas, como víscido, caudícala e estipe, cuja presença ou ausência varia de acordo com a espécie de orquídea. O ovário é inferior e apresenta grande número de óvulos, que após a fecundação dão origem a milhares de pequenas sementes que se caracterizam por serem compostas por um embrião envolto por uma cobertura denominada testa. O tipo de fruta é geralmente uma cápsula ou vagem no caso da *Vanilla* (ACKERMAN; CASTILLO, 1992).

3.2. Taxonomia e Filogenia em *Orchidaceae*

Orchidaceae é considerada uma família contemporânea devido à sua rápida evolução, bem como ao constante aparecimento de novos grupos taxonômicos com diferentes níveis de relacionamento (LUER, 2002). A estimativa do número de espécies na família vem mudando ao longo da história desde os trabalhos iniciais realizados por DRESSLER (1981) y ATWOOD (1986) onde estimaram 19.192 e 19.128 espécies respectivamente até os trabalhos mais atuais como os realizados por DRESSLER (2005) y OPPA; ROBERTS e PIMM (2011) onde estimaram 24.500 e 28.894 espécies respectivamente.

Da mesma forma, à medida que o número de espécies aumenta, também aumentam os gêneros dentro da família, onde seu número aumentou cerca de 163 nos últimos 5 anos (CHASE *et al.*, 2015; THE PLANT LIST, 2020). O Brasil possui a maior área geográfica da América do Sul e é considerado o terceiro país sul-americano com alta diversidade de orquídeas atrás da Colômbia e Equador, com cerca de 3.500 espécies, das quais 1.490 são endêmicas (FLORA DO BRASIL, 2020; IUCN/SSC ORCHID SPECIALIST GROUP, 1996; SOUZA; LORENZI, 2008),

Em relação à filogenia e taxonomia, a família *Orchidaceae* é a que mais sofreu mudanças e rearranjos ao longo da história. Existe uma grande variedade de sistemas de classificação na família, dos quais as características vegetativas e polínicas são as mais representativas (CAMPOS, 2008). Dentre os sistemas de classificação por características polínicas, destaca-se a realizada por BRIEGER (1976), onde também considerou a morfologia da coluna e subdividiu a família *Orchidaceae* em seis subfamílias (*Apostasioideae*, *Cypripedioideae*, *Orchidoideae*, *Neottioideae*, *Epidendroideae* e *Vandoideae*).

Dentre os sistemas de classificação por características vegetativas, destaca-se a realizada por DRESSLER (1981), onde também considerou a morfologia floral e polínica, subdividindo a família *Orchidaceae* em seis subfamílias (*Apostasioideae*, *Cypripedioideae*, *Orchidoideae*, *Spiranθοideae*, *Epidendroideae* e *Vandoideae*), sendo este último o sistema o mais utilizado ao contrário do outro porque compreende tanto as estruturas vegetativas como as reprodutivas (CAMPOS, 2008).

A grande complexidade taxonômica dentro da família *Orchidaceae* mostrou que as análises cladísticas de dados morfológicos são insuficientes para classificar os grupos taxonômicos inferiores, mas são importantes porque ajudaram a diversificar em grupos taxonômicos superiores (subfamílias) nos sistemas de classificação anteriores (CHASE *et al.*, 2003).

Nas últimas décadas, as análises moleculares têm sido utilizadas para descrever novos táxons em plantas, sendo uma ferramenta complementar às análises morfológicas tradicionais (CHASE *et al.*, 2015). Em *Orchidaceae* é necessário adicionar a análise de DNA aos estudos morfológicos para ter uma melhor base na descrição e classificação de novos táxons (CHASE *et al.*, 2015). Atualmente na literatura existem muitas investigações sobre a análise molecular da filogenia em diferentes grupos taxonômicos de *Orchidaceae*, seja na família (CHASE *et al.*, 1994; FREUDENSTEIN; SENYO; CHASE, 2000a, 2000b), subfamília (COX *et al.*, 1997; KORES, 1997), tribos (GOLDMAN *et al.*, 2001; WILLIAMS *et al.*, 2001), subtribos (PRIDGEON *et al.*, 1997; YUKAWA *et al.*, 1996) permitindo mais esclarecimentos sobre as relações íntimas e diferenças dentro das orquídeas.

A partir desses estudos genéticos foi possível construir uma árvore filogenética com bases sólidas, reconhecendo *Orchidaceae* como uma família monofilética e subdividindo-se não em seis, mas em cinco grandes subfamílias: *Apostasioideae*, *Vanilloideae*, *Cypripedioideae*, *Orchidoideae* e *Epidendroideae* (CHASE *et al.*, 2015; GIVNISH *et al.*, 2015). A subfamília *Epidendroideae* é a mais extensa e diversa, subdividida em 16 tribos e 650 gêneros com cerca de 21.000 espécies representando mais de 78% do total de espécies da família (GOVAERST *et al.*, 2013). A grande maioria das espécies da subfamília *Epidendroideae* são plantas epifíticas com distribuição geográfica principalmente em regiões tropicais e subtropicais (FELIX; GUERRA, 2010).

3.3. Citogenética e conteúdo de DNA nuclear em *Orchidaceae*

Os estudos citogenéticos, principalmente os de análise do número de cromossomos, são importantes porque fornecem informações fundamentais para um melhor entendimento da filogenia, taxonomia, alterações cromossômicas e também o melhoramento genético das espécies (GUERRA; SOUZA, 2002). Análises de número de cromossomos são comumente usadas como ferramentas úteis para determinar e

estudar os diferentes níveis de relações filogenéticas e taxonômicas no reino vegetal (GUERRA, 2000).

Os números de cromossomos nas plantas podem ser constantes, pois também pode haver uma grande variação cromossômica entre espécies dentro do mesmo gênero e entre gêneros dentro da mesma família (ASSIS *et al.*, 2013). As análises cromossômicas ajudam a entender a complexa taxonomia de *Orchidaceae* (FELIX; GUERRA, 2010). Existem poucos dados sobre o número de cromossomos em *Orchidaceae*, apenas conhecido citogeneticamente cerca de 11% do total de espécies (FELIX; GUERRA, 2010), sendo esta informação pequena em comparação com o grande número de espécies dentro da família.

Na literatura existem pesquisas relacionadas a variações cromossômicas dentro da família *Orchidaceae* (FELIX; GUERRA, 2010; JONES; LIM; CRIBB, 1982; KAO *et al.*, 2001; LEE *et al.*, 2020b; WILFRET; KAMEMOTO, 1971; WIMBER, 1956; YU-GE; WEI-HONG; BO-JI, 2002), onde provavelmente o número básico de cromossomos na família é $x = 7$ (FELIX; GUERRA, 2005; FÉLIX; GUERRA, 2000). No entanto existe uma grande variação cromossômica em *Orchidaceae*, desde espécies com menor número de cromossomos como em *Erycina pusilla* com $2n = 12$ (FELIX; GUERRA, 1999) até espécies como em *Epidendrum cinnabarinum* com $2n = 240$ (FELIX; GUERRA, 2010), ambas localizadas dentro a subfamília *Epidendroideae*. Em relação à informação citogenética na subfamília *Epidendroideae*, observou-se que é a que apresenta maior variação no tamanho e número de cromossomos dentro da família, onde o número básico de cromossomos está entre 15 e 25, com predomínio de 19 e 20 (FELIX; GUERRA, 2010).

A grande maioria das espécies de orquídeas tem um genoma relativamente pequeno com um tamanho médio de cerca de 8,5 pg, mas existem algumas espécies da subfamília *Cypripedioideae* e uma espécie em *Vanilloideae* que tem um tamanho de genoma maior que 20 pg (LEITCH *et al.*, 2009).

3.4. Gênero *Cattleya*

Cattleya pertence à subtribo *Laeliinae*, considerada um gênero neotropical de importância hortícola com cerca de 114 espécies no mundo (QUERINO *et al.*, 2020; VAN DEN BERG, 2005, 2008), das quais mais de 90% das espécies são encontradas em Brasil e 97 deles são endêmicas (VAN DEN BERG, 2020). As orquídeas *Cattleya*

são caracterizadas por serem de hábito epifítico, com alguns casos rupícolas apresentando pseudobulbos proeminentes dos quais pedúnculos florais comumente emergem e no qual os botões florais são protegidos por uma espata (CAVERO; COLLANTES; PATRONI, 1991).

As espécies de *Cattleya* podem ser divididas em dois grupos de acordo com o número de folhas apicais: um grupo unifoliado que possui pseudobulbos fusiformes com uma folha apical e flores pequenas a grandes com variações de cor do amarelo ao lilás. O outro grupo é o das bifoliadas que apresentam pseudobulbos cilíndricos com duas folhas apicais e com numerosas flores pequenas de diferentes cores de verde, amarelo, marrom, rosa e lilás (AOS, 2021; BRAEM, 1994). As flores caracterizam-se por apresentarem sépalas alongadas com menor largura em relação às pétalas e o labelo é largo e de cores vistosas (CAVERO; COLLANTES; PATRONI, 1991).

Há uma grande variedade natural dentro das espécies de *Cattleya*, bem como muitos híbridos gerados naturalmente (AOS, 2021), como *Laeliocattleya elegans* (BOSE *et al.*, 1999), *Epicattleya*, *Cattleya intricata* (DE *et al.*, 2014), entre outros. A hibridização artificial também está presente em *Cattleya*, sendo utilizada como forma de realizar melhoramento genético devido à grande capacidade que este grupo de orquídeas tem em produzir híbridos férteis provenientes de cruzamentos entre diferentes espécies e gêneros, permitindo assim a formação de sólidos híbridos interespecíficos e multigenéricos (DE *et al.*, 2014) com boas características ornamentais.

O gênero *Cattleya* em relação à análise cromossômica é um dos membros mais estudados dentro da subtribo *Laeliinae* com cerca de 22,8% do total das espécies, que possuem um número básico de cromossomos $x = 20$, sendo este número característico entre os membros da subtribo *Laeliinae* mas também pode apresentar variações de 40,21-27-30 (FELIX; GUERRA, 2010), onde se acredita que essas variações possam estar relacionadas a eventos intraespecíficos de poliploidia (BLUMENSCHNEIN, 1960), bem como às características próprias de cada subespécie (BLUMENSCHNEIN, 1961; FELIX; GUERRA, 2010).

Quanto à filogenia de *Cattleya*, é a que mais sofreu alterações nos últimos anos devido às análises filogenéticas moleculares (CHASE *et al.*, 2015; VAN DEN BERG, 2008, 2009; VAN DEN BERG *et al.*, 2009; VAN DEN BERG; CHASE, 2000, 2001) como a inclusão de espécies de *Sophranitis* e *Laelia* brasileira para *Cattleya* (VAN DEN BERG, 2008) fazendo com que o gênero seja considerado um dos maiores da subtribo devido à quantidade atual de espécies (VAN DEN BERG, 2020).

De acordo com a classificação atual de *Cattleya*, ela é dividida em 4 subgêneros: *C.* subgen. *Cattleya*, *C.* subgen. *Cattleyella*, *C.* subgen. *Intermediae* e *C.* subgen. *Maximae* (VAN DEN BERG, 2014). *C.* subgen. *Cattleya* é a que possui o maior número de espécies com cerca de 80% e ao contrário dos outros subgêneros está dividida em 3 seções: seção *Cattleya*, seção *Lawrenceanae* e seção *Crispae*, onde esta última seção é dividida em 5 séries (VAN DEN BERG, 2014).

As orquídeas no mercado internacional de vasos e flores de corte estão entre as primeiras posições, representando cerca de 10% do comércio mundial de flores de corte (DE *et al.*, 2015). *Cattleya* representa 2,7% do comércio internacional de orquídeas tropicais, sendo a Tailândia o maior exportador desse tipo de orquídea (DE *et al.*, 2015).

Cattleya a diferença de outras orquídeas comerciais apresenta alguns problemas e limitações no seu cultivo em larga escala. Uma delas é o seu longo período juvenil, entre 3-7 anos de cultivo, o que atrasa a comercialização e aumenta os custos de produção. Outro fator limitante para o cultivo é a baixa durabilidade de suas flores, não ultrapassando os 20 dias nas cultivares de maior durabilidade, dificultando o transporte e comercialização a longas distâncias (CARDOSO; ISRAEL, 2005; CARDOSO; MARTINELLI; TEIXEIRA DA SILVA, 2016).

Por último e não menos importante a floração da maioria dos híbridos comerciais de *Cattleya* são extremamente dependentes de condições climáticas genótipo-dependentes como fotoperíodo, estresse hídrico, temperatura ou multifatorial para o florescimento, tornando difícil o controle de sua floração para atender épocas específicas, ou mesmo a padronização de um controle que possa induzir o florescimento e ser utilizado em diferentes cultivares (CARDOSO; ONO; RODRIGUES, 2010).

Esses são os principais fatores que tornam as orquídeas *Cattleya* híbridas menos vantajosas comercialmente que outros gêneros de orquídeas como *Phalaenopsis*, *Dendrobium*, *Oncidium* e *Cymbidium* (CARDOSO; MARTINELLI; TEIXEIRA DA SILVA, 2016).

3.5. Poliploidias

A poliploidia é um fenômeno caracterizado pelo aumento de mais de dois conjuntos básicos completos de cromossomos em um organismo (RANNEY, 2006). A poliploidia em plantas é a principal responsável nos processos de diversificação e evolução das espécies (SOLTIS *et al.*, 2009). Cerca de 75% das plantas estudadas citogeneticamente experimentaram pelo menos um evento de duplicação de seu genoma ao longo de sua história evolutiva, permitindo a especiação em diferentes condições ambientais (JIAO *et al.*, 2011; MONDIN; NETO, 2006).

Em relação à estimativa das frequências de poliploidia em plantas com flores, existem diferentes especulações (SOLTIS; SOLTIS; TATE, 2003). Por exemplo, GRANT (1963) estimou que a frequência de poliploidias em angiospermas, monocotiledôneas e dicotiledôneas foi de 47%, 58% e 43%, respectivamente, com base em plantas com número de cromossomos $n = 14$.

Usando a mesma abordagem anterior, mas trabalhando com plantas com número cromossômico $n = 9$ e 10 , GOLDBLATT (1980) estimou que a frequência de poliploidias em monocotiledôneas estava entre 70-80%, sendo superior à estimada por GRANT (1963). OTTO e WHITTON (2000) estimaram a incidência de poliploidias a partir da distribuição dos cromossomos haploides, onde determinaram que de todos os eventos de especialização em angiospermas, aproximadamente 2-4% eram poliploides. Esta discrepância na estimativa das frequências de poliploidia em plantas deve-se principalmente às diferentes abordagens que cada autor utilizou para realizar as suas pesquisas.

As análises genômicas que também geraram alterações no modelo clássico de poliploidias, onde graças a este tipo de estudos acredita-se que a grande maioria dos organismos eucarióticos, incluindo angiospermas, tem uma elevada redundância genética devido a dois fenômenos: poliploidia ou duplicação total do genoma (SOLTIS; SOLTIS; TATE, 2003). No caso da família *Orchidaceae*, mais de 90% das espécies apresentam aumento no número básico de cromossomos (MONDIN; NETO, 2006).

Os organismos euploides são classificados de acordo com sua origem como autoploiploides e aloploiploides. Os autoploiploides têm sua origem na duplicação de um mesmo genoma enquanto os aloploiploides têm sua origem na duplicação de um genoma diferente formado a partir da hibridização entre duas espécies diferentes (ACQUAAH, 2009). Os eventos de poliploidia em plantas podem ocorrer naturalmente de duas maneiras, seja através da duplicação cromossômica em células somáticas como resultado de erros durante a mitose e também através da união de gametas não reduzidos ($2n$) que foram formados como resultado de erros durante a meiose (RANNEY, 2006).

A poliploidização somática em plantas ocorre principalmente devido ao fenômeno da endopoliploidia, comumente denominado endoreduplicação, que é definido como a duplicação exponencial do conteúdo nuclear que ocorre em algumas células ou tecidos somáticos de um organismo sem passar pelo processo de citocinese durante o processo de mitose (MALUSZYNSKA; KOLANO; SAS-NOWOSIELSKA, 2013; PACEY; MAHERALI; HUSBAND, 2020), sendo esse mecanismo comum em angiospermas e algas, mas ausente em gimnospermas (BAROW; MEISTER, 2003; MALUSZYNSKA; KOLANO; SAS-NOWOSIELSKA, 2013).

O fenômeno natural da endopoliploidia ocorre durante um tipo de ciclo celular chamado endociclo e isso pode ocorrer quando a célula está em processo de diferenciação e interrompe sua divisão celular (MALUSZYNSKA; KOLANO; SAS-NOWOSIELSKA, 2013). Existe um mecanismo molecular controlado por três classes de proteínas específicas CDKA1 (LEIVA-NETO *et al.*, 2004), CYCA e CYCD (JOHN; QI, 2008) responsáveis pela regulação do endociclo nas células.

A modulação e ocorrência de endopoliploidia em células vegetais depende de fatores intrínsecos como tipo de explante, espécie e idade da planta, além de fatores extrínsecos, principalmente o ambiente (PARK; PAEK, 2006; PARK; YEUNG; PAEK, 2010).

Também foi observado que fitoreguladores como auxinas, citocininas, giberelinas e etileno influenciam o endociclo (MALUSZYNSKA; KOLANO; SAS-NOWOSIELSKA, 2013). Entre os fatores ambientais envolvidos no número de endociclos nas células somáticas estão a luz e nutrientes como a sacarose (MALUSZYNSKA; KOLANO; SAS-NOWOSIELSKA, 2013).

Devido ao aumento do material genético durante a endopoliploidia, ocorre um aumento no número de cópias dos genes e também um aumento no metabolismo celular, acelerando os processos biológicos nos organismos (BAROW, 2006). Entre os processos biológicos que influenciam a endopoliploidia está o crescimento e o desenvolvimento celular, gerando aumento no tamanho de vários órgãos das plantas e flores, fenômeno conhecido como *Efeito Gigas* (LEE et al., 2004; REIS, 2013).

Há relatos de endopoliploidia em várias células e tecidos em diferentes gêneros de orquídeas como *Cattleya*, *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Doritanopsis*, *Oncidium*, *Phalaenopsis*, *Spathoglottis*, *Vanda* e *Vanilla* (VILCHERREZ-ATOCHE; IYAMA; CARDOSO, 2022). Entre os fatores que influenciaram a frequência de endopoliploidia em *Orchidaceae* estão a temperatura (LEE et al., 2007) e fitorreguladores como ácido naftalacético e ácido giberélico (LIM; LOH, 2003).

Vários estudos sobre endopoliploidia em orquídeas permitiram determinar a alta ocorrência de vários níveis de ploidia (2C, 4C, 8C, 16C, 32C e 64C) (VILCHERREZ-ATOCHE; IYAMA; CARDOSO, 2022) nas células somáticas desta família de plantas, na qual a partir dessas informações, foi possível utilizar técnicas de cultura de tecidos vegetais juntamente com esses diferentes materiais vegetais como explantes para a formação de plantas poliploides (CHEN et al., 2011b).

A poliploidização sexual é outro mecanismo responsável pela formação natural dos poliploides nas plantas, que ocorre pela união de gametas não reduzidos ($2n$) (HARLAN; DE WET, 1975; RAMSEY; SCHEMSKE, 1998). Existem alguns relatos sobre a presença de gametas não reduzidos em alguns gêneros de orquídeas como *Plocoglottis*, *Calanthe*, *Spathoglottis* e *Phaius* (TEOH, 1984), *Bletilla striata* var. *gebina* (MIDUNO, 1940), *Epipactis latifolia* (HAGERUP, 1947), *Aerides odoratum*, *Doritis pulcherrima*, *Vanda denisoniana* (KAMEMOTO; KASEMSAP; SAGARIK, 1964), Cultivares de *Cymbidium* (ZENG et al., 2020).

3.6. Cultivo *in vitro*

O cultivo *in vitro* em plantas é caracterizado pela assepsia e pelo controle dos parâmetros físicos e químicos que influenciam o desenvolvimento das plantas, permitindo assim a regeneração e multiplicação completa das plantas a partir de um pequeno segmento de tecido obtido de uma planta mãe colocada em meio artificial em um frasco (ROCA; MROGINSKI, 1991). As técnicas de cultura de tecidos vegetais,

bem como seus usos, são variados e são de grande interesse tanto para a agricultura quanto para a horticultura, pois são ferramentas alternativas para algumas culturas que apresentam problemas de propagação por meio de métodos convencionais (BARBAT, 2006).

As orquídeas são um grupo de plantas com flores que podem ser propagadas por métodos vegetativos e sexuais (ALTAFIN *et al.*, 2003). Os métodos de multiplicação vegetativa em orquídeas dependem do tipo de desenvolvimento que apresentam, pois no caso das orquídeas simpodiais a propagação ocorre através da separação de pseudobulbos estimulando a produção de brotos laterais onde esta técnica tem como principais desvantagens o grande trabalho e tempo de produção de clones devido ao lento desenvolvimento vegetativo, limitando sua produção em grande escala (LOBERANT; ALTMAN, 2010).

No caso da propagação vegetativa de orquídeas monopodiais é extremamente mais limitada, pois não geram pseudobulbos laterais (LOBERANT; ALTMAN, 2010) devido à ausência de meristemas laterais e à presença de um único meristema apical que é o que controla seu tipo de desenvolvimento vertical.

A propagação sexual de orquídeas é realizada através da produção de sementes sexuadas, que se caracterizam pela falta de substâncias de reserva e pela necessidade de formar associações simbióticas com micorrizas para germinar na natureza onde a porcentagem de germinação é baixa de 2 - 5 % (ARDITTI; ERNEST, 1993).

Devido às múltiplas limitações de propagação que as orquídeas apresentam, uma das alternativas para solucionar esses problemas é a utilização de técnicas de cultivo de tecidos vegetais. O cultivo *in vitro* de plantas é uma das técnicas biotecnológicas importantes, pois permite a produção em larga escala de variedades vegetais com elevadas características de qualidade e rendimento, gerando novos impulsos no mercado (DATTA; CHAKRABORTY; JANAKIRAM, 2017). Atualmente, muitas espécies ornamentais são produzidas e comercializadas por meio do cultivo *in vitro*, onde a maior parte dessa cifra está concentrada em flores de corte e vasos (PRAKASH, 2000, 2009).

No caso das orquídeas, a partir da formulação do meio de cultura artificial Knudson B e C (KNUDSON, 1946) e pelo método de germinação assimbiótica de KNUDSON (1922) iniciou-se o desenvolvimento de diversas investigações relacionadas ao estabelecimento e germinação *in vitro* de muitas espécies de orquídeas, pois graças a este método foi demonstrado que as sementes de *Cattleya*, *Epidendrum* e outras espécies eram capazes de germinar em um meio simples contendo minerais e açúcar sem a necessidade do micobionte.

O cultivo *in vitro* de sementes sexuadas de orquídea é uma técnica que além de permitir a propagação massiva em pouco tempo, é uma ferramenta eficaz de melhoramento genético, pois possibilita o desenvolvimento de embriões oriundos do cruzamento genético entre diferentes progenitores, gerando plantas híbridas com características genéticas herdadas de ambos pais (CARDOSO, 2012; CARDOSO; MARTINELLI; TEIXEIRA DA SILVA, 2016; MINAMIGUCHI; NETO, 2007).

Alguns métodos de melhoramento genético também auxiliam nesse processo, como aquele desenvolvido por CARDOSO; MARTINELLI; DA SILVA (2016), o qual se baseia em seleções de plantas ainda nas condições *in vitro* e feitas de forma sistemática a cada processo de repicagem *in vitro*, seguido pela seleção das plantas melhor desenvolvidas na fase de aclimatização e transferência para os vasos maiores, até o momento da floração. Utilizando esse método foi possível a seleção de híbridos de *Cattleya* com crescimento mais rápido e redução do período juvenil entre 1-2 anos, resultando em híbridos precoces para o florescimento e comercialização.

Da mesma forma que meios artificiais para orquídeas servem para a germinação *in vitro* de sementes, também permitem o desenvolvimento fenológico completo de muitas espécies de orquídeas de interesse para o cultivo (SOARES et al., 2013). A produção em larga escala de mudas de orquídea não é realizada apenas por semeadura *in vitro* de sementes, mas também por outras técnicas de cultura de tecidos vegetais que se baseiam no princípio da totipotência permitindo, assim, a regeneração de uma planta completa a partir do tecido somático (MURASHIGE, 1974; STANCATO; BEMELMANS; VEGRO, 2001).

Micropropagação é definida como o cultivo de pequenas partes de plantas denominadas explantes que, após sua posterior regeneração, permitirão a formação e propagação de plantas idênticas no fenótipo e na genética denominadas clones

(CASTILLO, 2007; GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008). Um dos pioneiros na realização de técnicas de micropropagação em orquídeas foi Roton (1949) que utilizou como explantes caules de inflorescência de *Phalaenopsis*, que foram colocados em meios de cultura, conseguindo a estimulação de gemas e a posterior regeneração de plantas inteiras.

MOREL (1960) conseguiu revolucionar a micropropagação em orquídeas após o cultivo dos meristemas de *Cymbidium in vitro*, conseguindo pela primeira vez a clonagem e produção de uma grande quantidade de plantas utilizando esta técnica a partir da formação e produção de corpos semelhantes a protocormos (PLBs), sendo uma alternativa nova para a propagação clonal *in vitro* de orquídeas em larga escala graças à cultura de tecidos vegetais (CHUGH; GUHA; RAO, 2009).

As diferentes técnicas de cultivo *in vitro* aplicadas em orquídeas como o cultivo de suspensões celulares, organogênese e embriogênese somática direta e indireta a partir de diferentes tipos de explantes somáticos permitiram grandes avanços e benefícios para a propagação clonal em orquídeas, bem como para estudos de transformação genética (HOSSAIN *et al.*, 2013) que anteriormente devido às limitações do material eram impossíveis de realizar. Outras técnicas de cultivo *in vitro* usadas para a obtenção de plantas são a fusão de protoplastos, a indução de poliploidias e a mutagêneses permitindo assim acelerar e aumentar o número de novos cultivares nos programas de melhoramento genético.

A poliploidia é uma característica cromossômica, na qual os organismos têm mais de dois conjuntos básicos completos de cromossomos (HONFI; BOLZAN; DAVIÑA, 2017). As plantas poliploides por apresentar um aumento no conjunto básico de cromossomos, provoca também um aumento no conteúdo nuclear e citoplasmático das células de vários órgãos da planta, causando o fenômeno do gigantismo ou *Efeito Gigas* (CAVALLER-SMITH, 1985; REIS, 2013), o que é importante nas áreas de agricultura principalmente na fruticultura e floricultura.

Do ponto de vista agrônomo, as poliploidias geram mudanças excepcionais na arquitetura dos vegetais, gerando plantas compactas devido à diminuição do tamanho do caule. Os poliploides têm folhas verdes mais escuras, mais amplas e mais espessas com formas diferentes das diploides (ENG; HO, 2019). Por exemplo em *Anturium andraeanum* as plantas tetraploides geradas apresentam maior espessura

da folha (CHEN *et al.*, 2011). Em *Manihot esculenta* as plantas poliploides apresentam folhas mais amplas (ZHOU; ZENG; YAN, 2017).

A poliploidização pode ocorrer de maneira natural e artificial, onde a duplicação do número de cromossomos provoca que as plantas adquiram novas características e vantagens adaptativas que seus predecessores tais como aumento na heterosis e heterozigocidade, maior tolerância as condições de estresse abióticas, especiação, redundância genética e apomixis (RANNEY, 2000).

A duplicação artificial de cromossomos em plantas foi desenvolvida devido ao uso de agentes químicos cujo mecanismo de ação é a interferência ou bloqueio em certas etapas do processo de divisão celular, causando a duplicação sintética do número cromossômico nas células vegetais (DHOOGHE *et al.*, 2011). Entre esses antimitóticos estão colchicina, orizalina, trifluralina, pronamida, amoproposfometil (APM) (GERMANÀ, 2012), entre outros; onde a colchicina é o agente mais comumente utilizando para gerar a duplicação do número básico de cromossomos nas plantas (DHOOGHE *et al.*, 2011).

A colchicina atua impedindo a polimerização das tubulinas que formam as fibras do fuso, impedindo a transição da metáfase para a anáfase e forçando os cromossomos a reorganizarem o núcleo interfásico sem passar por um processo de divisão celular (CAPERTA *et al.*, 2006; MONDIN; NETO, 2006).

As primeiras tentativas de indução artificial de poliploidias em plantas foram realizadas por meio de tratamentos térmicos de baixa e alta temperatura nos explantes (BLAKESLEE; AVERY, 1937; RANDOLPH, 1932), sendo essas técnicas ineficientes devido à baixa produção artificial de poliploides. Em seguida, com a descoberta da colchicina, foram iniciados os primeiros testes *ex vitro* utilizando-a como agente indutor de poliploidias em plantas (BLAKESLEE; AVERY, 1937), permitindo assim a geração de uma frequência maior de plantas poliploides em relação à técnica por tratamentos térmicos.

MURASHIGE e NAKANO (1966) relataram pela primeira vez um evento de poliploidia *in vitro* e recomendaram o cultivo *in vitro* como uma ferramenta eficiente para a duplicação de cromossomos em plantas principalmente devido ao maior controle e padronização para gerar poliploides sólidos (SATTLER; CARVALHO; CLARINDO, 2016).

Nas últimas décadas, um grande número de protocolos tem sido desenvolvido para a duplicação sintética de cromossomos mitóticos para diferentes culturas, onde comumente os protocolos estão compostos por 4 estágios: sistema de poliploidização, indução de poliploidização, regeneração de explantes tratados e identificação de poliploides (ENG; HO, 2019).

Para realizar a indução artificial de poliploidias usando colchicina, está pode ser aplicada de maneira *in vivo* diretamente nas plantas (submergindo ou pulverizando-as), bem como *in vitro*, onde os explantes utilizados (meristemas, sementes, gemas, mudas, entre outros) geralmente aqueles de menor tamanho são os mais adequados para ser expostos a determinadas concentrações e tempos de exposição ao agente antimitótico adicionado ao meio de cultura (líquido ou solidificado) (ENG; HO, 2019; REIS, 2013). A vantagem de aplicar a colchicina em um sistema *in vitro* é que ela permite obter um maior controle e eficiência nos tratamentos, e pode ser dividida em dois momentos – indução de poliploidia e transferência para meio de cultura normal, o que permite a identificação e separação das plantas poliploides regeneradas e sua propagação imediata em larga escala dos materiais poliploides obtidos (REIS, 2013).

Enquanto a indução de poliploidia *in vivo* é frequentemente caracterizada pelo aparecimento de mixoploides, que são organismos semelhantes às quimeras naturais e apresentam instabilidade genética devido à presença de células diploides e poliploides (ENG; HO, 2019; REIS, 2013). Esse tipo de organismo, devido aos diferentes níveis de ploidia em suas células, não apresenta padrões nos tempos de desenvolvimento e crescimento vegetal, quando comparadas com as plantas diploides e tetraploides, fazendo com que não sejam de grande interesse na agricultura (REIS, 2013).

A presença de mixoploides é um dos grandes desafios que ocorre durante a indução artificial de poliploides (ENG; HO, 2019). O aparecimento de mixoploides no método de indução *in vivo* pode ser devido ao grande número de células nos tecidos *in vivo*, em que o antimitótico não penetra nas células mais rapidamente do que em explantes com células com menor grau de diferenciação, o que dificulta a ação do antimitótico, causando uma poliploidização não uniforme durante a regeneração do organismo (ENG; HO, 2019), enquanto nos cultivos *in vitro* são utilizados sistemas de regeneração de origem uni ou multicelular o que aumenta as chances de obtenção de plantas poliploides sólidas, de maior interesse para o melhoramento genético.

Entre os métodos de identificação de poliploides estão a contagem de cromossomos, a citometria de fluxo e as características morfológicas (DHOOGHE *et al.*, 2011). A contagem de cromossomos é uma técnica citológica que permite determinar o número de cromossomos nas células, sendo considerada um método direto para a confirmação de poliploides regenerados a partir de explantes tratados com antimitóticos (ENG; HO, 2019). Para realizar a análise do número de cromossomos em células somáticas, existem diferentes protocolos que permitem aumentar a eficiência na obtenção e observação de metáfases mitóticas dentro das células, onde os órgãos utilizados são os de crescimento somático ou meristemático (MONDIN; NETO, 2006).

A citometria de fluxo é uma técnica que permite estimar o conteúdo do DNA nuclear, sendo considerada um indicador para medir os níveis de ploidia nas células e um método indireto para a confirmação de poliploides artificiais (ENG; HO, 2019; SUDA *et al.*, 2007). Essa técnica é baseada nos diferentes níveis de fluorescência que são emitidos por núcleos de células isoladas e coradas com fluorocromos de DNA (SUDA *et al.*, 2007).

A citometria de fluxo é uma técnica rápida e não destrutiva, pois utiliza uma pequena quantidade de tecido e leva pouco tempo para preparar as amostras, além de não necessitar de reagentes caros (CIRES; CUESTA, 2012) ao contrário da análise de contagem de cromossomos que é um método muito trabalhoso composto por várias etapas juntamente com a observação microscópica das preparações mitóticas onde frequentemente ocorrem erros devido ao pequeno tamanho dos cromossomos dificultando os resultados (DHOOGHE *et al.*, 2011).

Atualmente a citometria de fluxo está sendo usada principalmente em alguns estudos de plantas, como a biologia evolutiva, ecologia e sistemática, onde a principal informação fornecida por esta técnica não é apenas determinar individualmente o tamanho total do genoma, mas também fazer uma comparação entre a quantidade de DNA que foi determinado com o do material de referência (SUDA *et al.*, 2007).

As características morfológicas e anatômicas têm sido utilizadas como parâmetros indiretos para a identificação de poliploides. Entre as características morfológicas mais estudadas estão as folhas dos poliploides, visto que muitas vezes são os órgãos das plantas que apresentam as maiores alterações como espessura, tamanho e forma.

Outro órgão que também é estudado é o caule, onde são avaliados a altura e o diâmetro. Em relação às características anatômicas comumente avaliadas em estudos de poliploidia está o número de estômatos, tamanho estomático, densidade estomática e número de cloroplastos (ENG; HO, 2019).

Graças ao uso de agentes antimitótico, a poliploidia artificial tornou-se uma estratégia de grande interesse para o setor de plantas ornamentais, uma vez que o fenômeno da poliploidia em plantas ornamentais provoca aumento no tamanho de órgãos como folhas e flores, maior durabilidade, aumento na intensidade de cores, melhoria na arquitetura floral, restauração da fertilidade, produção triploide e aumento da variabilidade genética (ALDERETE *et al.*, 2007; GRIESBACH, 1985; SATTLER; CARVALHO; CLARINDO, 2016), sendo, portanto, não apenas uma ferramenta útil para produção de plantas, mas também para seu melhoramento genético e prova disso é o número expressivo de espécies ornamentais em que a poliploidia foi utilizada como parte de seu programa de melhoramento genético para gerar novas cultivares (ALDERETE *et al.*, 2007).

Existem na literatura trabalhos sobre indução artificial de poliploidia em diversos gêneros de orquídeas de importância comercial como *Phalaenopsis* (GRIESBACH, 1981), *Dendrodium* (YENCHON; TE-CHATO, 2012), *Cattleya* (MENEZES-SÁ *et al.*, 2019), *Cymbidium* (JI *et al.*, 2011), *Oncidium* (CUI *et al.*, 2010), *Vanda* (TUWO; INDRIANTO, 2016), *Paphiopedidium* (HUY *et al.*, 2019), entre outros gêneros. No caso de orquídeas as poliploidias geraram flores com fragrâncias e cores mais intensas, com conformação mais arredondada e de maior tamanho devido ao aumento do volume celular e nuclear, além disso têm maior tolerância ao estresse; sendo estas características superiores daquelas que possuem as plantas diploides (VICHATO *et al.*, 2007). Por exemplo em *Dendrobium nobile* as plantas tetraploides geradas pela indução com colchicina apresentaram flores com um labelo de formato arredondado com diâmetro e tamanho maior (VICHATO *et al.*, 2014). Em espécies de *Phalaenopsis*, as plantas tetraploides apresentaram aumento no tamanho da flor, além de apresentarem pétalas com melhor textura (CHEN; TANG; KAO, 2009).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Material vegetal e cultivo *in vitro*

Foi utilizado um cruzamento selecionado da coleção de germoplasma da família *Orchidaceae*, de responsabilidade do Prof. Dr. Jean Carlos Cardoso (DBPVA/CCA-UFSCar), onde foi usado como progenitor feminino a cultivar *Brassolaeliocattleya* Haw Yuan Beauty e como progenitor masculino a cultivar *Blc.* Goldenzelle “Lemon Chiffon”.

A cultivar *Blc.* Haw Yuan Beauty é um híbrido trigenérico (*Brassavola* x *Cattleya* x *Laelia*) originado por Haw Yuan em 1997 formado a partir do cruzamento entre *Rlc.* Haw Yuan Moon x *C.* Mari's Song (IOF, 2022a). Ela é caracterizada por apresentar flores de tamanho médio, sépalas brancas, pétalas laterais brancas no centro e roxas nas bordas e labelo nas cores amarelo, roxo e branco. A cultivar é uma planta de porte baixo com folhas de coloração verde claro, com desenvolvimento rápido e vigoroso, e que resulta em florações após 24 meses de cultivo em estufa de cultivo (Figura 1A).

A cultivar *Blc.* Goldenzelle “Lemon Chiffon” é um híbrido trigenérico (*Brassavola* x *Laelia* x *Cattleya*) originado por J. Hanes em 1982 formado a partir do cruzamento entre *Rlc.* Fortune x *C.* Horace (IOF, 2022b). Ela apresenta flores grandes e volumosas, de coloração predominantemente amarela com labelo grande e na coloração vinho e dois tons de amarelo. A planta é de porte alto com folhas verdes claras (Figura 1B).

Conforme a International Orchid Foundation (IOF, 2022a, 2022b) as características ornamentais e agronômicas da cultivar *Blc.* *Haw Yuan Beauty* vêm principalmente de 4 espécies de *Cattleya*: *C. briegei* (25%), *C. intermedia* (13%), *C. forbesii* (13%) e *C. loddigesii* (11%). Para *Blc.* Goldenzelle “LC” as espécies *C. dowiana* (33%), *C. trianae* (25%), *C. tenebrosa* (8%), e *C. bicolor* (7%) são as responsáveis por dar as características na cultivar.

Não há informações na literatura sobre a ploidia ou conteúdo de DNA desses híbridos.

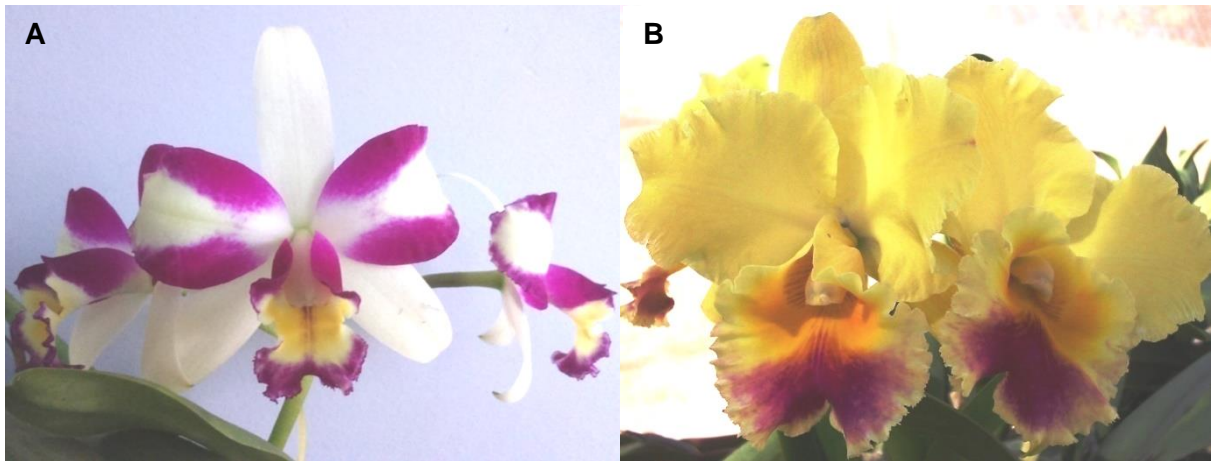


Figura 1. A. Cultivar *Brassolaeliocattleya* Haw Yuan Beauty. **B.** Cultivar *Brassolaeliocattleya* Goldenzelle “Lemon Chiffon”

A cápsula madura proveniente do cruzamento entre *Blc.* Haw Yuan Beauty x *Blc.* Goldenzelle Lemon “Chiffon” foi colhida com aproximadamente nove meses do momento da polinização, no momento da deiscência dos frutos, e as sementes foram previamente retiradas da cápsula e secas a temperatura ambiente por 24 horas antes do armazenamento a 8°C em Eppendorfs de 1,5 mL.

Para a desinfecção e a semeadura *in vitro* de sementes, foi seguido o protocolo utilizado em Laboratório de Fisiologia Vegetal e Cultura de Tecidos do Centro de Ciências Agrárias da UFSCar, utilizando solução contendo 15% de água sanitária (2.0-2.5% de cloro ativo). As sementes foram inoculadas e cultivadas em 30 mL de meio de cultura MS com a concentração de macronutrientes reduzida pela metade, 2% de sacarose, 1,2 g L⁻¹ de carvão ativado, 0,1 g L⁻¹ de inositol e pH ajustado para 5,7 antes da adição de 6,4 g L⁻¹ Ágar (MS Orquídea), acondicionados em frascos de vidro de 250 mL de volume, conforme resultados previamente obtidos em nosso laboratório e utilizados na rotina de cultivo. O cultivo das sementes, protocormos e plântulas foram realizados a temperatura de 25 ± 2 C° e iluminação fornecida por LEDs de cultivo nos comprimentos de onda do vermelho e azul (3:1), com fotoperíodo de 16 horas.

As sementes germinadas, na fase de protocormos e com 90 dias de cultivo, foram subcultivadas no mesmo meio de cultura e condições de cultivo por mais 90 dias até a obtenção das plântulas. Dessa forma, para a fase experimental, foram estabelecidos o uso de três tipos de explantes provenientes desse mesmo cruzamento, sendo esses:

Sementes utilizando o método de tratamento com a colchicina pela imersão das sementes como pré-tratamento, seguido de inoculação *in vitro* das sementes para a germinação; protocormos com idade de 90 dias após o período de germinação *in vitro*; e plântulas com idade de 180 dias de cultivo desde a semeadura *in vitro*, todos provenientes do mesmo cruzamento (Figura 2).

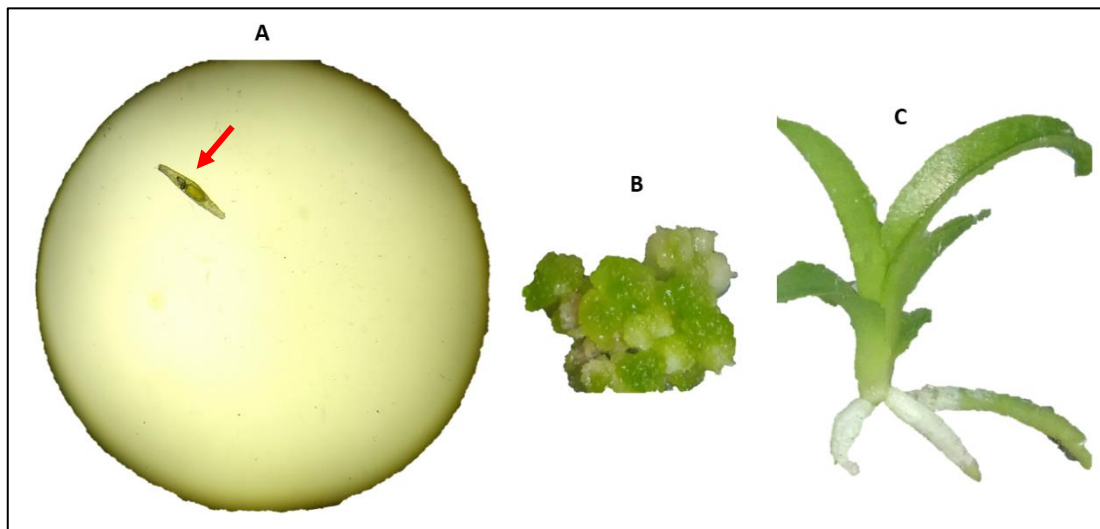


Figura 2. Explantes provenientes do cruzamento entre *B/c.* Haw Yuan Beauty x *B/c.* Goldenzelle "LC". **A.** Semente (seta vermelha). **B.** Protocormo. **C.** Plântula.

4.2. Estágio I: Indução de poliploidização

4.2.1. Experimento 1: Concentrações e tempos de exposição à colchicina

A colchicina foi o agente utilizado com o objetivo de induzir a duplicação dos cromossomos nas células, que foi adicionada em uma solução previamente dissolvida em 1% de DMSO (v/v); em concentrações de 0,00; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08% no meio MS orquídea de acordo com o explante utilizado e em tempos de exposição de 6, 12, 18, 24 horas. Foi utilizado um delineamento experimental inteiramente casualizado, com fatorial 5x4, no qual os diferentes tipos de explantes foram submetidos a cinco tratamentos com colchicina e quatro tempos de exposição.

4.2.2. Experimento 2: Exposição dos diferentes tipos de explantes da progênie de *Blc.* Haw Yuan Beauty x *Blc.* Goldenzelle “LC” à colchicina

Para a indução artificial de poliploidias, foram utilizados como explantes: sementes provenientes de frutos maduros e tratamento *in vivo*; protocormos com 90 dias de cultivo *in vitro*, e; plântulas com aproximadamente 180 dias de cultivo *in vitro* (Figura 3). Para os tratamentos contendo diferentes tipos de explantes foram utilizados de referência 5 mg de sementes, 15 protocormos e 10 plântulas por repetição de cada tratamento. Foram utilizadas quatro repetições, consistidas de frascos de vidro contendo as quantidades citadas de cada explante, por repetição.

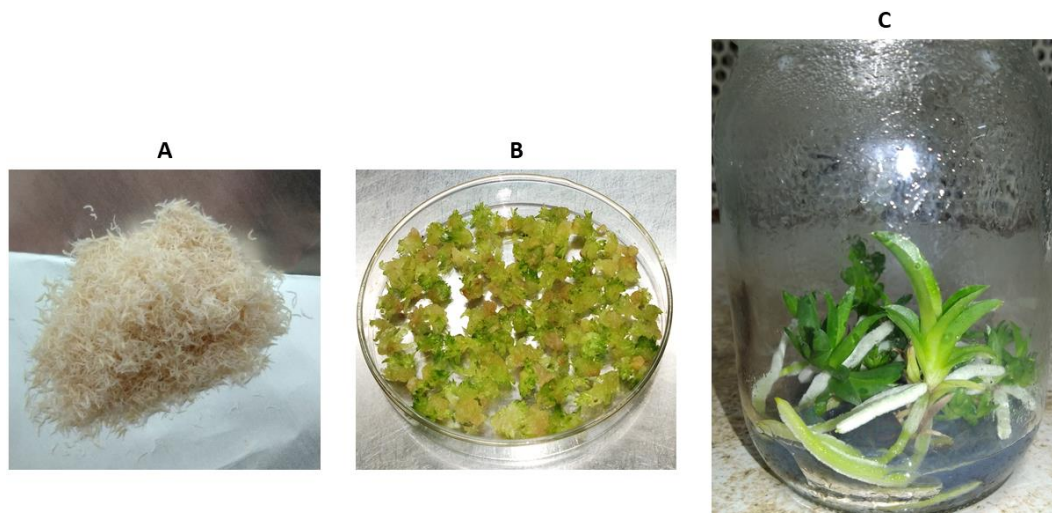


Figura 3. Explantes da progênie de *Blc.* Haw Yuan Beauty x *Blc.* Gondenzelli “LC” utilizados para realizar a indução artificial de poliploidias **A.** Sementes. **B.** Protocormos. **C.** Plântulas

4.2.3 Metodologia utilizada para os tratamentos com colchicina nos experimentos

Os tratamentos dos explantes com a colchicina em diferentes tempos de exposição foi realizado em meio líquido visando aumentar a superfície de contato e a exposição ao agente indutor. O meio de cultura líquido utilizado foi o mesmo meio de cultura utilizado para o cultivo *in vitro*, conforme descrito no ítem 4.1, porém ausentes de carvão ativado e ágar e contendo as diferentes concentrações de colchicina que foram esterilizados a frio com auxílio de filtro EMD Millipore Millex™. Após o preparo dos meios esses foram colocados em Erlenmeyer de 250 ml e em agitadores rotativos

horizontais (shaker) a 60 rpm e mantidos no escuro a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante os tratamentos. Em cada ensaio, um meio de cultura líquido sem colchicina foi incluído como controle. Ao final dos tempos de exposição com a colchicina, todos os explantes utilizados foram lavados com água deionizada estéril por três vezes para retirada da colchicina dos explantes tratados, e depois cultivados novamente no meio de cultura MS orquídea contendo carvão e ágar e conforme descrito no item 4.1, portanto, gelificado e sem a presença da colchicina.

4.2.4. Avaliações dos explantes tratados com colchicina

Para as avaliações essas foram divididas de acordo com o tipo de explante.

Experimento com o pré-tratamento aplicado às sementes: foi avaliado a porcentagem de sementes contendo embriões, a partir da presença ou ausência do embrião dentro da testa, bem como a porcentagem de germinação aos 180 dias da semeadura; as porcentagens de desenvolvimento de sementes em protocormos e/ou plântulas; massa fresca total de tecido vegetal obtidos por frasco.

No experimento com o tratamento dos protocormos previamente germinados *in vitro* foram avaliados aos 180 dias de cultivo as porcentagens de sobrevivência e morte dos protocormos tratados com a colchicina assim como também as porcentagens de massa fresca de proliferação de PLBs e de regeneração de protocormos em plântulas além da massa fresca total de tecido vegetal obtidos por frasco.

No experimento com uso das plântulas: Após de 180 dias de cultivo foi avaliada as porcentagens de sobrevivência e morte das plântulas tratadas com a colchicina assim como também a regeneração do explante, onde os parâmetros avaliados foram as porcentagens de regeneração de plântulas em PLBs e de plântulas em plântulas, além da massa fresca total de tecido vegetal obtidos por frasco.

4.3. Estágio II: Análise de ploidia das plântulas regeneradas

4.3.1. Análise citológica

a) Obtenção de raízes para análise citogenética

Uma vez obtidas plântulas (parte aérea + raízes) provenientes dos diferentes tipos de explantes tratados: sementes, protocormos e plântulas, foram selecionadas 60 plântulas por tratamento (15 plântulas por repetição) e do controle sem o

tratamento com a colchicina, para serem transferidas para um meio de enraizamento MS orquídea por 3-4 meses, até a obtenção de raízes para serem utilizadas visando o processamento da amostra para contagem de cromossomos

A primeira varredura para determinação da ploidia dessas plântulas pré-selecionadas foi realizada por citometria de fluxo comparando-se as plantas progenitoras, progênes do controle e aquelas obtidas dos tratamentos com diferentes tempos e concentrações de colchicina, seguido então pela contagem de cromossomos de ao menos cinco plantas caracterizadas como híbridos não tratados com ploidia estimada entre os parentais, e híbridos tratados com poliploidia confirmada em relação ao controle, provenientes das análises de citometria de fluxo, para confirmação dos resultados provenientes da citometria.

As metodologias utilizadas de citometria de fluxo e contagem de cromossomos nas células estão descritas abaixo:

b) Análise de citometria de fluxo das plântulas da progênie de *Blc.* Haw Yuan Beauty x *Blc.* Goldenzelle “LC” obtidas da regeneração dos explantes tratados e não tratados

As amostras que foram utilizadas para a análise por citometria de fluxo foram obtidas de folhas jovens e saudáveis de plântulas *in vitro* da progênie de *Blc.* Haw Yuan Beauty x *Blc.* Goldenzelle “LC” da fase de enraizamento, sendo utilizadas para isso oito, 13 e cinco plântulas obtidas do tratamento das sementes, protocormos e plântulas, respectivamente, com seis semanas de cultivo no meio de enraizamento.

O padrão interno utilizado para as análises foi *Solanum lycopersicum* L., 1753, 'Stupické' (2C = 2,00 pg) (PRAÇA-FONTES et al., 2011). Um fragmento foliar de ~2 cm² de cada indivíduo de *Blc.* Haw Yuan Beauty x *Blc.* Goldenzelle “LC” e do padrão interno foram simultaneamente retalhados (GALBRAITH et al., 1983) por cerca de 30 s em placa de Petri contendo 0,5 mL do tampão OTTO-I (OTTO, 1990) suplementado com 50 µg mL⁻¹ RNase e 2 mM ditiotreitól (PRAÇA-FONTES et al., 2011) e incubados por 3 min. 0,5 mL do mesmo tampão foi adicionado e a suspensão foi filtrada em filtro de nylon (Partec®) de 30 µm de diâmetro num microtubo de 2,0 mL.

Após centrifugação a 100 xg por 5 min, o sobrenadante foi descartado e 100 µL do mesmo tampão foram adicionados ao precipitado, o material foi homogeneizado em

vortex e incubado durante 10 min. Posteriormente, 0,5 mL do tampão de coloração OTTO-II (OTTO, 1990; PRAÇA-FONTES et al., 2011) modificado (400 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2 mM ditiotretitol, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ RNase, e 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ iodeto de propídeo –IP – comprimentos de onda de excitação/emissão: 480–575/550–740 nm) foi adicionado às suspensões. As suspensões foram filtradas em malha de nylon (Partec®) de 20 μm para os tubos de leitura (Partec®) e mantidas por 30 min no escuro para coloração dos núcleos.

Em seguida, as suspensões foram analisadas em citometro de fluxo (BD Accuri C6 flow cytometer, Accuri cytometers, Belgium) equipado com laser 488 nm para promover excitação do IP e emissão deste para os filtros FL2 (615 – 670 nm) e FL3 (> 670 nm). Os picos de fluorescência dos núcleos G0/G1 de cada indivíduo de *Blc. Haw Yuan Beauty* x *Blc. Goldenzelle* “LC” e do padrão interno foram analisados a partir de histogramas utilizando o software BD Accuri™ C6. Os picos G0/G1 com coeficiente de variação (CV) menor do que 5% foram considerados para a determinação do nível de ploidia de DNA. Para o cálculo do conteúdo de DNA nuclear de cada indivíduo de *Blc. Haw Yuan Beauty* x *Blc. Goldenzelle* “LC” em picogramas (pg) foi utilizada a seguinte fórmula: Conteúdo de DNA de cada indivíduo de *Blc. Haw Yuan Beauty* x *Blc. Goldenzelle* “LC” (pg) = [(canal médio do pico G0/G1 de cada indivíduo de *Blc. Haw Yuan Beauty* x *Blc. Goldenzelle* “LC”) * 2,00 pg *S. lycopersicum*] / (canal médio do pico G0/G1 de *S. lycopersicum*).

Também foram analisadas pela citometria de fluxo as cultivares *Blc. Haw Yuan Beauty* e *Blc. Goldenzelle* “LC”.

c) Exibição e contagem de cromossomos

As amostras que foram utilizadas para determinar o número de cromossomos foram as raízes jovens de 5 plântulas com nível de ploidia de 2C e 5 plântulas com nível de ploidia de 4C caracterizadas a partir da análise de citometria de fluxo.

Foi realizada a coleta das raízes de plântulas *in vitro* em câmara de fluxo laminar aproximadamente as 10:00 am. Foi realizado o pré-tratamento das raízes coletadas (~2 cm) em uma solução misturada de 8 – hidroxiquinolína e 300 ppm com ciclohexamina 25 ppm (19:1) por 24 horas com temperatura controlada de 27 °C. As raízes pré-tratadas foram fixadas em uma solução de Carnoy 3:1 por 24 horas com temperatura controlada de 27°C.

Foi utilizado o método de Feulgen para a coloração das raízes (MONDIN; AGUIAR-PERECIN, 2009). As raízes foram lavadas duas vezes por cinco minutos com água destilada e hidrolisadas em uma solução de HCl 5N a 60 °C por 12 minutos. Depois foram feitas duas lavagens com água destilada por cinco minutos e as raízes hidrolisadas foram incubadas no reagente de Schiff por 45 minutos em escuro. As raízes coradas foram colocadas duas vezes em uma solução de tampão citrato 0.01M por 5 minutos, para logo realizar a digestão enzimática usando uma solução misturada de celulase ($1,4 \text{ U mL}^{-1}$) e pectinase ($29,4 \text{ U mL}^{-1}$) (1:1) por uma hora de incubação.

Após da digestão, as raízes foram colocadas em uma solução de tampão citrato sobre placa de gelo até a preparação das lâminas. Para a preparação básica das lâminas citológicas contendo metáfases mitóticas foi realizada de acordo o protocolo descrito por MONDIN e AGUIAR-PERECIN (2009), onde a raiz foi colocada em uma solução de ácido acético 45% por ~2 minutos e em seguida o meristema radicular foi macerado sobre uma lâmina com uma gota de carmim acético 1%. Foi colocada uma lamínula sobre o tecido macerado e aquecido com ajuda de uma lamparina para seu posterior esmagamento/ squash.

Para a contagem de cromossomos as lâminas foram analisadas usando o microscópio Zeiss Axiophot 2 usando o filtro apropriado. As imagens foram adquiridas pela câmera PCO CCD e digitalizadas a traves do software IKARUS (Metasystems, Germany). Imagens das células contendo metáfases mitóticas foram capturadas com objetivo de 1000X. Para analisar e fazer a contagem dos cromossomos foi usado software Image J.

5. FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os dados foram analisados no software AgroEstat Online (<http://www.agroestat.com.br/>) onde foi realizada a análise de variância (ANOVA) e as diferenças estatísticas entre as médias dos tratamentos foram identificadas através do teste de comparações múltiplas de Tukey ($P < 0,05$ e $< 0,01$).

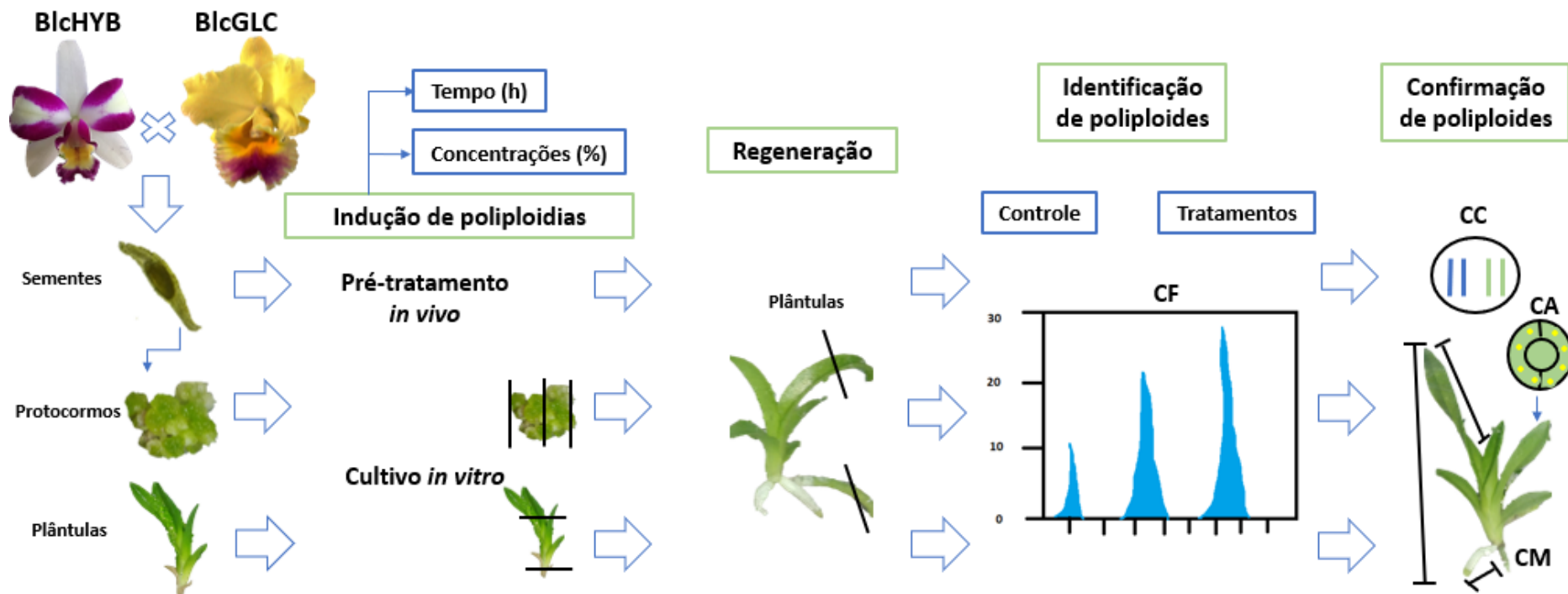


Figura 4. Metodologia usada para a indução artificial de poliploides da progênie de B1cHYB x B1cGLC. **B1cHYB:** *B1c.* Haw Yuan Beauty. **B1cGLC:** *B1c.* Goldenzelle “LC”. **CF:** Citometria de fluxo. **CC:** Contagem de cromossomos. **CA:** Características anatômicas. **CM:** Características morfológicas.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Efeitos da exposição à colchicina nos diferentes tipos de explantes da progênie de *Blc.* Haw Yuan Beauty x *Blc.* Goldenzelle “LC”

a) Sementes

A porcentagem de sementes contendo embriões da progênie de *Blc.* Haw Yuan Beauty x *Blc.* Goldenzelle “LC” foi de 81,3% (Figura 5). Em *Cattleya maxima* foi observado que a porcentagem de sementes com embrião zigótico foi de 55,44% (VILCHERREZ-ATOCHE; ROJAS-IDROGO; DELGADO-PAREDES, 2020) e em híbridos interespecíficos de *Cattleya* foi observado que a média da porcentagem de sementes com embrião foi de 44,22% (STORT, 1984).



Figura 5. Sementes do cruzamento entre *Blc.* Haw Yuan Beauty x *Blc.* Goldenzelle ‘LC’. **A.** Semente com embrião. **B.** Semente sem embrião.

Dessa forma, a contabilização de sementes com e sem embriões em orquídeas é um método para avaliar a viabilidade de um cruzamento específico, pois devido às características ainda pouco conhecidas e provavelmente de origem genética, são geradas diferentes porcentagens de sementes contendo ou não embriões, sendo que o cruzamento e os parentais utilizados podem resultar em maior ou menor quantidade de sementes contendo embriões (dados não publicados).

Entre as hipóteses que poderiam explicar este tipo de resposta nos híbridos em comparação com as espécies parentais estão as barreiras reprodutivas e de fertilidade (ARIDA *et al.*, 2021), além da esterilidade masculina causada pelo desenvolvimento anormal dos grãos de pólen (HU; LEE; LEE, 2018).

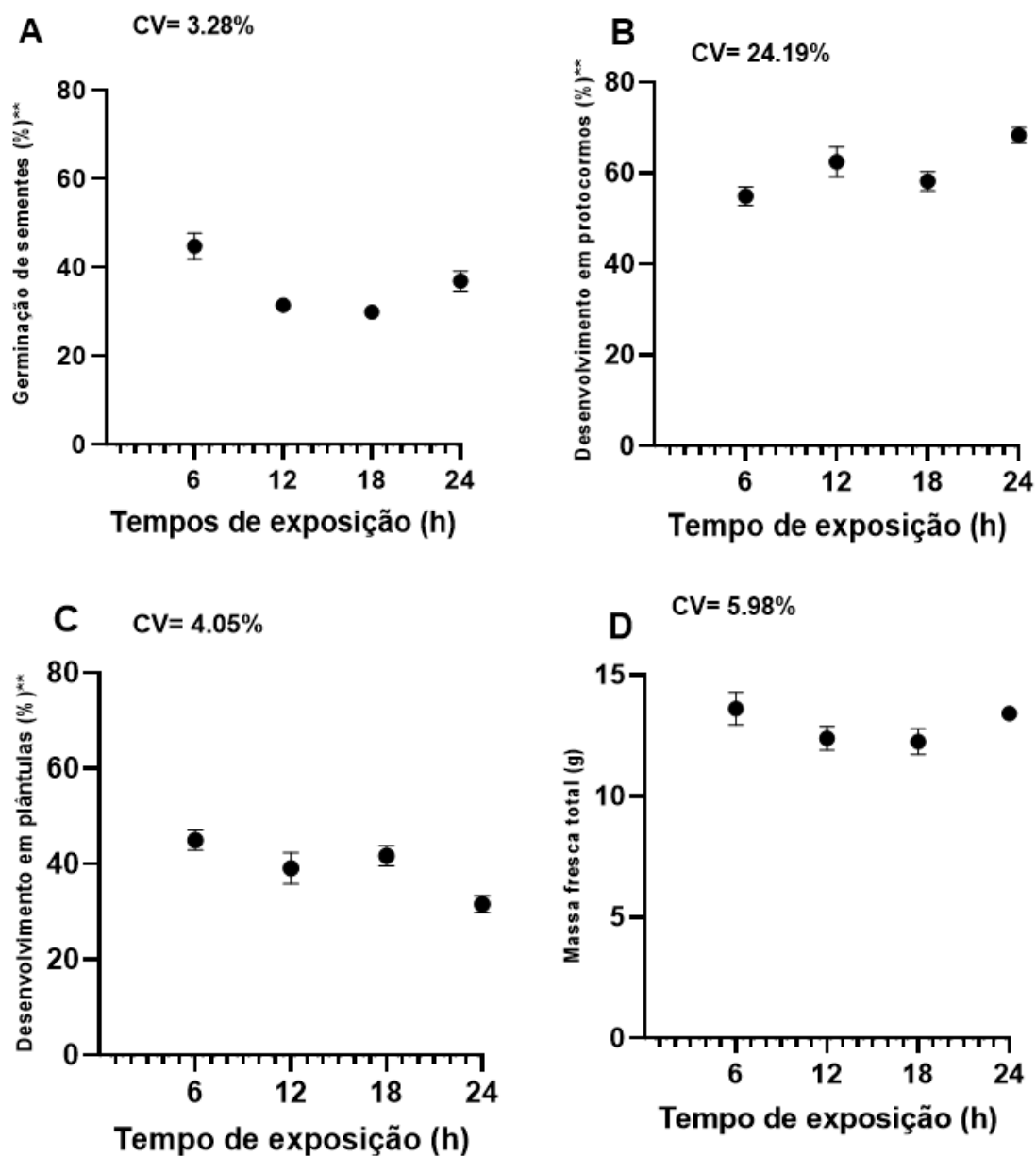


Figura 6. Efeitos do tempo de exposição à colchicina de sementes da progênie de *B/c*. Haw Yuan Beauty x *B/c*. Goldenzelle "LC". **A.** Germinação (%). **B.** Desenvolvimento em protocormos (%). **C.** Desenvolvimento em plântulas (%). **D.** Massa fresca total (g).

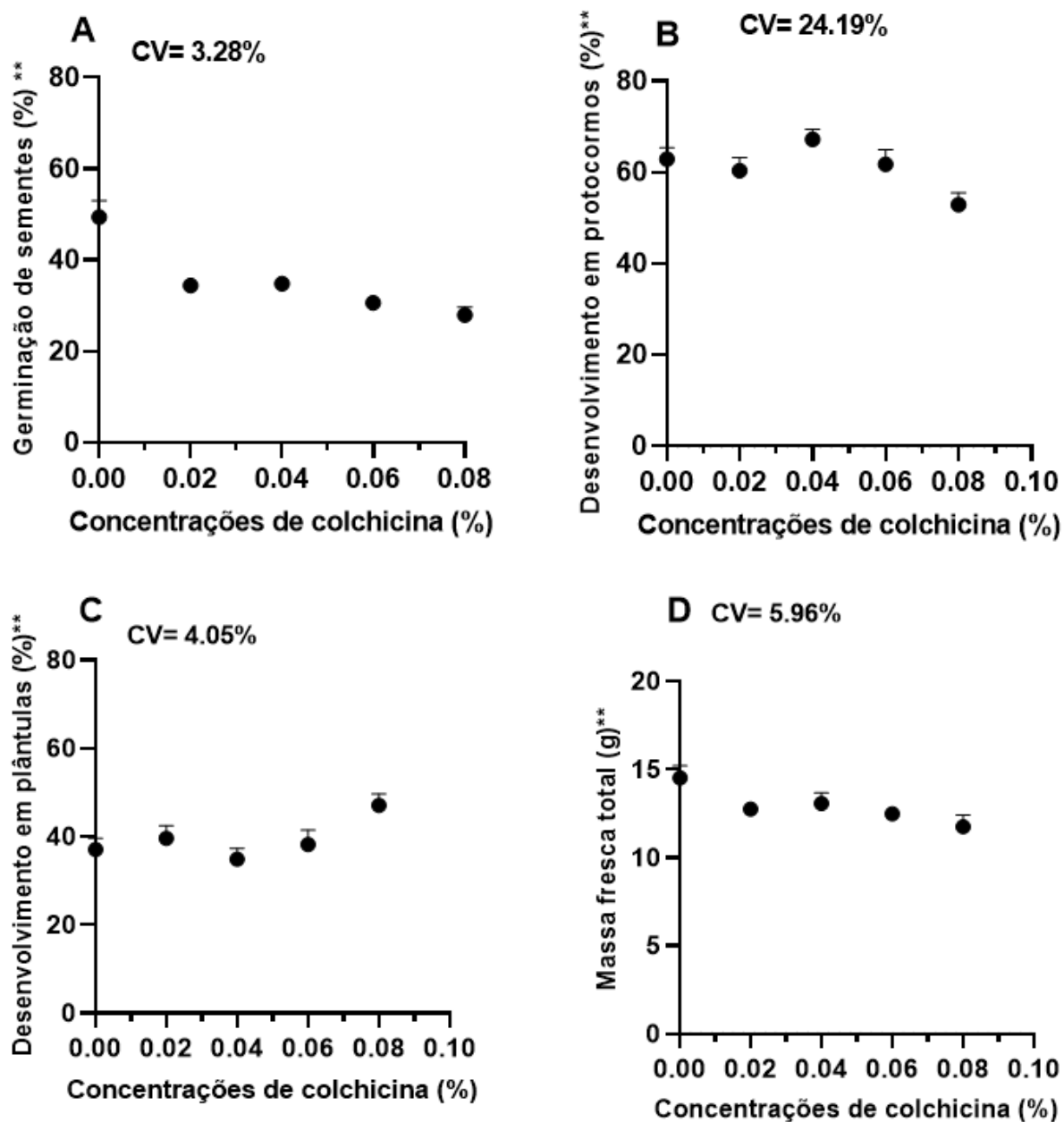


Figura 7. Efeitos das concentrações de colchicina de sementes da progênie de *Blc.* Haw Yuan Beauty x *Blc.* Goldenzelle "LC". **A.** Germinação (%). **B.** Desenvolvimento em protocormos (%). **C.** Desenvolvimento em plântulas (%). **D.** Massa fresca total (g).

Para a porcentagem de germinação, observou-se que à medida que as concentrações de colchicina aumentavam, provocava uma diminuição nos valores da variável analisada (Figura 7A). Para o fator tempo de exposição, observou-se uma diminuição na porcentagem de germinação de 14,9% entre os valores dos tempos 6 e 18 horas. (Figura 6A).

Resultados semelhantes também foram observados em outros trabalhos sobre a indução de poliploidias em plantas utilizando sementes como explantes, como no caso de *Sesamum indicacum* (ANBARASAN *et al.*, 2014), *Tetradenia ripara* (HANNWEG *et al.*, 2016), *Buddleja lindleyana* (YAN *et al.*, 2022), entre outros; em que a colchicina não só afetou a porcentagem de germinação, mas também no desenvolvimento das plantas após a germinação, gerando anormalidades ou dificultando sua sobrevivência.

Existem estudos que explicam os diferentes efeitos da colchicina nas células e tecidos vegetais, como o trabalho de ADAMAKIS; PANTERIS e ELEFTHERIOU (2010) em que observaram que a colchicina produziu efeitos sobre os microtúbulos corticais das células das raízes de *Pisum sativum*, uma vez que essas ultraestruturas foram substituídas por uma extensa rede de paracristais de tubulina/colchicina. Da mesma forma, PANTERIS *et al.* (2010) realizaram um trabalho sobre o efeito da colchicina em *Vigna sinnesis* observando que as células das plântulas após o tratamento com colchicina apresentaram paracristais de tubulina/colchicina endoplasmática, além de determinar a relação entre as proteínas MAP65 juntamente com a presença desses polímeros atípicos.

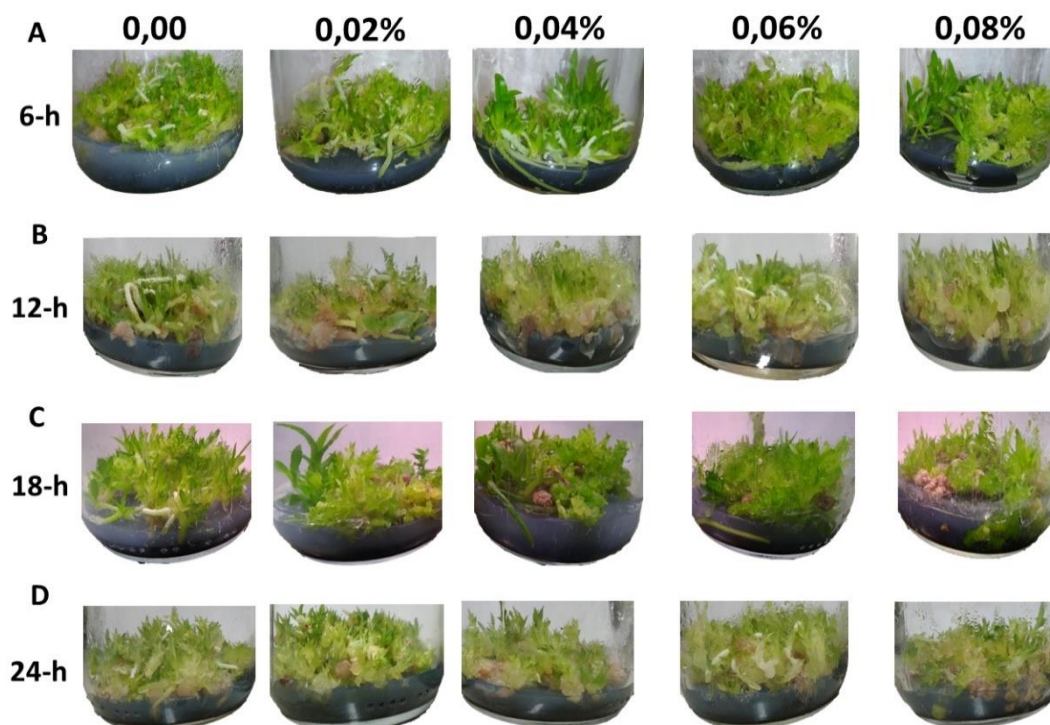


Figura 8. Efeitos de diferentes tempos de exposição e concentrações de colchicina no desenvolvimento *in vitro* de sementes da progênie de *Blc*. Haw Yuan Beauty x *Blc*. Goldenzelle “LC”. **A.** 6 horas / 0,00 a 0,08%. **B.** 12 horas / 0,00 a 0,08%. **C.** 18 horas / 0,00 a 0,08%. **D.** 24 horas / 0,00 a 0,08%.

WANG *et al.*, (2012) observaram que nas células radiculares de *Triticum aestivum* tratadas com colchicina essas apresentavam um bloqueio das junções de microtúbulos, fazendo com que o aparelho de Golgi se localize em diferentes áreas da célula dependendo do estágio de divisão celular. Por exemplo, nas células de interfase, essas organelas se agregam no citoplasma cortical enquanto nas células em fase mitótica elas se acumulam ao redor dos cromossomos. Outra alteração provocada pela colchicina é a interferência nos processos de polimerização dos microtúbulos, como foi determinado nas raízes de mutantes e não mutantes de *Arabidopsis thaliana* tratadas com colchicina e orizalina, na qual as células radiculares após a exposição com a colchicina mostraram uma extensa despolimerização dos microtúbulos corticais provocando uma instabilidade até uma ausência dessas ultraestruturas celulares (GIOURIEVA; PANTERIS, 2021).

No caso das porcentagens de desenvolvimento de sementes em protocormos e plântulas, ambas tiveram respostas opostas em relação aos tempos de exposição e concentrações de colchicina. Para o fator tempo de exposição foi observado que o tratamento mais longo (24 horas) provocou um aumento de 13,7% na porcentagem de desenvolvimento em protocormos (68,4%) e uma diminuição de 13,4% na porcentagem de desenvolvimento em plântulas (31,6%) em relação ao tratamento por 6 horas (54,1% e 45,0% respectivamente) (Figura 6B e 6C).

UNEMOTO *et al.* (2009) determinaram que o tempo de exposição é um fator importante que afeta tanto o desenvolvimento quanto a sobrevivência das plantas na presença de colchicina, pois observaram que tempos de exposição muito longos geraram uma diminuição no crescimento da parte aérea e da raiz nas plântulas regeneradas a partir de protocormos tratados com colchicina.

Acredita-se que a diminuição do crescimento no tecido vegetal tratado com colchicina seja causada pelo efeito negativo do antimitótico nas células meristemáticas, gerando ciclos anormais durante as divisões celulares (THAO *et al.*, 2003), resultando em baixo desenvolvimento da planta, sendo esse um dos motivos pelo qual as sementes da progênie de *Blc.* Haw Yuan Beauty x *Blc.* Goldenzelle "LC" formaram uma maior porcentagem de protocormos e uma menor porcentagem de plântulas no maior tempo de exposição proposto no experimento (Figura 8)

Para o fator de concentração de colchicina, observou-se que o tratamento com maior concentração (0,08%) causou uma diminuição de 9,8% na porcentagem de desenvolvimento em protocormos (52,9%) e um aumento de 9,99% na porcentagem de desenvolvimento em plântulas (47,1%) em relação ao tratamento controle (62,9% e 37,1% respectivamente) (Figura 7B e 7C).

Somente o fator concentração de colchicina teve efeito sobre a massa fresca total, com uma redução de 2,8 g na concentração 0,08% de colchicina (11,8g/frasco) em relação ao tratamento controle (14,5g/frasco) (Figura 7D). Entre os vários efeitos da colchicina nas plantas estão aqueles relacionados a alterações no funcionamento normal dos microtúbulos e na resposta hormonal específica de cada tecido vegetal (HARD; SABNIS, 2013) provocando anormalidades no desenvolvimento das plantas germinadas, por exemplo em sementes de *Lilium rosthorni* o alcaloide gerou hipocótilos com fenótipos anormais em forma, superfície, cor e baixa proporção de pêlos radiculares (WANG *et al.*, 2020).

Da mesma forma em sementes de *Buddleja lindleyana* tratadas com colchicina foi observado uma inibição no crescimento e comprimento do hipocótilo e da radícula (YAN *et al.*, 2022). Em uma análise de transcriptoma nas respostas de plantas à duplicação artificial de cromossomos usando colchicina, também foi determinado que o alcaloide inibiu genes relacionados a ultraestruturas celulares, celulose, segregação cromátide, processos de movimento intracelular, morfogênese da membrana e parede celular (ZHOU *et al.*, 2017) confirmando que a colchicina tem efeitos negativos não só no nível estrutural, mas também no nível genético, causando desorganização e anormalidades em células e tecidos.

Também foi observado diferenças estatísticas significativas entre as interações dos fatores concentrações de colchicina (%) x tempos de exposição (h) para as porcentagens de germinação e de desenvolvimento de sementes em protocormos e plântulas (Tabela 1).

Tabela 1. ANOVA e Teste de médias para os parâmetros avaliados nas sementes da progênie de *B/c.* Haw Yuan Beauty x *B/c.* Goldenzelle “LC”.

Genótipo: Progênie de <i>B/c.</i> Haw Yuan Beauty x <i>B/c.</i> Goldenzelle “LC”					
Sementes					
Fatores		Variáveis			
		PG (%)	PDP_r (%)	PDPI (%)	MFT (%)
	R1: Tempo de exposição	59,2**	12,9**	10,1**	2,5 ns
	R2:	69,9**	7,7**	4,8**	3,9**
	Concentrações (%)				
	Interação R1 x R2	5,1**	4,1**	3,1**	1,6 ns
	Coefficiente de variação (%)	3,3	24,2	4,1	6,0

PG: porcentagem de germinação; PDP_r: porcentagem de desenvolvimento de protocormos; PDPI: porcentagem de desenvolvimento de plântulas; MFT: massa fresca total. As médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade. ** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$). ns não significativo.

Para a variável porcentagem de germinação, o tratamento com 0,08% de colchicina por 18 horas (23,5%) gerou uma diminuição de 45,6% na germinação em relação ao tratamento controle por 6 horas (69,1%) (Tabela 2).

Tabela 2. Interações entre as concentrações de colchicina (%) e os tempos de exposição (h) na porcentagem de germinação de sementes da progênie de *B/c.* Haw Yuan Beauty x *B/c.* Goldenzelle “LC”.

Germinação de sementes (%)		CC (%)				
		0,00	0,02	0,04	P,06	0.08
TE (h)	6	69,1 Aa	41,7 Ab	4,9 Ab	32,7 Ac	38,1 Abc
	12	39,3 Ca	31,1 Bb	34,0 Bab	29,2 Abc	24,1 Bc
	18	35,9 Ca	32,5 Bab	30,3 Bab	27,5 Abc	23,5 Bc
	24	53,5 Ba	39,5 Ab	33,3 Bb	33,2 Ab	25,4 Bc

CC: concentrações de colchicina, TE: tempos de exposição.

Resultados similares foram observados em alguns trabalhos com orquídeas como *Bletilla striata* onde foi observado que o tratamento com maior concentração de colchicina / maior tempo de exposição (0,4% colchicina por 9 dias) causou a menor taxa de germinação nas sementes (LI *et al.*, 2018). CHUNG *et al.* (2014) realizaram uma indução de poliploidias utilizando sementes híbridas de *Calanthe* (*C. discolor* x *C. sieboldii*) onde determinaram que o tratamento com 0,1% de colchicina por 7 dias gerou uma diminuição na porcentagem de germinação de 11,8% em relação ao tratamento controle.

Para a variável porcentagem de desenvolvimento de sementes em protocormos, o tratamento com 0,06% de colchicina por 24 horas de exposição provocou o maior valor com 75,8% (Tabela 3), enquanto o tratamento com 0,08% de colchicina por 12 horas de exposição causou o menor valor com 43,4% (Tabela 3). Para a variável porcentagem de desenvolvimento de sementes em plântulas, observou-se comportamento contrário à variável porcentagem de desenvolvimento de sementes em protocormos, dado que o tratamento com 0,06% de colchicina por 24 horas de exposição apresentou o menor valor com 24,2% (Tabela 3), enquanto o tratamento com 0,08% de colchicina por 12 horas de exposição resultou no maior valor com 56,5% (Tabela 3).

No híbrido *Dendrobium santana* x *D. friedericksianum* foi observado que o segmento nodal tratado com 0,1% de colchicina por 72 horas produziu brotações no 100% dos explantes tratados (CHOOPENG; TE-CHATO; KHAWNIUM, 2019).

Tabela 3. Interações entre as concentrações de colchicina (%) e os tempos de exposição (h) de sementes da progênie de *B/c.* Haw Yuan Beauty x *B/c.* Goldenzelle “LC”. **A.** Desenvolvimento em protocormos (%). **B.** Desenvolvimento em plântulas (%).

A. Desenvolvimento em protocormos (%)		CC (%)				
		0,00	0,02	0,04	0,06	0,08
TE (h)	6	60,7 Ba	59,1 Aba	54,3 Ba	49,1 Ba	51,8 Aa
	12	74,6 Aa	54,9 Bbc	75,0 Aa	64,6 Bab	43,5 Ac
	18	52,9 Ba	56,8 Ba	68,2 Aa	57,6 Ba	55,8 Aa
	24	63,3 Bb	70,7 Aab	71,3 Aab	75,8 Aa	60,6 Ab
B. Desenvolvimento em plântulas (%)		CC (%)				
		0,00	0,02	0,04	0,06	0,08
TE (h)	6	39,3 Aa	40,9 Aab	45,7 Aa	50,9 Aa	48,2 Aa
	12	25,4 Bc	45,2 Aab	33,3 ABbc	35,4 ABbc	56,5 Aa
	18	47,1 Aa	43,2 ABa	31,8 Aba	42,5 Aa	44,2 Aa
	24	36,7 Abab	29,3 Bab	28,7 Bab	24,2 Bb	39,4 Aa

CC: concentrações de colchicina, TE: tempos de exposição.

b) Protocormos

Foi possível obter regeneração proveniente de protocormos tratados com colchicina a partir de todos os tratamentos realizados com diferentes concentrações e tempos de exposição dos explantes, sendo que parte dos protocormos tratados regeneraram plântulas diretamente e parte resultaram na produção de Protocorm-like Bodies ou PLBs (Figura 9A), estruturas similares a protocormos, porém de origem somática (CARDOSO; ZANELLO; CHEN, 2020) nesse caso proveniente dos protocormos tratados.

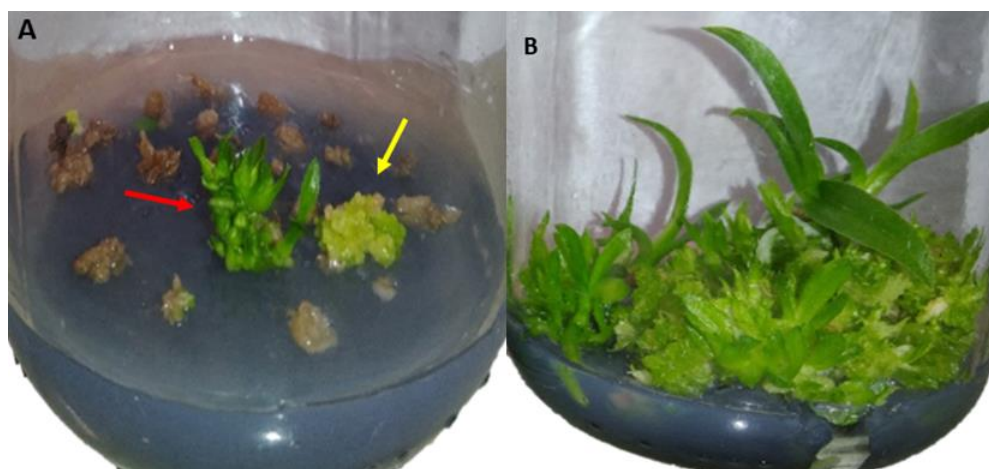


Figura 9. Efeitos da colchicina sobre a sobrevivência de protocormos *in vitro* da progênie de *Blc.* Haw Yuan Beauty x *Blc.* Goldenzelle “LC”. **A.** Protocormos cultivados em meio MS Orquídea por 120 dias após o tratamento com colchicina na concentração 0,08% e tempo de exposição 24 horas, demonstrando os tecidos mortos (*), a regeneração de PLBs (seta amarela) e plântulas (seta vermelha). **B.** Protocormos do tratamento controle em regeneração.

As porcentagens de sobrevivência dos protocormos tratados com colchicina foram influenciadas apenas pela concentração de colchicina, observando-se uma diminuição da sobrevivência à medida que as concentrações do alcaloide aumentaram (Figura 11A).

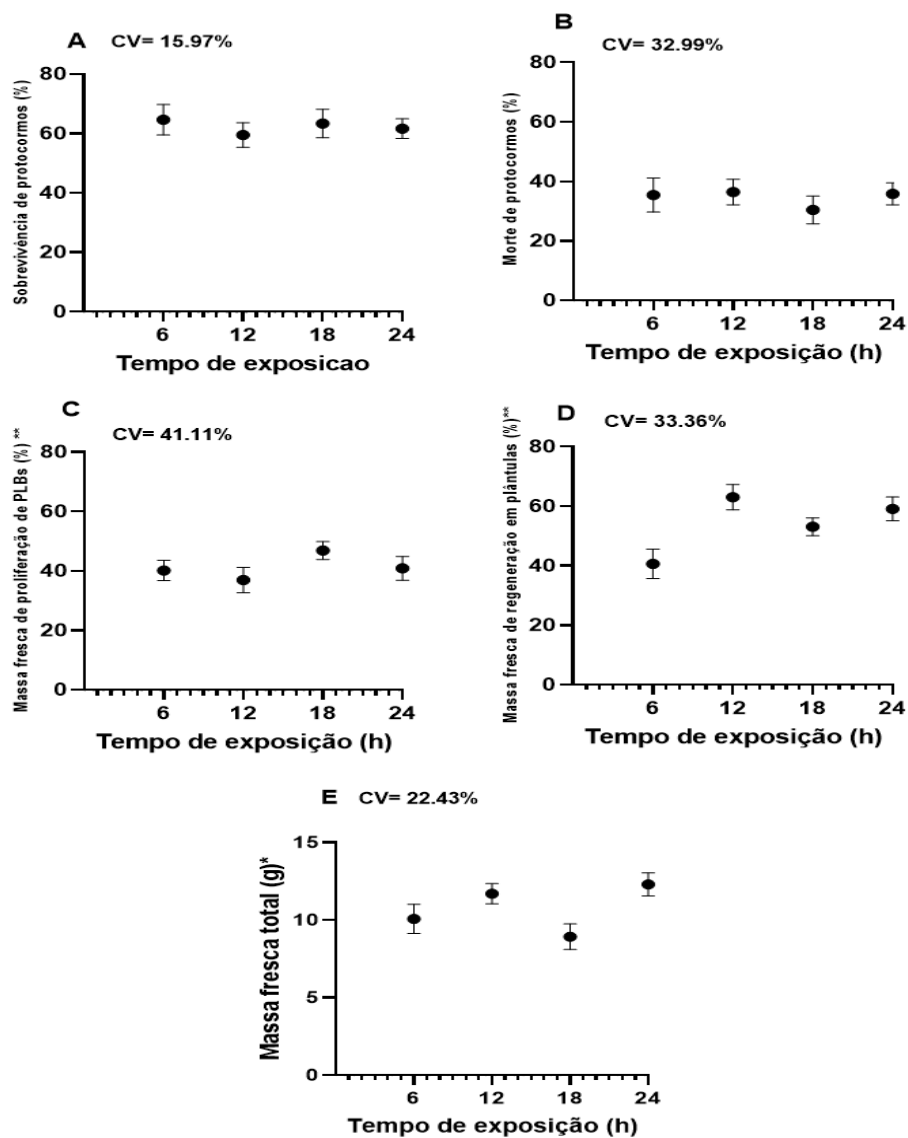


Figura 10. Efeitos do tempo de exposição à colchicina nos protocormos da progênie de *B/c.* Haw Yuan Beauty x *B/c.* Goldenzelle “LC”. A. Sobrevivência (%). B. Morte (%). C. Massa fresca de proliferação de PLBs (%). D. Massa fresca de regeneração em plântulas (%). E. Massa fresca total (g).

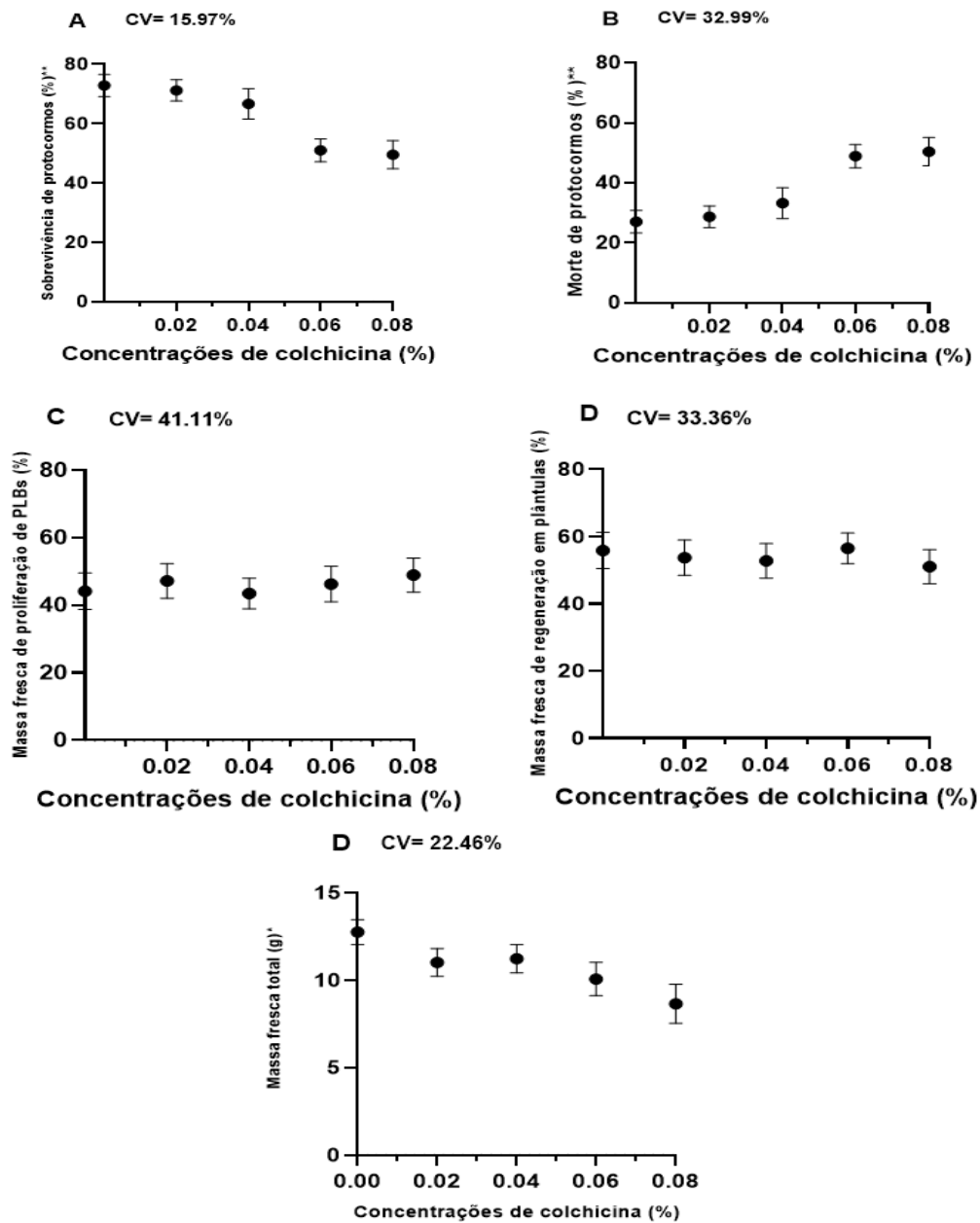


Figura 11. Efeitos das concentrações de colchicina nos protocormos da progênie de *Bc.* Haw Yuan Beauty x *Bc.* Goldenzelle “LC”. A. Sobrevivência (%). B. Morte (%). C. Massa fresca de proliferação de PLBs (%). D. Massa fresca de regeneração em plântulas (%). E. Massa fresca total (g).

Resultados semelhantes foram observados em protocormos de diferentes orquídeas tratadas com colchicina (BUNNAG; HONGTHONGKHAM, 2012, 2015; RAHAYU et al., 2015; RUNGRUCHKANONT; APISITWANICH, 2014; TUWO; INDRIANTO, 2016), no qual o aumento da concentração e do tempo de exposição à colchicina, resultaram em aumento da morte dos tecidos vegetais e, conseqüentemente, diminuição da porcentagem de sobrevivência dos tecidos tratados. Como exemplo, em *Cattleya tigrina*, LONE et al. (2010) observaram redução na taxa de sobrevivência dos explantes, somente na maior concentração de colchicina (1%), sendo essas de 100%, 96%, 84 e 100% no controle, e com 24, 48 e 72 horas de exposição dos explantes, respectivamente.

ATICHART e BUNNAG (2007) determinaram que as taxas de sobrevivência dos protocormos de *Dendrobium secundum* dependiam das concentrações e dos tempos de exposição à colchicina, sendo a maior concentração de colchicina (0,2%) a de maior efeito fitotóxico para os explantes. Em *D. draconis*, BUNNAG e HONGTHONGKHAM (2015) também observaram diminuição nas porcentagens de sobrevivência dos protocormos na maior concentração de colchicina (0,10%), sendo essas de 47%, 30%, 10% e 13% para 1, 2, 3 e 4 dias de exposição, respectivamente.

Esses autores explicam que o efeito fitotóxico do antimitótico em seu experimento pode ser devido ao fato de terem usado colchicina junto com meio de cultura MS sólido, onde os protocormos após tempos de exposição prolongados perderam umidade e, portanto, absorveram maiores quantidades do antimitótico causando a diminuição na sobrevivência dos explantes tratados de quase 90% (0,1% de colchicina por 3 dias) (BUNNAG; HONGTHONGKHAM, 2015).

Durante a indução artificial de protocormos da progênie de *Blc. Haw Yuan Beauty* x *Blc. Goldenzelle "LC"*, as diferentes concentrações de colchicina foram colocadas junto ao meio de cultura líquido MS para aumentar a superfície de contato e manter a viabilidade dos protocormos, permitindo assim uma diminuição na sobrevivência de quase 50% (0,08% de colchicina) (Figura 11A), aumentando as possibilidades de obtenção de plantas poliploides devido à presença de um maior número de explantes vivos tratados.

Também foram observadas diferenças estatísticas significativas entre as interações dos fatores concentrações de colchicina (%) x tempos de exposição (h) com a variável porcentagem de sobrevivência dos protocormos (Tabela 4), no qual o tratamento com colchicina 0,08% por 18 horas (38,3%) gerou uma diminuição de 46,7% na sobrevivência do explante em relação ao tratamento controle por 6 horas (85,0%) (Tabela 5).

Tabela 4. ANOVA e Teste de médias para os parâmetros avaliados nos protocormos da progênie de *Blc. Haw Yuan Beauty* x *Blc. Goldenzelle "LC"*

Genótipo: <i>Blc. Haw Yuan Beauty</i> x <i>Blc. Goldenzelle "LC"</i>						
Plântulas						
		Variáveis				
		PS (%)	PM (%)	PMFPPLBs (%)	PMFRPI (%)	MTF (g)
Fatores	R1: Tempo de exposição	0,5 ns	0,6 ns	5,0**	5,3**	4,1*
	R2: Concentrações (%)	7,7**	7,5**	0,2 ns	0,2 ns	2,3*
	Interação R1 x R2	1,9*	1,9 ns	0,7 ns	0,7 ns	1,0 ns
	Coeficiente de variação (%)	12,5	16,0	33,0	41,1	33,4

PS: porcentagem de sobrevivência; PM: porcentagem de morte; PMFPPr: porcentagem de massa fresca de proliferação de PLBs; PMFRPI: porcentagem de massa fresca de regeneração de plântulas; MFT: massa fresca total. As médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 1% e 5% de probabilidade. ** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$). * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). ns não significativo.

Tabela 5. Interações entre as concentrações de colchicina (%) e os tempos de exposição (h) na porcentagem de sobrevivência de protocormos da progênie de *Blc.* Haw Yuan Beauty x *Blc.* Goldenzelle “LC”.

	Sobrevivência de protocormos (%)	CC (%)				
		0	0.02	0.04	0.06	0.08
TE (h)	6	85,0 Aa	70,0 Aab	48,3 Bb	55,0 Aab	65,0 Aab
	12	68,3 Aa	75,0 Aa	63,3 ABa	47,5 Aa	43,3 Aa
	18	73,3 Aab	76,7 Aa	85,0 Aa	43,3 Abc	38,3 Ac
	24	65,0 Aa	63,3 Aa	70,0 ABa	58,3 Aa	51,7 Aa

CC: concentrações de colchicina, TE: tempos de exposição

Nas espécies *Cattleya luedemanniana* e *C. schilleriana*, cdeterminou que as maiores porcentagens de sobrevivência dos protocormos foram observadas no menor tratamento (0,15 uM de orizalina por 3 dias), sendo essas de 67% e 69% respectivamente. XIE *et al.* (2017) observaram que as maiores taxas de sobrevivência em protocormos de *Cymbidium hybridum* foram para o tratamento de 0,05% de colchicina por 5 dias e para o tratamento controle, sendo essas de 86,24% e 100% respectivamente.

Em *Rhynchosstylis gigantean var. rubrum*, KERDSUWAN e TE-CHATO (2012) observaram flutuações nas porcentagens de sobrevivência de PLBs já que para as concentrações 0,05% e 0,1% de colchicina por 72 horas os valores foram quase 50% e para o tratamento 0,15% de colchicina por 72 horas foi de 72,52%. Esses autores explicam que a existência de flutuações nas taxas de sobrevivência pode ser devido ao pequeno número de amostras no experimento, bem como aos diferentes estados fisiológicos de desenvolvimento e vigor das PLBs, o que poderia causar diferentes respostas na tolerância ou sensibilidade dos explantes ao antimitótico nas mesmas concentrações ou tempos de exposição.

A colchicina também ocasionou efeitos fisiológicos importantes nos protocormos, resultando em morte de parte dos protocormos e tecidos expostos à colchicina, portanto não sobrevivendo aos tratamentos (Figuras 9 e 12). Isso foi observado pela diferença de coloração entre parte dos explantes tratados com o alcaloide, que apresentaram coloração marrom, demonstrando a morte parcial ou total dos tecidos tratados (Figura 9A), em relação aos protocormos não tratados (Figura 9B).

Nesse caso, é válido salientar que em alguns casos, mesmo que os protocormos apresentassem coloração marrom, após um período de cultivo dos mesmos no meio de cultura, ainda foi possível observar o surgimento de novos pontos de formação de PLBs nos tecidos, demonstrando que parte dos efeitos fitotóxicos da colchicina afetaram grande parte, mas não a totalidade do tecido, permitindo, portanto, sua regeneração (Figura 12).

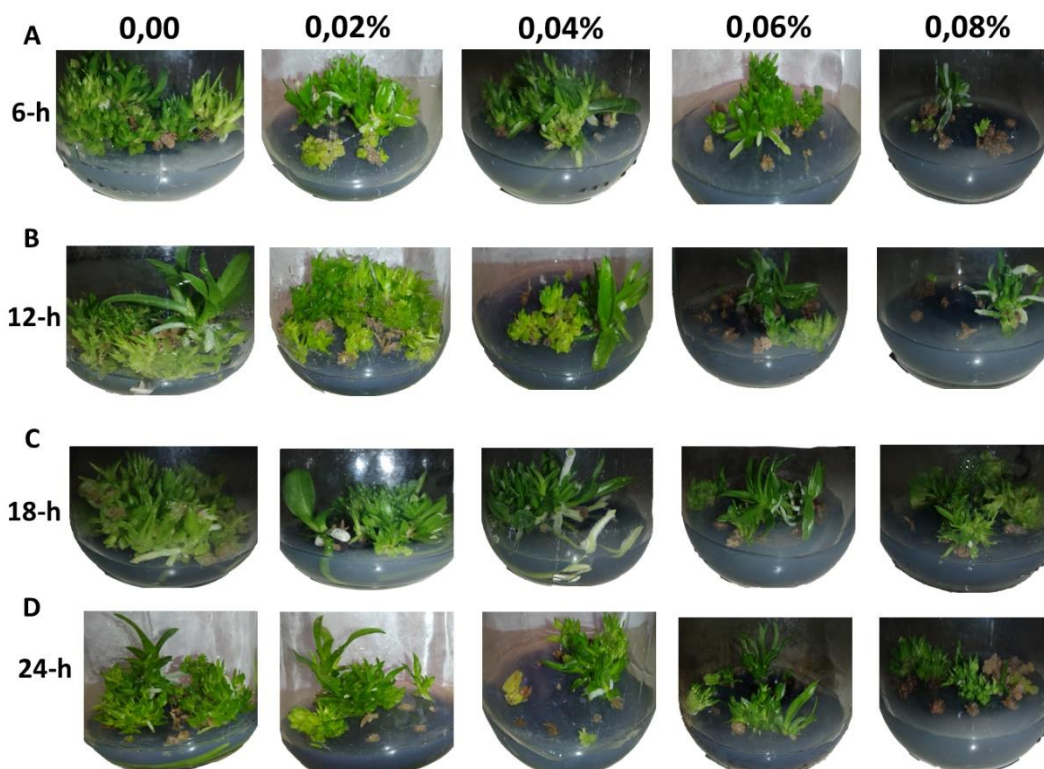


Figura 12. Efeitos de diferentes tempos de exposição e concentrações de colchicina na sobrevivência e morte de protocormos da progênie de *B/c*. Haw Yuan Beauty x *B/c*. Goldenzelle "LC". **A.** 6 horas / 0,00 a 0,08%. **B.** 12 horas / 0,00 a 0,08%. **C.** 18 horas / 0,00 a 0,08%. **D.** 24 horas / 0,00 a 0,08%.

Resultados similares foram obtidos com o uso de colchicina *in vitro* na indução de poliploidias em protocormos de *Vanda*, sendo que a resposta à colchicina dos tecidos resultou em maior acúmulo de compostos fenólicos, resultando em desenvolvimento limitado dos explantes tratados (TUWO; INDRIANTO, 2016)

Outro grupo de variáveis analisada para os efeitos da colchicina foram as porcentagens de massa fresca de PLBs, plântulas e massa total regeneradas em diferentes tratamentos de concentrações e tempos de exposição à colchicina (Tabela 4).

A massa fresca total regenerada (PLBs + plântulas) foi influenciada pelos fatores concentração e tempo de exposição à colchicina (Tabela 4). A maior concentração de colchicina (0,08%) causou uma diminuição de 4,09 g de massa fresca em relação ao tratamento controle (Figura 11E). Maiores concentrações de colchicina provavelmente geram uma diminuição nas taxas de divisão mitótica (HEO *et al.*, 2016), causando irregularidades no desenvolvimento normal das células vegetais, sendo esse um dos motivos da redução da massa fresca total nos protocormos da progênie de *Blc.* Haw Yuan Beauty x *Blc.* Goldenzelle “LC”.

GALDIANO (2013) utilizou outro agente antimitótico alternativo à colchicina, a orizalina, visando a obtenção de plantas poliploides de duas espécies de *Cattleya* (*C. luedemanniana* e *C. schilleriana*), e observaram que o aumento das concentrações de orizalina (60 e 90 μM por 6 dias) resultaram na diminuição da massa fresca de protocormos de *C. luedemanniana*.

Alguns herbicidas inibidores de mitose (orizalina, trifluran, entre outros) usados em baixas concentrações têm um efeito estimulante sobre o crescimento das plantas (GANGA; CHEZHIYAN, 2002), mas concentrações maiores desses reagentes causam desequilíbrios na regulação da divisão celular, provocando redução no desenvolvimento das plantas, como foi verificado na redução da massa fresca de plântulas de *C. luedemanniana* expostas a orizalina (GALDIANO, 2013).

Para o fator tempo de exposição, o tratamento com maior tempo de exposição à colchicina (24 horas) resultou no maior valor de massa fresca total (12,3 g), observada pela presença de maior regeneração de protocormos em plântulas (Figura 10E). Já UNEMOTO *et al.* (2009) observaram que o tempo de exposição à colchicina por 48 horas foi aquele que mostrou o maior valor de massa fresca.

O efeito positivo da colchicina nos processos morfogênicos em plantas pode ser devido à duplicação artificial do genoma da célula vegetal juntamente com a influência de estímulos ambientais, causando um aumento no número de células devido à formação de novas regiões meristemáticas (NURA *et al.*, 2017; UNO; STOREY; MOORE, 2001). Em *Alocasia* 'Green Velvet', observou-se que os tratamentos com colchicina e orizalina causaram proliferação de brotações por explante tratado, no qual esse efeito pode ser devido à interação dos antimitóticos com as células meristemáticas (THAO *et al.*, 2003).

HLAING *et al.* (2020) observaram em *Antirrhinum majus* que altas concentrações e tempos de exposição a outro agente antimitótico chamado AMP geraram dois tipos de efeitos: a morte de plântulas e a proliferação de brotações adventícias, onde uma vez que os novos órgãos da planta fossem induzidos, eles poderiam continuar seu crescimento sem os efeitos inibitórios do AMP devido à transição de tecido jovem para tecido maduro.

Houve influência do tempo de exposição, mas não da concentração, sobre o tipo de desenvolvimento, pela formação de PLBs ou plântulas diretamente dos protocormos, após o tratamento a colchicina (Tabela 4). A avaliação dessas variáveis foi obtida a partir da porcentagem da massa individual de formação de novos PLBs ou plântulas nos diferentes tratamentos.

De uma forma geral, à medida que o tempo de exposição à colchicina aumentou, isso resultou em diminuição na porcentagem de massa fresca de formação de PLBs (Figura 10C) e, aumento da porcentagem de massa fresca de protocormos que regeneraram diretamente em plântulas (Figura 10D), observada pela presença de múltiplas brotações formadas a partir dos protocormos tratados (Figura 13 e 14).



Figura 13. Efeitos da colchicina sobre as porcentagens de massa fresca de proliferação de PLBs e regeneração a plântulas de protocormos *in vitro* da progênie de *Blc.* Haw Yuan Beauty x *Blc.* Goldenzelle “LC”. Protocormos cultivados em meio MS Orquídea por 180 dias após o tratamento com colchicina na concentração 0,08% e tempo de exposição 24 horas, demonstrando os tecidos mortos (*), a regeneração de PLBs (seta vermelha) e plântulas (seta amarela).

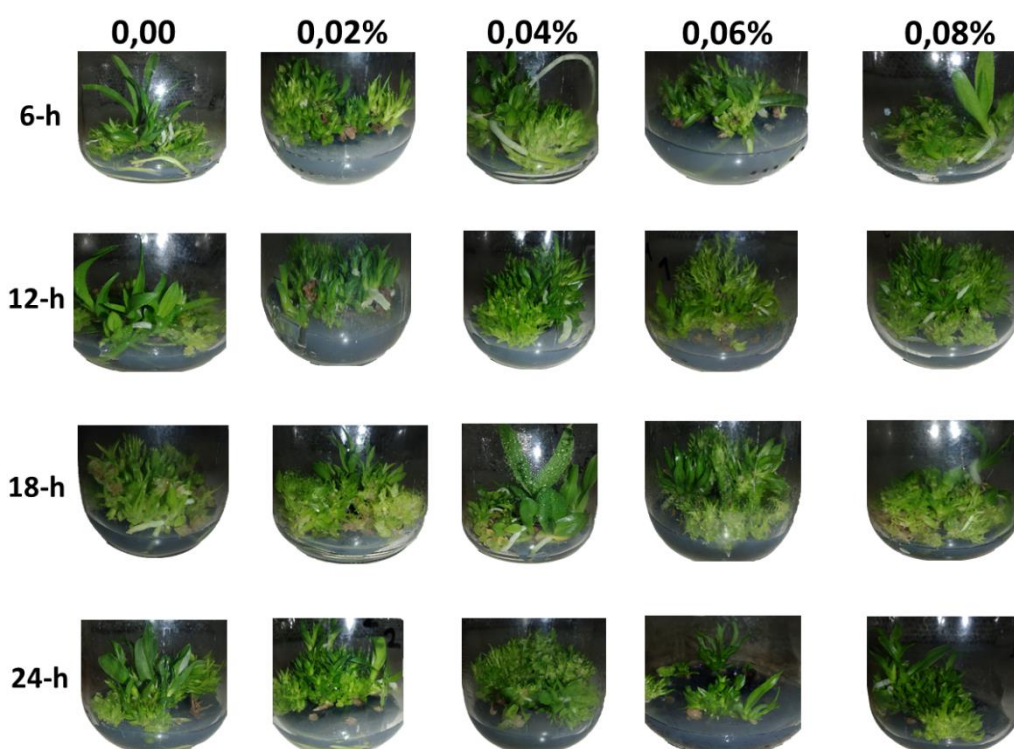


Figura 14. Efeitos de diferentes tempos de exposição e concentrações de colchicina no desenvolvimento de protocormos *in vitro* da progênie de *Blc. Haw Yuan Beauty* x *Blc. Goldenzelle* “LC”. **A.** 6 horas / 0,00 a 0,08%. **B.** 12 horas / 0,00 a 0,08%. **C.** 18 horas / 0,00 a 0,08%. **D.** 24 horas / 0,00 a 0,08%.

Em *Antirrhinum majus*, altas concentrações de colchicina e orizalina estimularam a formação de brotos adventícios em epicótilos (HLAING *et al.*, 2021). Segundo HLAING *et al.* (2021), uma das hipóteses sobre os mecanismos reguladores da indução de brotos adventícios de hipocótilos e epicótilos se deve ao fator estresse produzido pelos efeitos negativos sobre as ultraestruturas celulares e pela disjunção cromossômica anormal. POTTERS *et al.* (2007) explicam que as respostas morfológicas induzidas pelo fator estresse podem variar desde a estimulação da divisão mitótica até alterações e inibições da diferenciação e alongamento celular.

Em alguns trabalhos sobre os efeitos da colchicina em protocormos, observou-se que o antimitótico exerceu um efeito estimulante sobre os explantes, como no trabalho de LONE *et al.* (2010), onde observaram que o tratamento com maior tempo de exposição (72 horas) à colchicina resultou em aumento da regeneração de plântulas a partir dos protocormos de *Cattleya tigrina* tratados com colchicina. Em *Oncidium flexosum*, UNEMOTO *et al.* (2009) determinaram que os protocormos tratados com colchicina por 120 horas apresentaram maior número de plantas regeneradas com intensa proliferação de brotações.

a) Plântulas

O aumento das concentrações e tempos de exposição ao alcaloide reduziu significativamente a porcentagem de sobrevivência das plântulas *in vitro* (Tabela 6, Figura 15A e 16A). O efeito fitotóxico da colchicina nas plantas é devido à sua atividade fitotóxica nas células vegetais (BLASCO; LUISA; NAVAL, 2015)

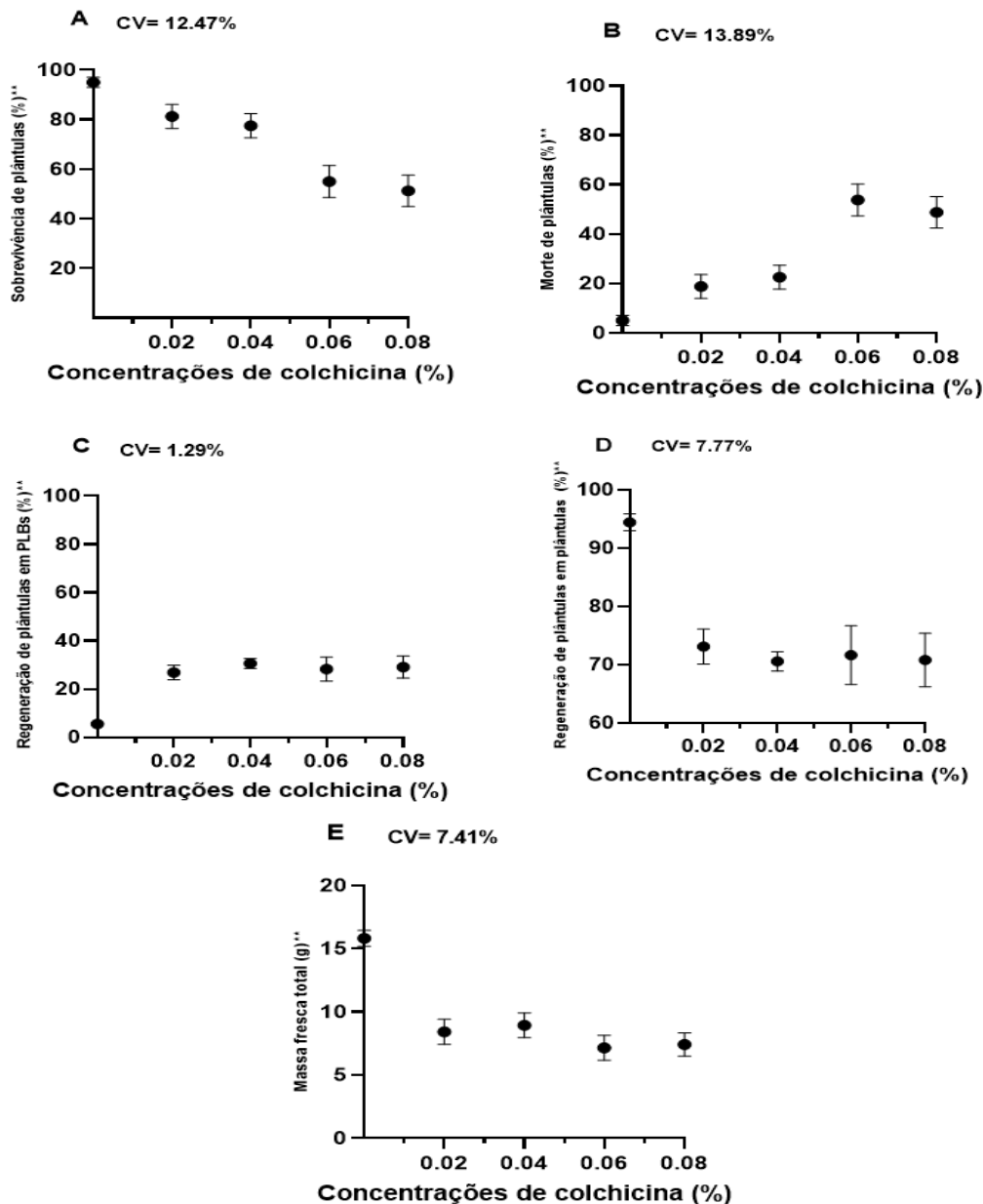


Figura 15. Efeitos das concentrações de colchicina em plântulas da progênie de *Blc. Haw Yuan Beauty* x *Blc. Goldenzelle* "LC". A. Sobrevivência (%). B. Morte (%). C. Regeneração de plântulas em PLBs (%). D. Regeneração de plântulas em plântulas (%). E. Massa fresca total (g).

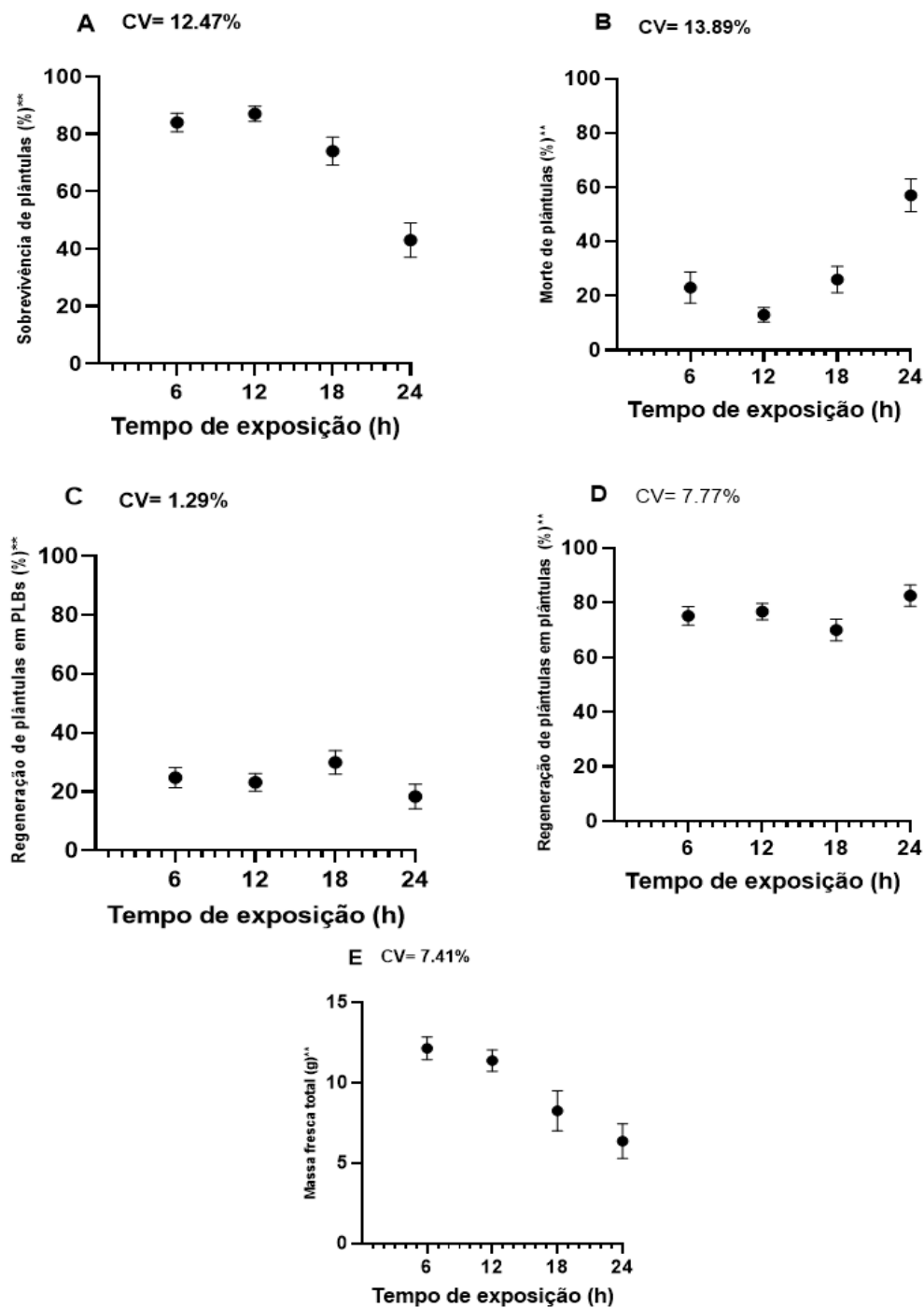


Figura 16. Efeitos do tempo de exposição à colchicina em plântulas da progênie de *Blc.* Haw Yuan Beauty x *Blc.* Goldenzelle “LC”. **A.** Sobrevivência (%). **B.** Morte (%). **C.** Regeneração de plântulas em PLBs (%). **D.** Regeneração de plântulas em plântulas (%). **E.** Massa fresca total (g).

Similar ao que ocorreu com o experimento com protocormos, as plântulas expostas aos diferentes tratamentos com colchicina também apresentaram alteração da cor de verde para marrom em comparação com as plântulas dos tratamentos controle, demonstrando efeitos fitotóxicos da colchicina sobre os tecidos, resultando em morte de parte das plântulas tratadas (Figura 17A). No entanto, embora algumas plântulas tenham morrido em decorrência do tratamento com colchicina, uma parte das plântulas com esses sintomas se regeneraram, resultando em formação de PLBs ou novas brotações (Figura 17A).



Figura 17. Efeitos da colchicina sobre a sobrevivência de plântulas *in vitro* da progênie de *Blc.* Haw Yuan Beauty x *Blc.* Goldenzelle “LC”. **A.** Plântulas cultivadas em meio MS Orquídea por 120 dias após o tratamento com colchicina na concentração 0,08% e tempo de exposição 24 horas, demonstrando os tecidos mortos (seta vermelha), a regeneração de plântulas (seta amarela); **B.** Plântulas do tratamento controle em regeneração.

MOHAMMADI; KAVIANI e SEDAGHATHOOR (2021) também observaram que o aumento da concentração de colchicina de 0,00% para 0,15% (por 72 horas) diminuiu a porcentagem de sobrevivência de 85% (controle) para 50% de plântulas tratadas de *Phal. amabilis*. CHOOPENG; TE-CHATO e KHAWNIUM (2019) observaram menor taxa de sobrevivência dos segmentos nodais no híbrido *Dendrobium santana* x *D. friedericksianum*, tratados com diferentes concentrações de colchicina (0,01%; 0,05% e 0,1%) por 72 horas, sendo essas de 13,33%; 6,67% e 16,67%, respectivamente.

Apesar disso, alguns autores, não observaram redução da sobrevivência de explantes em decorrência do tratamento com colchicina, nas *Cattleya trigina* e *Dendrobium nobile*, (MENEZES-SÁ *et al.* (2019) e VICHATO *et al.* (2007), demonstrando que os efeitos fitotóxicos da colchicina também podem estar associados a sensibilidade dos genótipos utilizados.

Isso também já foi observado no gênero *Cattleya*. Em *Cattleya intermedia* foram reportadas diferentes porcentagens de sobrevivência em dois clones diferentes de *Cattleya intermedia* expostos aos mesmos tratamentos com colchicina.

Também foi observado interação entre os fatores concentração de colchicina (%) e tempo de exposição (h) para a variável porcentagem de plântulas mortas (Tabela 6). Foi observado que o tratamento com maior concentração de colchicina e tempo de exposição (0,08% de colchicina por 24 horas) resultou na maior porcentagem de plântulas mortas (85%). Os tratamentos controle por 6 e 12 horas não causaram danos às plântulas (Tabela 7).

Tabela 6. ANOVA e Teste de médias para os parâmetros avaliados nas plântulas da progênie de *B/c.* Haw Yuan Beauty x *B/c.* Goldenzelle “LC”

Genótipo: <i>B/c.</i> Haw Yuan Beauty x <i>B/c.</i> Goldenzelle “LC”						
Plântulas						
		Variáveis				
		PS (%)	PM (%)	PRPIPLBs (%)	PRPIPI (%)	MTF (g)
Fatores	R1: Tempo de exposição	86,0**	70,0**	36,1**	36,6**	27,4**
	R2: Concentrações (%)	69,5**	83,9**	142,7**	134,0**	40,5**
	Interação R1 x R2	1,5 ns	2,0*	77,8**	73,0**	4,2**
Coeficiente de variação (%)		12,5	13,9	1,3	7,8	7,4

PS: porcentagem de sobrevivência; PM: porcentagem de morte; PRPIPLBs: porcentagem de regeneração de plântulas em PLBs; PRPIPI: porcentagem de regeneração de plântula a plântulas; MFT: massa fresca total. As médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 1% e 5% de probabilidade. ** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$). * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). ns não significativo.

Tabela 7. Efeitos das interações entre as concentrações de colchicina (%) e os tempos de exposição (h) na porcentagem de morte de plântulas da progênie de *B/c.* Haw Yuan Beauty x *B/c.* Goldenzelle “LC”.

Morte de plântulas (%)		CC (%)				
		0,00	0,02	0,04	0,06	0,08
TE (h)	6	0,0 Bd	10,0 Bcd	12,5 Bc	62,5 Aba	30,0 BCb
	12	0,0 Bd	5,0 Bb	7,5 Bb	25,0 Ca	27,5 Ca
	18	2,5 Bc	12,5 Bbc	17,5 Bb	45,0 BCa	52,5 Ba
	24	17,5 Ac	47,5 Ab	52,5 Aab	82,5 Aa	85,0 Aa

CC: concentrações de colchicina, TE: tempos de exposição.

HUY *et al.* (2019) observaram uma redução na taxa de sobrevivência de 100% (controle) para 33,04% de brotos de *Paphiopedilium vellosum*, tratados com 50 uM de colchicina por 9 dias. Em *Phalaenopsis amabilis*, ZAKER TAVALLAIE e KOLAH (2017) também observaram uma diminuição em torno de 50% na porcentagem de sobrevivência de gemas axilares em relação ao tratamento controle (100%) para os tratamentos com 0,15% de colchicina por 24 e 48 horas.

A alta porcentagem de morte de plântulas da progênie de *B/c.* Haw Yuan Beauty x *B/c.* Goldenzelle “LC” utilizado no atual experimento e também observados em trabalhos anteriores com uso da colchicina também pode ser devido à natureza do explante, uma vez que plântulas, brotos, gemas axilares ou segmentos nodais são tecidos que não possuem uma cobertura protetora

espesa, resultando em explantes com maior sensibilidade aos efeitos fitotóxicos da colchicina (ENG; HO; LING, 2021).

É provável que a liberação de compostos fenólicos das plântulas da progênie de *B/c. Haw Yuan Beauty* x *B/c. Goldenzelle* “LC” também esteja relacionada ao aumento da porcentagem de morte de explantes durante a indução artificial com colchicina. Compostos fenólicos são liberados para o exterior da planta como mecanismo de defesa contra condições de estresse biótico ou abiótico, estimulando a produção de radicais oxidativos tóxicos que inibem a regeneração do explante (WIBISONO *et al.*, 2021).

Em sementes de *Buddleja lindleyana*, YAN *et al.* (2022) propuseram que o efeito inibitório da colchicina sobre a taxa de sobrevivência não se deve apenas à colchicina, mas também à presença de outros compostos orgânicos liberados pelo próprio explante, como flavonoides e terpenoides (ZHAN; CHEN; FAN, 2011) o que aumentaria o efeito tóxico no sistema *in vitro*.

Além dos efeitos na sobrevivência das plântulas, o experimento avaliou também como variáveis a massa fresca total e as porcentagens de regeneração de PLBs e plântulas obtidas dos explantes. Para a variável massa fresca total houve influência da concentração de colchicina, do tempo de exposição e das interações entre esses dois fatores (Tabela 6). O controle, sem a aplicação da colchicina, resultou no maior valor de massa fresca total (15,8g), enquanto o tratamento com 0,06% de colchicina resultou na menor massa fresca total regenerada (7,2) (Figura 15E), provavelmente consequência da alta mortalidade dos explantes (53,8%) para essa concentração de colchicina (Figura 15B).

A colchicina causa diminuição da viabilidade das células vegetais devido à despolimerização dos microtúbulos, pois esses são peças importantes para a formação e o correto funcionamento de diferentes ultraestruturas celulares (NOGALES, 2000; WU *et al.*, 2022) que participam de diferentes processos biológicos. Os microtúbulos são ultraestruturas celulares que participam dos processos biológicos de divisão celular e morfogênese celular (HOTTA *et al.*, 2016), permitindo assim o crescimento e desenvolvimento normal das plantas.

Em uma análise de ontologia gênica (GO term) sobre as respostas das plantas aos tratamentos com colchicina, observou-se que o antimitótico influenciou em genes relacionados ao fuso acromático e diminuiu a regulação e expressão de genes relacionados às atividades biológicas dos microtúbulos, além de causar uma redução na quantidade de tubulinas nas células (ZHOU *et al.*, 2017).

Os valores de massa fresca total das plântulas diminuíram com o aumento do tempo de exposição à colchicina (Figura 16E). O menor valor de massa fresca total foi observado no tratamento por 24 horas (6,4 g), enquanto o tratamento controle resultou na maior massa fresca total regenerada (12,3 g) (Figura 16E). KHARDE *et al.* (2017) observaram que o tempo de exposição de 5 horas gerou o maior valor de massa fresca (1,04 mg) de plântulas regeneradas de segmentos foliares de *Bacopa monnieri* expostas à colchicina.

Também foram observadas diferenças estatísticas significativas entre as interações dos fatores concentrações de colchicina (%) x tempos de exposição (h) com a variável massa fresca total das plântulas (Tabela 6), onde o tratamento controle com 18 horas de exposição apresentou o maior valor com 18,5 g, enquanto o tratamento com 0,06% de colchicina por 24 horas de exposição resultou no menor valor com 3,3 g (Tabela 8).

Tabela 8. Interações entre as concentrações de colchicina (%) e os tempos de exposição (h) na massa fresca total (g) de plântulas da progênie de *B/c.* Haw Yuan Beauty x *B/c.* Goldenzelle “LC”.

Massa fresca total (%)		CC (%)				
		0,00	0,02	0,04	0,06	0,08
TE (h)	6	15,4 Aa	11,2 Aab	14,0 Aab	10,3 Ab	9,9 ABb
	12	14,4 Aa	12,4 Aab	9,6 Bb	10,5 Aab	10,0 Aab
	18	18,5 Aa	4,9 Bb	7,7 BCb	4,5 Bb	5,7 BCb
	24	145,0 Aa	5,1 Bb	4,4 Cb	3,3 Bb	4,1c Cb

CC: concentrações de colchicina, TE: tempos de exposição

Em segmentos foliares de *Bacopa monnieri* KHARDE *et al.* (2017) observaram que os tratamentos com 0,1% de colchicina por uma hora e 0,1% e 0,2% de colchicina por cinco horas geraram os maiores valores de massa fresca total, sendo esses de 1,1 mg; 1,0 mg e 0,99 mg respectivamente.

Embora a colchicina seja tóxica para as plantas, em alguns casos observou-se que o efeito negativo sobre os explantes varia de acordo com os tratamentos, pois altas concentrações com tempos de exposição curtos reduzem a fitotoxicidade do antimetabólito (SAJJAD *et al.*, 2013). A partir disso, é provável que a diminuição da massa fresca total em plântulas da progênie de *B/c.* Haw Yuan Beauty x *B/c.* Goldenzelle “LC” para ambos os fatores e suas interações se deva à alta mortalidade das plântulas devido ao aumento das concentrações e tempos de exposição ao antimetabólito (Tabela 8). Da mesma forma, a diminuição da massa fresca total foi observada nos protocormos da progênie de *B/c.* Haw Yuan Beauty x *B/c.* Goldenzelle “LC” devido ao efeito do aumento nas concentrações de colchicina (Figura 10E).

Para as porcentagens de regeneração de PLBs proveniente de plântulas e a manutenção do crescimento de plântulas, foram observadas diferenças para os fatores concentração de colchicina, tempo de exposição e a interação entre os fatores (Tabela 6).

O aumento da concentração de colchicina nos tratamentos (Figuras 15C e 15D) provocou um aumento na porcentagem de formação de PLBs na base e parte apical das plântulas (Figura 18A) e uma diminuição na porcentagem de formação de novas brotações das plântulas (Figuras 18B).



Figura 18. Efeitos da colchicina sobre a regeneração das plântulas *in vitro* da progênie de *Blc.* Haw Yuan Beauty x *Blc.* Goldenzelle “LC”. **A.** Regeneração de PLBs na parte basal e apical (seta azul) **B.** Plântulas cultivados em meio MS Orquídea por 120 dias após o tratamento com colchicina na concentração 0,06% e tempo de exposição 18 horas, demonstrando os tecidos mortos (*), a regeneração de PLBs (seta vermelha) e plântulas (seta amarela).

O aumento do tempo de exposição das plântulas ao alcaloide resultou em diminuição na porcentagem de regeneração de plântulas em PLBs (Figura 16C) e aumento na porcentagem de novas brotações (Figuras 16D e 19), o oposto do que foi observado para a concentração da colchicina (Figuras 15C e 15D)

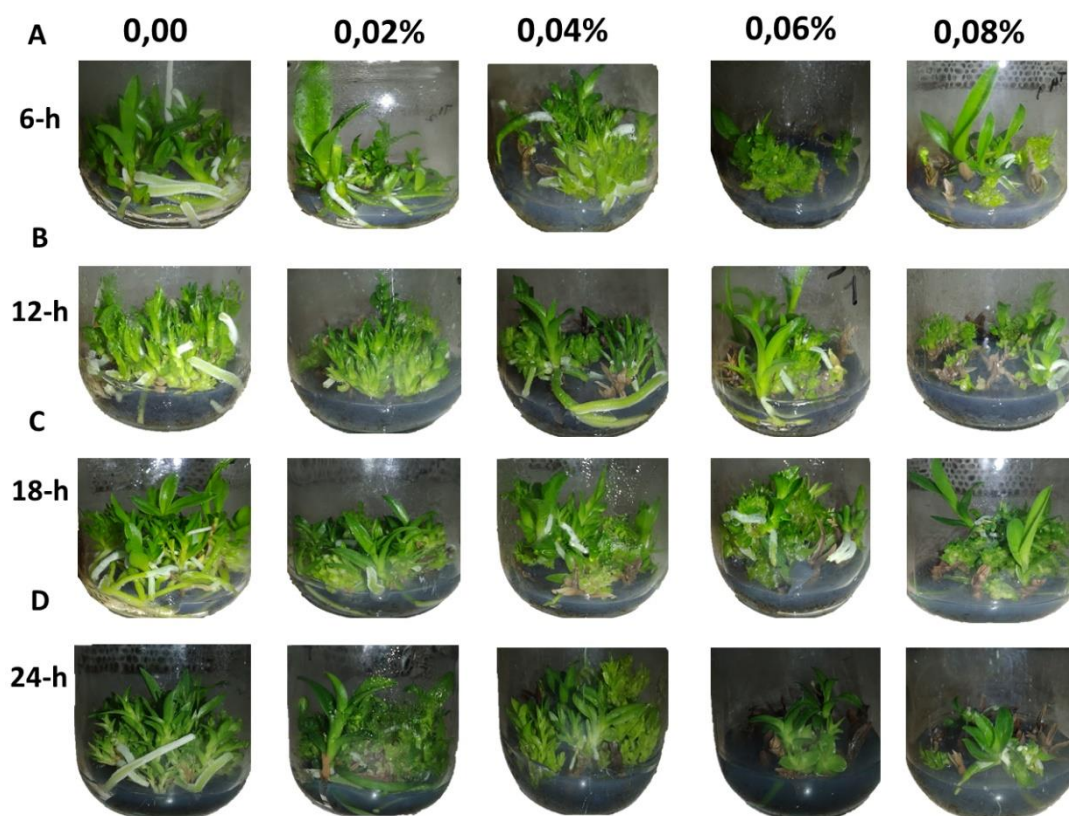


Figura 19. Efeitos de diferentes tempos de exposição e concentrações de colchicina no desenvolvimento de plântulas *in vitro* da progênie de *Blc.* Haw Yuan Beauty x *Blc.* Goldenzelle “LC”. **A.** 6 horas / 0,00 a 0,08%. **B.** 12 horas / 0,00 a 0,08%. **C.** 18 horas / 0,00 a 0,08%. **D.** 24 horas / 0,00 a 0,08%.

Com relação às interações das concentrações de colchicina (%) e tempos de exposição (h) com as porcentagens de regeneração de plântulas em PLBs e regeneração de plântulas em plântulas, foi observado que o tratamento com 0,06% de colchicina por 18 horas de exposição resultou na maior porcentagem de regeneração de plântulas em PLBs (54,3%), enquanto os tratamentos controle por 6 horas, 0,06% e 0,08% de colchicina por 24 horas não geraram regeneração de plântulas em PLBs (Tabela 9A).

Tabela 9. Interações entre as concentrações de colchicina (%) e os tempos de exposição (h) de plântulas da progênie de *B/c.* Haw Yuan Beauty x *B/c.* Goldenzelle “LC”. **A.** Regeneração de plântulas em PLBs (%). **B.** Regeneração de plântulas em plântulas (%).

A. Regeneração em PLBs (%)		CC (%)				
		0,00	0,02	0,04	0,06	0,08
TE (h)	6	0,0 Cd	22,7 Bc	26,0 Bbc	32,3 Bb	43,3 Aa
	12	7,5 Abc	10,6 Cc	29,6 Bb	26,8 Bb	41,5 Aa
	18	2,5 BCd	37,2 Ab	24,3 Bc	54,3 Aa	31,7 Bbc
	24	12,2 Ab	37,4 Aa	42,5 Aa	0,0 Cc	0,0 Cc
B. Regeneração em plântulas (%)		CC (%)				
		0,00	0,02	0,04	0,06	0,08
TE (h)	6	100,0 Aa	77,6 Bb	74,0 Abc	67,1 Bc	56,7 Cd
	12	92,5 BCa	89,5 Aa	70,4 ABb	73,2 Bb	58,5 Cc
	18	97,5 ABa	62,9 Cc	75,7 Ab	45,8 Cd	68,3 Bbc
	24	87,9 Cb	62,6 Cc	62,5 Bc	100,0 Aa	100,0 Aa

CC: concentrações de colchicina, TE: tempos de exposição.

Para a porcentagem de regeneração de plântulas em plântulas, o tratamento com 0,06% de colchicina por 18 horas de exposição causou o menor valor (45,8%) enquanto os tratamentos controle por 6 horas, 0,06%, 0,08% de colchicina por 24 horas apresentaram somente a formação de novas brotações (100,0%) (Tabela 9B), observando-se plântulas com múltiplas brotações (Figura 20).



Figura 20. Efeitos da colchicina sobre a regeneração das plântulas *in vitro* da progênie de *B/c.* Haw Yuan Beauty x *B/c.* Goldenzelle “LC”. **A e B.** Plântulas cultivadas em meio MS Orquídea por 180 dias após os tratamentos com colchicina nas concentrações 0,06% e 0,08% e tempo de exposição 24 horas, demonstrando regeneração de plântulas. **C.** Plântulas do tratamento controle em regeneração.

6.2. Origem e ploidia das plantas regeneradas

6.2.1. Citometria de fluxo de plantas tratadas com colchicina

Foi possível a obtenção de picos definidos e de alta qualidade (baixo CV) para a maior parte das plantas analisadas provenientes do cruzamento de *B/c.* Haw Yuan Beauty x *B/c.* Goldenzelle “LC”, utilizados como fonte de explantes para os tratamentos com colchicina, bem como dos progenitores.

Os histogramas da citometria de fluxo demonstraram a presença células com diferentes níveis de ploidia, com picos de comprimento significativo nos canais 2C, 4C, 8C e 16C, demonstrando que os tecidos analisados das progênies (folhas) apresentaram alto nível de endopoliploidia (Figuras 21 e 22).

Dessa forma, a separação de plantas poliploidizadas daquelas não poliploidizadas, foram baseadas nos seguintes parâmetros: plantas diploides foram consideradas aquelas que mostraram apenas células nos canais 2C, 4C e 8C enquanto as plantas poliploides apresentaram células apenas nos canais 4C, 8C e 16C (Figura 21 e 22).

A presença de endopoliploidia em tecidos de *Cattleya tigrina* também foi observada no trabalho de MENEZES-SÁ *et al.* (2019), sendo que as plantas controle de *C. tigrina* apresentaram células com níveis de ploidia de 2C e 4C na maioria de suas células, e as plantas autopoliploidizadas pelo uso de antimitótico resultaram em células com níveis de ploidia 4C e 8C. No nosso trabalho, as plantas poliploidizadas demonstraram células com níveis de ploidia 4C, 8C e 16C, esse último em frequência muito menor que os picos 4C e 8C (Figura 22B).

Também foi realizada a medição do conteúdo de DNA nuclear durante a análise de citometria de fluxo dos progenitores e os resultados mostraram que a cultivar *B/c. Haw Yuan Beauty* (progenitor feminino) possui maior conteúdo de DNA nuclear (2C= 7,79 pg) enquanto a cultivar *B/c. Goldenzelle "LC"* (progenitor masculino) possui menor conteúdo de DNA (2C= 5,79 pg). Para os híbridos sem tratamento com colchicina (plantas controle) a citometria de fluxo mostrou-se que possuíam um conteúdo de DNA nuclear intermediário (2C= 6,86 pg) em relação ambos parentais. Esse mesmo fenômeno onde a progênie possui um conteúdo de DNA intermediário também foi observado em alguns híbridos como em *Helianthus annuus x H. petiolaris* (BAACK; WHITNEY; RIESEBERG, 2005) e em *Paspalum dilatatum spp. flavecens x P. juergensii* (VAIO *et al.*, 2007).

Por outro lado, para a progênie tratada com colchicina (plantas poliploides) mostrou ter maior conteúdo de DNA nuclear (2C=14,37 pg) em comparação com os parentais e duas vezes o conteúdo de DNA nuclear em comparação com a progênie sem tratamento com colchicina (plantas controle).

Foi possível também confirmar a origem híbrida das plântulas vindas de sementes desses cruzamentos, visto que os histogramas de citometria de fluxo comparando os parentais materno (com maior conteúdo de DNA) e paterno (com menor conteúdo de DNA) bem como das progênies não submetidas ao

tratamento com colchicina, demonstraram picos de absorção com valores intermediários aos parentais, sem exceção (Figura 21).

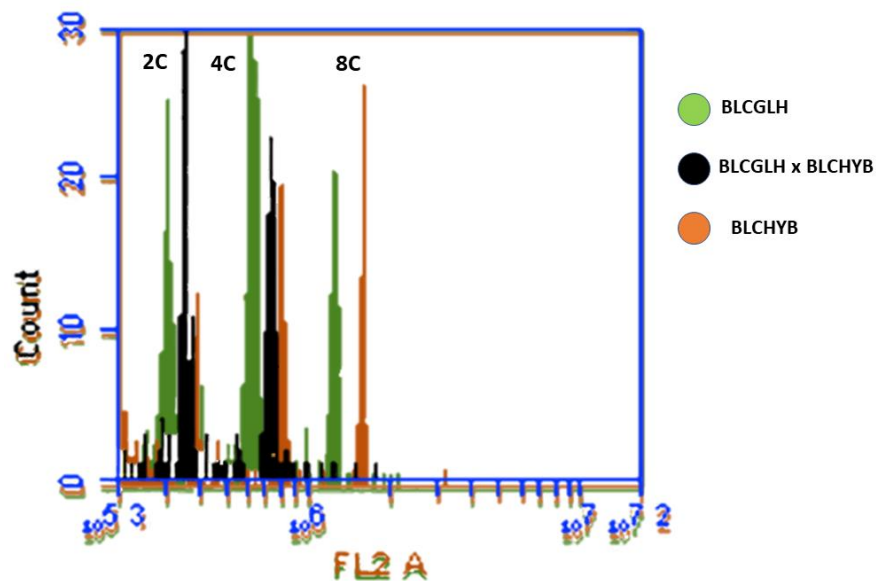


Figura 21. Comparações entre as análises de citometria de fluxo. a cultivar *Blc.* Haw Yuan Beauty (círculo laranja). a cultivar *Blc.* Goldenzelle “LC” (círculo verde). Indivíduo de *Blc.* Haw Yuan Beauty x *Blc.* Goldenzelle “LC” sem tratamento com colchicina (círculo preto).

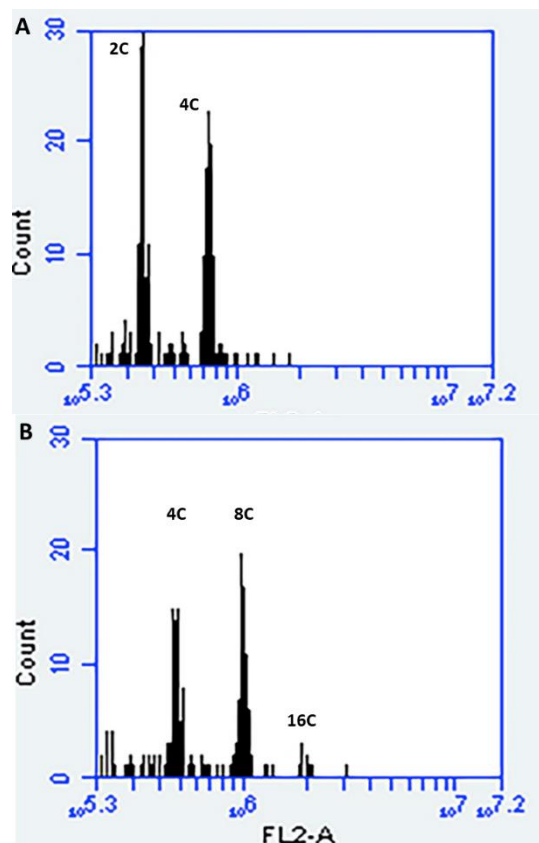


Figura 22. Análises de citometria de fluxo. **A.** Indivíduo de *Blc.* Haw Yuan Beauty x *Blc.* Goldenzelle “LC” sem tratamento com colchicina. **B.** Indivíduo de *Blc.* Haw Yuan Beauty x *Blc.* Goldenzelle “LC” com tratamento com colchicina.

Observou-se também que as plantas consideradas poliploides (Figura 23A) apresentavam morfologia diferente em relação às plantas diploides (Figura 23B). Entre essas diferenças estão as mudanças na arquitetura das plantas e no formato das folhas, visto que as plantas poliploidizadas com a colchicina apresentavam folhas mais grossas e largas, com aumento na intensidade da coloração verde.

Marcadores morfológicos similares, como grossura, largura e intensidade da coloração verde foram observados nas folhas das plântulas com duplicação cromossômica de *C. tigrina* (MENEZES-SÁ *et al.*, 2019), *Dendrobium formosum* (YENCHON; TE-CHATO, 2012), *Cymbidium lowianum* (XUEJIAO; ZHILIN; LIPIN, 2010), *Phalaenopsis amabilis* e *Phal. amboinesis* (RAHAYU *et al.*, 2015b); no qual essa intensidade e acentuação da coloração nas folhas é utilizada como parâmetro indireto para a identificação de plantas poliploides (ENG; HO, 2019) e acredita-se que sua origem possa estar relacionada a um dos efeitos da duplicação cromossômica devido ao aumento de pigmentos e enzimas nas células das plântulas poliploides (MENEZES-SÁ *et al.*, 2019).



Figura 23. Desenvolvimento e enraizamento *in vitro* das plântulas regeneradas a partir de partir de explantes tratados e não tratados com colchicina. **A.** Indivíduos poliploide de *Blc.* Haw Yuan Beauty x *Blc.* Goldenzelle “LC”. **B.** Indivíduos de *Blc.* Haw Yuan Beauty x *Blc.* Goldenzelle “LC” não tratadas com colchicina.

6.3. Obtenção de plantas poliploides a partir dos diferentes tipos de explantes da progênie de *Blc.* Haw Yuan Beauty x *Blc.* Goldenzelle “LC”

Os tipos de explantes, as concentrações e o tempo de exposição à colchicina tiveram influência sobre as porcentagens de regeneração de plantas poliploidizadas.

A colchicina tem sido um dos antimitóticos mais usados para induzir poliploidias em diferentes gêneros de orquídeas de importância comercial como em *Phalaenopsis* (GRIESBACH, 1985), *Dendrobium* (YENCHON; TE-CHATO, 2012) e *Cymbidium* (SONG et al., 2018). Para o gênero *Cattleya*, existem três trabalhos relacionados à indução artificial de poliploidias na literatura em comparação com outros gêneros comerciais (GALDIANO, 2013; MENEZES-SÁ et al., 2019; SILVA; CALLEGARI-JACQUES; BODANESE-ZANETTINI, 2000), onde a maioria dessas pesquisas trabalharam apenas com espécies e não com cultivares comerciais.

É importante salientar que com *Cattleya* predomina no mercado de flores as plantas híbridas multigenéricas, provenientes de cruzamentos entre espécies e híbridos dos gêneros *Cattleya*, *Laelia*, *Brassavola* e *Sophranitis*, principalmente), a exemplo de *Laeliocattleya*, *Brassolaeliocattleya* e *Potinara*. Desse modo, esse grupo de híbridos podem ser caracterizados do ponto de vista comercial como Grupo Híbrido de *Cattleyas* (CARDOSO et al., 2016), tendo como principais características robustez e vigor vegetativo, maior tamanho e número de flores, além de grande diversidade de cores com contribuições diversas dos gêneros usados nos cruzamentos.

Dessa forma, a produção de poliploides em híbridos de *Cattleya*, principalmente de cultivares de alta qualidade ornamental, é intrigante pelo fato de não haver registros ou informações sobre a aplicação de colchicina ou mesmo por outros métodos.

No presente estudo, observou-se que a eficiência e o sucesso da colchicina na duplicação artificial de cromossomos na progênie de *B/c. Haw Yuan Beauty* x *B/c. Goldenzelle "LC"* dependeram de fatores como tipo de explante, tempo de exposição e concentrações (Tabela 10).

Tabela 10. Eficiências e frequências de poliploidias na progênie de *B/c. Haw Yuan Beauty* x *B/c. Goldenzelle "LC"*.

Explante	Eficiência de poliploidização (%)	Tempo de exposição (h)	Concentração de colchicina (%)	Frequências de poliploidias (%)
Sementes	3,2	18	0,04	25,0
		18	0,06	25,0
Protocormos	13,5	6	0,04	46,0
		12	0,06	38,0
		18	0,02	38,0
		18	0,08	44,0
Plântulas	22,1	6	0,04	50,0
		12	0,02	40,0
		12	0,04	33,3
		12	0,06	50,0
		18	0,04	33,3
		18	0,06	25,0
		24	0,02	50,0
		24	0,08	100,0

a) Sementes

No caso do uso das sementes como explantes para o tratamento com a colchicina, foram analisadas o total de 156 plântulas considerando plântulas tratadas e do tratamento controle, das quais foram identificadas cinco plantas poliploidizadas (3,2% de eficiência de poliploidização) (Tabela 10), pela colchicina de acordo com as análises por citometria de fluxo, sendo os tratamentos com a concentração de 0,08% de colchicina por 6 horas e 0,04% - 0,06% de colchicina por 18 horas os únicos que geraram plantas poliploidizadas. As frequências de poliploidias nas sementes foram de 13,0% (0,08% por 6 horas) e 25,0% (0,04% e 0,06% por 18 horas) (Figura 24A).

Para as sementes tratadas com colchicina, concentrações acima de 0,04% resultaram em plantas poliploidização com frequências de 6,3% à 3,3%, não sendo possível observar correlação diretamente proporcional entre o aumento da concentração ou do tempo de exposição a colchicina, com o aumento gradativo do número ou frequência de poliploidização.

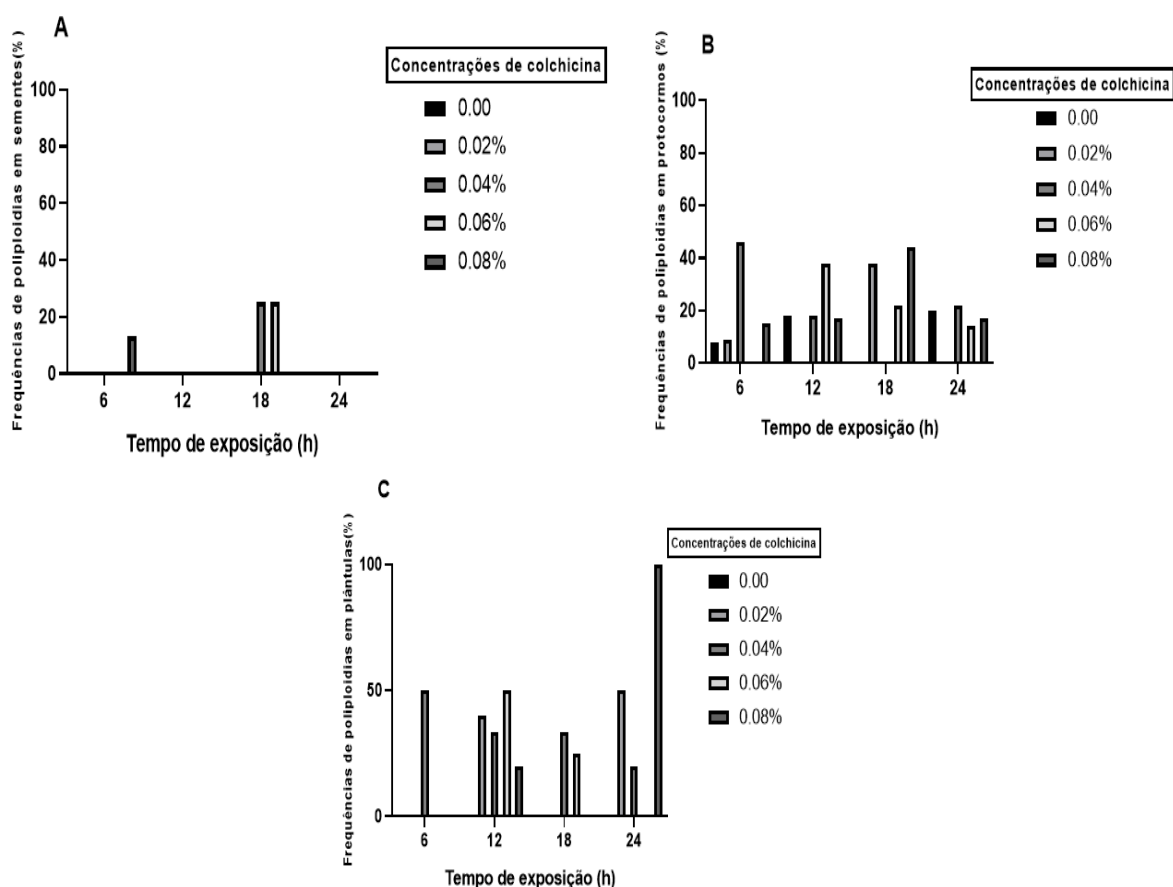


Figura 24. Frequências de poliploidias nos explantes da progênie de de *Blc.* Haw Yuan Beauty x *Blc.* Goldenzelle “LC”. **A.** Sementes. **B.** Protocormos. **C.** Plântulas.

Resultados diferentes foram relatados por CHUNG *et al.* (2014) utilizando sementes híbridas de orquídea *Calanthe* como explantes, no qual o aumento da porcentagem de tetraploides ocorreu em função do tempo e da concentração de colchicina, visto que à medida que aumentava o tempo de exposição (de 3 a 7 dias) e a concentração de colchicina (0,05% a 0,1%) também aumentava a frequência de tetraploides. As sementes híbridas de *Calanthe* tratadas com 0,1% de colchicina por 3 e 7 dias produziram uma alta porcentagem de poliploides de 74% e 81%, respectivamente (CHUNG *et al.*, 2014).

Além da maior concentração de colchicina utilizada nesse experimento (0,1%), comparado ao realizado com os nossos resultados com a progênie de *Blc.* Haw Yuan Beauty x *Blc.* Goldenzelle “LC”, também o tempo de exposição das sementes à colchicina foi muito maior, de 3 a 7 dias. Dessa forma, é possível que para o uso de sementes de orquídeas seja necessário o tratamento por maior quantidade de tempo visando a obtenção de maiores taxas de poliploidização.

Frequências similares de poliploidização obtidas nesse experimento, com sementes da progênie de *Blc.* Haw Yuan Beauty x *Blc.* Goldenzelle “LC” (25,0% de poliploides nos tratamentos 0,04% e 0,06% de colchicina por 18 horas) (Figura 24A) foi observado nas sementes do genótipo *Rynchosstylis gigantea* ‘K3.0124W’, onde o tratamento com outro tipo de antimetabólito denominado pronamida a 200 μ M por 4 dias gerou 23% das plantas poliploides (TANTASAWAT *et al.*, 2012).

Em outro estudo com *Cymbidium hybridum*, PLBs foram expostos a diferentes tempos e concentrações de colchicina, onde o tratamento com 0,05% de colchicina por 5 dias permitiu uma eficiência de poliploidia de 23,7% (WANG *et al.*, 2010). Da mesma forma, em PLBs de *Dendrobium* ‘Sonia’, observou-se que o tratamento com 0,015% de colchicina por 3 dias produziu 26,60% de poliploides (ZAKIZADEH; KAVIANI; HASHEMABADI, 2020).

b) Protocormos

De forma diferente das sementes que tiveram baixa taxa de obtenção de plantas poliploidizadas, a utilização de protocormos tratados com colchicina, resultaram no total de 35 plantas poliploides do total de 213 enviadas para análise (13,5% de eficiência de poliploidização) (Tabela 10), no qual 75% dos tratamentos com colchicina propostos geraram ao menos uma planta poliploidizada (Figura 24B). As frequências de poliploidia nos protocormos variaram de 8,0% (controle – água por 6 horas) a 44,0-46,0% (0,08% por 18 horas e 0,04% por 6 horas) (Figura 24B).

Interessantemente, utilizando protocormos, também foram observadas plantas poliploidizadas no controle, sem a adição da colchicina (Figura 26A e 26C). Essas plantas naturalmente poliploidizadas somente foram observados nos protocormos usados como explantes, mas não nas sementes. Embora para conclusões mais robustas seja necessário maior número de plantas analisadas, esses resultados demonstram que a endopoliploidia comumente observada em protocormos de orquídeas (CHEN; TANG, 2018; CHEN; TANG; KAO, 2010) é capaz, naturalmente, de gerar PLBs poliploidizados sem a adição de colchicina. Isso possivelmente ocorreu no momento em que os protocormos foram isolados e seccionados para inoculação dos PLBs individuais visando a instalação do experimento.

Outra possível origem das plantas poliploidizadas poderia ter origem no cruzamento, do qual a formação das plântulas híbridas poderia naturalmente gerar plantas poliploidizadas. No entanto, pelos resultados obtidos com sementes, somente plantas não poliploidizadas foram identificadas, fortalecendo a hipótese da endopoliploidia associada aos protocormos não tratados e que geraram poliploides.

Em relação à indução de poliploidias em protocormos tratados da progênie de *Blc.* Haw Yuan Beauty x *Blc.* Goldenzelle “LC”, foi observado que a formação de poliploides ocorreu em função de concentrações crescentes, mas não dos tempos de exposição dos explantes ao agente antimitótico. Também foi observada correlação entre os tempos de exposição, até o tempo de 18 horas de exposição com aumento da frequência de poliploides (Figura 24B). Porém, o

maior o tempo de 24 horas, o número de poliploides observados foi menor em relação aos demais tempos de indução (14,6% de poliploides) (Figura 24B).

Em PLBs tratados de *Cymbidium hybridum*, no qual o tratamento com 0,1% de colchicina por 7 dias gerou o menor número de poliploides (17,14%) em comparação aos demais tratamentos com menor tempo de exposição (XIE *et al.*, 2017). Da mesma forma, uma diminuição de 7,6% na formação de tetraploides foi observada em sementes de *Tetradenia riparia* tratadas com 0,1% de colchicina por 3 dias em comparação com sementes submersas por apenas uma noite (overnight) (HANNWEG *et al.*, 2016).

De acordo com SARATHUM *et al.* (2010) tanto a concentração quanto o tempo ideal de exposição ao antimitótico dependem do método de indução, visto que altas concentrações devem ser usadas com tempos de exposição mais curtos para que o explante entre em contato direto com a colchicina em solução líquida enquanto que em baixas concentrações os explantes devem ser expostos por mais tempo no meio de cultura misturado com o alcaloide.

Em relação às frequências de poliploidias, observou-se que os tratamentos com 0,04% de colchicina por 6 horas e 0,08% de colchicina por 18 horas foram os que apresentaram as maiores porcentagem de poliploides com 46,0% e 44,0% respectivamente, seguidos dos tratamentos com 0,06% de colchicina por 12 horas e 0,02% de colchicina por 18 horas com uma frequência de 38,0% para ambos os tratamentos (Figura 24B).

Considerando as frequências de poliploidização obtidas em nosso experimento, esses resultados foram superiores ou similares àqueles obtidos com outras espécies de orquídeas. Em protocormos do híbrido *Cymbidium sinenthese* 'Lv mosu' × *C. hybridum* 'Shijieheping', o tratamento com 0,03% de colchicina por 72 horas gerou o melhor resultado com 36% de poliploides (SONG *et al.*, 2018).

Em PLBs de *Dendrobium chrysotoxum* o tratamento com 0,04% de colchicina por 24 horas produziu uma frequência de poliploides de 47% (ATICHART, 2013). Da mesma forma, em protocormos de *Phalaenopsis equestris*, *Phal. fasciata*, *Phal. Betty Hausermann*, o tratamento com 50 mg/L de colchicina por 10 dias teve uma eficiência de poliploidia de 46% (GRIESBACH, 1981).

No estudo também se observou duas situações que não são comuns durante a indução artificial de poliploidias que é a formação de poliploides para o menor tempo de exposição (6 horas) e para o tratamento controle, com frequências de poliploidia de 15,6%, para a concentração de 0,06% de colchicina por 6 horas, e de 11,5% sem a presença do antimetabólito (Figura 24B).

Em protocormos do híbrido *Vanda limbiata* Blume x *Vanda tricolor* Lindl. var. *suavis*, foi observado que o tratamento com maior concentração de colchicina e o menor tempo de exposição (0,5% de colchicina por 6 horas) foi eficaz para a produção de tetraploides (TUWO; INDRIANTO, 2016).

A eficiência na obtenção de poliploides obtida na grande maioria dos tratamentos propostos pode ser devida a diversos fatores como o sistema de indução e poliploidização *in vitro* utilizado na pesquisa, visto que oferece múltiplas vantagens comparado aos sistemas *in vivo* e *ex vitro* (ENG; HO, 2019).

Além disso, o método de indução utilizado para a poliploidização artificial dos protocormos da progênie de *Blc.* Haw Yuan Beauty x *Blc.* Goldenzelle "LC" misturou o citado por SARATHUM *et al.* (2010), onde os explantes foram expostos diretamente em tempos de exposição não tão longos à solução líquida de colchicina juntamente com o meio de cultura líquido, aumentando seu contato com o alcaloide, bem como mantendo sua viabilidade graças aos nutrientes do meio de cultura.

Sobre a ocorrência de poliploidização natural a partir de protocormos não tratados com a colchicina (11,5%) (Figura 24B), essa poderia ser explicada por três fatores principais: a poliploidização ser resultado do cruzamento entre os híbridos; a ocorrência de endoreduplicação natural em células dos protocormos; o uso de meio líquido e a presença de anaerobiose associado ao tempo de tratamento dos protocormos.

A hibridização é considerada um dos fenômenos mais importantes para originar espécies poliploides (SOLTIS; SOLTIS, 2009). Em orquídeas, esse fenômeno com a poliploidia é usado em programas de melhoramento genético e desenvolver híbridos (DE *et al.*, 2014), sendo que os parentais desempenham um papel importante nos programas de melhoramento genético em orquídeas,

sendo que depende deles a boa qualidade e quantidade das sementes, bem como a transmissão de suas características à progênie (DE *et al.*, 2014).

Em relação às frequências de poliploidias nas progênies, acredita-se que os progenitores utilizados para a hibridização tenham grande influência na duplicação cromossômica (ZENG *et al.*, 2020). No presente estudo, ambos progenitores utilizados são híbridos intergenéricos, uma vez que

Considerando isso, é provável que devido aos altos níveis de hibridizações interespecíficas e intergenéricas usadas para a formação dos progenitores bem como as progênies obtidas do cruzamento entre esses híbridos sejam aloploidos, os quais possuem diferentes números e estrutura cromossômica.

O fenômeno natural de poliploidização, resultado da hibridação, foi reportado em um híbrido interespecífico de *Vaccinium*, no qual observou-se a formação de poliploides espontâneos onde a maior frequência de duplicação cromossômica foi produto da hibridação interespecífica do que no material vegetal tratado com colchicina (PERRY; LYRENE, 1984).

De acordo com CHUNG *et al.* (2014), a grande eficiência na formação de poliploides a partir de sementes híbridas de *Calanthe* (*C. discolor* x *C. sieboldii*) não se deve apenas ao produto dos tratamentos com os antimitóticos utilizados, mas também do genoma dos híbridos interespecíficos que tendem a duplicar mais facilmente seu número básico de cromossomos.

Apesar dessa hipótese ser real e poder ocorrer devido a hibridação interespecífica e intergenérica, inclusive em orquídeas, ela pode ser considerada remota no caso observado em nosso experimento. Isso porque apesar de terem sido reportadas poliploidização natural quando foram usados protocormos individuais como explantes, o mesmo padrão não foi observado quando sementes foram usadas como explantes, não sendo identificado nenhuma plântula poliploide utilizando o controle (Figuras 24A), sendo que todas as plântulas obtidas e provenientes de sementes, avaliadas por citometria de fluxo, apresentaram exatamente a quantidade intermediária dos genomas de seus progenitores (Figura 21).

Outra hipótese mais aceita seria o fato de que a geração de poliploidização natural a partir de protocormos usados como explantes, poderia ser explicada pela presença de células naturalmente em endoreduplicação, o que gera a replicação do DNA sem passar pelo processo normal de divisão celular (MASONBRINK *et al.*, 2013) gerando diferentes níveis de ploidia nas células vegetais, tecidos e órgãos, similar ao que foi observado nas folhas analisadas por citometria de fluxo em nosso estudo (Figuras 21 e 22).

Os diferentes níveis de endoreduplicação em plantas dependem de fatores bióticos e abióticos, sendo um mecanismo de adaptação natural para que o organismo possa sobreviver às diferentes condições de estresse no novo ambiente onde crescerá e se desenvolverá (TEIXEIRA DA SILVA *et al.*, 2014). *Cattleya* é um dos gêneros de orquídeas que tem sido observado eventos de endopoliploidia em tecidos de várias espécies como *C. trigina* (MENEZES-SÁ *et al.*, 2019), *C. trianae*, *C. grandis*, *C. guttata*, *C. labiata*, *C. cernua*, *C. tenius*, *C. elongata*, *C. crispata*, *C. rupestres*, *C. aelandiae*, *C. amethystoglossa*, *C. pfisterii*, *C. rupestris*, *C. sincorana*, *C. loddigesii* e *C. granulosa* (SOUZA *et al.*, 2017).

Além disso, ainda considerando a hipótese da endoreduplicação, isso pode ser fortalecido pela forma como os protocormos foram individualizados para o tratamento com a colchicina, uma vez que esses foram subdivididos para obter um padrão de tamanhos durante os tratamentos. Esses cortes, expõem células internas dos tecidos, parte delas endoreduplicadas, e que durante a regeneração dos protocormos e indução de PLBs, parte desses podem ter origem de células endoreduplicadas, já que a regeneração de PLBs tem origem unicelular (LEE; HSU; YEUNG, 2013; CARDOSO *et al.* 2020).

A produção de PLBs em orquídeas tem sido amplamente utilizada para a propagação clonal de genótipos superiores, como em *Dendrobium* (PARTHIBHAN *et al.*, 2018), *Cymbidium* (MOHANTY *et al.*, 2012), *Oncidium* (GOMES; FRANCESCHI; RIBAS, 2015) e *Phalaenopsis* (ZANELLO; CARDOSO, 2019).

Em orquídeas *Phalaenopsis* foi reportado uma alta frequência de células com eventos de endopoliploidia em diferentes tecidos e órgãos (CHEN *et al.*, 2011c), bem como em protocormos e PLBs (CHEN; TANG, 2018; CHEN; TANG; KAO,

2010). Utilizando esse princípio, diferentes autores utilizaram esses tecidos com altos níveis de endopoliploidia visando o desenvolvimento de uma nova técnica usando a cultura *in vitro* para obter poliploides.

A técnica consiste em utilizar PLBs ou protocormos e realizar sucessivos ciclos de seccionamento horizontal nos explantes, permitindo assim a exposição de células endopoliploides e a geração de uma alta frequência de plântulas com duplicação natural dos cromossomos na nova geração de PLBs, e que após a regeneração formariam plantas poliploides (CHEN; TANG, 2018; CHEN; TANG; KAO, 2009).

Essa técnica mencionada acima poderia explicar também como os protocormos do tratamento controle geraram plantas poliploides através de seccionamento e posterior formação e regeneração dos PLBs da progênie de *Blc. Haw Yuan Beauty* x *Blc. Goldenzelle* “LC” utilizado no atual experimento, visto que altos níveis de endopoliploidia também são identificados em tecidos de *Cattleyas híbridas*, como demonstrado para a progênie de *Blc. Haw Yuan Beauty* x *Blc. Goldenzelle* “LC”.

Como último item que poderia explicar a ocorrência de plântulas poliploidizadas naturalmente provenientes de protocormos, está no fato de que no atual experimento, os protocormos de todos os tratamentos, inclusive os do tratamento controle, foram colocados em meio líquido durante o período de tratamento e indução da poliploidização *in vitro* (6-24 horas), procedimento que poderia gerar diferentes níveis de estresses nos protocormos e como resultado dessas mudanças de meio de cultura algumas de suas células poderiam passar por um processo natural de poliploidização como mecanismo de adaptação ao novo ambiente e gerar as plantas poliploides (LEE et al., 2007; MALUSZYNSKA; KOLANO; SAS-NOWOSIELSKA, 2013).

Dessa forma, o meio líquido no qual foi utilizado para o tratamento dos protocormos contendo a colchicina também poderia produzir níveis de estresse em protocormos, resultando em maiores frequências de poliploidização. ZHOU et al. (2017) observaram por uma análise de transcriptoma em plantas de *Dactylis glomerata* submersas as suas raízes em água apresentaram um estresse de tipo não hídrico, se não pelo alagamento, já que aqui a planta está

em condições de baixo ou ausente nível de oxigênio e ao crescer nesse tipo de meio ambiente a energia celular vem do metabolismo anaeróbico das raízes acumulando etanol como produto. Além disso, determinaram aumento nos níveis de polipeptídios anaeróbios (APN), incluindo lactato desidrogenase e álcool desidrogenase (ADH).

No entanto, essa hipótese é colocada com menor impacto comparado a hipótese de presença de células endopoliploides, pois não foram observados aumento da frequência de poliploides de acordo com o tempo de exposição, especialmente no tratamento controle (Figura 26C).

c) Plântulas

Em relação à indução de poliploidia em plântulas, resultaram em uma eficiência de poliploidização de 22,08% (17 plantas poliploides) (Tabela 10) das 77 amostras analisadas. As frequências de poliploidia em plântulas variam de 20% (0,04% por 24 horas e 0,08% por 12 e 18 horas) a 100% (0,08% por 24 horas) (Figura 24C).

Em plântulas de *Phalaenopsis amabilis* var. *grandiflora*, observou-se que o tratamento *in vitro* com colchicina 0,15% por 72 horas gerou a maior indução de tetraploides (MOHAMMADI; KAVIANI; SEDAGHATHOOR, 2021). Em *Dendrobium nobile*, a solução de colchicina a 0,05% e 0,1% por 96 horas de imersão *in vivo* causou as maiores porcentagens de plantas tetraploides de 16,67% e 29,17%, respectivamente (VICHATO *et al.*, 2007).

Neste experimento, os autores determinaram que o aumento das concentrações e tempos de exposição permitiu aumentar a produção de poliploides, diferentemente do nosso experimento onde foi observado que a formação de plantas poliploides não teve correlação entre concentrações e tempos de exposição ao antimitótico.

Em relação às frequências de poliploidia, observou-se que 15% do total de tratamentos no experimento geraram 20% (0,04% para 24 horas e 0,08% para 12 e 18 horas) e 50% (0,04% para 6 horas, 0,06 % por 12 horas, 0,02% por 24 horas) de poliploides, enquanto apenas um tratamento (5% do total) gerou plantas 100% poliploides (0,08% por 24 horas) (Figura 24C).

Em brotos de *Paphiopedilium villosum* induzidos com 50 μ M de colchicina por 9 dias, produziu uma taxa de poliploides de 19,88% (HUY et al., 2019). RAHAYU et al. (2015) observaram em plântulas de *P. amabilis* que o tratamento *in vivo* com 5000 mg/L de colchicina foi o mais eficaz para a formação de poliploides com eficiência de 50%.

É provável que as diferenças entre as frequências de poliploidia obtidas nas plântulas tratadas com colchicina em comparação com os trabalhos anteriores se devam principalmente ao pequeno número de amostras analisadas (77 amostras), ao efeito genótipo, concentrações e tempos de exposição ao antimitótico e ao método de poliploidização. Segundo VICHATO et al. (2007), eles sugerem que o método de indução de poliploidia *in vitro* em orquídeas é altamente eficiente para duplicação cromossômica em comparação com tratamentos *in vivo*.

O experimento também permitiu determinar que as plântulas também podem ser outra opção ótima para a produção de plantas poliploides da progênie *Blc. Haw Yuan Beauty* x *Blc. Goldenzelle "LC"* devido às frequências de poliploidia que apresentaram nos diversos tratamentos propostos no experimento (Tabela 10).

Diferentemente dos protocormos, plantas poliploidizadas não foram observadas no tratamento controle (Figuras 24C) e isso pode ser devido ao fato de as plântulas já serem organismos completos com tecidos definidos, enquanto os tecidos dos protocormos ainda estão em processo de diferenciação celular, além de a alta probabilidade de algumas células passarem pelo fenômeno natural da endopoliploidia como observado na citometria de fluxo (Figuras 21 e 22), gerando células poliploides que dariam origem a plantas poliploidizadas.

A presença de mixoploides também foi observada no tratamento com colchicina 0,04% por 6 horas com frequência de 25% (Figura 25).

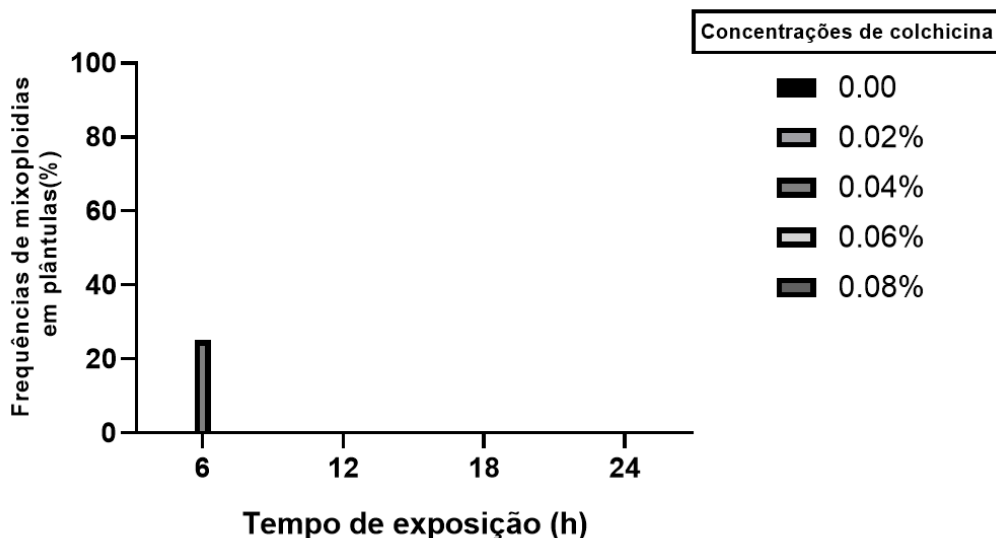


Figura 25. Frequências de mixoploidias nas plântulas da progênie de de *Blc.* Haw Yuan Beauty x *Blc.* Goldenzelle "LC".

Em *Phalaenopsis amabilis* var. *grandiflora* observou-se que os tratamentos com 0,05%, 0,1% e 0,15% de colchicina por 72 horas geraram plantas mixoploides com frequência de 65% (MOHAMMADI; KAVIANI; SEDAGHATHOOR, 2021). KAZEMI e KAVIANI (2020) também observaram em *Catasetum pileatum* que o tratamento com 4 mg/L de colchicina por 72 horas causou a produção de mixoploides.

A presença de plantas mixoploides durante a indução artificial de poliploidia em plântulas da progênie de *Blc.* Haw Yuan Beauty x *Blc.* Goldenzelle "LC" tratado com colchicina pode ser devido ao curto tempo de exposição (6 horas) utilizado no tratamento, uma vez que a presença de mixoploides não foi observada nos demais tempos de exposição utilizados no experimento.

A otimização dos tempos de exposição ao antimitótico pode ser uma das causas para a formação de mixoploides, pois os curtos tempos utilizados durante a indução da poliploidia podem ser insuficientes para que o explante entre em contato com o antimitótico, o que não permite uma completa inibição da divisão celular (DHOOGHE *et al.*, 2011).

Em alguns relatos de indução artificial de poliploidia, observou-se que não apenas tempos curtos de exposição ao agente antimitótico geram plantas mixoploides, mas também tempos muito longos, como em PLBs de dois clones diferentes de *Cattleya intermedia*, onde o tratamento por 4 dias de exposição à colchicina geraram 42% e 33% de mixoploides (SILVA; CALLEGARI-JACQUES; BODANESE-ZANETTINI, 2000).

Da mesma forma, observou-se que sementes do híbrido *C. discolor* x *C. sieboldii* tratadas com colchicina por 3 e 7 dias de exposição provocaram a formação de plantas mixoploides (CHUNG *et al.*, 2014). A partir desses resultados, o aparecimento de plantas mixoploides durante a duplicação artificial de cromossomos em plantas depende não apenas do tempo de exposição, mas também da concentração do antimitótico, tipo de explante e genótipo.

O tempo de avaliação dos níveis de ploidia após o tratamento com colchicina também pode ser outro fator na detecção de mixoploides, já que em nosso trabalho as plântulas induzidas foram analisadas após 90-120 dias após sua regeneração. Em *Cattleya intermedia*, a presença de mixoploides (9% e 13%) foi observada durante a avaliação dos níveis de ploidia aos 120 dias após a indução com colchicina (SILVA; CALLEGARI-JACQUES; BODANESE-ZANETTINI, 2000).

Em plantas de *Dendrobium nobile* tratadas com colchicina e avaliadas citogeneticamente aos 210 dias após a exposição ao agente antimitótico não evidenciaram a presença de mixoploides (VICHATO *et al.*, 2007). Esses autores explicam que os explantes expostos à colchicina precisam de um tempo necessário para que suas células se reorganizem e se multipliquem até formar um organismo com nível de ploidia estável, no qual esse tempo depende do desenvolvimento da planta.

Em orquídeas, é provável que devido ao seu lento desenvolvimento e crescimento vegetal, necessitem de maiores intervalos de tempo para realizar a análise dos níveis de ploidia (VICHATO *et al.*, 2007).

6.3.1. Análises de contagem de cromossomos

As contagens de cromossomos em pontas de raízes confirmaram a ocorrência de poliploidização, especialmente provenientes dos tratamentos com a colchicina. As análises de contagem de cromossomos de ambos progenitores, onde o número de cromossomos estimados seriam de aproximadamente 70 (Figura 26B). As análises de contagem de cromossomos mostraram que a progênie, sem tratamento com colchicina, e originadas a partir da hibridação entre a cultivar *Blc.* Haw Yuan Beauty e a cultivar *Blc.* Goldenzelle “LC” possuem possivelmente um número de cromossomos aproximado também de 70 (Figura 26A).

Já as plântulas consideradas poliploidizadas, confirmadas pelas análises de citometria de fluxo e originadas a partir dos explantes tratados com a colchicina, as análises de contagem de cromossomos mostraram que o número provável de cromossomos seja 140 (Figura 26C e 26D).

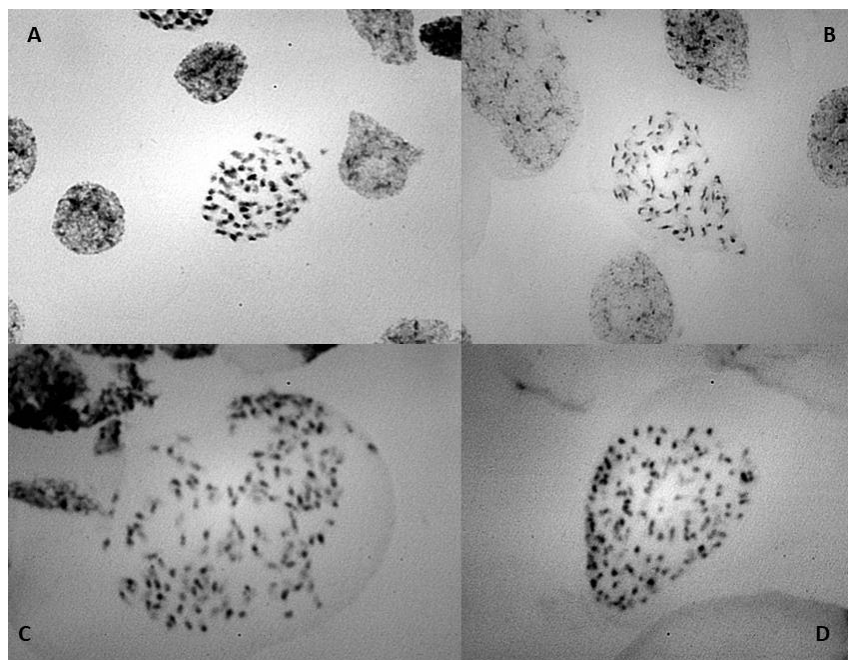


Figura 26. Cromossomos prometafasicos. **A.** Individuo da progênie de *Blc.* Haw Yuan Beauty x *Blc.* Goldenzelle “LC” sem tratamento com colchicina. **B.** a cultivar *Blc.* Haw Yuan Beauty. **C e D.** Individuo da progênie *Blc.* Haw Yuan Beauty x *Blc.* Goldenzelle “LC” tratados com colchicina.

Foi realizada uma caracterização citogenética de dois híbridos de *Cymbidium* (*C. Showgirl* “Silky” e *C. Mystery Island* “Silk Road”) utilizados para indução artificial de poliploidia, onde a análise mostrou que ambos os híbridos eram triploides (3x) com 60 cromossomos e as plantas poliploides desses híbridos geradas a partir de tratamentos com orizalina eram hexaploides (6x) com 120 cromossomos (HWANG; KIM; PARK, 2015). A indução artificial de poliploidia no híbrido interespecífico de *Vanda limbata* Blume x *V. tricolor* Lindl. var. *suavis* gerou duplicação cromossômica de plântulas regeneradas a partir de protocormos tratados com colchicina, onde a análise citológica mostrou que as plantas de tratamento controle tinham 38 cromossomos e as plantas tetraploides tinham 76 cromossomos (TUWO; INDRIANTO, 2016).

No presente trabalho foram utilizadas duas cultivares de *Brassolaeliocattleya* no qual as características ornamentais e agronômicas dependiam de *C. briegei*, *C. intermedia*, *C. forbessi*, *C. loddigesii*, *C. dowiana*, *C. trianae*, *C. tenebrosa* e *C. bicolor* (IOF, 2022a; 2022b). Estudos citológicos mostraram que a grande maioria das espécies de *Cattleya* citadas acima possuem 40 cromossomos (QUERINO *et al.*, 2020; SOUZA, 2011), mas também houve algumas variações cromossômicas intraespecíficas como em *C. trianae* e *C. bicolor* com 42 cromossomos (FELIX; GUERRA, 2010; SOUZA, 2011).

Brassavola e *Laelia* pertencem à subtribo *Laeliinae*, portanto possuem 40 cromossomos somáticos, além de apresentarem algumas variações cromossômicas de 42, 44 e 60 apenas para o gênero *Laelia* (FELIX; GUERRA, 2010). Normalmente é comum encontrar variações cromossômicas entre as espécies, razão pela qual as análises cromossômicas desempenham um papel importante, pois fornecem informações que permitem entender a origem e a evolução das plantas (GUERRA, 2012).

A análise filogenética em orquídeas permitiu organizar sua taxonomia complexa para um grupo monofilético de plantas (GIVNISH *et al.*, 2015). Na subtribo *Laeliinae*, a análise filogenética das relações evolutivas entre os clados mostrou que *Cattleya* e *Brassavola* pertenciam ao mesmo grupo enquanto *Laelia* foi separada formando um único grupo (VAN DEN BERG, 2009).

Técnicas de citogenética molecular permitiram aumentar a quantidade de informações sobre a evolução do cariótipo na subtribo *Laeliinae* (MORAES *et al.*, 2013; QUERINO *et al.*, 2020). Em um estudo sobre a diversidade evolutiva do cariótipo na subtribo *Laeliinae* usando citogenética molecular juntamente com análise de bandas cromossômicas, foi demonstrado que *C. trianae* apresentou uma fusão de um par de cromossomos como mecanismo de rearranjo, para *Laelia gouldiana* foi demonstrado que tinha um cariótipo poliploide e para *L. marginata* tinha um cromossomo supranumérico (QUERINO *et al.*, 2020).

A partir de todas essas informações, é provável que essas diferenças filogenéticas e variações em números, tamanhos e rearranjos cromossômicos durante os fenômenos de hibridização interespecífica (entre espécies de *Cattleyas*) e intergenérica (entre *Cattleya* x *Brassavola* x *Laelia*) utilizados para a formação de ambas as cultivares de *Brassolaeliocattleya* tenham gerado mudanças nos cariótipos da progênie de *Blc.Haw Yuan Beauty* x *Blc. Goldenzelle "LC"* com novos números cromossômicos, como foi observado na caracterização citogenética dos híbridos interespecíficos de *C. violacea* x *C. nobilior*, *C. violacea* tipo x *C. granulosa* e *C. violaceae* tipo x *C. harrisonae*, onde os números cromossômicos foram 66, 86 e 32 respectivamente (DA SILVA *et al.*, 2017).

Híbridos interespecíficos de *Epidendrum fulgens* ($2n=24$) e *E. puniceoluteum* ($2n=56$) apresentaram números cromossômicos com aneuploidias de 38 e 40 cromossomos (MORAES *et al.*, 2013). Esses autores explicam que essas variações de um par de cromossomos entre os híbridos interespecíficos de *E. fulgens* e *E. puniceoluteum* podem depender do parental *E. puniceoluteum* ($n=28$), pois a análise GISH mostrou a presença de todos os cromossomos de *E. fulgens* ($n=12$) no genoma de todos os híbridos. A hibridização interespecífica também é considerada um fenômeno evolutivo responsável por permitir a especiação e adaptação nas plantas (BARTON, 2001).

Cariotipicamente, *Cattleya* apresenta cromossomos metacêntricos e sua constituição cromossômica pode ser produto de eventos de poliploidia e disploidia observados na subtribo *Laeliinae* (FELIX; GUERRA, 2010). A poliploidia é um fenômeno relevante porque permite a evolução e especiação em organismos vegetais (SATTLER; CARVALHO; CLARINDO, 2016). Espécies

tetraploides foram observadas em *Cattleya* como *C. bicolor* spp. *minageraensis* ($2n=80$) (BLUMENSCHNEIN, 1961) e *C. walkeriana* var. *príncipes* ($2n=80$) (FELIX; GUERRA, 2010).

Os programas de melhoramento genético de orquídeas utilizam a poliploidia e a hibridização como ferramentas para a formação de novas cultivares (DE *et al.*, 2014; LEE *et al.*, 2020b). Os gêneros *Brassavola*, *Cattleya*, *Laelia* e *Sophonithis* possuem compatibilidade reprodutiva intergenérica permitindo a formação de um grande número de híbridos multigenéricos (ADAMS; ANDERSON, 1958; DE *et al.*, 2014).

O aumento da cor, tamanho, intensidade, durabilidade, arquitetura, época de floração e número de flores são parâmetros utilizados para selecionar os melhores progenitores em programas de melhoramento de orquídeas, sendo essas características comuns em plantas tetraploides (DE *et al.*, 2014). Em *Phalaenopsis*, a seleção de espécies parentais tetraploides como *P. amabilis* e *P. afrodite* (ROYAL HORTICULTURAL SOCIETY, 2018) foi crucial para o desenvolvimento de cultivares brancas standart (LEE *et al.*, 2020b).

A partir disso, também é provável que pelo uso exclusivo de marcadores morfológicos, progenitores poliploides tenham sido selecionados durante a formação dos primeiros híbridos de *Cattleya*, onde os cruzamentos interespecíficos e intergenéricos de esses poliploides com espécies diploides poderiam ser responsáveis pelo número cromossômico na progênie de *Blc.* Haw Yuan Beauty x *Blc.* Goldenzelle “LC”.

Em uma análise da constituição cromossômica e conteúdo nuclear de 60 cultivares de *Phalaenopsis*, observou-se que muitos dos híbridos eram poliploides e alguns apresentavam hiper ($2n=4x+1$) e hipotetraploidia ($2n=4x-1$) (LEE *et al.*, 2020b). Esses autores explicam que a possível origem da poliploidização e variação cromossômica em cultivares de *Phalaenopsis* se deve ao uso de parentais poliploides formadores de gametas não reduzidos durante os programas de melhoramento genético.

De fato, os resultados das análises de contagem de cromossomos mostrados no trabalho são estimativos, devido aos grandes desafios que apresentaram os materiais vegetais desenvolvidos no cultivo *in vitro* como os

fatores associados ao citoplasma das células, desenvolvimento do meristema radicular, índices mitóticos, velocidade do desenvolvimento vegetal, entre outros; dificultando desde a obtenção de uma correta amostra até limitações encontradas na metodologia para a preparação de lâminas citológicas.

Células-tronco especializadas chamadas células iniciais são responsáveis por dar origem aos principais tecidos radiculares: estela, tecido fundamental, epiderme e coifa (PIERRE-JEROME; DRAPEK; BENFEY, 2018). Os principais fitohormônios responsáveis pelos processos de atividade meristemática nas plantas são as auxinas e as citocinina (PIERRE-JEROME; DRAPEK; BENFEY, 2018), que nas raízes produzem a regulação das células iniciais e os primeiros sinais de diferenciação celular (BLILOU *et al.*, 2005).

Os reguladores de crescimento de plantas (PGRs) são um dos fatores responsáveis pelo desenvolvimento das plantas durante o cultivo *in vitro* (CARDOSO, 2019). As auxinas e citocininas são o grupo de reguladores vegetais amplamente utilizados na cultura de tecidos vegetais, pois participam dos processos de divisão, crescimento, diferenciação celular, diminuição da senescência foliar, entre outros (HELENICE, 2004; PERES; KERBAUY, 2004).

Durante a micropropagação, as plantas liberam produtos de suas vias metabólicas. Dentre eles, tem sido relatada a presença e acúmulo de gás etileno no sistema *in vitro* e na sala de crescimento, gerando efeitos fisiológicos no desenvolvimento normal das plantas (CARDOSO, 2019; YASMIN *et al.*, 2014) porque esse está associado a processos de estresse (BLEECKER; KENDE, 2000). Em *Arabidopsis thaliana*, a inibição do crescimento radicular foi observada como resultado da biossíntese de etileno mediada por colchicina, além de afetar a resposta do gravitropismo (KIM *et al.*, 2018).

As auxinas também estão relacionadas ao desenvolvimento radicular (HELENICE, 2004) e diferentes respostas de gravitropismo e tigmotropismo nas raízes, em que sua redistribuição é mediada por facilitadores do transporte de auxina polar PIN (LEE *et al.*, 2020a). Em sementes de linhaça germinadas, o aumento na produção de etileno causou diminuição da sensibilidade e transporte de auxina na raiz, afetando a resposta do gravitropismo (MA; REN, 2012).

É provável que um dos fatores responsáveis pelos problemas de desenvolvimento radicular *in vitro* das plântulas da progênie de *Blc. Haw Yuan Beauty* x *Blc. Goldenzelle* “LC” seja o etileno, uma vez que está envolvido em produzir efeitos em diversos processos biológicos que ocorrem no interior das células radiculares, como divisão, crescimento e desenvolvimento celular, resposta a estímulos físicos e transporte de fitoreguladores.

DEL BIANCO E KEPINSKI (2021) explicam que um gravitropismo positivo e uma resposta negativa de tigmotropismo são provavelmente responsáveis pelo movimento da raiz contra as barreiras físicas. Em uma análise do transcriptoma da resposta do crescimento radicular *in vitro* de *A. thaliana* contra barreiras físicas, foi determinado que esse processo era regulado por espécies reativas de oxigênio (ROS), etileno e sinalização de auxina, onde a resposta positiva do crescimento radicular contra o impedimento físico foi observada quando houve inibição das respostas ao etileno (JACOBSEN *et al.*, 2021).

Esses autores concluíram que o desenvolvimento radicular dependeu das características físicas do substrato. A partir disso, é possível que o sistema *in vitro* (frasco + gelificante) também seja um dos fatores responsáveis por problemas no desenvolvimento radicular nas plântulas da progênie de *Blc. Haw Yuan Beauty* x *Blc. Goldenzelle* “LC”.

Como observação, as plantas cultivadas em cultura *in vitro* e usadas para fazer preparações citológicas no trabalho devem ser reavaliadas citogeneticamente a partir de plantas aclimatizadas para análise posterior, pois as raízes fora do ambiente *in vitro* tendem a crescer e se desenvolver normalmente sem o estresse do sistema de cultivo *in vitro*, aumentando as possibilidades de obter uma amostra ótima para coletar e utilizá-la para realizar a análise da contagem de cromossomos.

MORAES (2014) também teve dificuldades semelhantes em realizar análises citológicas em espécies brasileiras de *Cattleya* usando raízes *ex vitro*, pois as observações microscópicas mostraram cromossomos pequenos em prometáfase, metáfases altamente condensadas e não espalhada e irregularidades na condensação cromossômica impedindo a contagem de

cromossomos e o cariótipo. Esse autor concluiu que o método de pré-tratamento com 8-hidroquinolina não foi eficiente na obtenção de cromossomos claros.

Todas essas dificuldades anteriores foram observadas durante as análises de cromossomos da progênie de *B/c. Haw Yuan Beauty* x *B/c. Goldenzelle "LC"*, mas diferentemente do trabalho anterior, conseguimos obter prometáfases espalhadas (Figura 26) que nos permitiram estimar o número cromossômico no material analisado, onde esse resultado pode ser devido ao pré-tratamento com 8 - hidroquinolina + ciclohexamina e à digestão enzimática com pectinase: celulase ao contrário do outro trabalho que somente utilizou 8 – hidroquinolina.

Em análises citológicas de outros tipos de culturas como milho (MONDIN *et al.*, 2014), *Passiflora* (SILVIA *et al.*, 2005) e *Crotalaria*, (MORALES; AGUIAR-PERECIN; MONDIN, 2012) observou-se que o uso do pré-tratamento com 8-hidroquinolina e ciclohexamina deu ótimos resultados para a observação de cromossomos.

As dificuldades para a realização de preparações citogenéticas de boa qualidade na família *Orchidaceae* se devem às características cromossômicas particulares em morfologia, tamanho e número de cromossomos (MONDIN; NETO, 2006).

7. CONCLUSÕES

- Foi possível obter um protocolo de sucesso para a produção *in vitro* de plantas poliploidizadas da progênie de *Blc.* Haw Yuan Beauty x *Blc.* Goldenzelle “LC” por meio do uso de colchicina.
- Foi possível determinar os diferentes efeitos das concentrações e tempos de exposição à colchicina no crescimento e desenvolvimento *in vitro* de sementes, protocormos e plântulas da progênie de *Blc.* Haw Yuan Beauty x *Blc.* Goldenzelle “LC”.
- Foi possível determinar o efeito do tipo de tecido tratado: sementes e protocormos na eficiência de poliploidização da progênie de *Blc.* Haw Yuan Beauty x *Blc.* Goldenzelle “LC”.
- Foi possível determinar o nível de ploidia das plantas utilizadas como progenitores, progênie não tratada com colchicina e progênie poliploidizada por colchicina, por meio do uso das análises de citometria de fluxo e contagem de cromossomo.

8. LITERATURA CITADA

- ACKERMAN, J.; CASTILLO, M. **Las orquídeas de Puerto Rico y Las Islas Vírgenes**. 1. ed. San Juan, Puerto Rico: Editorial de la Universidad de Costa Rica, 1992. Disponível em: https://books.google.com.pe/books?id=_HLhxFBFV1UC&pg=PA19&dq=Los+po+linios+con+sus+estructuras+asociadas,+constituyen+los+polinarios.+El+viscido+es+una+almohadilla+de+tejido+pegajoso+que+se+deriva+de+un+estigma+modificado++el+rostelo.+El+viscido+sirve+p. Acesso em: 21 abr. 2020.
- ACQUAAH, G. Polyploidy in Plant Breeding. *In: Principles of plant genetics and breeding*. Malden: John Wiley & Sons, 2009. p. 214–230.
- ADAMAKIS, I. .. D. S.; PANTERIS, E.; ELEFTHERIOU, E. P. Tungsten affects the cortical microtubules of *Pisum sativum* root cells: experiments on tungsten–molybdenum antagonism. **Plant Biology**, v. 12, n. 1, p. 114–124, 2010. DOI: doi:10.1111/j.1438-8677.2009.00197.x.
- ADAMS, H.; ANDERSON, E. A conspectus of hybridization in the *Orchidaceae*. **Evolution**, p. 512–518, 1958. DOI: <https://doi.org/10.2307/2405962>.
- ALDERETE, M.; BOLOGNA, P.; FACCIUTO, G.; HAGIWARA, J. C.; KATO, A.; ESCANDÓN, A. S. El uso de mutágenos en el mejoramiento de germoplasma ornamental nativo. **Ornamental Horticulture**, [S. l.], v. 13, p. 1938–1943, 2007.
- ALTAFIN, V. L.; MENEZES, M. O.; LIMA, R. R.; PITOMBO, L. M. **Semeadura in vitro de orquídeas para propagação massal**. Espiritu Santo do Pinhal: Unipinhal, 2003.
- ANBARASAN, K.; RAJENDRAN, R.; SIVALINGAM, D.; CHIDAMBARAM, A. C. Studies on the effect of EMS and colchicine in M1 generation of sesame (*Sesamum indicum* L.) var. TMV3. **International Letters of Natural Sciences**, [S. l.], v. 11, n. 2, 2014.
- AOS. **The showy Cattleya, queen of the orchids**. 2013. Disponível em: <http://www.aos.org/Default.aspx?id=%0A443>. Acesso em: 9 jul. 2021.
- AOS. **Cattleya**. 2021. Disponível em: <https://www.aos.org/orchids/orchids-a-to-z/letter-c/cattleya.aspx>. Acesso em: 18 jul. 2021.
- ARDITTI, J.; ERNEST, R. **Micropropagation of Orchis**. New York: Jhon Wiley y Sons, 1993.
- ARIDA, B. L.; SCOPECE, G.; MACHADO, R. M.; MORAES, A. P.; FORNI-MARTINS, E.; PINHEIRO, F. Reproductive barriers and fertility of two neotropical orchid species and their natural hybrid. **Evolutionary Ecology**, v. 35, n. 1, p. 41–64, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10682-020-10095-5>.
- ASSIS, F. N. M.; SOUZA, B. C. Q.; MEDEIROS-NETO, E.; PINHEIRO, F.; SILVA, A. E. B.; FELIX, L. P. Karyology of the genus *Epidendrum* (*Orchidaceae: Laeliinae*) with emphasis on subgenus *Amphiglottium* and chromosome number variability in *Epidendrum secundum*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 172, n. 3, p. 329–344, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1111/boj.12045>.
- ATICHART, P. Polyploid Induction by Colchicine Treatments and Plant Regeneration of *Dendrobium chrysotoxum*. **Thai Journal of Agricultural**

Science, v. 46, n. 1, p. 59–63, 2013. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Porntip_Atichart/publication/26555927_Agr-obacterium-Mediated_Transformation_of_Dendrobium_secundum_BI_Lindl_with_Antisense_ACC_Oxidase/links/0c96052436c218f654000000.pdf. Acesso em: 18 out. 2020.

ATICHART, P.; BUNNAG, S. Polyploid induction in *Dendrobium secundum* (Bl.) Lindl. by *in vitro* techniques. **Thailand Journal of Agricultural Science**, v. 40, n. 1–2, p. 91–95, 2007. Disponível em: <https://www.thaiscience.info/journals/Article/TJAS/10469513.pdf>. Acesso em: 15 out. 2020.

ATWOOD, J. T. The size of the *Orchidaceae* and the systematic distribution of epiphytic orchids. **Selbyana**, v. 9, n. 1, p. 171–186, 1986. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/41888801>.

BAACK, E. J.; WHITNEY, K. D.; RIESEBERG, L. H. Hybridization and genome size evolution: timing and magnitude of nuclear DNA content increases in *Helianthus* homoploid hybrid species. **New Phytologist**, v. 167, n. 2, p. 623–630, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01433.x>.

BARBAT, T. La multiplicación de las plantas. **Viveros**, v. 1, p. 33–43, 2006.

BAROW, M. Endopolyploidy in seed plants. **BioEssays**, v. 28, n. 3, p. 271–281, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1002/bies.20371>.

BAROW, M.; MEISTER, A. Endopolyploidy in seed plants is differently correlated to systematics, organ, life strategy and genome size. **Plant, Cell and Environment**, v. 26, n. 4, p. 571–584, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2003.00988.x>.

BARTON, N. H. The role of hybridization in evolution. **Molecular Ecology**, v. 10, n. 3, p. 551–568, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2001.01216.x>.

BLAKESLEE, A. F.; AVERY, A. G. Methods of inducing doubling of chromosomes in plants: by treatment with colchicine. **Journal of Heredity**, v. 28, n. 12, p. 393–411, 1937. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a104294>.

BLASCO, M. B.; LUISA, M.; NAVAL, M. Colchicine-induced polyploidy in loquat (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 120, n. 2, p. 453–461, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0612-3>.

BLEECKER, A. B.; KENDE, H. Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 16, n. 1, p. 1–18, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.16.1.1>.

BLILOU, I. et al. The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. **Nature**, v. 433, n. 7021, p. 39–44, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature03184>.

BLUMENSCHNEIN, A. Número de cromossomas de algumas espécies de orquídeas. **Publicação Científica da Universidade de São Paulo**, v. 1, p. 45–50, 1960.

BLUMENSCHNEIN, A. Uma nova espécie do gênero *Cattleya* Lindl. **Publicação**

Científica Instituto de Genética Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo, v. 2, p. 23–33, 1961.

BORISY, G. G.; TAYLOR, E. W. The mechanism of action of colchicine: colchicine binding to sea urchin eggs and the mitotic apparatus. **The Journal of Cell Biology**, v. 34, n. 2, p. 535–548, 1967. DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.34.2.535>.

BOSE, T. K.; BHATTACHARJEE, S. K.; DAS, P.; BASAK, U. C. **Orchids of India**. 2. ed. Kolkata, India: Naya Prokash, 1999.

BRAEM, G. J. **William Cattley e o gênero Cattleya**. Turriers, France: Naturalia Publications, 1994.

BRIEGER, F. G. On the orchid system: general principles and the distinction of subfamilies. *In*: PROC. 8TH WORLD ORCHID CONF. 1976, **Anais**, p. 488–504.

BUNNAG, S.; HONGTHONGKHAM, J. Polyploid induction of *Dendrobium Draconis* rchb. F. **Acta Horticulturae**, v. 1087, p. 445–451, 2015. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1087.60>.

CAMPOS, F. A. D. B. Considerações sobre a Família *Orquidacea*: taxonomia, antropismo, valor econômico e tecnologia. **O Mundo Saúde**, v. 32, n. 3, p. 383–392, 2008. Disponível em: http://www.saocamilo-sp.br/pdf/mundo_saude/63/383-392.pdf. Acesso em: 8 abr. 2021.

CAPERTA, A. D.; DELGADO, M.; RESSURREIÇÃO, F.; MEISTER, A.; JONES, R. Neil; VIEGAS, W.; HOUBEN, Andreas. Colchicine-induced polyploidization depends on tubulin polymerization in c-metaphase cells. **Protoplasma**, v. 227, n. 2–4, p. 147–153, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00709-005-0137-z>.

CARDOSO, J. C. *Laeliocattleya* 'Brazilian Girl Rosa': cultivar de orquídea para cultivo em vaso. **Horticultura Brasileira**, v. 28, p. 378–381, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-05362010000300024>.

CARDOSO, J. C. *Dendrobium* 'Brazilian Fire 101'-New option of color of flowers for the orchid market. **Horticultura Brasileira**, Recife, Pernambuco, v. 30, n. 3, p. 561–564, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362012000300035>. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-05362012000300035&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 24 jun. 2020.

CARDOSO, J. C. Silver nitrate enhances *in vitro* development and quality of shoots of *Anthurium andraeanum*. **Scientia Horticulturae**, v. 253, p. 358–363, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.04.054>.

CARDOSO, J. C.; ISRAEL, M. Levantamento de espécies da família *Orchidaceae* em Águas de Sta. Bárbara (SP) e seu cultivo. **Horticultura Brasileira**, Recife, Pernambuco, v. 23, n. 2, p. 169–173, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0102-05362014000100002>. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-05362014000100007&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 30 jun. 2020.

CARDOSO, J. C.; MARTINELLI, A. P.; TEIXEIRA DA SILVA, J. A. A novel approach for the selection of *Cattleya* hybrids for precocious and season-independent flowering. **Euphytica**, v. 210, n. 1, p. 143–150, 2016. DOI:

<https://doi.org/10.1007/s10681-016-1714-2>.

CARDOSO, J. C.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. Gibberellic acid and water regime in the flowering induction of *Brassocattleya* and *Cattleya* hybrid orchids. **Horticultura Brasileira**, Recife, Pernambuco, v. 28, n. 4, p. 395–398, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-05362010000400003>.

CARDOSO, J. C.; ZANELLO, C. A.; CHEN, J. T. An overview of orchid protocorm-like bodies: Mass propagation, biotechnology, molecular aspects, and breeding. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 3, p. 985, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21030985>.

CASTILLO, A. **Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo**. 2007. Disponível em: http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos_compartidos/111219220807102417.pdf. Acesso em: 28 jun. 2020.

CAVALLER-SMITH, T. **The evolution of genome size**. London: Wiley - Interscience, 1985.

CAVERO, Moisés; COLLANTES, Benjamín; PATRONI, César. **Orquídeas del Perú**: Centro de Datos para la Conservación del Perú, 1991.

CHASE, M. W.; CAMERON, K. G.; HILLS, H. G.; JARRELL, D. Molecular systematics of the *Orchidaceae* and other lilioid monocots. *In*: PROCEEDINGS OF THE 14TH WORLD ORCHID CONFERENCE 1994, **Anais**: HMSO London, 1994. p. 61–73.

CHASE, M. W.; CAMERON, K. M.; BARRETT, R. L.; FREUDENSTEIN, J. V. DNA data and *Orchidaceae* systematics: a new phylogenetic classification. **Orchid Conservation**, v. 69, n. 89, p. 32, 2003. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Russell-Barrett/publication/234814296_DNA_data_and_Orchidaceae_systematics_a_new_phylogenetic_classification/links/00463523d4084c70e1000000/DNA-data-and-Orchidaceae-systematics-a-new-phylogenetic-classification.pdf.

CHASE, M. W.; CAMERON, K. M.; FREUDENSTEIN, J. V.; PRIDGEON, A. M.; SALAZAR, G.; VAN DEN BERG, C.; SCHUITEMAN, A. An updated classification of *Orchidaceae*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 177, n. 2, p. 151–174, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/boj.12234>.

CHEN, C.; HOU, X.; ZHANG, H.; WANG, G.; TIAN, L. Induction of *Anthurium andraeanum* “Arizona” tetraploid by colchicine *in vitro*. **Euphytica**, v. 181, n. 2, p. 137–145, 2011. a. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10681-010-0344-3>.

CHEN, W. H.; KAO, Y. L.; TANG, C. Y.; JEAN, G. T. Endopolyploidy in *Phalaenopsis* orchids and its application in polyploid breeding. *In*: **Orchid Biotechnology II**: World Scientific, 2011. b. p. 25–48. DOI: https://doi.org/10.1142/9789814327930_0002.

CHEN, W. H.; TANG, C. Y. A Protocol for the Induction of Polyploids in *Phalaenopsis* Orchids by *In Vitro* Method Without Using Anti-microtubule Agents. *In*: LEE, Y. I.; YEUNG, E. T. (org.). **Orchid Propagation: From Laboratories to Greenhouses—Methods and Protocols**. New York: Humana Press, 2018. p. 317–330. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7771-0_17.

CHEN, W. H.; TANG, C. Y.; KAO, Y. L. Ploidy doubling by *in vitro* culture of excised protocorms or protocorm-like bodies in *Phalaenopsis* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 98, n. 2, p. 229–238, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9557-3>.

CHEN, W. H.; TANG, C. Y.; KAO, Y. L. Polyploidy and variety improvement of phalaenopsis orchids. **Acta Horticulturae**, n. 878, p. 133–138, 2010. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.878.14>.

CHEN, W. H.; TANG, C. Y.; LIN, T. Y.; WENG, Y. C.; KAO, Y. L. Changes in the endopolyploidy pattern of different tissues in diploid and tetraploid *Phalaenopsis* aphrodite subsp. formosana (*Orchidaceae*). **Plant Science**, v. 181, n. 1, p. 31–38, 2011. c. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.03.006>.

CHOOPENG, S.; TE-CHATO, S.; KHAWNUIUM, T. Effect of colchicine on survival rate and ploidy level of hybrid between *Dendrobium santana* x *D. friedericksianum* orchid. **International Journal of Agricultural Technology**, v. 15, n. 2, p. 249–260, 2019.

CHUGH, S.; GUHA, S.; RAO, I. U. Micropropagation of orchids: a review on the potential of different explants. **Scientia Horticulturae**, v. 122, n. 4, p. 507–520, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.07.016>.

CHUNG, M. Y.; KIM, C. Y.; MIN, J. S.; LEE, D. J.; NAING, A. H.; CHUNG, J. D.; KIM, Ch. K. *In vitro* induction of tetraploids in an interspecific hybrid of *Calanthe* (*Calanthe discolor* x *Calanthe sieboldii*) through colchicine and oryzalin treatments. **Plant Biotechnology Reports**, v. 8, n. 3, p. 251–257, 2014. DOI: [10.1007/s11816-014-0317-4](https://doi.org/10.1007/s11816-014-0317-4).

CIRES, E.; CUESTA, C. Una herramienta eficaz en el estudio de la Botánica: la citometría de flujo. **Cuadernos de Biodiversidad**, Alicante, España, n. 37, p. 19–25, 2012. DOI: [10.14198/cdbio.2011.37.03](https://doi.org/10.14198/cdbio.2011.37.03). Disponível em: <http://hdl.handle.net/10045/19567>. Acesso em: 10 jul. 2020.

COX, A. V.; PRIDGEON, A. M.; ALBERT, V. A.; CHASE, M. W. Phylogenetics of the slipper orchids (*Cypripedioideae*, *Orchidaceae*): nuclear rDNA ITS sequences. **Plant Systematics and Evolution**, v. 208, n. 3, p. 197–223, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00985442>.

CUI, G. R.; ZHANG, Z. X.; ZHANG, C. Y.; HU, N. B.; SUI, Y. H.; LI, J. Q. Polyploid induction and identification of *Oncidium*. **Acta Prataculturae Sinica**, v. 19, n. 1, p. 184–190, 2010.

DA SILVA, G. M.; VARELLA, T. L.; KARSBURG, I. V.; SANTANA, T. N.; DE CARVALHO, I. F.; DA SILVA AÑEZ, R. B.; ROSSI, A. A. B.; DA SILVA, M. L. Cytogenetic Characterization of Species and Hybrids of Orchids of *Cattleya* Genus. **Cytologia**, v. 82, n. 2, p. 137–140, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1508/cytologia.82.137>.

DATTA, S. K.; CHAKRABORTY, D.; JANAKIRAM, T. Low cost tissue culture: an overview. **The Journal of Plant Science Research**, v. 33, n. 2, p. 181–199, 2017. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Subodh_Kumar_Datta_Datta/publication/321383581_ch_7_PSpdf/links/5a1fe06aa6fdccc6b7fb8464/ch-7-PSpdf.pdf.

Acesso em: 14 jul. 2020.

DE BARROS, F.; HALL, C. F.; DE PAIVA NETO, V. B.; BATISTA, J. A. N. Checklist das *Orchidaceae* do estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Iheringia, Série Botânica**, v. 73, p. 287–296, 2018. DOI: 10.21826/2446-8231201873s287.

DE, L. C.; PATHAK, P.; RAO, A. N.; RAJEEVAN, P. K. 2 Global Orchid Industry. *In: Commercial orchids*. Warsaw, Poland: De Gruyter Open Poland, 2015. p. 13–19. DOI: <https://doi.org/10.2478/9783110426403.2>.

DE, L. C.; RAO, A. N.; RAJEEVAN, P. K.; PATHAK, P. ORCHID IMPROVEMENT-AN OVERVIEW. **Journal Orchid Society India**, v. 28, p. 35–45, 2014. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/L-De-2/publication/335443619_Orchid_Improvement-_An_Overview/links/5d6635a2458515b5b41deb3f/Orchid-Improvement-An-Overview.pdf. Acesso em: 6 ago. 2021.

DEL BIANCO, M.; KEPINSKI, S. How plants get round problems: new insights into the root obstacle avoidance response. **New Phytologist**, v. 231, n. 1, p. 8–10, 2021.

DHOOGHE, E.; VAN LAERE, K.; EECKHAUT, T.; LEUS, L.; VAN HUYLENBROECK, J. Mitotic chromosome doubling of plant tissues *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 104, n. 3, p. 359–373, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9786-5>.

DRESSLER, R. L. **The orchids: Natural History and Classification**. Cambridge: Harvard University Press, 1981.

DRESSLER, R. L. **Phylogeny and classification of the orchid family**. 1 ed. ed. Portland, Oregon: Dioscorides Press, 1993.

DRESSLER, R. L. How many orchid species? **Selbyana**, v. 26, n. 1, p. 155–158, 2005.

ENG, W. H.; HO, W. S. Polyploidization using colchicine in horticultural plants: a review. **Scientia horticultrae**, v. 246, p. 604–617, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.11.010>.

ENG, W. H.; HO, W. S.; LING, K. H. Effects of colchicine treatment on morphological variations of *Neolamarckia cadamba*. **International Journal of Agricultural Technology**, v. 17, n. 1, p. 47–66, 2021.

FELIX, L. P.; GUERRA, M. Chromosome analysis in *Psygmorchis pusilla* (L.) Dodson & Dressier: the smallest chromosome number known in *Orchidaceae*. **Caryologia**, v. 52, n. 3–4, p. 165–168, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1080/00087114.1998.10589169>.

FELIX, L. P.; GUERRA, M. Basic chromosome numbers of terrestrial orchids. **Plant Systematics and Evolution**, v. 254, n. 3–4, p. 131–148, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00606-004-0200-9>.

FELIX, L. P.; GUERRA, M. Variation in chromosome number and the basic number of subfamily *Epidendroideae* (*Orchidaceae*). **Botanical Journal of the Linnean Society**, Oxford, UK, v. 163, n. 2, p. 234–278, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2010.01059.x>.

FÉLIX, L. P.; GUERRA, M. Cytogenetics and cytotaxonomy of some Brazilian species of *Cymbidioid* orchids. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 4, p. 957–978, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1415-47572000000400041>.

Flora do Brasil. 2020. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB179>. Acesso em: 7 jul. 2021.

FREUDENSTEIN, J. V.; SENYO, D. M.; CHASE, M. W. Mitochondrial DNA and relationships in the *Orchidaceae*. In: WILSON, K. L.; MORRISON, D. A. (org.). **Monocots: Systematics and Evolution: Systematics and Evolution**. Collingwood: CSIRO PUBLISHING, 2000. a. p. 421–429.

FREUDENSTEIN, J. V.; SENYO, D. M.; CHASE, M. W. Phylogenetic implications and comparative utility of 26S and ITS2 sequences in *Orchidaceae*. **Americal Journal of Botany (Abstracts)**, v. 87, p. 127–128, 2000. b.

FREULER, M. J. **100 orquídeas argentinas**. Buenos Aires, Argentina: Editorial Albatros, 2003.

FREULER, M. J. **Orquídeas**. Buenos Aires, Argentina: Editorial Albatros, 2008. Disponível em: https://books.google.com.br/books?id=SjFbL4qd9-MC&printsec=frontcover&dq=orquideas+Freuler&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=orquideas+Freuler&f=false. Acesso em: 9 jun. 2021.

FRITSCHÉ, Y. **Regeneração de estruturas semelhantes a protocormos e citometria de fluxo aplicadas ao melhoramento genético e ao estudo do genoma nuclear de orquídeas. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais)**. 2012. Universidad Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/103396/314952.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 24 jun. 2020.

GALBRAITH, D. W.; HARKINS, K. R.; MADDOX, J. M.; AYRES, N. M.; SHARMA, D. P.; FIROOZABADY, E. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. **Science**, v. 220, n. 4601, p. 1049–1051, 1983. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.220.4601.1049>.

GALDIANO, R. F. **Criopreservação, indução de poliploidia e avaliação da estabilidade genética de orquídeas. Tese (Doutorado em Agronomia-Genética e Melhoramento de Plantas)**. 2013. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2013. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/102802/000738238.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 18 out. 2020.

GALDIANO, R. F.; VENDRAME, W. A.; MORETTO, C.; DE FARIA, R. T.; DE MACEDO LEMOS, E. G. **Seed cryopreservation, 'in vitro' propagation and 'ex vitro' growth of *Cattleya walkeriana* "Gardner", a vulnerable ornamental orchid**. 2017. Disponível em: <https://search.informit.com.au/documentSummary;dn=887468231816743;res=ELHSS>. Acesso em: 4 abr. 2021.

GANGA, M.; CHEZHIYAN, N. Influence of the antimitotic agents colchicine and oryzalin on *in vitro* regeneration and chromosome doubling of diploid bananas (*Musa spp.*). **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 77,

n. 5, p. 572–575, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1080/14620316.2002.11511540>.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. Micropropagation: Uses and Methods. *In*: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. D. (org.). **Plant Propagation by Tissue Culture**. Dordrecht: Springer, 2008. p. 29–64. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3_2.

GERMANÀ, M. A. Use of irradiated pollen to induce parthenogenesis and haploid production in fruit crops. *In*: SHU, Q. Y.; FORESTER, B. P.; NAKAGAWA, H. (org.). **Plant Mutation Breeding and Biotechnology** : CABI and FAO, 2012. p. 411–421.

GIOURIEVA, V.; PANTERIS, E. Inhibition of cell expansion enhances cortical microtubule stability in the root apex of *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Biological Research-Thessaloniki**, v. 28, n. 1, p. 1–16, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40709-021-00143-8>.

GIVNISH, T. J. et al. Orchid phylogenomics and multiple drivers of their extraordinary diversification. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 282, n. 1814, p. 20151553, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.1553>.

GOLDBLATT, P. Polyploidy in angiosperms: monocotyledons. *In*: LEWIS, W. H. (org.). **Polyploidy**. Boston, MA: Springer, 1980. p. 219–239. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4613-3069-1_13.

GOLDMAN, D. H.; FREUDENSTEIN, J. V.; KORES, P. J.; MOLVRAY, M.; JARRELL, D. C.; WHITTEN, W. M.; CAMERON, K. M.; JANSEN, R. K.; CHASE, M. W. Phylogenetics of *Arethuseae* (*Orchidaceae*) based on plastid matK and rbcL sequences. **Systematic Botany**, v. 26, n. 3, p. 670–695, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1043/0363-6445-26.3.670>.

GOMES, L. R. P.; FRANCESCHI, Cr. d. R. B.; RIBAS, L. L. F. Micropropagation of *Brasiliidium forbesii* (*Orchidaceae*) through transverse and longitudinal thin cell layer culture. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 37, n. 2, p. 143–149, 2015. DOI: 10.4025/actascibiols.v37i2.27276.

GÓMEZ, L. D. Orquídeas centroamericanas en Inglaterra del siglo XIX. **Lankesteriana International Journal on Orchidology**, v. 7, n. 3, p. 479–492, 2007. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/443/44339814003.pdf>.

GOVAERST, R. et al. **World checklist of *Orchidaceae***. 2013. Disponível em: <http://www.kew.org/wcsp/monocots/>. Acesso em: 14 jul. 2021.

GRANT, V. **The origin of adaptations**. New York, Estados Unidos: Columbia University Press, 1963.

GRIESBACH, R. J. Colchicine-induced polyploidy in *Phalaenopsis* orchids. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 1, n. 1, p. 103–107, 1981.

GRIESBACH, R. J. Polyploidy in *Phalaenopsis* orchid improvement. **Journal of Heredity**, v. 76, n. 1, p. 74–75, 1985.

GUERRA, M. **Chromosome number variation and evolution in monocots**. Collingwood: CSIRO, 2000. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?hl=es&lr=&id=YzQBUQqLS0YC&oi=fnd&pg>

=PA127&dq=Chromosome+number+variation+and+evolution+in+monocots.+&ots=XXDsGihZHE&sig=-IVHoJOQvEJ-r5k9AAvWNTwnEUo&redir_esc=y#v=onepage&q=Chromosome number variation and evolution in mono. Acesso em: 2 jul. 2020.

GUERRA, M. Cytotaxonomy: the end of childhood. **Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**, v. 146, n. 3, p. 703–710, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1080/11263504.2012.717973>.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. São Paulo: Funpec, 2002.

GUIMARÃES, Leonardo Ramos Seixas; CAETANO, Jader Oslim; SCHLEMPER, Carlos Roberto; COUTO, Ciro Carlos Mello; NASCIMENTO, Marcelo Vieira. Novelties in *Orchidaceae* from the State of Santa Catarina, Brazil. **Richardiana**, [S. l.], v. 16, p. 249–257, 2016.

HAGERUP, O. The spontaneous formation of haploid, polyploid, and aneuploid embryos in some orchids. *K. Dansk. Videnskab. Selskab. Biology Meddelelse*, v. 20, p. 1–22, 1947.

HANNWEG, K.; VISSER, G.; DE JAGER, K.; BERTLING, I. *In vitro*-induced polyploidy and its effect on horticultural characteristics, essential oil composition and bioactivity of *Tetradenia riparia*. **South African Journal of Botany**, v. 106, p. 186–191, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.07.013>.

HARD, J. W.; SABNIS, D. D. Colchicine and plant microtubules: A critical evaluation. *In*: SMITH, H. (org.). **Commentaries in Plant Science**. Oxford, UK: Pergamon Press, 2013. v. 2p. 51.

HARLAN, J. R.; DE WET, J. M. J. On Ö. Winge and a prayer: the origins of polyploidy. **The Botanical Review**, v. 41, n. 4, p. 361–390, 1975. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02860830>.

HELENICE, M. Auxinas. *In*: KERBAUY, G. B. (org.). **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 217–249.

HEO, J. Y.; JEONG, S. H.; CHOI, H. R.; PARK, S. M. Polyploid production in *Lilium leichtlinii* var. *maximowiczii* using colchicine. **JAPS: Journal of Animal and Plant Sciences**, v. 26, n. 4, 2016.

HLAING, T. S.; HARUKA, K.; AYUMI, D.; KAZUMITSU, M. Induction of adventitious shoots and tetraploids in *Antirrhinum majus* L. by treatment of antimetabolic agents in vitro without plant growth regulators. **Plant Biotechnology**, p. 20–731, 2021. DOI: 10.5511/plantbiotechnology.20.0731a.

HLAING, T. S.; KONDO, H.; DEGUCHI, A.; MIYOSHI, K. The efficient induction of tetraploid plants via adventitious shoots in *Antirrhinum majus* L. by *in vitro* seed treatment with amiprofos-methyl. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 142, n. 1, p. 157–166, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01849-8>.

HONFI, A. I.; BOLZAN, A. D.; DAVIÑA, J. R. Dimensión Cromosómica. **Ciencia e Investigacion**, Buenos Aires, Argentina, v. 67, n. 1, p. 5–24, 2017. Disponível em:

https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/68433/CONICET_Digital_Nro.7d0e219e-77ca-4632-b244-cfa53da7bf64_D.pdf?sequence=5&isAllowed=y.
Acesso em: 15 jul. 2020.

HOSSAIN, M. M.; KANT, R.; VAN, P. T.; WINARTO, B.; ZENG, S.; TEIXEIRA DA SILVA, J. A. The application of biotechnology to orchids. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 32, n. 2, p. 69–139, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1080/07352689.2012.715984>.

HOTTA, T.; FUJITA, S.; UCHIMURA, S.; NOGUCHI, M.; DEMURA, T.; MUTO, E.; HASHIMOTO, T. Affinity purification and characterization of functional tubulin from cell suspension cultures of *Arabidopsis* and tobacco. **Plant Physiology**, v. 170, n. 3, p. 1189–1205, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.15.01173>.

HU, C. J.; LEE, N.; LEE, Y. I. Meiotic defects and premature tapetal degeneration are involved in the low fertility of *Oncidesa* Gower Ramsey, an important cut-flower orchid. **HortScience**, v. 53, n. 9, p. 1283–1287, 2018. DOI: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI13011-18>.

HUY, N. P.; LUAN, V. Q.; TUNG, H. T.; HIEN, V. T.; NGAN, H. T. M.; DUY, P. N.; NHUT, D. Tan. *In vitro* polyploid induction of *Paphiopedilum villosum* using colchicine. **Scientia Horticulturae**, v. 252, p. 283–290, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.03.063>.

HWANG, S. H.; KIM, M. S.; PARK, S. Y. Improvement of chromosome doubling efficiency in *Cymbidium* hybrids by colchicine and oryzalin treatment. **Korean Journal Horticulture Science Technology**, v. 33, p. 900–910, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.7235/hort.2015.15063>. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/99d6/14dde419a6356221fd1ff4bd66079150ea56.pdf>. Acesso em: 18 out. 2020.

IOF. **Orchid Hybrid: *Brassolaeliocattleya* Haw Yuan Beauty**. 2022a. Disponível em: <https://www.orchids.org/grexes/brassolaeliocattleya-haw-yuan-beauty>. Acesso em: 15 abr. 2022.

IOF. **Orchid Hybrid: *Brassolaeliocattleya* Goldenzelle**. 2022b. Disponível em: <https://www.orchids.org/grexes/brassolaeliocattleya-goldenzelle>. Acesso em: 15 abr. 2022.

IUCN/SSC ORCHID SPECIALIST GROUP. **Orchids: status survey and conservation action plan**. Gland Switzerland and Cambridge, UK: IUCN, 1996. v. 28

JACOBSEN, A. G. R.; JERVIS, G.; XU, J.; TOPPING, J. F.; LINDSEY, K. Root growth responses to mechanical impedance are regulated by a network of ROS, ethylene and auxin signalling in *Arabidopsis*. **New Phytologist**, v. 231, n. 1, p. 225–242, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.17180>.

JI, B. X.; CHEN, D. W.; ZHANG, C. C.; MIN, D.; HUANG, W. J.; WANG, Y. High efficient polyploid induction of *Cymbidium hybridium*. **Bulletin of Botanical Research**, v. 31, n. 5, p. 558–562, 2011.

JIAO, Y. et al. Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms. **Nature**, v. 473, n. 7345, p. 97–100, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature09916>.

JOHN, P. C. L.; QI, R. Cell division and endoreduplication: doubtful engines of vegetative growth. **Trends in Plant Science**, v. 13, n. 3, p. 121–127, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.01.004>.

JONES, K.; LIM, K. Y.; CRIBB, P. J. The chromosomes of orchids VII *Dendrobium*. **Kew Bulletin**, v. 37, n. 2, p. 221–227, 1982.

JOPPA, L. N.; ROBERTS, D. L.; PIMM, S. L. How many species of flowering plants are there? **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 278, n. 1705, p. 554–559, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.1004>.

KAMEMOTO, H.; KASEMSAP, S.; SAGARIK, R. **Chromosome numbers of *Sarcanthine* orchid species of Thailand National History Bulletin Siam. Society**, 1964.

KAO, Y. Y.; CHANG, S. B.; LIN, T. Y.; HSIEH, C. H.; CHEN, Y. H.; CHEN, W. H.; CHEN, C. C. Differential accumulation of heterochromatin as a cause for karyotype variation in *Phalaenopsis* orchids. **Annals of Botany**, v. 87, n. 3, p. 387–395, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1006/anbo.2000.1348>.

KAZEMI, M.; KAVIANI, B. Anatomical, morphological, and physiological changes in colchicine-treated protocorm-like bodies of *Catasetum pileatum* Rchb. f. *in vitro*. **Cogent Biology**, v. 6, n. 1, p. 1840708, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1080/23312025.2020.1840708>.

KERDSUWAN, N.; TE-CHATO, S. Effects of colchicine on survival rate, morphological, physiological and cytological characters of chang daeng orchid (*Rhynchostylis gigantea* var. *rubrum* Sagarik) *in vitro*. **Journal of Agricultural Technology**, v. 8, n. 4, p. 1451–1460, 2012. Disponível em: http://ijat-aatsea.com/pdf/v8_n4_12_July/25_IJAT_2012_8_4__Nattaporn_Kerdsuwan-plant-science-accepted.pdf. Acesso em: 8 set. 2020.

KHARDE, A. V.; CHAVAN, N. S.; CHANDRE, M. A.; AUTADE, R. H.; KHETMALAS, M. B. *In vitro* enhancement of bacoside in brahmi (*Bacopa monnieri*) using colchicine. **Journal Plant Biochemistry Physiology**, v. 5, n. 1, p. 1–6, 2017. DOI: 10.4172/2329-9029.1000172.

KIM, S. W.; PARK, A.; AHN, D. G.; KIM, S. Y. Effect of Colchicine on the Growth and Gravitropic Response via Ethylene Production in *Arabidopsis* Roots. **Korean Journal of Plant Resources**, v. 31, n. 6, p. 597–603, 2018. DOI: <https://doi.org/10.7732/kjpr.2018.31.6.597>.

KNUDSON, L. **Nonsymbiotic germination of orchid seeds**. [s.l.] : The University of Chicago Press, 1922. v. 73

KNUDSON, L. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, v. 15, p. 214–217, 1946.

KORES, P. J. The phylogenetic relationships of orchidoideae and spiranthoideae (*Orchidaceae*) as inferred from rbcL plastid sequences. **Lindleyana**, v. 12, p. 1–11, 1997.

KRAHL, A. H.; KRAHL, D. R. P.; VALSKO, J. J.; HOLANDA, A. S. S.; ENTRINGER-JÚNIOR, H.; NASCIMENTO, J. W.; DO, Juliana Werner. Biologia reprodutiva e polinização em orquídeas: com ênfase em espécies brasileiras e

da região amazônica-uma revisão de literatura. **Natureza on-line**, v. 13, n. 3, p. 128–133, 2015. Disponível em: http://www.naturezaonline.com.br/natureza/conteudo/pdf/KrahlAHetal_128-133.pdf. Acesso em: 9 set. 2020.

LEE, H. -. J.; KIM, H. -. S.; PARK, J. M.; CHO, H. S.; JEON, J. H. PIN-mediated polar auxin transport facilitates root– obstacle avoidance. **New Phytologist**, v. 225, n. 3, p. 1285–1296, 2020. a. DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.16076>.

LEE, H. C.; CHEN, Y. J.; MARKHART, A. H.; LIN, T. Y. Temperature effects on systemic endoreduplication in orchid during floral development. **Plant Science**, v. 172, n. 3, p. 588–595, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.11.013>.

LEE, H. C.; CHIOU, D. W.; CHEN, W. H.; MARKHART, A. H.; CHEN, Y. H.; LIN, T. Y. Dynamics of cell growth and endoreduplication during orchid flower development. **Plant Science**, v. 166, n. 3, p. 659–667, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2003.10.034>.

LEE, Y. I.; HSU, S. -. T.; YEUNG, E. C. Orchid protocorm-like bodies are somatic embryos. **American Journal of Botany**, v. 100, n. 11, p. 2121–2131, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3732/ajb.1300193>.

LEE, Y. I.; TSENG, Y. -. F.; LEE, Y. C.; CHUNG, M. C. Chromosome constitution and nuclear DNA content of *Phalaenopsis* hybrids. **Scientia Horticulturae**, v. 262, p. 109089, 2020. b. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.109089>.

LEITCH, I. .. J.; KAHANDAWALA, I.; SUDA, J.; HANSON, L.; INGROUILLE, M. J.; CHASE, M. W.; FAY, M. F. Genome size diversity in orchids: consequences and evolution. **Annals of Botany**, v. 104, n. 3, p. 469–481, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mcp003>.

LEIVA-NETO, J. T.; GRAFI, G.; SABELLI, P. A.; DANTE, R. A.; WOO, Y. -m.; MADDOCK, S.; GORDON-KAMM, W. J.; LARKINS, B. A. A dominant negative mutant of cyclin-dependent kinase A reduces endoreduplication but not cell size or gene expression in maize endosperm. **The Plant Cell**, v. 16, n. 7, p. 1854–1869, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.022178>.

LI, M.; DING, B.; HUANG, W.; PAN, J.; DING, Z.; JIANG, F. Induction and characterization of tetraploids from seeds of *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/3246398>.

LIM, W. L.; LOH, C. S. Endopolyploidy in *Vanda* Miss Joaquim (*Orchidaceae*). **New Phytologist**, v. 159, n. 1, p. 279–287, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00797.x>.

LOBERANT, B.; ALTMAN, A. Micropropagation of plants. *In*: FLICKINGER, M. C. (org.). **Encyclopedia of industrial biotechnology: bioprocess, bioseparation, and cell technology**. New York: Wiley, 2010. p. 1–17.

LONE, A. B.; UNEMOTO, L. K.; TAKAHASHI, L. S. A.; DE FARIA, R. T. Sobrevivência e desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya* (*Orchidaceae*) submetida a tratamentos com colchicina. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 1, p. 1337–1341, 2010. Disponível em:

<https://www.redalyc.org/pdf/4457/445744099025.pdf>. Acesso em: 3 abr. 2021.

LUER, C. A. A systematic method of classification of the *Pleurothallidinae* versus a strictly phylogenetic method. **Selbyana**, v. 23, n. 1, p. 57–110, 2002. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/41760106>.

MA, Z.; REN, Y-y. Ethylene interacts with auxin in regulating developmental attenuation of gravitropism in flax root. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 31, n. 4, p. 509–518, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00344-012-9261-0>.

MALUSZYNSKA, Jolanta; KOLANO, Bozena; SAS-NOWOSIELSKA, Hanna. Endopolyploidy in plants. *In: Plant Genome Diversity*. Vienna: Springer, 2013. v. 2p. 99–119.

MASONBRINK, R. E.; FU, S.; HAN, F.; BIRCHLER, J. A. Heritable loss of replication control of a minichromosome derived from the B chromosome of maize. **Genetics**, v. 193, n. 1, p. 77–84, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1534/genetics.112.146126>.

MENEZES-SÁ, T. S. A.; DE FÁTIMA ARRIGONI-BLANK, M.; DA COSTA, A. S.; DE ALMEIDA SANTOS-SEREJO, J.; BLANK, A. F.; SOARES, C. A.; MOURA, G. M. S. Chromosome doubling in *Cattleya tigrina* A. Rich. **Scientia Plena**, v. 15, n. 11, 2019. DOI: <https://doi.org/10.14808/sci.plena.2019.110202>.

MIDUNO, T. Chromosomenstudien an Orchidazeen. III Über das Vorkommen von haploiden Pflanzen bei *Bletilla striata* Reichb. f. var. *gebina* Reichb. f. **Cytologia**, v. 11, n. 1, p. 156–177, 1940. DOI: <https://doi.org/10.1508/cytologia.11.156>.

MINAMIGUCHI, J. Y.; NETO, N. B. M. EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DIRETA EM FOLHAS DE PHALAEENOPSIS: ORCHIDACEAE. **Colloquium Agrariae**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 7–13, 2007. Disponível em: <http://revistas.unoeste.br/index.php/ca/article/view/111>.

MOHAMMADI, M.; KAVIANI, B.; SEDAGHATHOOR, S. In vivo polyploidy induction of *Phalaenopsis amabilis* in a bubble bioreactor system using colchicine. **Ornamental Horticulture**, v. 27, p. 204–212, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1590/2447-536X.v27i2.2275>.

MOHANTY, P.; PAUL, S.; DAS, M. C.; KUMARIA, S.; TANDON, P. A simple and efficient protocol for the mass propagation of *Cymbidium mastersii*: an ornamental orchid of Northeast India. **AoB Plants**, v. 2012, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1093/aobpla/pls023>.

MONDIN, M.; AGUIAR-PERECIN, M. L. R. **Coloração pelo Método de Feulgen**, 2009. Disponível em: <http://www.genetica.esalq.usp.br/citogenetica/protocolos/Feulgen.pdf>. Acesso em: 28 jul. 2020.

MONDIN, M.; NETO, A. D. Citogenética vegetal enfatizando a família *Orchidaceae*. **Orchidstudium**, v. 4, p. 24–54, 2006.

MONDIN, M.; SANTOS-SEREJO, J. A.; BERTÃO, M. R.; LABORDA, P.; PIZZAIA, D.; AGUIAR-PERECIN, M. L. R. Karyotype variability in tropical maize sister inbred lines and hybrids compared with KYS standard line. **Frontiers in**

Plant Science, v. 5, p. 544, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00544>.

MORAES, A. P.; CHINAGLIA, M.; PALMA-SILVA, C.; PINHEIRO, F. Interploidy hybridization in sympatric zones: the formation of *Epidendrum fulgens* x *E. puniceoluteum* hybrids (*Epidendroideae*, *Orchidaceae*). **Ecology and Evolution**, v. 3, n. 11, p. 3824–3837, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1002/ece3.752>.

MORAES, M. C. **Estudo biotecnológico, citogenético e molecular em espécies de orquídeas endêmicas da flora brasileira. Dissertação (Mestrado em Agronomia- Genética e Melhoramento de Plantas)**. 2014. Universidade Estadual Paulista, Assis, 2014. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/115895/000810969.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 29 jul. 2020.

MORALES, A. G.; AGUIAR-PERECIN, M. L. R.; MONDIN, M. Karyotype characterization reveals an up and down of 45S and 5S rDNA sites in *Crotalaria* (*Leguminosae-Papilionoideae*) species of the section Hedriocarpae subsection Macrostachyae. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 59, n. 2, p. 277–288, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10722-011-9683-8>.

MOREL, G. M. Producing virus-free *Cymbidium*. **American Orchid Society Bulletin**, v. 29, p. 495–497, 1960.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 25, n. 1, p. 135–166, 1974. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.25.060174.001031>.

MURASHIGE, T.; NAKANO, R. Tissue culture as a potential tool in obtaining polyploid plants. **Journal of Heredity**, v. 57, n. 4, p. 115–118, 1966.

NOGALES, E. Structural insights into microtubule function. **Annual Review of Biochemistry**, v. 69, n. 1, p. 277–302, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.277>.

NURA, S.; ADAMU, A. K.; ADELANWA, M. A.; USMAN, I. S.; SHEHU, K. Colchicine-induced variability on growth and yield related traits of m2 generation fonio (*Digitaria exilis* [Kippist] Stapf) in Zaria, Nigeria. **Nigerian Journal of Scientific Research**, v. 16, n. 4, p. 557–564, 2017.

OTTO, F. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. *In: Methods in Cell Biology* : Elsevier, 1990. v. 33p. 105–110. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)60516-6](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)60516-6).

OTTO, S. P.; WHITTON, J. Polyploid incidence and evolution. **Annual Review of Genetics**, v. 34, p. 401–437, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.34.1.401>.

PACEY, E. K.; MAHERALI, H.; HUSBAND, B. C. The influence of experimentally induced polyploidy on the relationships between endopolyploidy and plant function in *Arabidopsis thaliana*. **Ecology and Evolution**, v. 10, n. 1, p. 198–216, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/ece3.5886>.

PANTERIS, E.; KOMIS, G.; ADAMAKIS, I. - D. S.; ŠAMAJ, J.; BOSABALIDIS, A. M. MAP65 in tubulin/colchicine paracrystals of *Vigna sinensis* root cells: possible role in the assembly and stabilization of atypical tubulin polymers.

Cytoskeleton, v. 67, n. 3, p. 152–160, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1002/cm.20432>.

PARK, S. Y.; PAEK, K. Y. Endoreduplication pattern of somatic embryos and variants occurrence affected by pre-existed endoreduplicated cells in *Doritaenopsis*. **Journal of Plant Biotechnology**, v. 33, n. 4, p. 297–302, 2006. DOI: <https://doi.org/10.5010/JPB.2006.33.4.297>.

PARK, S. Y.; YEUNG, E. C.; PAEK, K. Y. Endoreduplication in *Phalaenopsis* is affected by light quality from light-emitting diodes during somatic embryogenesis. **Plant Biotechnology Reports**, v. 4, n. 4, p. 303–309, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11816-010-0148-x>.

PARTHIBHAN, S.; RAO, M. V.; TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; SENTHIL KUMAR, T. Somatic embryogenesis from stem thin cell layers of *Dendrobium aqueum*. **Biologia Plantarum**, v. 62, n. 3, p. 439–450, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10535-018-0769-4>.

PERES, L. E. P.; KERBAUY, G. B. Citocininas. *In*: KERBAUY, G. B. (org.). **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 250–278.

PERRY, J. L.; LYRENE, P. M. *In vitro* induction of tetraploidy in *Vaccinium darrowi*, *V. elliotii*, and *V. darrowix V. elliotii* with colchicine treatment. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 109, n. 1, p. 4–6, 1984.

PIERRE-JEROME, E.; DRAPEK, C.; BENFEY, P. N. Regulation of division and differentiation of plant stem cells. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 34, p. 289, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1146%2Fannurev-cellbio-100617-062459>.

POTTERS, G.; PASTERNAK T. P.; GUISEZ, Y.; PALME, K. J.; JANSEN, M. A. K. Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? **Trends in Plant Science** v. 12, n. 3, p. 98–105, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.01.004>.

PRAÇA-FONTES, M. M.; CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R.; CRUZ, C. D. Revisiting the DNA C-values of the genome size-standards used in plant flow cytometry to choose the “best primary standards”. **Plant Cell Reports**, v. 30, n. 7, p. 1183–1191, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1026-x>.

PRAKASH, J. **Proceedings of International Symposium on Methods and Markers for Quality Assurance in Micropropagation**, 2000.

PRAKASH, J. Micropropagation of ornamental perennials: progress and problems. **Acta Horticulturae**, v. 812, p. 289–294, 2009.

PRIDGEON, A. M.; BATEMAN, R. M.; COX, A. V.; HAPEMAN, J. R.; CHASE, M. W. Phylogenetics of subtribe *Orchidinae* (*Orchidoideae*, *Orchidaceae*) based on nuclear ITS sequences. 1. Intergeneric relationships and polyphyly of *Orchis* sensu lato. **Lindleyana**, v. 12, p. 89–109, 1997.

QUERINO, B. C.; FERRAZ, M. E.; MATA-SUCRE, Y.; SOUZA, G.; FELIX, L. P. Cytomolecular diversity of the subtribe *Laeliinae* (*Epidendroidae*, *Orchidaceae*) suggests no relationship between genome size and heterochromatin abundance. **Plant Systematics and Evolution**, v. 306, n. 2, p. 1–15, 2020. DOI:

<https://doi.org/10.1007/s00606-020-01650-2>.

RAHAYU, E. M. D.; SUKMA, D.; SYUKUR, M.; AZIZ, S. A.; IRAWATI, D. In Vivo Polyploid Induction Using Colchicine of Moth Orchid Seedling (*Phalaenopsis amabilis*(L.) Blume). **Buletin Kebun Raya**, v. 18, n. 1, p. 41–48, 2015. a. Disponível em: <https://publikasikr.lipi.go.id/index.php/buletin/article/view/31/31>.

RAHAYU, E. M. D.; SUKMA, D.; SYUKUR, M.; IRAWATI, D. Polyploid Induction of *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume and *Phalaenopsis amboinensis* J. J. Smith by Colchicine in *In Vitro* Culture. **Indonesian Journal of Agronomy**, v. 43, n. 3, p. 219–226, 2015. b. DOI: <https://doi.org/10.24831/jai.v43i3.11248>.

RAMALHO, A. M. Z.; PIMENTA, H. C. D. Valoração econômica do dano ambiental ocasionado pela extração ilegal da orquídea *Cattleya granulosa* no Parque Natural Dom Nivaldo Monte, Natal/RN. **Holos**, v. 26, n. 1, 2010.

RAMSEY, J.; SCHEMSKE, D. W. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 29, n. 1, p. 467–501, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.29.1.467>.

RANDOLPH, L. F. Some effects of high temperature on polyploidy and other variations in maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 18, n. 3, p. 222, 1932. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1076195/pdf/pnas01731-0012.pdf>.

RANNEY, T. G. **Polyploidy: from evolution to landscape plant improvement** *Proceedings of the 11th Metropolitan Tree Improvement Alliance (METRIA)*, 2000.

RANNEY, T. G. Polyploidy: From evolution to new plant development. **Combined Proceedings International Plant Propagators' Society**, Carlisle, USA, v. 56, p. 137–142, 2006. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Thomas_Ranney/publication/228633988_Polyploidy_From_Evolution_to_New_Plant_DevelopmentC/links/0046352b095c13de6a000000.pdf. Acesso em: 24 jul. 2020.

RASMUSSEN, F. N. *Orchidaceae*. In: DAHLGREN, R. M. T.; CLIFFORD, T.; YEO, P. F. (org.). **The families of the monocotyledons**. Berlin: Springer-Verlag, 1985. p. 249–274.

REIS, D. T. N. **Ensaio de poliploidização in vitro em vários explantes de tamarilho (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt). Dissertação (Mestrado em Ecologia)**. 2013. Universidade de Coimbra, Coimbra, 2013. Disponível em: <https://estudogeral.uc.pt/bitstream/10316/24931/1/Tese David Reis.pdf>. Acesso em: 27 jul. 2020.

RIVAS ROSSI, M.; WARNER, J. Las orquideas. In: MONJE-NÁJERA, J. (org.). **El mundo de la naturaleza tropical**. 1. ed. San José, Costa Rica: Editorial Universidad Estatal a Distancia, 1998. Disponível em: https://books.google.com.br/books?hl=es&lr=&id=NQi5cyIRGPEC&oi=fnd&pg=PA1&dq=el+mundo+de+la+naturaleza+tropical&ots=yU_xiCgaEk&sig=vjSSeb-q5pCJwmtAWm_ijt8P9o&redir_esc=y#v=onepage&q=el mundo de la

naturaleza tropical&f=false. Acesso em: 22 maio. 2021.

ROBERTS, D. L.; DIXON, K. W. Orchids. **Current Biology**, v. 18, n. 8, p. R325–R329, 2008. Disponível em: <http://pdf.xuebalib.com:1262/8onN0dqjMiO.pdf>.

ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 1991.

ROYAL HORTICULTURAL SOCIETY. **Royal Horticultural Society Orchid Hybrid Registration Database Information System**. 2018. Disponível em: <http://apps.rhs.org.uk/horticulturaldatabase/%0Aorchidregister/orchidresults.asp/>. Acesso em: 14 abr. 2022.

SAJJAD, Y.; JASKANI, M. J.; MEHMOOD, A.; AHMAD, I.; ABBAS, H. Effect of colchicine on *in vitro* polyploidy induction in African marigold (*Tagetes erecta*). **Pakistan Journal of Botany**, v. 45, n. 3, p. 1255–1258, 2013.

SARATHUM, S.; HEGELE, M.; TANTIVIWAT, S.; NANAKORN, M. Effect of concentration and duration of colchicine treatment on polyploidy induction in *Dendrobium scabrilingue* L. **European Journal of Horticulture Science**, v. 75, n. 3, p. 123–127, 2010. Disponível em: http://www.pubhort.org/ejhs/2010/file_1591098.pdf. Acesso em: 28 jul. 2020.

SATTLER, M. C.; CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R. The polyploidy and its key role in plant breeding. **Planta**, v. 243, n. 2, p. 281–296, 2016. DOI: DOI 10.1007/s00425-015-2450-x.

SILVA, P. A. K. X.; CALLEGARI-JACQUES, S.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Induction and identification of polyploids in *Cattleya intermedia* Lindl. (*Orchidaceae*) by *in vitro* techniques. **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 105–111, 2000. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782000000100017&script=sci_arttext. Acesso em: 2 out. 2020.

SILVIA, M. C.; VIEIRA, M. L. C.; MONDIN, M.; AGUIAR-PERECIN, M. L. R. Comparative karyotype analysis of three *Passiflora* L. species and cytogenetic characterization of somatic hybrids. **Caryologia**, v. 58, n. 3, p. 220–228, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1080/00087114.2005.10589454>.

SOARES, J. S.; ROSA, Y. B. C. J.; SUZUKI, R. M.; SCALON, S. .. P. Q.; ROSA JUNIOR, E. J. Cultivo in vitro de *Dendrobium nobile* com uso de água de coco no meio de cultura. **Horticultura Brasileira**, v. 31, p. 63–67, 2013.

SOLTIS, D. E. et al. Polyploidy and angiosperm diversification. **American Journal of Botany**, v. 96, n. 1, p. 336–348, 2009. DOI: <https://doi.org/10.3732/ajb.0800079>.

SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; TATE, J. A. Advances in the study of polyploidy since plant speciation. **New Phytologist**, v. 161, n. 1, p. 173–191, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00948.x>.

SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E. The role of hybridization in plant speciation. **Annual Review of Plant Biology**, v. 60, p. 561–588, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.043008.092039>.

SONG, L.; YANG, J.; LIU, D.; LI, Z.; WANG, Y. Polyploid induction in *Cymbidium*

sinenthes'Lv mosu'× *Cymbidium hybridum*'Shijieheping'F1 generation. **Guangxi Zhiwu/Guihaia**, v. 38, n. 2, p. 188–194, 2018.

SOUZA, B. C. Q. **Citogenética da subtribo *Laeliinae* (Orchidaceae: Epidendroideae): Regiões heterocromáticas e localização do DNA ribossomal. Dissertação (Mestrado em Agronomia)**. 2011. Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, Brazil, 2011.

SOUZA, B. C. Q.; SOUZA, A. C. M.; ALMEIDA, E. M.; FELIX, L. P. *Orchidaceae*-IAPT/IOPB chromosome data 26. **Taxon**, v. 66, n. 6, p. 1487–1499, 2017.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. J. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. 2. ed. : Instituto Plantarum Nova Odessa, 2008.

STANCATO, G. C.; BEMELMANS, P. F.; VEGRO, C. L. R. Produção de mudas de Orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: estudo de caso. **Ornamental Horticulture**, v. 7, n. 1, 2001. DOI: <https://doi.org/10.14295/rbho.v7i1.74>.

STORT, M. N. S. Phylogenetic relationship between species of the genus *Cattleya* as a function of crossing compatibility. **Revista de Biologia Tropical**, v. 32, n. 2, p. 223–226, 1984.

SUDA, J.; KRON, P.; HUSBAND, B. C.; TRAVNICEK, P. Flow Cytometry and Ploidy: Applications in plants systematics, ecology and evolutionary biology. *In*: DOLEZEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. (org.). **Flow cytometry with plant cells: Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes**. Weinheim: John Wiley & Sons, 2007. p. 103. DOI: <https://doi.org/10.1002/9783527610921.ch5>.

TAKANE, R. J.; YANAGISAWA, S. S.; PIVETTA, K. F. L. **Cultivo moderno de orquídeas: *Cattleya* e seus híbridos**. Fortaleza, UFC.

TANTASAWAT, P.; KHAIRUM, A.; CHAOWISET, W.; WANNAJINDAPORN, A. Pronamide-induced polyploidy in *Rhynchostylis* and *Dendrobium*. **Acta Horticulturae**, p. 615–620, 2012. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.937.75>.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; GIANG, D. T. T.; DOBRÁNSZKI, J.; ZENG, S. ...; TANAKA, M. Ploidy analysis of *Cymbidium*, *Phalaenopsis*, *Dendrobium* and *Paphiopedillum* (Orchidaceae), and *Spathiphyllum* and *Syngonium* (Araceae). **Biologia**, v. 69, n. 6, p. 750–755, 2014. DOI: <https://doi.org/10.2478/s11756-014-0370-z>.

TEOH, S. B. Polyploid spore formation in diploid orchid species. **Genetica**, v. 63, n. 1, p. 53–59, 1984. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/BF00137465.pdf>.

THAO, N. T. P.; URESHINO, K.; MIYAJIMA, I.; OZAKI, Y.; OKUBO, H. Induction of tetraploids in ornamental *Alocasia* through colchicine and oryzalin treatments. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 72, n. 1, p. 19–25, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1021292928295>.

The Plant List. 2020. Disponível em: <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Orchidaceae/#statistics>. Acesso em: 7

jun. 2020.

TUWO, Mustika; INDRIANTO, Ari. Improvement of orchid *Vanda* hybrid (*Vanda limbata* Blume x *Vanda tricolor* Lindl. var. *suavis*) by colchicines treatment in vitro. **Modern Applied Science**, v. 10, n. 11, p. 83–89, 2016. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/9d27/c05697a90c8dad8688ad577ad7cf78062671.pdf>. Acesso em: 18 out. 2020.

UNEMOTO, L. K.; FARIA, R. T. D.; DESTRO, D.; BARBOSA, C. M.; LONE, A. B. Sobrevivência e diferenciação de protocormos de *Oncidium flexuosum* submetidos a tratamento com ácido peracético e colchicina. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 31, n. 3, p. 503–508, 2009. DOI: <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v31i3.697>.

UNO, G.; STOREY, R.; MOORE, R. **Principles of Botany**. New York, Estados Unidos: McGraw-Hill, 2001.

VAIO, M.; MAZZELLA, C.; PORRO, V.; SPERANZA, P.; LÓPEZ-CARRO, B.; ESTRAMIL, E.; FOLLE, G. A. Nuclear DNA content in allopolyploid species and synthetic hybrids in the grass genus *Paspalum*. **Plant Systematics and Evolution**, v. 265, n. 1, p. 109–121, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00606-006-0506-x>.

VAN DEN BERG, C. *Cattleya*. In: PRIDGEON, A. M.; CRIBB, P. J.; CHASE, M. W.; RASMUSSEN, F. N. (org.). **Genera Orchidacearum, 4. Epidendroideae (Part One)**. Oxford: Oxford University Press, 2005. p. 213–217.

VAN DEN BERG, C. New Combinations in the genus *Cattleya* Lindl. (*Orchidaceae*). **Neodiversity**, v. 3, p. 3–12, 2008. Disponível em: <http://orchids24.de/downloads/download-new-combinations-in-the-genus-cattleya.pdf>. Acesso em: 22 jun. 2021.

VAN DEN BERG, C. Phylogeny and systematics of *Cattleya* and *Sophranitis*. In: (R. P. Sauleda, L. A. Sandow, Org.) THE 19TH WORLD ORCHID CONFERENCE 2009, Miami. **Anais** [...]. Miami p. 319–323.

VAN DEN BERG, C. Reaching a compromise between conflicting nuclear and plastid phylogenetic trees: a new classification for the genus *Cattleya* (*Epidendreae*; *Epidendroideae*; *Orchidaceae*). **Phytotaxa**, v. 186, n. 2, p. 75–86, 2014. DOI: <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.186.2.2>.

VAN DEN BERG, C. **Cattleya in Flora do Brasil 2020**. 2020. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB11329>. Acesso em: 7 jul. 2021.

VAN DEN BERG, C.; CHASE, M. W. Nomenclatural notes on *Laeliinae*-I. **Lindleyana**, v. 15, n. 2, p. 115–119, 2000.

VAN DEN BERG, C.; CHASE, M. W. Nomenclatural notes on *Laeliinae*-II. Additional combinations and notes. **Lindleyana**, v. 16, n. 2, p. 109–112, 2001.

VAN DEN BERG, C.; HIGGINS, W. E.; DRESSLER, R. L.; WHITTEN, W. M.; SOTO-ARENAS, M. A.; CHASE, M. W. A phylogenetic study of *Laeliinae* (*Orchidaceae*) based on combined nuclear and plastid DNA sequences. **Annals of Botany**, v. 104, n. 3, p. 417–430, 2009. DOI:

<https://doi.org/10.1093/aob/mcp101>.

VICHIATO, M. R. M.; VICHIATO, M.; PASQUAL, M.; CASTRO, D. M.; DUTRA, L. F. Indução e identificação de tetraplóides em *Dendrobium nobile* Lindl.(*Orchidaceae*). **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, Ceará, v. 38, n. 4, p. 385–390, 2007. Disponível em: <http://www.ccarevista.ufc.br/seer/index.php/ccarevista/article/view/98>. Acesso em: 20 jul. 2020.

VICHIATO, M. R. M.; VICHIATO, M.; PASQUAL, M.; RODRIGUES, F. A.; CASTRO, D. M. Morphological effects of induced polyploidy in *Dendrobium nobile* Lindl.(*Orchidaceae*). **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, Minas Gerais, v. 14, n. 3, p. 154–159, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/1984-70332014v14n3a23>. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-70332014000300003&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 28 jul. 2020.

VILCHERREZ-ATOCHE, J. A.; IYAMA, C. M.; CARDOSO, J. C. Polyploidization in Orchids: From Cellular Changes to Breeding Applications. **Plants**, v. 11, n. 4, p. 469, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants11040469>.

VILCHERREZ-ATOCHE, J. A.; ROJAS-IDROGO, C.; DELGADO-PAREDES, G. E. Micropropagation of *Cattleya maxima* J. Lindley in Culture Medium with Banana Flour and Coconut Water. **International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences**, v. 10, n. 4, p. 179–193, 2020.

WANG, L. J.; ZHANG, G. Q.; CAO, Q. Z.; GAO, X.; JIA, G. X. An efficient method for inducing multiple genotypes of tetraploids *Lilium rosthornii* Diels. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 141, n. 3, p. 499–510, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01807-4>.

WANG, M.; ZENG, R.; XIE, L.; LI, Y.; ZENG, F.; ZHANG, Z. *In vitro* induction and its identification of tetraploid *Cymbidium hybridum*. **Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica**, v. 30, n. 1, p. 56–62, 2010.

WANG, W.; LAZAREVA, E.; KYREEV, I.; SMIRNOVA, E. The role of microtubules in the maintenance of regular localization and arrangement of Golgi apparatus in root cells of *Triticum aestivum* L. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 11, p. 1545–1551, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.01.001>.

WIBISONO, K.; SYARIFAH, I. A.; WARAS, N.; SUHEST, S. Sensitivity in Callus Tissue of *Plectranthus amboinicus* (L.) through Mutation Induction with Colchicine. **AGRIVITA, Journal of Agricultural Science**, v. 44, n. 1, 2021.

WILFRET, G. J.; KAMEMOTO, H. Genome and Karyotype Relationships in the Genus *Dendrobium* (*Orchidaceae*). **Cytologia**, v. 36, n. 4, p. 604–613, 1971. DOI: <https://doi.org/10.1508/cytologia.36.604>.

WILLIAMS, N. H.; CHASE, M. W.; FULCHER, T.; WHITTEN, W. M. Molecular systematics of the *Oncidiinae* based on evidence from four DNA sequence regions: expanded circumscriptions of *Cyrtochilum*, *Erycina*, *Otoglossum*, and *Trichocentrum* and a new genus (*Orchidaceae*). **Lindleyana**, v. 16, p. 113–139, 2001.

WIMBER, Donald E. **Cytogenetic studies in the genus *Cymbidium*. Tese**

(Doutorado em Filosofia). 1956. Claremont Graduate University, 1956. Disponível em: https://scholarship.claremont.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1002&context=cg_u_etd. Acesso em: 23 nov. 2021.

WU, J.; CHENG, .; KONG, B.; ZHOU, Q.; SANG, Y.; ZHANG, P. In vitro octaploid induction of *Populus hopeiensis* with colchicine. **BMC Plant Biology**, v. 22, n. 1, p. 1–11, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12870-022-03571-3>.

XIE, L.; ZHOU, S. S.; WANG, M. G.; ZENG, R. Z.; GUO, H. R.; ZHANG, Z. S. Creation and micropropagation of polyploids in *Cymbidium hybridum*. **Acta Horticulturae**, v. 1167, p. 107–113, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1167.16>.

XUEJIAO, L.; ZHILIN, L.; LIPIN, H. Induction and Identification of Polyploids in Wild *Cymbidium lowianum* [J]. **Chinese Agricultural Science Bulletin**, v. 13, 2010.

YAN, Y. J.; QIN, S. S.; ZHOU, N. Z.; XIE, Y.; HE, Y. Effects of colchicine on polyploidy induction of *Buddleja lindleyana* seeds. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, p. 1–11, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02245-0>.

YASMIN, S.; MENSUALI-SODI, A.; PERATA, P.; PUCCIARIELLO, C. Ethylene influences *in vitro* regeneration frequency in the FR13A rice harbouring the SUB1A gene. **Plant Growth Regulation**, v. 72, n. 1, p. 97–103, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10725-013-9840-5>.

YENCHON, S.; TE-CHATO, S. Polyploidy induction of *Dendrobium formosum* by colchicine treatment *in vitro*. **Acta Horticulturae**, v. 1025, p. 81–88, 2012. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1025.12>.

YU-GE, L. I.; WEI-HONG, G. U. O.; BO-JI, W. U. A karyological study of seven species and one variety of *Cymbidium* from China. **Journal of Systematics and Evolution**, v. 40, n. 5, p. 406–413, 2002. Disponível em: <https://www.jse.ac.cn/EN/Y2002/V40/I5/406>.

YUKAWA, T.; OHBA, H.; CAMERON, K. M.; CHASE, M. W. Chloroplast DNA phylogeny of subtribe *Dendrobiinae* (*Orchidaceae*): Insights from a combined analysis based on *rbcL* sequences and restriction site variation. **Journal of Plant Research**, v. 109, n. 2, p. 169–176, 1996.

ZAKER TAVALLAIE, F.; KOLAH, H. Induction of *in vitro* polyploidy in ornamental flowers of orchid species (*Phalaenopsis amabilis*). **Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research**, v. 25, n. 2, p. 259–270, 2017. Disponível em: https://ijrfpbgr.areeo.ac.ir/article_113315_9ffa7b17d5edbc206df5e4be0d1d9ac1.pdf?lang=en. Acesso em: 4 mar. 2022.

ZAKIZADEH, S.; KAVIANI, B.; HASHEMABADI, D. In vivo-induced polyploidy in *Dendrobium* 'Sonia' in a bubble bioreactor system using colchicine and oryzalin. **Brazilian Journal of Botany**, v. 43, n. 4, p. 921–932, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40415-020-00654-z>.

ZANELLO, C. A.; CARDOSO, J. C. PLBs induction and clonal plantlet regeneration from leaf segment of commercial hybrids of *Phalaenopsis*. **The**

Journal of Horticultural Science and Biotechnology, v. 94, n. 5, p. 627–631, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/14620316.2019.1600384>.

ZENG, R. Z.; ZHU, J.; XU, S. Y.; DU, G. H.; GUO, H. R.; CHEN, J.; ZHANG, Z. S.; XIE, L. Unreduced male gamete formation in *Cymbidium* and its use for developing sexual polyploid cultivars. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 558, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00558>.

ZHOU, H. W.; ZENG, W. D.; YAN, H. B. *In vitro* induction of tetraploids in cassava variety 'Xinxuan 048' using colchicine. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 128, n. 3, p. 723–729, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1141-z>.

ZHOU, K.; FLEET, P.; NEVO, E.; ZHANG, X.; SUN, G. Transcriptome analysis reveals plant response to colchicine treatment during on chromosome doubling. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08391-2>.