



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

**COLCHICINA NA INDUÇÃO *IN VITRO* DE POLIPLOIDES E
EFEITOS DA POLIPLOIDIZAÇÃO EM *Mandevillas*
ORNAMENTAIS**

MARIANA PELAIS LEITE

ARARAS

2025



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

**COLCHICINA NA INDUÇÃO *IN VITRO* DE POLIPLOIDES E EFEITOS DA
POLIPLOIDIZAÇÃO EM *Mandevillas* ORNAMENTAIS**

MARIANA PELAIS LEITE

ORIENTADOR: PROF. DR. JEAN CARLOS CARDOSO

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

2025

Leite, Mariana Pelais

Colchicina na indução in vitro de poliploides e efeitos da poliploidização em Mandevillas ornamentais / Mariana Pelais Leite -- 2025.
85f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, Araras
Orientador (a): Jean Carlos, Cardoso
Banca Examinadora: Jean Carlos Cardoso, Everton Gomes da Costa, Fernando Angelo Piotto
Bibliografia

1. Melhoramento. 2. Poliploidia . 3. Plantas ornamentais .
I. Leite, Mariana Pelais. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Helena Sachi do Amaral - CRB/8
7083



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 da candidata Mariana Pelais Leite, realizada em 30/04/2025.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Jean Carlos Cardoso (UFSCar)

Prof. Dr. Everton Gomes da Costa (Terra Viva)

Prof. Dr. Fernando Angelo Piotto (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

Agradeço, primeiramente, a Deus, por me permitir a vida, e à Nossa Senhora, que escuta todas as minhas orações, sem exceção.

Aos meus pais, Adalto e Susana, por todo o amor; e à minha irmã Amanda, meu maior vínculo — amo vocês infinitamente.

Ao Matheus, porque, em você, além do meu amor, encontrei meu melhor amigo.

À Laura, meu docinho de prima, que sempre entendeu pacientemente quando eu precisava estudar e não podia brincar.

Ao meu avô Rafael Pelais, cuja ausência deixou saudade em todos nós.

Aos amigos Carla Midori e Joe Atoche, pela amizade e por toda a ajuda ao longo desses anos — vocês são a minha referência de mestres.

Ao meu orientador, Jean Carlos Cardoso, pela amizade, pelo conhecimento compartilhado e por ajudar cada aluno a enxergar os muitos caminhos.

Ao Laboratório de Fisiologia Vegetal e Cultura de Tecidos Vegetais, e à Ana Arruda, pelos ensinamentos e, sobretudo, pela paciência.

Ao Everton Gomes da Costa, meu supervisor na empresa Terra Viva, pela amizade e confiança.

À Rosa Antunes, Roseli Pires, Jô e Juliana, colegas de trabalho na empresa Terra Viva, pela pronta disposição e pelo ânimo que sempre encontrei quando precisei de ajuda.

Ao Laboratório de Citogenética e Citometria da Universidade Federal de Viçosa, pela ajuda com as análises de citometria de fluxo.

À empresa Terra Viva, pelo fornecimento das cultivares de *Mandevilla* e pelo apoio neste trabalho.

Ao PPGPVBA — Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados —, à coordenação e aos funcionários, por todo o suporte, e aos professores, pelo conhecimento que pude adquirir.

À CAPES — Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior —, pelo financiamento deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
ÍNDICE DE TABELAS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1 INTRODUÇÃO	5
2 OBJETIVOS	7
3 REVISÃO DA LITERATURA	7
3.1 Melhoramento genético em Mandevilla	7
3.2 Poliploidia	8
3.3 Indução de poliploidia	9
4 MATERIAIS E MÉTODOS	11
4.1 Introdução do material vegetal in vitro	11
4.2 Tratamento com colchicina	13
4.3 Aclimatização	15
4.4 Desenvolvimento in vitro após o tratamento com colchicina	16
4.5 Citometria de Fluxo	16
4.6 Quantificação de Clorofila utilizando o equipamento CFL1030 (Falker®).	19
4.7 Tamanho e densidade estomáticas	20
4.8 Dimensões foliares	20
4.9 Dimensões florais	21
4.10 Coloração das flores utilizando o equipamento espectrofotômetro CM-26d (Konica Minolta®)	21
4.11 Dimensões radiculares	22
4.12 Eficiência fotoquímica e no uso da água utilizando o equipamento fluorômetro e porômetro combinados LI-600 da LI-COR®	22
4.13 Forma de análise dos resultados	23
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23

5.1	Resumo das principais observações.....	23
5.2	Desenvolvimento in vitro dos explantes tratados com colchicina.....	24
5.3	Resultados da citometria de fluxo	28
5.4	Quantificação de clorofila.....	31
5.5	Dimensões e densidade estomáticas.....	35
5.6	Dimensões foliares.....	43
5.7	Dimensões das flores.....	49
5.8	Coloração das flores	55
5.9	Eficiência fotossintética	60
5.10	Raízes.....	66
6	CONCLUSÕES	70
7	LITERATURA CITADA.....	70

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Taxa de sobrevivência de segmentos nodais <i>in vitro</i> , decorrente do tratamento com colchicina por 24 e 48 horas	25
Tabela 2. Taxa de novas brotações <i>in vitro</i> por segmento nodal, decorrente do tratamento dos segmentos nodais com colchicina por 24 e 48 horas	26
Tabela 3. Eficiência de indução de poliploidia <i>in vitro</i> , eficiência de indução de poliploidia <i>in vitro</i> ajustada pela sobrevivência dos controles, e frequência de poliploidia, decorrente do tratamento dos segmentos nodais com colchicina por 24 e 48 horas.....	29
Tabela 4. Teores de clorofila A, B e relação A/B em condição <i>ex vitro</i> , decorrente do tratamento das plantas com colchicina por 24 e 48 horas <i>in vitro</i>	31
Tabela 5. Teor de clorofila A, B e relação A/B de poliploides identificados nos grupos da cultivar MD 1480 tratados com colchicina <i>in vitro</i> por 24 e 48 horas	32
Tabela 6. Teor de clorofila A, B e relação A/B de poliploides identificados nos grupos da cultivar MD 1296 tratados com colchicina <i>in vitro</i> por 24 e 48 horas	32
Tabela 7. Teor de clorofila A, B e relação A/B de poliploides identificados nos grupos da cultivar MD 1287 tratados com colchicina <i>in vitro</i> por 24 e 48 horas	33
Tabela 8. Diâmetro polar e equatorial de estômatos em condição <i>ex vitro</i> , decorrente do tratamento das plantas com colchicina por 24 e 48 horas <i>in vitro</i>	36
Tabela 9. Diâmetro polar e equatorial do ostíolo em condição <i>ex vitro</i> , decorrente do tratamento das plantas com colchicina por 24 e 48 horas <i>in vitro</i>	36
Tabela 10. Densidade de estômatos em lâmina foliar abaxial em condição <i>ex vitro</i> , decorrente do tratamento das plantas com colchicina por 24 e 48 horas <i>in vitro</i>	37
Tabela 11. Diâmetro polar e equatorial de estômatos e ostíolos e densidade estomática de poliploides identificados nos grupos da cultivar MD 1480 tratada com colchicina <i>in vitro</i> por 24 e 48 horas	40
Tabela 12. Diâmetro polar e equatorial de estômatos e ostíolos e densidade estomática de mixoploides identificados nos grupos da cultivar MD 1296 tratada com colchicina <i>in vitro</i> por 24 e 48 horas	41

Tabela 13. Diâmetro polar e equatorial de estômatos e ostíolos e densidade estomática de tetraploides identificados nos grupos da cultivar MD 1287 tratada com colchicina <i>in vitro</i> por 24 e 48 horas	41
Tabela 14. Comprimento (C) e largura (L) de folhas em condição <i>ex vitro</i> , decorrente do tratamento das plantas com colchicina por 24 e 48 horas <i>in vitro</i>	43
Tabela 15. Espessura (E) e área foliar (AF) em condição <i>ex vitro</i> , decorrente do tratamento das plantas com colchicina por 24 e 48 horas <i>in vitro</i>	44
Tabela 16. Comprimento (C), largura (L), espessura (E) e área foliar (AF) em condição <i>ex vitro</i> , de poliploides identificados nos grupos da cultivar MD 1480 tratados com colchicina <i>in vitro</i> por 24 e 48 horas	45
Tabela 17. Comprimento (C), largura (L), espessura (E) e área foliar (AF) em condição <i>ex vitro</i> , de poliploides identificados nos grupos da cultivar MD 1296 tratados com colchicina <i>in vitro</i> por 24 e 48 horas	46
Tabela 18. Comprimento (C), largura (L), espessura (E) e área foliar (AF) em condição <i>ex vitro</i> , de poliploides identificados nos grupos da cultivar MD 1287 tratados com colchicina <i>in vitro</i> por 24 e 48 horas	46
Tabela 19. Comprimento (C), largura (L) e altura de flores (H) em condição <i>ex vitro</i> , decorrente do tratamento das plantas com colchicina por 24 e 48 horas <i>in vitro</i>	50
Tabela 20. Comprimento (C) e largura (L) de botões em condição <i>ex vitro</i> , decorrente do tratamento das plantas com colchicina por 24 e 48 horas <i>in vitro</i>	50
Tabela 21. Comprimento (C), largura (L), altura de flores (H) e comprimento (C) e largura (L) de botões em condição <i>ex vitro</i> , de poliploides identificados nos grupos da cultivar MD 1287 tratados com colchicina <i>in vitro</i> por 24 e 48 horas.....	51
Tabela 22. Parâmetros de cor em flores de plantas submetidas ou não a colchicina em diferentes tempos de tratamento	57
Tabela 23. Parâmetros de cor de flores de poliploides oriundos de plantas submetidas a diferentes tempos de exposição a colchicina	58
Tabela 24. Parâmetros fotossintéticos em plantas submetidas ou não a colchicina em dois tempos de tratamento	62
Tabela 25. Parâmetros fotossintéticos de poliploides de MD 1480 obtidas da exposição a colchicina em dois tempos de tratamento	63

Tabela 26. Parâmetros fotossintéticos de poliploides de MD 1296 obtidas da exposição a colchicina em dois tempos de tratamento	64
Tabela 27. Parâmetros fotossintéticos de poliploides de MD 1287 obtidas da exposição a colchicina em dois tempos de tratamento	65
Tabela 28. Diâmetro (\emptyset) e comprimento (C) de raízes em condição <i>ex vitro</i> , decorrente do tratamento das plantas com colchicina por 24 e 48 horas <i>in vitro</i>	67
Tabela 29. Diâmetro (\emptyset) e comprimento (C) de raízes em condição <i>ex vitro</i> , de poliploides identificados nos grupos da cultivar MD 1480 tratados com colchicina <i>in vitro</i> por 24 e 48 horas.....	68
Tabela 30. Diâmetro (\emptyset) e comprimento (C) de raízes em condição <i>ex vitro</i> , de poliploides identificados nos grupos da cultivar MD 1296 tratados com colchicina <i>in vitro</i> por 24 e 48 horas.....	68
Tabela 31. Diâmetro (\emptyset) e comprimento (C) de raízes em condição <i>ex vitro</i> , de poliploides identificados nos grupos da cultivar MD 1287 tratados com colchicina <i>in vitro</i> por 24 e 48 horas.....	69

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Cultivar MD 1480.....	12
Figura 2. Cultivar MD 1296.....	13
Figura 3. Cultivar MD 1287.....	12
Figura 4. Meio de cultura Murashighe & Skoog líquido para o tratamento dos segmentos nodais com a colchicina.....	14
Figura 5. Resumo gráfico das etapas de tratamento e análises.....	16
Figura 6. Organização das plantas de Mandevilla tratadas e não tratadas com colchicina na estufa de cultivo.....	18
Figura 7. Estômatos da cultivar MD 1480 expostos e não expostos a colchicina.....	38
Figura 8. Estômatos da cultivar MD 1287 expostos e não expostos a colchicina.....	38
Figura 9. Densidade de estômatos da cultivar MD 1480 expostos ou não a colchicina.....	39
Figura 10. Densidade de estômatos da cultivar MD 1296 expostos ou não a colchicina.....	39
Figura 11. Características morfológicas das folhas de MD 1480 tratadas ou não com colchicina por 24 horas.....	47
Figura 12. Características morfológicas das folhas de MD 1480 tratadas ou não com colchicina por 48 horas.....	47
Figura 13. Características morfológicas das flores de MD 1287 tratada e não tratada com colchicina (primeira amostra).....	52
Figura 14. Pétalas da cultivar MD 1287 poliploide e diploide.....	52
Figura 15. Características morfológicas das flores de MD 1287 tratada e não tratada com colchicina (segunda amostra).....	53
Figura 16. Flor de planta da cultivar MD 1287 tetraploide obtida do tratamento de exposição a colchicina por 24 horas.....	53
Figura 17. Quadro de diferença entre cores entre plantas tetraploides e diploides da cultivar MD 1287.....	59

COLCHICINA NA INDUÇÃO *IN VITRO* DE POLIPLÓIDES E EFEITOS DA POLIPLÓIDIZAÇÃO EM *MANDEVILLAS* ORNAMENTAIS

Autor: MARIANA PELAIS LEITE

Orientador: Prof. Dr. JEAN CARLOS CARDOSO

RESUMO

Este estudo investiga a indução de poliploidia em *Mandevilla in vitro*, utilizando a colchicina como um inibidor mitótico. O objetivo principal é estabelecer um protocolo eficaz para a poliploidização e avaliar seus impactos em três genótipos de *Mandevilla*. Os objetivos específicos incluem avaliar os efeitos do tempo de exposição à colchicina na indução de poliploides, bem como a influência do genótipo no sucesso do desenvolvimento de plantas poliploides. Os resultados demonstram que o tratamento com colchicina levou a mudanças significativas nas características morfológicas e fisiológicas de *Mandevilla*, incluindo alterações no tamanho das folhas, densidade estomática, conteúdo de clorofila, cor e tamanho de flores e eficiência fotossintética. As descobertas sugerem que a poliploidização induzida pode melhorar características ornamentais desejáveis. Esta pesquisa destaca o potencial da poliploidização como uma estratégia para aumentar o valor ornamental de *Mandevilla* e oferece insights para futuras aplicações em melhoramento de plantas.

Palavras-chave: Micropropagação; Poliploidia; Antimitótico; Apocynaceae; Ornamentais.

COLCHICINE IN THE IN VITRO INDUCTION OF POLYPLOIDS AND EFFECTS OF POLYPLOIDIZATION IN ORNAMENTAL *MANDEVILLAS*

Author: MARIANA PELAIS LEITE

Adviser: Prof. Dr. JEAN CARLOS CARDOSO

ABSTRACT

This study investigates the induction of polyploidy in *Mandevilla* in vitro, utilizing colchicine as a mitotic inhibitor. The main objective is to establish an effective protocol for polyploidization and evaluate its impacts on three genotypes of *Mandevilla*. Specific objectives include assessing the effects of exposure time to colchicine on the induction of polyploids, as well as the influence of genotype on the success of polyploid plant development. The results demonstrate that colchicine treatment led to significant changes in the morphological and physiological characteristics of *Mandevilla*, including alterations in leaf size, stomatal density, chlorophyll content, flower color and size, and photosynthetic efficiency. The findings suggest that induced polyploidization may enhance desirable ornamental characteristics. This research highlights the potential of polyploidization as a strategy to increase the ornamental value of *Mandevilla* and offers insights for future applications in plant breeding.

Key-words: Micropropagation; Polyploidy; Antimitotic; Apocynaceae; Ornamentals.

1 INTRODUÇÃO

A floricultura atualmente está entre as indústrias com maior crescimento entre os setores da horticultura, crescimento esse ligado à maior exigência do público e a melhora no padrão de vida (Manikas *et al.*, 2019). Hoje o mercado nacional de plantas ornamentais e floricultura possui um PIB aproximado de R\$ 19,8 bilhões, sendo R\$ 7,8 bilhões apenas do estado de São Paulo, englobando nisso plantas com flores, plantas destinadas a decoração e paisagismo, autosserviço e produtos relacionados (jardinagem, nutrição, etc.). A parcela restrita apenas à floricultura dentro desse valor é de R\$ 3,4 bilhões (17%), oriundos de uma área de 15.600 hectares, entre estufas (1.342 ha), sombrite (530 ha) e ar livre (13.738 ha) (AIPH, 2023).

Além disso, o setor é responsável por 272.000 empregos diretos (do plantio ao varejo), e no campo emprega cerca de 3,8 trabalhadores por hectare, sendo destes 20% familiar, e do total, entre 48% e 63%, mão de obra feminina, destacando-se como o setor da agropecuária que mais emprega mulheres. É o setor com mão de obra mais formalizada e com maior escolaridade média comparado com outros setores da agropecuária. São 2.500 espécies e 17.500 variedades/cultivares produzidas nos 8.300 produtores distribuídos pelo país – 4.200 apenas em São Paulo – e cuja produção é absorvida majoritariamente pelo mercado nacional (97,5%) (Ibraflor, 2023).

Em 2023 o consumo per capita do brasileiro com flores e plantas ornamentais foi de R\$ 97,89 e no estado de São Paulo, novamente esse número se eleva para R\$ 174,68. Apesar desse valor ser baixo quando comparado com outros países como Suíça e Alemanha - € 127 e € 108 per capita em 2019 – o que a uma taxa de conversão de R\$ 6,3772/€ 1 colocaria o consumo brasileiro ao redor de € 8,02, ele vem crescendo ano a ano. Em 2021 foi de R\$ 51,17 per capita, em 2019 foi igual a R\$ 40,11 per capita, e igual a R\$ 36,34 per capita em 2017 (AIPH, 2023).

Em relação aos anos em que o mundo passou pela pandemia de Covid-19, com limitação da circulação de pessoas, limitação da mão de obra e ao varejo, o desempenho da floricultura teve um incremento pela adoção por parte do mercado consumidor do hábito de cultivar plantas em casa, até como forma de lidar com as restrições e estresse gerados pelo momento. Após o término das medidas de

isolamento, o retorno de eventos e festas garantiu também um desempenho confortável. No contexto de evolução econômica e social da floricultura, a inovação é um dos elementos que se destaca para a expansão desse mercado. Um dos indicadores desse aspecto atrelado à floricultura é o número de feiras e exposições – veículos de novidades - desse setor no país, 35 em âmbito nacional e 15 concentradas em São Paulo (Ibraflor, 2023).

Embora a inovação em tecnologias de cultivo seja constante, a busca por novos genótipos e variedades que tragam novidade ao mercado tem sido um dos pilares da expansão da floricultura. Para tanto, o melhoramento genético tem sido essencial na introdução de novas características de interesse ornamental nos cultivos, como porte compacto, flores com coloração exótica, tipos de inflorescências, dentre outras características. Também, pelo uso de novas espécies com potencial ornamental, processos como construção de bancos de germoplasma, domesticação e hibridação para atender padrões comerciais de cultivo tem se destacado (Botelho; Rodrigues; Bruzi, 2015; Li, M. *et al.* 2022).

Esse é o caso do gênero *Mandevilla*, com espécies distribuídas por todo o continente americano e que tem como características principais para o cultivo o hábito trepador, a preferência por locais iluminados, solo bem drenado, rico em matéria orgânica e argila, sendo comercializada principalmente em vasos (Royal Horticultural Society, 2024; Flora e Funga do Brasil, 2024).

A área (ha) com plantas comercializadas em vasos não apresentou decréscimos, assim como os investimentos neste grupo em nenhum dos países avaliados no relatório International Statistics of Flowers and Bulbs, que englobou Dinamarca, França, Alemanha, Grécia, Hungria, Itália, Países Baixos, África do Sul, Coréia, Turquia, EUA, e Costa Rica, considerando os anos de 2022 e 2021, se equiparando nesse sentido somente à categoria de bulbos, em detrimento de flores de corte e plantas destinadas a canteiros e folhagens, mesmo após as restrições devido à COVID e aumento de taxas/custos energéticos em muitos países (AIPH, 2023).

No Brasil a área com plantas comercializadas em vasos passou de 790 hectares em 2014 para 840 hectares em 2020, sendo que a *Mandevilla* se manteve como um produto estável em quantidade de vendas nos mercados mundiais e com

valorização no preço médio que foi de 4,85 euros para 5,86 euros de 2017 a 2020 (Ibraflor, 2023). Apenas em um centro florista da Holanda - Plantion – a *Mandevilla* teve aumento na receita gerada de 2017 até 2020 em 50%, com um retorno de 900.000 euros em 2020 (AIPH, 2022).

2 OBJETIVOS

Objetivo geral

Este estudo teve como principal objetivo estabelecer uma metodologia eficiente para a indução *in vitro* da poliploidização utilizando o antimitótico colchicina.

Objetivos específicos

- Estabelecer uma metodologia de indução de poliploides em *Mandevilla*.
- Avaliar o efeito do tempo de exposição dos tecidos de *Mandevilla* à colchicina
- Avaliar a influência dos genótipos em relação à indução de *Mandevillas* poliploides *in vitro*.
- Avaliar efeitos da poliploidização em características fenotípicas, com especial atenção às plantas de porte compacto, robustas e com flores de tamanho maior.
- Determinar a ploidia das plantas selecionadas e de interesse, comparando aqueles provenientes do controle àquelas tratadas com colchicina, por meio de técnicas citometria de fluxo.
- Avaliar uma possível correlação entre o nível de ploidia, determinado pela citometria de fluxo, com parâmetros indiretos, à exemplo do teor de clorofila A e B, e tamanho e densidade de estômatos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Melhoramento genético em *Mandevilla*

As plantas do gênero *Mandevilla*, pertencente à família Apocynaceae, apresentam grande diversidade em cores, tamanhos e variações também em seu formato de corola, o que as torna extremamente populares no mercado de

ornamentais como planta envasada, sendo propagadas por estaquia (Araújo; Quirino; Machado, 2014; Wojtania; Yonghong, 2021).

No entanto, apesar dos números promissores, poucos programas de melhoramento genético têm desenvolvido a base das cultivares de *Mandevilla* lançadas nacional e internacionalmente. Similar a outros grupos de espécies ornamentais, prevalece o melhoramento genético convencional, pelo uso de cruzamentos entre plantas com características de interesse, seguido da seleção de híbridos superiores em populações F1 (Costa, 2018).

Ao mesmo tempo, a combinação de ferramentas biotecnológicas e do melhoramento genético convencional tem sido uma base para a construção de variabilidade genética de interesse ornamental, sendo que as ferramentas biotecnológicas são aptas a resolver limitações que são difíceis ou impossíveis de se obter por meio do melhoramento convencional, especialmente por restrições e barreiras reprodutivas que impedem a formação de híbridos entre algumas espécies (Costa, 2018).

Nessa vertente, a utilização de técnicas de poliploidização *in vitro* é uma ferramenta valiosa na geração de genótipos com características de interesse como flores maiores, plantas mais compactas e tolerantes a adversidades climáticas, bem como uma maneira de restaurar a fertilidade e também na tentativa de aumentar a compatibilidade em genótipos anteriormente incompatíveis para hibridação.

3.2 Poliploidia

Poliploidia é - de forma simplificada - o aumento no número de cromossomos, ou seja, organismos poliploides contam com mais de dois conjuntos completos de cromossomos (Vilcherrez-Atoche; Iiyama; Cardoso, 2022). Os autopoliploides são formados pela duplicação do próprio genoma de uma espécie. Essa duplicação pode ocorrer devido a erros na meiose ou mitose, resultando em gametas não reduzidos que, ao se fundirem, formam um novo organismo com um número de cromossomos duplicado. Os aloploiploides, por outro lado, são formados a partir da hibridização entre duas ou mais espécies diferentes. Isso resulta em um organismo que possui conjuntos de cromossomos de diferentes espécies. Se esse híbrido sofrer uma

duplicação de seu genoma, ele se tornará aloploidio, contendo dois conjuntos de cromossomos de cada uma das espécies parentais. (Vilcherrez-Atoche; Iiyama; Cardoso, 2022).

A duplicação do número de cromossomos pode acontecer em decorrência de indução, ou seja, de forma artificial, e também de forma natural, espontânea, sendo os fatores envolvidos nesta última ainda pouco conhecidos (Ahmadi; Ebrahimzadeh, 2020).

A poliploidia espontânea geralmente está relacionada a erros no processo de duplicação celular e tem um impacto bastante relevante em processos de evolução e adaptação (Viccinni, 2017). Isso porque ela é capaz de alterar perfis de expressão gênica, o número de cópias de um gene, e formas de reprodução (Anatskaya; Vinogradov, 2022). Além disso organismos poliploides podem sofrer com reorganizações do genoma, sendo comum a redução da quantidade total de DNA através das gerações subsequentes, o que demonstra sua natureza dinâmica (Manson; Wendel, 2020).

A indução de poliploides em contrapartida é utilizada como forma de acelerar o surgimento de indivíduos que possam ser destinados a programas de melhoramento devido a suas características desejáveis (Vilcherrez-Atoche; Iiyama; Cardoso, 2022), mas que apresentam alguma restrição reprodutiva, como esterilidade devido a triploidia, ou alguma restrição ornamental, à exemplo de flores pequenas em relação ao padrão comercial esperado (Costa, 2018).

Em termos de domesticação de plantas, a poliploidia dentro da agricultura é um recurso valioso, pois pode gerar cultivares com uma série de características desejáveis economicamente. Nas culturas ornamentais assim também o é, sendo que geralmente organismos poliploides apresentam flores maiores, cores mais intensas e folhagem mais resistente (Sattler; Carvalho; Clarindo, 2016).

3.3 Indução de poliploidia

A poliploidia induzida ou artificial pode ser realizada através de duas técnicas, (1) a autopoliploidização, no qual tecidos somáticos são expostos à indução com agentes químicos, como a colchicina, óxido nitroso, trifluralina, que inibem a correta

formação do fuso mitótico durante a mitose, impedindo a divisão celular e a divisão dos cromossomos duplicados na célula, e (2) a poliploidização sexual (alopoliploides) realizada por meio da hibridação entre plantas com gametas não reduzidos. Essa última técnica frequentemente é utilizada visando a restauração de fertilidade em híbridos oriundos de diferentes espécies ou gêneros, e também como uma forma de transferência de genes (Eeckhaut *et al.* 2018). Mais recentemente, uma terceira via de poliploidização tem sido observada, pela presença de células endopoliplóides que podem regenerar naturalmente plantas poliploides, especialmente em condições *in vitro* (Vilchérrez-Atoche *et al.* 2023). Também é possível a obtenção de plantas alopoliplóides pela fusão de células somáticas, geralmente obtidas pela técnica de isolamento e fusão de protoplastos (Eng; Ho, 2018).

A duplicação somática com agentes químicos é, por sua vez, como já mencionado, uma via importante no melhoramento de espécies ornamentais, e pode ser feita por meio da exposição de sementes, plântulas e meristemas aos agentes antimitóticos tanto *in vitro* quanto *ex vitro* (Niazian; Molaahmad, 2020). Entre as vantagens da aplicação *in vitro* está o maior controle das condições ambientais, além da possibilidade de repetir o experimento (Wu, 2018).

Uma série de moléculas pode ser utilizada como antimitótico, como a colchicina, oryzalina, agalim, entre outros. A oryzalina, por exemplo, se trata de um dos antimitóticos mais comuns na indução de poliploidia, também usado como herbicida, e costuma ser menos tóxico que a colchicina, contudo, pode apresentar taxas de indução de poliploidia menores que a colchicina (Bona; Karsburg; Gallo, 2016; Fauzan *et al.*, 2024).

A colchicina, por sua vez, é um alcaloide extremamente tóxico oriundo da planta conhecida como açafão-do-outono ou açafão-do-prado, o *Colchicum autumnale*. Tem ação inibitória na polimerização da tubulina – proteína estrutural que atua na formação do fuso mitótico durante a divisão celular – dessa forma a metáfase é pausada e a célula não se divide em duas, não dividindo assim seu conteúdo genético também (Esmaeili *et al.* 2020).

Após o tratamento com a colchicina, nem todos os tecidos tratados são poliploidizados. Portanto, há necessidade de separação entre aqueles que foram poliploidizados e os materiais que se mantiveram diploides. Quanto a identificação de

poliploides, os métodos mais comuns são a contagem de cromossomos e a citometria de fluxo (métodos diretos) e a observação de parâmetros morfofisiológicos, como tamanho e espessura de folhas, tamanho e densidade de estômatos e índices de clorofila (métodos indiretos) (Mondin *et al.* 2018; Viruel *et al.* 2019; Bohanec, 2003).

Cada um deles tem suas limitações e também vantagens. Os métodos indiretos costumam ter pouca acurácia, mas são de fácil execução, enquanto que a contagem de cromossomos tem muita acurácia, mas consome bastante tempo e é considerada mais trabalhosa. A citometria de fluxo é bastante rápida, mas a acurácia depende bastante de cuidados durante sua execução/realização (Xu *et al.* 2014; Natarajan *et al.* 2023; Bohanec, 2003).

Em síntese, estudos sobre poliploidização induzida em *Mandevilla* podem ser uma via importante para a contribuição com novas características florais em programas de melhoramento de ornamentais e na solução de desafios como restauração de fertilidade em híbridos interespecíficos (Mwathi *et al.* 2020; Niazian; Molaahmad, 2020; Vilcherrez-Atoche; Iiyama; Cardoso, 2022).

Exemplos de plantas poliploides presentes hoje no mercado incluem variedades triploides e tetraploides de lírios, tulipas, narcisos, peônias, um híbrido tetraploide de *Magnolia × soulangeana* (Cui *et al.* 2023) e orquídeas (Pham *et al.*, 2019), além dos poliploides utilizados como parentais nos processos de hibridação (Bolaños-Villegas; Chen, 2022).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Introdução do material vegetal *in vitro*

Foram utilizadas três cultivares de *Mandevilla* fornecidas pela empresa produtora de plantas ornamentais Terra Viva®, sendo os códigos MD 1287, MD 1296 e MD 1480 utilizadas neste trabalho. As estacas do material vegetal foram recebidas no Laboratório de Fisiologia Vegetal e Cultura de Tecidos (LFVCT-UFSCar) no dia de sua colheita, sendo mantidos sob refrigeração por 24 horas até seu uso. As três cultivares são híbridos e foram desenvolvidas pela empresa Terra Viva em seu programa interno de melhoramento genético. A cultivar MD 1480 é classificada como uma cultivar de porte médio, com flores amarelas que evoluem para tonalidade salmão ao longo do tempo (Figura 1), a cultivar MD 1296 é porte compacto (ou *Mandevilla*

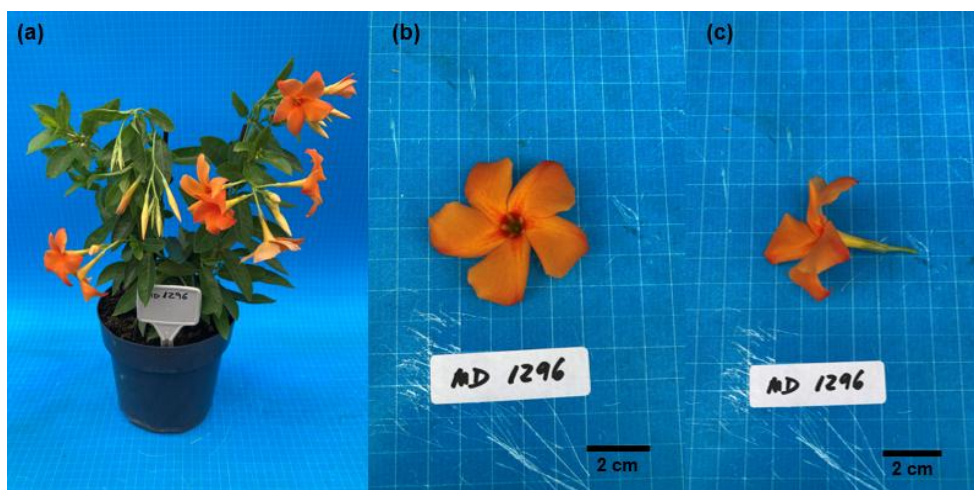
picolli comercialmente) e apresenta flores laranjas (Figura 2), e a cultivar MD 1287 também é considerada porte compacto e suas flores são amarelas (Figura 3).

Figura 1. Cultivar MD 1480



Fonte: Terra Viva (2024)

Figura 2. Cultivar MD 1296



Fonte: Terra Viva (2024)

Figura 3. Cultivar MD 1287



Fonte: Terra Viva (2024)

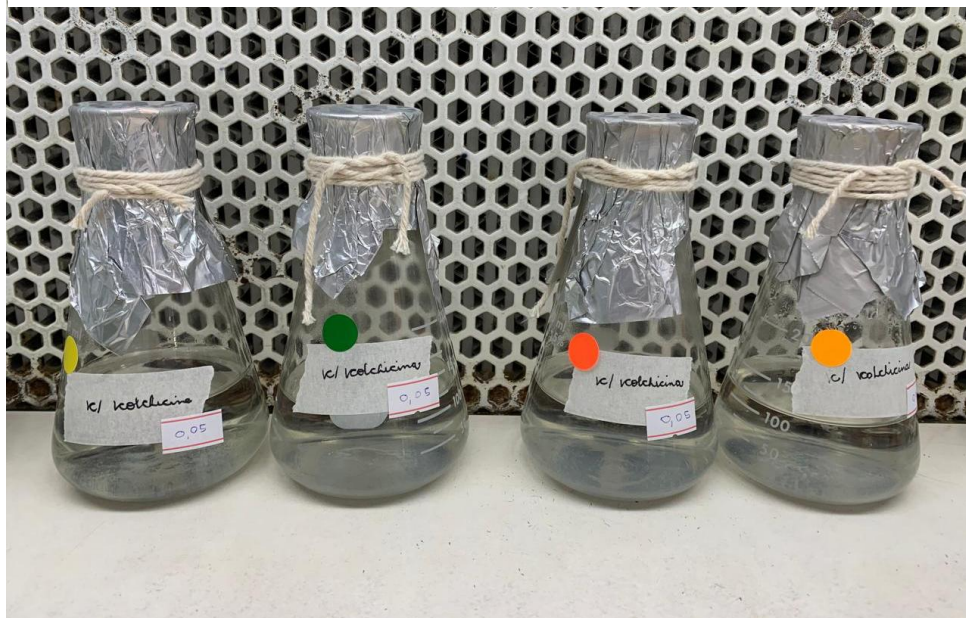
A introdução do material vegetal *in vitro* foi realizada seguindo protocolo do Laboratório de Fisiologia Vegetal e Cultura de Tecidos, com limpeza superficial dos explantes com uso de algodão hidrófilo e degermante Riohex® (digliconato de clorexidina 2%) e lavagem em água corrente por cerca de 5 segundos. Em seguida, foi feito a remoção das folhas e o seccionamento das hastes, para redução do seu tamanho e separação de segmentos contendo gemas laterais e apicais. A partir de então, o material vegetal foi levado a câmara de fluxo e imerso em álcool 70% por trinta segundos, seguido por imersão em solução preparada com 75% de água sanitária (2,0-2,5% de cloro ativo), onde permaneceu sob agitação por mais vinte minutos. Decorrido esse tempo, foram realizadas três lavagens consecutivas dos explantes em água deionizada autoclavada. Na sequência o material teve as extremidades removidas devido ao dano provocado pelo contato com a solução de assepsia, e foi introduzido no frasco com meio MS (Murashige & Skoog, 1962) com modificações para o cultivo *in vitro*.

4.2 Tratamento com colchicina

A cultura foi mantida em processo de subcultivos sequenciais por cerca de três meses até a obtenção de plantas suficientes ao delineamento do experimento. Nesse momento foram preparados meios de cultura MS padrão líquidos (sem sacarose e sem ágar), autoclavados e mantidos em seis Erlenmeyer, para os quais foram transferidas secções das plântulas *in vitro* contendo uma gema lateral cada. Dos seis

Erlenmeyer, em três foram acrescidas uma solução com colchicina ao meio líquido, na concentração única de 0,05% (Figura 1). Essa adição foi realizada com auxílio de esterilização à frio, utilizando filtro de esterilização (filtro EMD Millipore Millex™).

Figura 4. Meio de cultura Murashighe & Skoog líquido para o tratamento dos segmentos nodais com a colchicina



Todos os Erlenmeyer, com e sem adição de colchicina foram mantidos sob agitação constante e em condições de escuro, para garantir a correta oxigenação do meio e das plantas e a não-degradação da colchicina, respectivamente. Foram utilizados dois tempos de imersão dos segmentos nas soluções com e sem a colchicina (0.05%) - 24 horas ou 48 horas. Após o período de tratamento, as plantas passaram por um processo de 3 lavagens consecutivas de 60 segundos cada, com água deionizada autoclavada e então foram levadas para frascos com meio MS modificado e solidificado para o cultivo de *Mandevilla*. As plantas decorrentes do tratamento foram cultivadas por 30 dias em sala de crescimento sob luz LED azul e vermelha com Densidade de fluxo de Fótons Fotossintéticos (PPFD) de 112,6 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ por segundo (medido com sensor Full-Spectrum Quantum SQ-520, da Apogee Instruments®), com fotoperíodo 16/8 horas, e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

O número de segmentos nodais de cada tratamento foi igual a 50, e o delineamento experimental foi um esquema fatorial com 2 condições de dose (com e sem colchicina) x 2 tempos de exposição x 3 genótipos.

Após quatro semanas de cultivo, as novas brotações provenientes dos segmentos nodais tratados com colchicina e também do controle foram isoladas do segmento nodal tratado e subcultivadas para o mesmo meio de cultivo das outras fases, mantendo os segmentos nodais originais no mesmo meio em que foi colocado ao final das 24 e 48 horas. Esse processo de coleta de novas brotações foi repetido até a obtenção de aproximadamente 100 plantas de cada tratamento. As novas brotações foram então mantidas em cultivo *in vitro* até a formação completa das plantas durante 60 dias.

4.3 Aclimatização

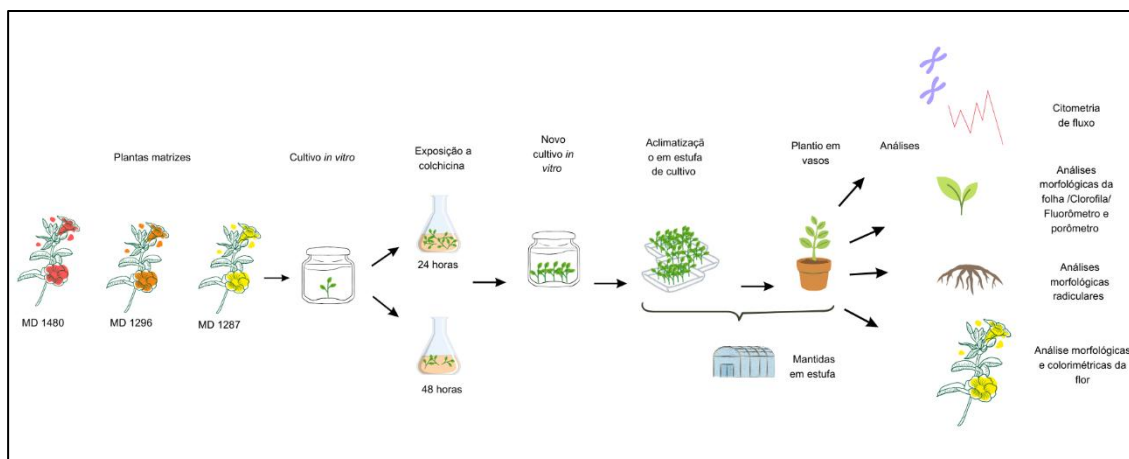
As plantas *in vitro* obtidas da fase anterior foram levadas então para o ambiente *ex vitro*, na empresa Terra Viva®, localizada na rodovia que liga Holambra à Santo Antônio de Posse, interior de São Paulo. As plantas foram, portanto, retiradas dos frascos, lavadas com água corrente e transplantadas para papers de enraizamento (paper-pot) e mantidas em condição de mini túnel com irrigação uma vez na semana.

Após seis semanas de aclimatização a sobrevivência das plantas foi contabilizada, uma vez que a saída da condição *in vitro*, no qual há alta umidade relativa, temperatura amena, fornecimento de sacarose (fotomixotrofia), água e nutrientes no meio de cultura - além do ambiente ser isento de microrganismos - para o ambiente *ex vitro*, em geral com baixa umidade relativa, temperaturas variáveis, necessidade de estabelecimento da autotrofia, baixa disponibilidade de água e nutrientes e com presença de microrganismos, sendo alguns patogênicos, pode resultar em taxas de perdas variáveis de acordo com a cultivar e o ambiente em que foi feito o transplante. Após seis semanas no mini túnel as plantas foram transplantadas em potes número 12 (12 cm diâmetro de boca e capacidade de um litro de substrato), com substrato a base de pinus (pH 5,5), e mantidas em estufa do tipo Poly Shade (8m x 40m), com sombreamento aluminet 40%, e plástico difusor 150 micra, com adubação NPK 12-8-14 e irrigação duas vezes por semana no verão e uma vez por semana no inverno, durante dois meses.

Ao final de dois meses de cultivo nesse pote, com as plantas já desenvolvidas, tiveram início avaliações do material, visando rastrear plantas e tratamentos com características de poliploidia. Essas avaliações se concentraram na medição de teores

de clorofila A e B com equipamento portátil, medidas do comprimento e largura das folhas, além de coletas de folhas para citometria de fluxo e análise de estômatos. Todos estes parâmetros estão melhor descritos nos tópicos seguintes. A figura 4 compreende as principais etapas do tratamento e de análise está exposto a seguir.

Figura 5. Resumo gráfico das etapas de tratamento e análises



4.4 Desenvolvimento *in vitro* após o tratamento com colchicina

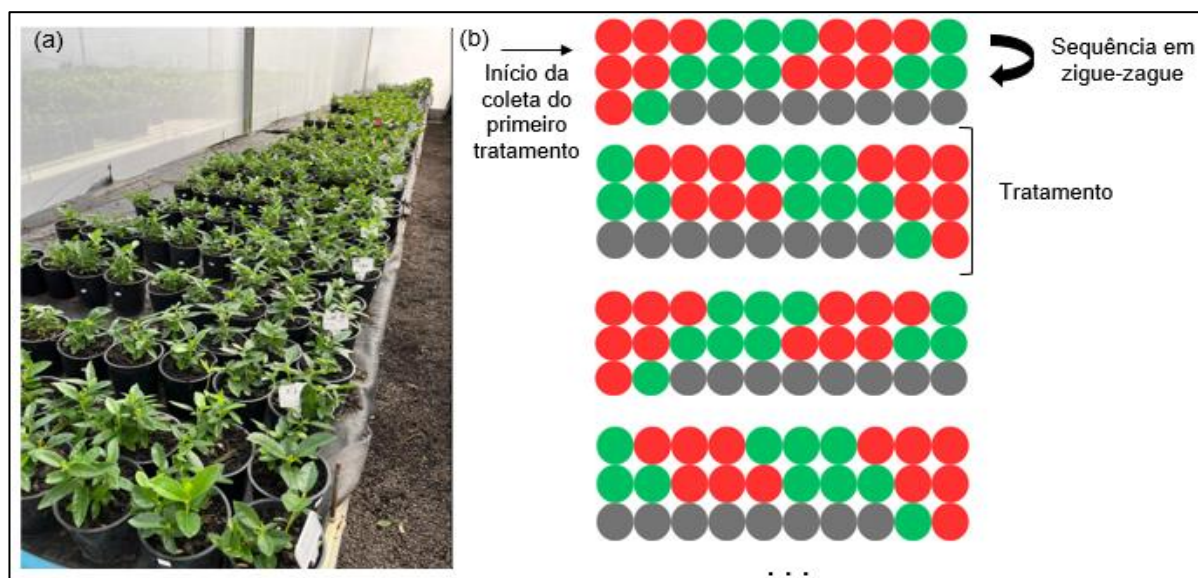
Durante o cultivo *in vitro* do material pós tratamento com as dosagens de colchicina e tempos de exposição ao antimitótico, foi realizada a contagem de novos brotos e também da mortalidade das plantas, uma vez que a colchicina pode ser bastante tóxica para os tecidos vegetais e provocar a morte da planta. A contagem de brotações foi realizada aos 30 e 60 dias, sendo que com trinta dias os novos brotos foram separados dos explantes tratados e dos controles e passados para novos meios de cultivo, repetindo esse processo ao final de sessenta dias. A sobrevivência das brotações *in vitro* foi obtida a partir de um experimento contendo cinco repetições (frascos) cada um contendo dez segmentos. Portanto, foram obtidos a partir do total de 50 brotações avaliadas por tratamento. O mesmo foi feito para contabilizar o número de brotações.

4.5 Citometria de Fluxo

As amostras que passaram pela técnica de citometria de fluxo foram coletadas a partir das plantas cultivadas em pote 12 e mantidas em cultivo em estufas na

empresa Terra Viva® por 2 meses desde o término da aclimatização, sendo estabelecido um padrão de coleta para garantir a aleatoriedade. Durante esta fase de cultivo, considerando as perdas ao longo do experimento, o total de plantas por tratamento foi o seguinte: para MD 1480, os controles apresentaram 40 plantas (24 horas) e 38 plantas (48 horas), enquanto os tratamentos com colchicina resultaram em 27 plantas (24 horas) e 23 plantas (48 horas). Para MD 1296, os controles tiveram 25 plantas (24 horas) e 18 plantas (48 horas), enquanto os tratamentos apresentaram 32 plantas (24 horas) e 22 plantas (48 horas). Já para MD 1287, os controles contabilizaram 29 plantas (24 horas) e 32 plantas (48 horas), enquanto os tratamentos com colchicina resultaram em 32 plantas (24 horas) e 36 plantas (48 horas). O padrão de coleta consistiu em colocar todas as plantas obtidas em fileiras paralelas, não coletando-se as três plantas iniciais de cada linha, e em seguida coletar três, pulando mais três e coletando três, isso até se obter o total de 10 amostras de folhas. Ao final da primeira linha com o primeiro tratamento, o movimento de coleta começou no lado oposto, repetindo novamente a coleta 3x3, e seguiu até a última linha/tratamento, como exposto na figura 5. As amostras coletadas tinham, no mínimo, cerca de três pares de folhas já desenvolvidas, e aquelas que sofreram danos no tecido decorrente do armazenamento antes da análise de citometria foram descartadas e não utilizadas para análise.

Figura 6. Organização das plantas de *Mandevilla* tratadas e não tratadas com colchicina na estufa de cultivo



(a) Grupos com os vasos de cada tratamento em estufa; (b) Padrão de coleta utilizado para envio de amostras para etapa de citometria de fluxo; Círculo vermelho corresponde a planta não coletada, círculo verde corresponde a planta coletada, círculo cinza corresponde a plantas que sobraram sem necessidade de coleta.

Para as análises de citometria de fluxo, foi feita a secção dos tecidos das folhas de tratamentos e de referência em um fragmento de 2 cm², então estes foram retalhados por 30 segundos com 0,5 mL de tampão OTTO-I, 50 µg mL⁻¹ RNase e 2 mM ditiotretol, seguindo para incubação por mais três minutos e pela posterior nova adição de 0,5 mL do tampão OTTO-I seguido de filtração em malha de nylon - 30 µm de diâmetro – diretamente no microtubo de análise do equipamento, com capacidade de 2 mL, e então centrifugado por cerca de 5 minutos a 100xg. A parte sobrenadante desta última etapa foi descartada e novamente mais 100 µL do tampão OTTO-I foi adicionado ao precipitado, que foi homogeneizado em vórtex e levado a incubação por 10 minutos.

0,5 mL de tampão para coloração – OTTO-II – com de 400 mM Na₂HPO₄.H₂O, 2 mM ditiotretol, 50 µg mL⁻¹ RNase, e 75 µg mL⁻¹ iodeto de propídeo –IP – comprimentos de onda de excitação/emissão: 480–575/550–740 nm - foi adicionado ao tubo com a suspensão, novamente filtradas em filtro de nylon – 20 µm - diretamente nos tubos de análise, e mantidas por 30 minutos no escuro para colorir os núcleos. Essa suspensão foi analisada no citômetro de fluxo BD (Accuri C6 flow cytometer) com um laser de 488 nm para excitar o DNA e capturar a emissão nos filtros FL2 (615 – 670 nm) e FL3 (> 670 nm).

Como referência padrão para a análise de citometria das amostras provenientes dos experimentos foram utilizadas as cultivares originais (MD 1480, MD 1296 e MD 1287), utilizadas como controles de cada tratamento, sendo também coletadas uma folha de cada cultivar em triplicata, portanto, utilizando-se três amostras por cultivar. O mesmo procedimento de coleta e análise por citometria de fluxo foi realizado para todos os tratamentos com colchicina. Ao total, foram avaliadas 10 plantas por tratamento, as quais foram usadas para comparação dos perfis de citometria e identificação da porcentagem de plantas poliploides em relação ao padrão ou referência (cultivar original). Foi estabelecido que amostras com o dobro (ou próximo do dobro) dos valores de citometria de fluxo das cultivares referência, seriam identificadas como poliploides. A outra possibilidade de resultado observado foi o surgimento de mais de um pico nos histogramas de citometria, sendo um dos picos próximo aos valores da cultivar original e outro com o dobro (ou próximo do dobro) do valor da cultivar original. Nesse caso, as plantas foram consideradas mixoploides, com a presença de tecidos diploides e tetraploides crescendo conjuntamente.

Picos do histograma gerados que apresentavam coeficiente de variação menores que 5% foram utilizados como referência para determinar o nível de ploidia do DNA. O canal de referência para determinação da ploidia de cada amostra de tratamento foi o conteúdo de DNA de cada cultivar respectiva (controles).

4.6 Quantificação de Clorofila utilizando o equipamento CFL1030 (Falker®)

A quantificação dos teores de clorofila das plantas obtidas com ou sem o tratamento com a colchicina e dos controles (referência) relativos a cada tratamento foi feita com equipamento Clorofilog CFL1030(Falker®). Esse equipamento é portátil, de manuseio simples, e fornece um índice de clorofila A e B em alguns segundos, pelo simples contato do sensor com a folha analisada.

As medições foram realizadas na terceira e quarta folha totalmente desenvolvida a partir do ápice, concentrando o sensor na porção mediana da folha, evitando-se a região central da folha. Cada folha recebeu três leituras, e a média dessas leituras foi registrada como repetição. Foram analisadas dez plantas por tratamento, além de coletadas 10 medidas de cada um dos poliploides identificados.

4.7 Tamanho e densidade estomáticas

A dimensão dos estômatos foi avaliada considerando a sua medida longitudinal e equatorial, além da medida longitudinal e equatorial do ostíolo, somente em estômatos com ostíolo aberto. Foram analisadas 5 plantas por tratamento. As folhas coletadas se tratavam do terceiro e quarto par de folhas totalmente desenvolvidas a partir do ápice. As lâminas foram preparadas com uso de uma camada fina de esmalte de unha transparente, aplicada sobre a face abaxial das folhas de *Mandevilla*. Após a completa secagem do esmalte, foi feito uso de uma fita transparente de durex pressionada levemente contra o esmalte, então removida da folha cuidadosamente e passada para uma lâmina de análise.

Para a avaliação das dimensões dos estômatos foi utilizado o aumento de 400 X – 10 X na lente ocular e 40 X na lente objetiva – além do auxílio de câmera acoplada ao microscópio ótico, software de análise e fotografia das lâminas, ambos Opticam Microscopy Technology®.

Para análise da densidade estomática foi feito uso da mesma técnica de fita durex sobre esmalte seco, sendo modificado apenas o aumento do microscópio, para 100 X – 10 X na ocular e 10 X na objetiva.

Com as imagens coletadas, foi utilizado outro software, ImageJ®, para as medidas e também para a contagem de estômatos por área. Para a estatística de tamanho de estômato, foram coletadas 20 medidas de cada tratamento ou poliploide (nos casos constatados pela citometria) e de cada dimensão - medida longitudinal, equatorial e o mesmo do ostíolo. Já para a estatística de densidade estomática, foi realizada a análise de 10 lâminas por tratamento ou por poliploide, sendo o número absoluto de estômatos da lâmina dividido pelo campo de visão do microscópio em mm², calculando-se assim a densidade de estômatos.

4.8 Dimensões foliares

As dimensões foliares como parâmetros morfoanatômicos compreendem uma análise indireta para a identificação de poliploides, e foram realizadas sobre as mesmas plantas analisadas nos parâmetros anteriores, de citometria de fluxo, dimensões estomáticas e densidade de estômatos foliares. Foi feito uso de

paquímetro digital cód.316119 (marca MTX®), com duas casas depois da virgula, e graduação em mm.

Foram realizadas 3 medidas de cada parâmetro por folha – 3 medidas de comprimento, 3 de largura e 3 de espessura – cuja média foi considerada uma repetição. O total de médias contabilizadas tanto dos controles quanto dos poliploides foi de 10.

Quanto à área foliar, foi utilizado o equipamento scanner de área foliar LI-3100C Area Meter da LI-COR®, que fornece a medida da superfície foliar em cm² em poucos minutos, somente passando a folha em uma esteira iluminada por uma fonte de luz. Nesse caso, a repetição também foi obtida da média aritmética entre três medidas coletadas da mesma folha. O total de repetições para área foliar também foi igual a 10. Para coleta dos dados foliares também foi feito uso do terceiro e quarto par de folhas totalmente desenvolvidas, a partir do ápice da planta.

4.9 Dimensões florais

Os parâmetros avaliados nas flores, assim como nas folhas, correspondem à uma análise indireta para avaliação dos tratamentos, e foram realizadas também sobre as mesmas plantas analisadas nos parâmetros supracitados. O mesmo paquímetro digital utilizado para a coleta de dados das folhas foi utilizado para as flores. Foi feita a coleta de 3 medidas de cada parâmetro por flor – 3 medidas de comprimento, 3 de largura e 3 de altura – cuja média foi considerada uma repetição. O total de médias contabilizadas tanto dos controles quanto dos poliploides foi de 5, devido à baixa frequência de floração observada em alguns poliploides.

4.10 Coloração das flores utilizando o equipamento espectrofotômetro CM-26d (Konica Minolta®)

Para avaliação da coloração das flores, foram realizadas medidas das pétalas de flores totalmente abertas, sendo coletadas três medidas com a média delas resultando numa repetição. A coleta de dados de coloração foi feita com o uso do espectrofotômetro de esfera portátil modelo CM-26d da Konica Minolta®, que fornece dados de cor no sistema *CIELAB (Lab)*, fornecendo índices de cor (Pseudocor),

luminosidade (L), tendências da cor entre verde e vermelho (a) e entre azul e amarelo (b), saturação ou intensidade da cor (C), ângulos da cor (h) no espaço CIELAB, valores ligados a percepção humana da cor (x, y e z) e o brilho specular da amostra (GU). No entanto somente alguns desses dados são de fato necessários para as análises estatísticas da cor da amostra, sendo eles a luminosidade, as tendências entre verde e vermelho, e as tendências entre azul e amarelo, *L*, *a* e *b* respectivamente. Para a estatística da coloração das flores foi feito o uso de 5 repetições de cada tratamento e controles, e dos poliploides identificados.

4.11 Dimensões radiculares

As dimensões radiculares avaliadas foram o diâmetro médio e o comprimento médio das raízes, sendo que a média de três medidas coletadas constituiu uma repetição. Para a análise estatística foram estabelecidas 10 repetições de cada parâmetro. Para a medida dos parâmetros foi feito uso de fotografias do sistema radicular das plantas, livres de substrato, sobre um fundo quadriculado de 1 por 1 centímetro, e feitas todas com a mesma distância. Com uso dessas fotografias, e do software ImageJ® junto com o plugin SmartRoot® foram realizadas as medidas. O plugin SmartRoot® é capaz de fornecer medidas do diâmetro de raízes e comprimento total delas de maneira bastante eficiente, já que foi desenvolvido exatamente para tal função.

4.12 Eficiência fotoquímica e no uso da água utilizando o equipamento fluorômetro e porômetro combinados LI-600 da LI-COR®

Para análise da eficiência fotoquímica – como o fotossistema II está convertendo luz em energia química - e do uso da água foram coletados parâmetros de fluorescência da clorofila e também de trocas gasosas das folhas com o equipamento combinado fluorômetro e porômetro LI-600 da LI-COR®.

A fluorescência da clorofila (PAM) é avaliada segundo os parâmetros de eficiência máxima do fotossistema II em folhas escuras (F_v/F_m), rendimento quântico efetivo do fotossistema II em condições de luz (Y_{II}), transporte de elétrons (ETR) e extinção não fotoquímica ou liberação de calor (NPQ).

Quanto aos parâmetros de trocas gasosas ou porômetria, os parâmetros fornecidos pelo equipamento são a condutância estomática ou o nível de abertura dos estômatos (gsw), a temperatura da folha, e o potencial de transpiração da planta (VPD).

Para a coleta de tais parâmetros as plantas foram mantidas sob luz direta de 30 a 40 minutos, entre as 11:00 da manhã e 12:30 da tarde, estando todos os vasos bem hidratados. As folhas utilizadas para a coleta foram as do terceiro e quarto par totalmente desenvolvidas a partir do ápice da planta, sendo cada medida uma repetição.

4.13 Forma de análise dos resultados

Os dados foram analisados por meio do software R, com a realização da ANOVA para checar a significância dos tratamentos e teste de comparações múltiplas de médias de Scott-Knott, nos níveis de $p < 0,001$, $p < 0,01$ e $p < 0,05$ no máximo.

Foram considerados dois tipos de análises, uma comparando-se os tratamentos com diferentes tempos de exposição à colchicina, avaliando o efeito da colchicina sobre as características avaliadas nos genótipos de *Mandevilla* e uma segunda comparação na qual foram analisadas e comparadas as plantas poliploides com diploides, com o objetivo de demonstrar os efeitos da poliploidia sobre o desenvolvimento e fisiologia de *Mandevillas*. Dessa forma, após a identificação de indivíduos poliploides em cada tratamento por meio da citometria de fluxo, os mesmos parâmetros utilizados para avaliação dos tratamentos foram medidos nos poliploides para uma comparação direta com os indivíduos diploides.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Resumo das principais observações

Sintetizando aqui alguns dos resultados expostos mais detalhadamente adiante, o protocolo utilizado foi eficiente para obtenção de poliploides neste trabalho e é possível observar o quanto a indução de poliploidia é genótipo dependente, assim como algumas características e fatores dos poliploides também se alteram de forma distinta entre os genótipos de *Mandevilla* aqui estudados. Isso pode ser notado na

avaliação de sobrevivência, que cai com o uso da colchicina e aumento do tempo de exposição, exceto para a cultivar MD 1287. Com a taxa de novas brotações essa dinâmica de queda com aumento de tempo se mantém para a cultivar MD 1480, enquanto que as cultivares MD 1296 e MD 1287 tem elevação da taxa aos 60 dias. O melhor tratamento considerando a eficiência de indução de poliploidia para MD 1480 e MD 1287 foi a exposição a colchicina por 48 horas, mas o mesmo não pode ser concluído para cultivar MD 1296.

Analisando poliploides obtidos, os da cultivar MD 1480 apresentam em sua maior parte redução da clorofila A, enquanto que nos tetraploides da cultivar MD 1287 apenas os valores de clorofila B sofreram elevação.

Os poliploides de MD 1480 e MD 1287 também apresentaram maior espessura foliar. Elas concentraram sobretudo um aspecto mais brilhante e coriáceo. O tamanho das flores até o momento só pode ser verificado para MD 1287, nos quais apenas os poliploides oriundos do tratamento por 48 horas apresentaram aumento de comprimento e largura. A cor verificada para duas flores de tetraploides de MD 1287, apresentou certo desvanecimento em uma delas. As flores, contudo, mostraram diferenças no formato de pétala e em suas bordas.

Quanto a eficiência fotossintética, dois tetraploides de MD 1287 e um de MD1480 apresentaram maior taxa de transporte de elétrons (em ambos os tempos de 24 horas e 48 horas), indicando respostas bastante heterogêneas à poliploidia dentro da mesma cultivar. A poliploidia se concentra, portanto, em detalhes, a níveis estruturais, bioquímicos e fisiológicos.

5.2 Desenvolvimento in vitro dos explantes tratados com colchicina

Os explantes tratados com colchicina por 24h e 48h assim como os controles sem colchicina foram avaliados em relação a sobrevivência dos segmentos nodais e ao número de brotações. Essas avaliações foram realizadas aos trinta e sessenta dias de cultivo após o tratamento com colchicina.

A sobrevivência dos explantes foi significativa para a concentração de colchicina apenas para as cultivares MD 1296 e MD 1287 aos 30 dias. Já o fator tempo de exposição à colchicina foi significativo para MD 1296 aos 60 dias e para MD

1287 aos 30 dias, assim como também a única interação significativa foi verificada para MD 1287 aos 30 dias. Somente o tratamento sem colchicina mantido por 24 horas em meio de cultura líquido não apresentou mortalidade de segmentos nodais em números absolutos. Mesmo os controles com tempo de imersão em meio sem colchicina por 48 horas demonstraram redução da sobrevivência dos segmentos nodais aos 60 dias de cultivo em números absolutos (Tabela 1). A morte de tecidos controle muito possivelmente é devida ao acúmulo de líquido e a alta umidade que permanece nos espaços intercelulares em meios líquidos, reduzindo a troca gasosa nos tecidos, que mesmo sob agitação, sofrem hipóxia e estresse oxidativo (Polivanova; Bedarev, 2022). Já a sobrevivência reduzida de explantes que tiveram contato com a colchicina é bastante comum, uma vez que a substância é tóxica, sendo observado o escurecimento dos tecidos seguido de morte.

Tabela 1. Taxa de sobrevivência de segmentos nodais *in vitro*, decorrente do tratamento com colchicina por 24 e 48 horas

Dose (%)	Tempo (h)	MD 1480		MD 1296		MD 1287	
		30 dias (%)	60 dias (%)	30 dias (%)	60 dias (%)	30 dias (%)	60 dias (%)
0,0	24	100	100	100 A	100 a	100 Aa	100
	48	100	80	100 A	62 b	100 Aa	80
0,05	24	96	68	92 A	92 a	98 Ba	74
	48	100	50	80 B	32 b	92 Bb	84
F (dose)		2,67	4,16	23,06***	1,92	12,5**	0,62
F (Tempo)		2,65	1,56	4,24	12,77**	4,5*	0,13
F (Interação)		2,63	0,01	4,23	0,66	4,3*	1,15

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott; Letras maiúsculas referem-se ao fator dose, enquanto letras minúsculas indicam o fator tempo; *** significativo ao nível de 0,1% de probabilidade de erro ($p < 0,001$); ** significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro ($p < 0,01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro ($0,01 < p < 0,05$)

Para as avaliações de 30 e 60 dias a dose de colchicina foi significativa – a nível de 0,001 – para MD 1480 e MD 1287. A única interação dose X tempo significativa ocorreu aos trinta dias para a cultivar MD 1296, que também teve influência da dose do antimetabólito. Já aos sessenta dias de cultivo, apenas o tempo de contato com a solução contendo colchicina foi responsável – a 5% de significância - pela redução nas novas brotações em MD 1296. O fator tempo também teve influência sobre a cultivar MD 1480 aos sessenta dias, ao nível de 5% (Tabela 2).

Todos os segmentos nodais tratados com colchicina, independente da cultivar, tiveram redução no número de novas brotações geradas, em relação aos controles sem exposição à colchicina. Essa redução do número de brotações é consequência dos efeitos adversos da colchicina sobre os tecidos vegetais, causando em parte mortandade dos tecidos ou estresses que resultam na redução do número de brotações geradas por explante. A cultivar MD 1296 aparentemente apresenta uma recuperação mais rápida desses efeitos, pois aos 60 dias o tempo de contato com a colchicina por 24 horas já teve influência sobre a taxa de novas brotações (Tabela 2).

Tabela 2. Taxa de novas brotações *in vitro* por segmento nodal, decorrente do tratamento dos segmentos nodais com colchicina por 24 e 48 horas

Dose (%)	Tempo (h)	MD 1480		MD 1296		MD 1287	
		30 dias	60 dias	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias
0,0	24	1,28 A	2,22 Aa	1,56 Aa	2,26 a	1,94 A	2,94 A
	48	1,32 A	1,34 Ab	1,82 Aa	1,82 a	2,34 A	2,58 A
0,05	24	0,46 B	0,36 Bc	1,28 Ba	1,98 a	1,10 B	0,64 B
	48	0,44 B	0,18 Bc	0,62 Bb	0,70 b	0,64 B	1,28 B
F (dose)		58,98***	38,81***	11,85**	4,15	26,14***	23,14***
F (Tempo)		0,01	4,78*	0,86	6,26*	0,01	0,14
F (Interação)		0,07	2,08	0,05*	1,49	2,99	1,78

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott; Letras maiúsculas referem-se ao fator dose, enquanto letras minúsculas indicam o fator tempo; *** significativo ao nível de 0,1% de probabilidade de erro ($p < 0,001$); ** significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro ($p < 0,01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro ($0,01 < p < 0,05$)

Em *Mandevilla bahiensis* exposta a duas doses (0,025% e 0,05%) de colchicina por 3 tempos (8,16 e 24 horas), a maior taxa de mortalidade foi oriunda do tratamento com 0,025% de colchicina por 24 horas de exposição (9,3%), seguida pela dose de 0,05% por 24 horas (8,0%). As menores taxas – entre plantas que foram expostas ao antimitótico - foram 4% e 2,7% dos tratamentos com dose de 0,05% por 8 horas e 0,05% por 16 horas respectivamente. Já os controles, que não foram expostos à colchicina, somente aos meios de cultura pelos três tempos corresponderam aos menores valores de mortalidade geral, com 1,3%, 2,7% e 6,7% para 8, 16 e 24 horas respectivamente (Costa, 2018).

Khan *et al.* (2023) obtiveram resultados similares com melancia, *Citrullus lanatus* (cultivar Thailand-2) obtidos em seu estudo, comparando o grupo tratado com doses de colchicina (0.05%, 0.1% e 0.5% por 24 h, 48 h e 72 h cada) no qual a

sobrevivência foi reduzida em comparação com os grupos controle não tratados com colchicina. Em nêspera, *Eriobotrya japonica*, a sobrevivência esteve associada apenas com a concentração do agente antimitótico (Blasco; Badene; Naval, 2015). No trabalho de Talei e Fotokian (2020) os explantes de melissa (*Melissa officinalis*) submetidos a concentrações de 0,1% e 0,2% de colchicina pelo maior tempo em questão (72 h) não foram capazes de sobreviver, mesmo que Costa (2018), tenha observado que não houve associação entre a sobrevivência de plantas de *Mandevilla bahiensis* cultivadas *in vitro* e o uso de concentrações crescentes de colchicina e nem com o aumento do tempo de exposição ao alcalóide.

A colchicina como já exposto interfere na mitose, inibindo a polimerização da tubulina e, conseqüentemente, a formação do fuso mitótico. Isso leva à interrupção da divisão celular e pode resultar em poliploidia. No entanto, a colchicina também causa estresse celular e toxicidade (Manzoor *et al.* 2023).

Isso porque quando as células são expostas à colchicina, pode ocorrer um aumento na produção de EROs (espécies reativas de oxigênio), como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), superóxido (O_2^-) e radicais hidroxila ($\bullet OH$). Esses compostos são altamente reativos e podem danificar componentes celulares, incluindo lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. Com o acúmulo de EROs, a capacidade antioxidante da planta fica comprometida, causando estresse oxidativo (que por sua vez pode gerar dano a membranas, ao DNA, a atividade enzimática) e mesmo a morte celular (Castañeda-Nava *et al.* 2021).

A sobrevivência dos explantes ou tecidos expostos à colchicina é um fator crucial na avaliação da eficiência do processo de indução de poliploidia. Embora um tratamento possa induzir poliploides, ele também pode resultar em uma alta taxa de mortalidade dos tecidos, especialmente quando o tempo de exposição à colchicina é prolongado ou sua concentração é muito elevada (Ansari *et al.* 2022). Essa mortalidade elevada pode reduzir a frequência e a eficiência geral da indução de poliploidia. Para mitigar esse problema, é recomendável calcular a eficiência do tratamento com base no número de plantas sobreviventes, ajustando os resultados pela taxa de sobrevivência dos grupos controles (Cabahug *et al.* 2021).

5.3 Resultados da citometria de fluxo

Os canais utilizados como padrão na citometria de fluxo foram determinados a partir da ploidia das plantas controle (diplóides), sendo os canais 2C iguais a 25939,15, 25619,76, e 26517,10 para MD 1480, MD 1296 e MD 1287 respectivamente.

A partir da citometria de fluxo foi possível encontrar dois indivíduos mixoploides pertencentes a cultivar MD 1296 – oriundos do tratamento com colchicina 0,05% por 24 h. Também foram detectados um indivíduo mixoploide e quatro indivíduos tetraploides nos grupos tratados com colchicina 0.05% da cultivar MD 1480, sendo que o indivíduo mixoploide e um indivíduo tetraploide foram obtidos no tratamento de exposição à colchicina por 24 horas, e os outros três tetraploides foram identificados no tratamento com colchicina por 48 horas. Quanto a cultivar MD 1287, foram identificados apenas indivíduos tetraploides, sendo 4 deles oriundos do tratamento com colchicina por 24 horas e mais 4 oriundos do tratamento com colchicina por 48 horas. Após a coleta de imagens do sistema radicular das plantas, um dos tetraploides do tratamento com colchicina por 48 horas secou e morreu. Um detalhe importante sobre essa planta é o fato de que ela já aparentava estrutura muito mais frágil que as outras, com tamanho muito reduzido e folhas encarquilhadas cujo pecíolo soltava facilmente do caule. Além dessa planta, mais um tetraploide oriundo do mesmo tratamento também possui tais características e aparência frágil, este outro, contudo, sobreviveu. Um dos mixoploides identificados da cultivar MD 1296 após o surgimento de sintomas de uma bactéria fitopatogênica também morreu. Este, da mesma forma, também aparentava se tratar de uma planta de aspecto mais frágil.

A frequência de poliploides foi calculada com base na fórmula (I) a seguir, sendo ajustada pelo número de indivíduos analisados:

$$(I) \text{ Frequência de Poliploides} = \left(\frac{\text{Número de poliploides}}{\text{Número de indivíduos analisados}} \right) * 100\%$$

A eficiência de poliploidização ou eficiência de indução de poliploidia foi calculada a partir da equação (II) ajustada de Hassan *et al.* (2020) exposta a seguir:

$$(II) \text{ Eficiência de Poliploidização} = \left(\frac{\text{Número de poliploides}}{\text{Número de explantes tratados}} \right) * 100\%$$

A adaptação da fórmula visa calcular a eficiência do processo de poliploidização em relação à frequência de poliploides observada pela sobrevivência das plantas tratadas, corrigidas pela mortalidade do controle, para maior diferenciação de plantas que morreram pela colchicina ou pelo estresse fisiológico de permanecer em meio líquido sem colchicina por 24 ou 48 horas (controles).

Tabela 3. Eficiência de indução de poliploidia *in vitro* ajustada pela sobrevivência dos controles, e frequência de poliploidia, decorrente do tratamento dos segmentos nodais com colchicina por 24 e 48 horas

MD	Eficiência de indução de poliploidia <i>in vitro</i> *(%)	Tempo de exposição (h)	Frequência de poliploidia (%)
1480	5,88	24	40
	15	48	60
1296	4,34	24	40
	0	48	0
1287	10,8	24	66,7
	12,12	48	50

*Corrigida pela sobrevivência dos controles

A maior frequência de poliploidia foi observada na cultivar MD 1287 exposta a colchicina por 24 horas (66,7%), seguida pela cultivar MD 1480 exposta a substância por 48 horas (60%). A cultivar MD 1296 apenas desenvolveu poliploides quando exposta a colchicina pelo período de 24 horas, e mesmo assim foi observada apenas dois indivíduos identificados como mixoploides. Quanto a eficiência de indução de poliploidia *in vitro* os melhores valores observados foram os da cultivar MD 1480 com tempo de exposição a colchicina por 48 h (15%) seguido pela cultivar MD 1287 (12,12%) pelo mesmo tempo de exposição, e o menor valor obtido foi para a cultivar MD 1296 (4,34%) em 24 horas de tratamento com colchicina (Tabela 3).

A variação que existe na frequência e eficiência entre os tratamentos e cultivares testadas tem causa multifatorial, e pode estar relacionada às doses de antimitótico, ao tempo de exposição a eles, sua forma de aplicação e à espécie utilizada. No trabalho de Costa, onde foram testadas as dosagens de 0,025% e 0,05% de colchicina por 8 horas, 16 horas e 24 horas para induzir poliploidia na espécie

Mandevilla bahiensis, a maior porcentagem de tetraploides (17%) foi observada no tratamento com a dose de 0,05% por 24 horas de exposição, seguida pela dose de 0,025% por 24 horas (9%), o que pautou aqui a escolha pela dosagem de 0,05%, ampliando o tempo em cultivares de *Mandevilla* (Costa, 2018).

Mahanta *et al.* (2023) avaliaram a eficiência de poliploidização *in vitro* de três concentrações de colchicina (0,1%, 0,25% e 0,5% p/v) por tempos de exposição de (4, 6, 8 e 12 horas) em ápices caulinares de gérbera, sendo que a maior eficiência de indução foi obtida no tratamento com concentração de 0,1% por 4 horas. Em carqueja amarga (*Melastoma candidum sp.*) submetida a doses de 0,05%, 0,1%, 0,2%, e 0,4% de colchicina por 24 h, 48 h, 96 h e 144 h, as melhores frequências de poliploidia e sobrevivência de explantes foram observadas no tratamento com 0,2% por 48 h. Embora os outros tratamentos com 0,2% de colchicina por 96 h e 144 h tenham apresentado frequências de poliploidia de 100%, as taxas de sobrevivência foram menores, 42,3 % e 28,5 % respectivamente (Zou *et al.* 2024).

De acordo com Dhooghe *et al.* (2011) a aplicação de doses mais baixas de colchicina por períodos curtos de exposição pode aumentar a taxa de sobrevivência de plantas, mas pode resultar em uma menor porcentagem de poliploides. Por outro lado, doses mais altas e tempos de exposição mais longos podem aumentar a taxa de poliploidização, mas também podem levar a uma maior mortalidade das plantas e à formação de células com níveis de ploidia indesejados (como octaploides).

Outros fatores menos intuitivos, no entanto, também têm impacto no sucesso ou insucesso da indução de poliploidia. O tempo de pré-cultivo do explante (escama) foi um fator significativo na pesquisa de Li *et al.* (2020), onde a maior taxa de indução de tetraploides (33,33%) de lírio (*Lilium davidii var. unicolor*) foi alcançada com um tratamento de pré-cultura de 15 dias (início de embriogênese) seguido de imersão em uma solução de colchicina 0,025% por 24 horas, em comparação com o pré-cultivo de 20 dias (final da embriogênese) e outras doses 0,05% ou 0,1%. Logo é bastante importante frente a esses dados considerar a importância de uma série de fatores e particularidades diante do processo de poliploidização.

5.4 Quantificação de clorofila

A única diferença significativa ocorreu dentro da cultivar MD 1480. A interação foi significativa para a relação Clorofila A/B, no tratamento com colchicina por 48 horas, a um nível de significância de 5%. A relação entre as clorofilas foi menor nesse grupo em detrimento dos controles e do tratamento com colchicina por 24 horas. As clorofilas A e B da cultivar MD 1480, dos grupos tratados com colchicina não diferiram dos seus grupos controles. As cultivares MD 1296 e MD1287 tratadas com colchicina não apresentaram diferenças nas clorofilas A e B e na relação A/B de seus respectivos controles, em nenhum fator isolado nem na interação deles (Tabela 4).

Tabela 4. Teores de clorofila A, B e relação A/B em condição *ex vitro*, decorrente do tratamento das plantas com colchicina por 24 e 48 horas *in vitro*

Dose (%)	Tempo (h)	MD 1480			MD 1296			MD 1287		
		A	B	A/B	A	B	A/B	A	B	A/B
0,0	24	32,74	9,08	3,50 Aa	38,93	14,53	2,72	36,98	14,99	2,72
	48	31,62	9,00	3,69 Aa	38,68	14,54	2,70	39,32	13,21	2,70
0,05	24	31,72	8,54	3,76 Aa	37,24	13,16	2,67	40,15	14,01	2,67
	48	32,28	11,01	3,27 Ab	39,79	15,03	2,72	39,59	12,17	2,72
F (dose)		0,04	0,72	0,24	0,16	0,35	0,03	0,73	0,38	0,03
F (Tempo)		0,97	1,86	0,91	2,48	1,59	0,02	0,19	0,58	0,04
F Interação		0,10	2,12	4,42*	3,67	1,56	0,16	0,52	0,01	0,13

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott; Letras maiúsculas referem-se ao fator dose, enquanto letras minúsculas indicam o fator tempo; *** significativo ao nível de 0,1% de probabilidade de erro ($p < 0,001$); ** significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro ($p < 0,01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro ($0,01 < p < 0,05$)

Nas análises comparativas entre poliploides e controles foi possível encontrar grupos com redução da clorofila A, como no caso de um mixoploide e de um tetraploide, oriundos dos tratamentos de MD 1480 com colchicina por 24 e 48 horas respectivamente (Tabela 5). Os teores de clorofila dos mixoploides da cultivar MD 1296 não foram significativamente diferentes dos controles (Tabela 6). Esses valores, de clorofilas A e B, foram contrários ao esperado inicialmente neste trabalho, pois em diversas induções de poliploidia consultadas na literatura científica, as plantas poliploides obtidas costumam apresentar teores mais elevados que seus comparativos diploides embora isso não seja uma regra. Para a cultivar MD 1287,

essa expectativa se mostrou mais alinhada, uma vez que tanto os teores de clorofila A quanto de clorofila B foram significativamente distintos entre os poliploides e também entre poliploides e controles (Tabela 7).

Tabela 5. Teor de clorofila A, B e relação A/B de poliploides identificados nos grupos da cultivar MD 1480 tratados com colchicina *in vitro* por 24 e 48 horas

Dose (%)	Tempo (h)	Ploidia	Clorofila		
			A	B	A/B
0	24	Controle	31,62 a	9,08	3,50 b
	48	Controle	32,74 a	9,00	3,69 b
0,05	24	Mixoploide	27,37 c	6,24	4,54 a
		Tetraploide 1	30,27 b	8,42	3,69 b
	48	Tetraploide 2	28,12 c	6,70	4,20 a
		Tetraploide 3	29,80 b	8,02	3,77 b
		Tetraploide 4	30,40 b	16,13	3,33 b
F (entre ploidias)			6,00***	1,22	4,98***

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott; *** significativo ao nível de 0,1% de probabilidade de erro ($p < 0,001$); ** significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro ($p < 0,01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro ($0,01 < p < 0,05$)

Tabela 6. Teor de clorofila A, B e relação A/B de poliploides identificados nos grupos da cultivar MD 1296 tratados com colchicina *in vitro* por 24 e 48 horas

Dose (%)	Tempo (h)	Ploidia	Clorofila		
			A	B	A/B
0	24	Controle	39,55	14,62	2,72
	48	Controle	38,06	14,45	2,70
0,05	24	Mixoploide 1	38,51	16,25	2,42
		Mixoploide 2	39,40	14,30	2,81
F (entre ploidias)			1,231	1,533	2,016

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott; *** significativo ao nível de 0,1% de probabilidade de erro ($p < 0,001$); ** significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro ($p < 0,01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro ($0,01 < p < 0,05$)

Tabela 7. Teor de clorofila A, B e relação A/B de poliploides identificados nos grupos da cultivar MD 1287 tratados com colchicina *in vitro* por 24 e 48 horas

Dose (%)	Tempo (h)	Ploidia	Clorofila		
			A	B	A/B
0	24	Controle	36,98 a	14,99 b	3,48
	48	Controle	39,32 a	13,21 b	2,98
0,05	24	Tetraploide 1	39,16 a	16,26 a	2,49
		Tetraploide 2	32,38 b	10,03 b	3,26
		Tetraploide 3	41,02 a	18,22 a	2,28
		Tetraploide 4	39,50 a	17,60 a	2,50
	48	Tetraploide 6	38,99 a	16,44 a	2,58
		Tetraploide 7	40,55 a	19,15 a	2,16
		Tetraploide 8	37,63 a	13,69 b	2,89
		F (entre ploidias)		2,99**	3,19**

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott; *** significativo ao nível de 0,1% de probabilidade de erro ($p < 0,001$); ** significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro ($p < 0,01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro ($0,01 < p < 0,05$)

A poliploidia e a duplicação do genoma podem levar a uma desregulação de genes que controlam a biossíntese de clorofila, impactando a capacidade da planta de produzir esse entre outros pigmentos e metabólitos (Mohammadi, V. *et al.* 2023). A redução da eficiência fotossintética, no entanto também pode estar relacionada ao estresse fisiológico nas plantas, causado pela colchicina, e aos danos que ela pode causar na célula (Gaynor, Lim-Hing, Mason, 2020) como exposto anteriormente neste.

Mohammadi, Kaviani e Sedagathoor (2021), puderam observar que a poliploidia induzida em biorreator em *Phalaenopsis amabilis* – especificamente a tetraploidia - promoveu aumento nas concentrações de clorofila, gerando plantas com folhagens verde mais escuro e consequente desempenho fotossintético superior. Assim também ocorreu com a indução de poliploidia sobre Jasmim Sambac (*Jasminum sambac*), cujas plantas tratadas com colchicina apresentaram valores mais altos de clorofila que as plantas controle (Vishnupandi *et al.* 2023). Em amora, genótipo Sanctus C o conteúdo de clorofila foi substancialmente maior (2319,9 +/- 100,40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em um hexaploide oriundo de um tratamento com concentração de 125 mg L^{-1} de colchicina por 72 horas, em relação ao seu controle diploide (1200,5 +/- 393 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) (Sabooni *et al.* 2021). Apesar de não medir os índices de clorofila, de acordo com Castillo *et al.* (2020), o número médio de cloroplastos foi de 5,5 em plantas

de controle diploides e mais de 7 em tetraploides de *Eucalyptus dunnii* Maiden, induzidos tanto por colchicina quanto oryzalina como agente antimitótico.

Ao contrário disso e da mesma forma que observado para a cultivar MD 1296 neste estudo com *Mandevilla*, em *Cannabis sativa* o processo de indução de poliploidia não foi capaz de alterar significativamente os níveis de clorofila na planta poliploide, mantendo-os estáveis (Bagheri; Mansouri, 2015), enquanto que, de acordo com Talei e Fotokian (2020) plantas de melissa (*Melissa officinalis* L.) tratadas com 0,05% de colchicina por 72 h tiveram reduzidas as quantidades de clorofilas a e b entre outras substâncias (fenóis e carotenóides) em relação ao tratamento de 0,1% de colchicina por 24 h de exposição, como ocorreu com alguns poliploides da cultivar MD 1287.

Em *Lilium distichum* não foram observadas diferenças significativas entre os teores de clorofila de tetraploides e diploides, mas segundo os autores, o teor observado nos poliploides era um pouco menor que o observado nos controles, já em *Lilium cernuum* o conteúdo de clorofila seguiu a dinâmica contrária, sendo significativamente superior ao encontrado em plantas diploides (Fu *et al.* 2019). Em tetraploides de *Dendrobium* “Sonia” obtidos do tratamento com colchicina em biorreatores, o conteúdo de clorofila também era maior que os diploides. Nesse mesmo trabalho, os poliploides obtidos de tratamento com oryzalina não apresentaram conteúdo superior de clorofila em relação ao seu controle (Zakizadeh; Livani; Hashemabadi, 2020). Tal parâmetro - a quantificação de clorofila - pode, portanto, ser bastante variável e pouco apropriada, quando sozinha, na investigação de ploidias.

Os poliploides induzidos, portanto, dificilmente apresentam um padrão em seus parâmetros. Um organismo poliploide, que precisa conter (e garantir a manutenção) de um genoma, por exemplo, 4 vezes maior que o seu normal, por vezes, apresenta outros processos relegados à um segundo plano, como a produção de pigmentos. Já quando a planta consegue manter todo o genoma poliploide sem exaurir seus recursos energéticos, pode haver a expressão mais forte de características (mais clorofila por exemplo), ligada a presença de mais genes para expressá-las (Dhooghe *et al.* 2011).

5.5 Dimensões e densidade estomáticas

Os valores de diâmetro polar do estômato foram significativos para as três cultivares testadas. Para a cultivar MD 1480, a dose, o tempo e a interação foram significativos ao nível de 0,1% para tal parâmetro. Nas cultivares MD 1296 e MD 1287 apenas o efeito de interação foi significativo, a 1% e a 5% respectivamente. O diâmetro polar das plantas MD 1480 tratadas com colchicina por 48 horas foi consideravelmente maior que das plantas tratadas com o antimitótico por 24 horas e ambos superiores aos controles (Tabela 8; Figura 7). Já o grupo da cultivar MD 1296 exposta à colchicina por 24 horas apresentou redução significativa dos valores de diâmetro polar - em detrimento de seus controles e também em relação ao grupo tratado por 48 horas. Na cultivar MD 1287, ocorreu a situação oposta, o grupo tratado com colchicina por 24 horas apresentou aumento no diâmetro polar em relação aos controles e ao grupo tratado por 48 horas. (Tabela 8; Figura 8).

A variação do diâmetro equatorial do estômato foi significativa para as três cultivares. Para MD 1480, a dose, tempo e sua interação apresentaram efeito de significância ao nível de 0,1%, com o maior diâmetro equatorial identificado no tratamento com colchicina por 48 horas (24,78 μm) seguido pelo tratamento por 24 horas (18,78 μm) e pelos controles (16,34 μm e 15,97 μm). Para a cultivar MD 1296, a dose e a interação foram significativas ao nível de 0,1% para o diâmetro equatorial, sendo que os grupos tratados com colchicina apresentaram redução do diâmetro equatorial médio em comparação com os controles, mas não diferindo entre si. Apenas o fator dose foi responsável pela variação no diâmetro equatorial da cultivar MD 1287, aumentando-os em relação aos controles (Tabela 8).

Tabela 8. Diâmetro polar e equatorial de estômatos em condição *ex vitro*, decorrente do tratamento das plantas com colchicina por 24 e 48 horas *in vitro*

		Ø Estômato (µm)					
Dose (%)	Tempo (h)	MD 1480		MD 1296		MD 1287	
		Polar	Equatorial	Polar	Equatorial	Polar	Equatorial
0,0	24	24,84 Bc	16,34 Bc	30,22 Aa	21,15 Aa	29,90 Ab	21,03 B
	48	25,37 Bc	15,97 Bc	28,92 Aa	20,55 Aa	31,21 Ab	21,17 B
0,05	24	30,28 Ab	18,78 Ab	25,75 Ab	18,48 Bb	33,08 Aa	22,01 A
	48	37,23 Aa	24,78 Aa	30,24 Aa	19,95 Bb	29,97 Ab	21,63 B
F (dose)		164,74***	127,89***	3,47	32,28***	1,28	4,40*
F (Tempo)		57,55***	66,91***	3,56	2,29	1,12	0,28
F (Interação)		19,23***	33,01***	11,69**	12,81***	6,70*	0,72

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott; Letras maiúsculas referem-se ao fator dose, enquanto letras minúsculas indicam o fator tempo; *** significativo ao nível de 0,1% de probabilidade de erro ($p < 0,001$); ** significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro ($p < 0,01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro ($0,01 < p < 0,05$)

As dimensões do ostíolo, seguiram um padrão similar dos estômatos para a cultivar MD 1480, com interação significativa para diâmetro polar e equatorial do ostíolo, com valor F significativo para dose, tempo e interação a 0,1% de significância (Tabela 9). O ostíolo dos grupos tratados com colchicina apresentou aumento do diâmetro polar e equatorial, sendo que os maiores valores para ambos foram identificados no tratamento por 48 horas, seguidos pelo tratamento por 24 horas. Para a cultivar MD 1287, houve variação apenas para o tamanho do ostíolo polar, advinda do fator dose a 5% de significância, promovendo aumento no diâmetro médio do ostíolo dos grupos expostos à colchicina, mas indistintos entre si. (Tabela 9).

Tabela 9. Diâmetro polar e equatorial do ostíolo em condição *ex vitro*, decorrente do tratamento das plantas com colchicina por 24 e 48 horas *in vitro*

		Ø Ostíolo (µm)					
Dose (%)	Tempo (h)	MD 1480		MD 1296		MD 1287	
		Polar	Equatorial	Polar	Equatorial	Polar	Equatorial
0,0	24	15,09 Bc	6,30 Bc	16,51 Bb	8,74 Aa	16,51 B	8,38
	48	14,97 Bc	5,87 Bc	17,40 Ba	8,30 Ab	16,83 B	8,26
0,05	24	21,11 Ab	8,73 Bb	13,14 Cc	6,17 Bb	19,10 A	8,37
	48	27,43 Aa	12,09 Aa	18,22 Aa	9,26 Aa	18,00 A	9,14
F (dose)		256,38***	149,22***	11,05 **	7,94**	4,58*	0,85
F (Tempo)		61,44***	41,23***	59,97***	21,49***	0,20	0,47
F (Interação)		26,94***	24,34***	29,76***	37,97***	0,66	0,89

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott; Letras maiúsculas referem-se ao fator dose, enquanto letras minúsculas indicam o fator tempo; *** significativo ao nível de 0,1% de probabilidade de erro ($p < 0,001$); ** significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro ($p < 0,01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro ($0,01 < p < 0,05$)

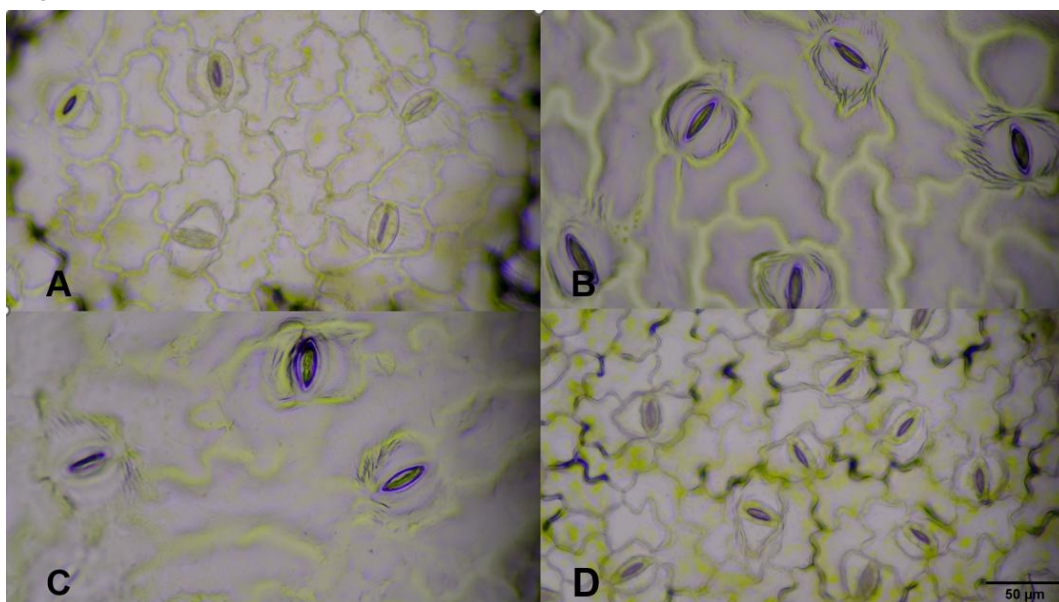
Para densidade de estômatos houve diferença significativa para a *Mandevilla* MD 1480 (fatores dose e tempo a 0,1%, e interação a 1%, responsáveis pela diferença) e para MD 1296 (interação dose x tempo de exposição a 0,1% de significância e tempo a 1% de significância) (Tabela 10). As lâminas da cultivar MD 1480 submetida ao tratamento com colchicina revelaram densidade de estômatos reduzida em relação aos controles sendo ainda mais significativa quando o tempo de contato com a colchicina se elevou de 24 para 48 horas (Figura 10). Para a cultivar MD 1296, o grupo com tempo de exposição à colchicina por 24 horas apresentou menor densidade de estômatos em relação aos outros grupos (Tabela 10; Figura 9). Não houve diferença significativa entre os grupos para a cultivar MD 1287 (Tabela 10).

Tabela 10. Densidade de estômatos em lâmina foliar abaxial em condição *ex vitro*, decorrente do tratamento das plantas com colchicina por 24 e 48 horas *in vitro*

Dose (%)	Tempo (h)	MD 1480 (estômatos/mm ²)	MD 1296 (estômatos/mm ²)	MD 1287 (estômatos/mm ²)
0,0	24	120,71 Aa	222,88 Aa	106,72
	48	120,11 Aa	210,06 Aa	109,65
0,05	24	66,52 Bb	176,03 Bb	103,48
	48	47,73 Cc	236,53 Aa	103,58
F (dose)		465,18***	1,99	0,40
F (Tempo)		22,72***	10,94**	0,04
F (Interação)		9,46**	25,86***	0,03

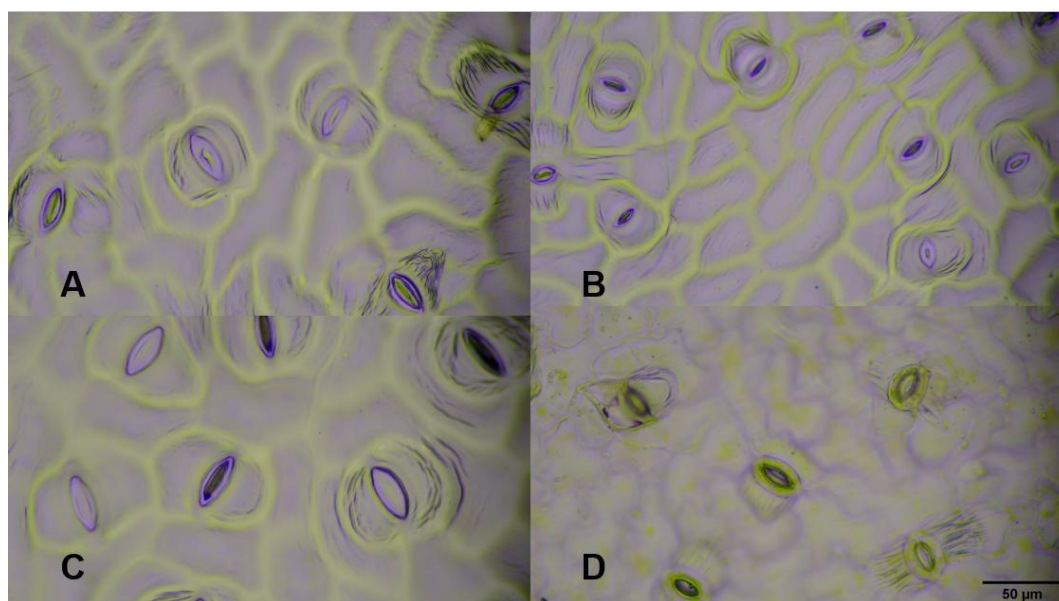
Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott; Letras maiúsculas referem-se ao fator dose, enquanto letras minúsculas indicam o fator tempo; *** significativo ao nível de 0,1% de probabilidade de erro ($p < 0,001$); ** significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro ($p < 0,01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro ($0,01 < p < 0,05$)

Figura 7. Estômatos da cultivar MD 1480 expostos e não expostos a colchicina



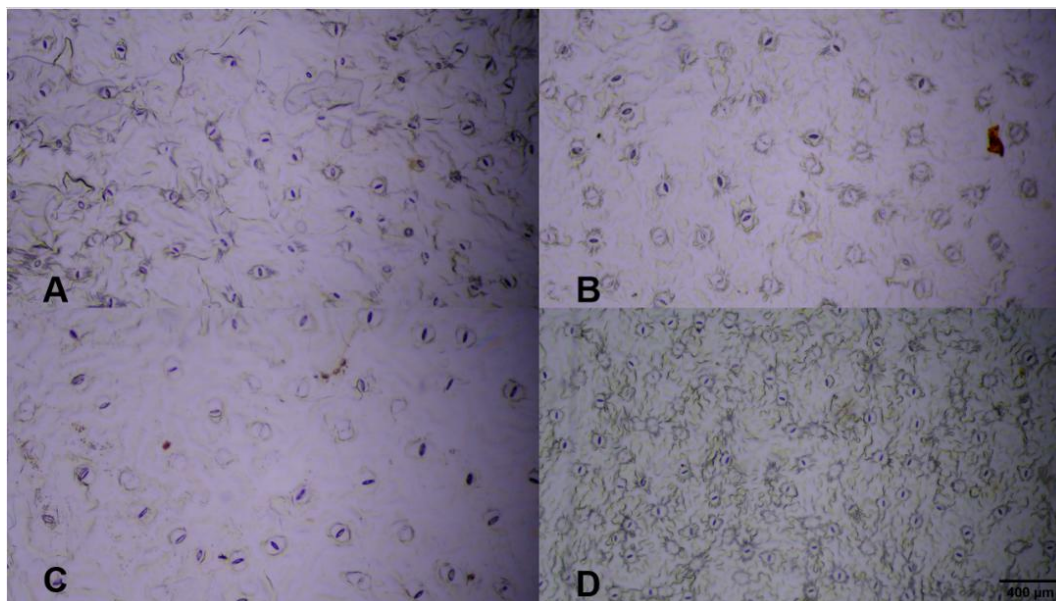
Estômatos de: (A) mixoploide de MD 1480 oriundo do tratamento 0,05% por 24 h; (B) tetraploide de MD 1480 oriundo do tratamento 0,05% por 24 h; (C) tetraploide de MD 1480 oriundo do tratamento 0,05% por 48 h; (D) Controle diploide de MD 1480

Figura 8. Estômatos da cultivar MD 1287 expostos e não expostos a colchicina



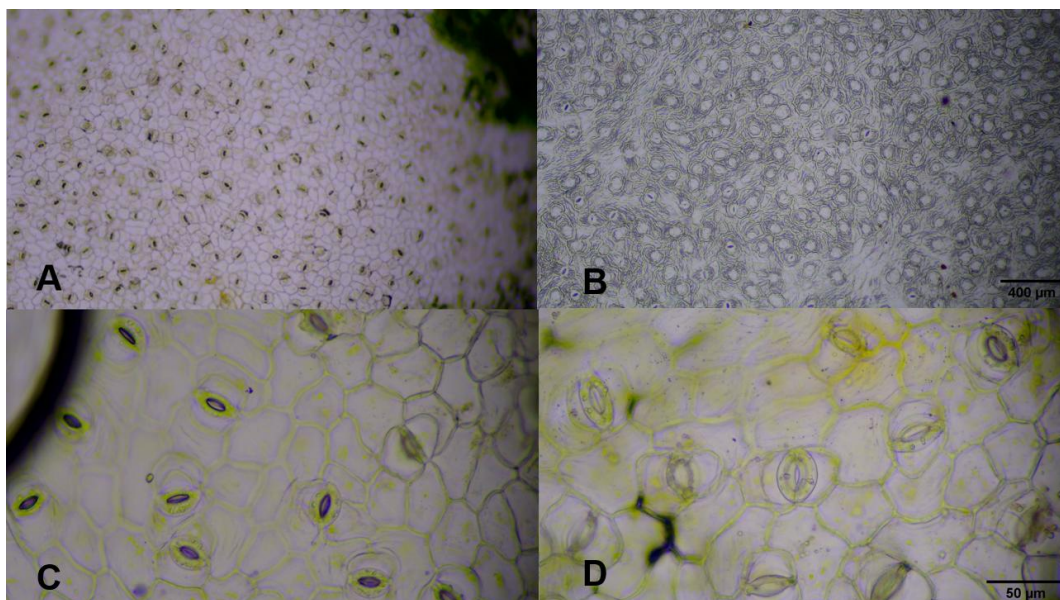
Estômatos de: (A) tetraploide de MD 1287 oriundo do tratamento 0,05% por 24 h; (B) tetraploide de MD 1287 oriundo do tratamento 0,05% por 48 h; (C) tetraploide de MD 1287 oriundo do tratamento 0,05% por 48 h; (D) Controle diploide de MD 1287

Figura 9. Densidade de estômatos da cultivar MD 1480 expostos ou não a colchicina



Densidade de estômatos de: (A) mixoploide de MD 1480 oriundo do tratamento 0,05% por 24 h; (B) tetraploide de MD 1480 oriundo do tratamento 0,05% por 24 h; (C) tetraploide de MD 1480 oriundo do tratamento 0,05% por 48 h; (D) Controle diploide de MD 1480

Figura 10. Densidade de estômatos da cultivar MD 1296 expostos ou não a colchicina



Densidade de estômatos de: (A) mixoploide de MD 1296 oriundo de tratamento com 0,05% de colchicina por 24 h; (B) Densidade de estômatos de controle diploide; (C) Estômatos de mixoploide oriundo de tratamento com 0,05% de colchicina por 24 h e (D) Estômatos de controle diploide

Quanto as dimensões de estômatos dos poliploides da cultivar MD 1480, ocorreu o aumento no tamanho destes (exceto para o mixoploide) nos poliploides em

comparação com diploides (Tabela 11) e, por sua vez, redução na densidade estomática observada nas células (Figura 8). Já os mixoploides da cultivar MD 1296, apresentaram reduzidos diâmetros polar e equatorial de estômatos, além da densidade que seguiu a mesma dinâmica para um dos mixoploides, sendo menor que os controles diploides (Tabela 12).

Nos poliploides identificados da cultivar MD 1287 é possível observar tanto aumentos médios dos parâmetros dos estômatos quanto reduções neles. O tetraploide 6 obtido do tratamento da cultivar com colchicina por 48 horas, por exemplo, apresentou aumento do diâmetro polar e equatorial de estômatos, assim como do ostíolo em relação aos controles, além de densidade estomática reduzida. Já o tetraploide 5 (tratamento com colchicina por 24 horas) apresentou redução do diâmetro polar e equatorial médio do estômato juntamente com aumento médio da densidade de estômatos (Tabela 13).

Tabela 11. Diâmetro polar e equatorial de estômatos e ostíolos e densidade estomática de poliploides identificados nos grupos da cultivar MD 1480 tratada com colchicina *in vitro* por 24 e 48 horas

Dose (%)	Tempo (h)	Ploidia	Ø Estômato (µm)		Ø Ostíolo (µm)		d (estômatos/mm ²)
			Polar	Equatorial	Polar	Equatorial	
0	24	Controle	24,84 c	16,34 c	15,09 e	6,30 e	120,71 a
	48	Controle	25,37 c	15,97 c	14,97 e	5,87 e	120,40 a
0,05	24	Mixoploide	26,99 c	17,04 c	18,22 d	7,43 d	78,80 b
		Tetraploide 1	33,56 b	20,52 b	24,00 c	10,03 c	54,24 c
	48	Tetraploide 2	38,44 a	25,05 a	28,71 a	12,16 a	36,49 d
		Tetraploide 3	36,07 a	24,22 a	26,09 b	11,30 b	54,54 c
		Tetraploide 4	37,18 a	25,07 a	27,49 a	12,80 a	52,17 c
F (entre ploidias)			58,51***	44,52***	85,66***	45,87***	197,30***

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott; *** significativo ao nível de 0,1% de probabilidade de erro ($p < 0,001$); ** significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro ($p < 0,01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro ($0,01 < p < 0,05$)

Tabela 12. Diâmetro polar e equatorial de estômatos e ostíolos e densidade estomática de mixoploides identificados nos grupos da cultivar MD 1296 tratada com colchicina *in vitro* por 24 e 48 horas

Dose (%)	Tempo (h)	Ploidia	Ø Estômato (µm)		Ø Ostíolo (µm)		d (estômatos/mm ²)
			Polar	Equatorial	Polar	Equatorial	
0	24	Controle	30,24 a	21,15 a	18,22 a	8,74 a	222,88 a
	48	Controle	28,92 a	20,55 a	17,40 a	8,30 a	210,06 a
0,5	24	Mixoploide 1	25,75 b	18,48 c	13,14 c	6,17 b	176,03 b
		Mixoploide 2	25,44 b	19,94 b	16,51 b	9,26 a	236,53 a
F (entre ploidias)			6,24***	15,80***	33,59***	22,47***	12,93***

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott; *** significativo ao nível de 0,1% de probabilidade de erro ($p < 0,001$); ** significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro ($p < 0,01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro ($0,01 < p < 0,05$)

Tabela 13. Diâmetro polar e equatorial de estômatos e ostíolos e densidade estomática de tetraploides identificados nos grupos da cultivar MD 1287 tratada com colchicina *in vitro* por 24 e 48 horas

Dose (%)	Tempo (h)	Ploidia	Ø Estômato (µm)		Ø Ostíolo (µm)		d (estômato/mm ²)
			Polar	Equatorial	Polar	Equatorial	
0	24	Controle	30,36 c	21,03 c	16,51 d	8,38 c	106,72 b
	48	Controle	30,35 c	21,17 c	16,83 d	8,26 c	109,65 b
0,05	24	Tetraploide 1	40,26 a	23,59 b	30,79 b	13,73 a	71,65 c
		Tetraploide 2	41,47 a	25,50 b	32,93 a	14,44 a	57,67 c
		Tetraploide 3	38,42 b	24,26 b	31,65 b	14,14 a	76,89 c
		Tetraploide 4	37,11 b	24,10 b	30,58 b	12,97 a	87,38 c
	48	Tetraploide 5	26,39 d	20,17 c	19,26 c	9,75 a	141,55 a
		Tetraploide 6	37,70 b	25,36 b	31,39 b	13,32 a	69,90 c
		Tetraploide 7	38,58 b	25,08 b	31,79 b	13,30 a	71,65 c
		Tetraploide 8	41,05 a	27,49 a	34,24 a	13,40 a	73,40 c
F (entre ploidias)			35,68***	15,31***	96,06***	32,67***	21,11***

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott; *** significativo ao nível de 0,1% de probabilidade de erro ($p < 0,001$); ** significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro ($p < 0,01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro ($0,01 < p < 0,05$)

Uma dose de 0,2% de colchicina também foi capaz de aumentar o tamanho dos estômatos de melissa em seu diâmetro polar e equatorial de $31,19 \pm 0,59 \mu\text{m}$ e $17,94 \pm 0,47 \mu\text{m}$ (controle) para $39,93 \pm 0,75 \mu\text{m}$ e $23,20 \pm 0,71 \mu\text{m}$ respectivamente,

além de reduzir a densidade estomática de 13,10+/- para $6,19 \pm 0,43$ (Talei e Fotokiam, 2020).

Em melancia, o diâmetro polar e equatorial de estômatos de poliploides induzidos também foi maior que seus controles no estudo elaborado por Khan *et al.* (2023). Segundo os autores, apesar de maiores, a sua quantidade diminuiu promovendo redução da densidade de estômatos. Da mesma forma, nas plantas de lírio tetraploides obtidas por Li, S. *et al.* (2020) a densidade de estômatos foliar ficava na faixa de 10,5 a 13,8 (plantas *in vitro* e *ex vitro* respectivamente) em comparação com as plantas diploides, com valores de 16,5 a 26,3 nas mesmas condições.

A diferença na dinâmica dos estômatos e de sua densidade (de aumento ou redução) em grupos com mixoploides ou tetraploides também foi identificada em *Neolamarckia cadamba*, uma árvore originária do sul e sudeste asiáticos, utilizada principalmente como ornamental, onde as dimensões dos estômatos apresentaram variações, com diâmetro polar e equatorial de 25,3 μm e 14,9 μm , 29,3 μm e 16,1 μm , e 30,7 μm e 16,6 μm para plantas tetraploides, mixoploides e octoploides respectivamente. A densidade estomática foi 426,7 estômatos por mm^2 nos tetraploides, 298,2 estômatos por mm^2 nos mixoploides e 301,8 estômatos por mm^2 nos octoploides (Eng; Ho; Ling, 2021). Em tetraploides induzidos de coentro (*Coriandrum sativum*) o comprimento dos estômatos e sua largura tinha praticamente o dobro dos presentes nas plantas diploides (Purbiya *et al.* 2021).

Samatadze *et al.* (2022) induziram plantas de *Polemonium caeruleum* a tetraploidia com uso de colchicina, e puderam observar que nestes indivíduos (tetraploides) os estômatos apresentavam também aumento no diâmetro estomático, mas ao contrário do que foi verificado com as *Mandevillas*, a densidade de estômatos aumentou em relação aos controles diploides. No trabalho de Wang, F. *et al.* (2023) também com uso de colchicina como indutor de poliploidia, mas em *Dendrobium wardianum*, os estômatos de plantas tetraploides apresentaram comprimento e largura maiores que seus controles diploides, e densidade de estômatos reduzida.

De fato, assumir um padrão de dimensão estomática e principalmente de densidade estomática diante de poliploides, é difícil, uma vez que o resultado deles é o mais diverso possível tornando difícil até mesmo usar tal parâmetro indireto como parâmetro de identificação de indivíduos poliploides.

5.6 Dimensões foliares

A variação nas dimensões foliares foi verificada para as cultivares MD 1296 e MD 1287. Para MD 1296 houve aumento do comprimento foliar no grupo exposto a colchicina por 48 horas (a 1% de significância em decorrência do fator dose) e aumento da largura de folhas nos tratamentos com colchicina por 24 e 48 horas (a 0,1% de significância decorrente tanto da dose quanto do tempo de exposição). Isso de fato é um importante sinal para maiores investigações entre os grupos tratados dessa cultivar, uma vez que pode indicar algum mixoploide que passou despercebido entre as amostras coletadas para o teste de citometria de fluxo. Isso pode ser justificado pois organismos mixoploides apresentam partes com diferentes ploidias na mesma planta, como endopoliploides ou quimeras, sendo alguns ramos diploides sem modificação da ploidia original da planta. Nos grupos da cultivar MD 1287 o tempo de exposição foi significativo ao nível de 1% para o comprimento foliar das plantas, reduzindo tal parâmetro em relação aos controles (e permanecendo indistintos entre si). Quanto a largura foliar, apenas a dose foi significativa, a um nível de 0,1%, levando a um aumento apenas para o grupo exposto à colchicina por 24 horas, em detrimento dos restantes. (Tabela 14).

Tabela 14. Comprimento (C) e largura (L) de folhas em condição *ex vitro*, decorrente do tratamento das plantas com colchicina por 24 e 48 horas *in vitro*

Dose (%)	Tempo (h)	MD 1480		MD 1296		MD 1287	
		C (cm)	L (cm)	C (cm)	L (cm)	C (cm)	L (cm)
0,0	24	3,99	2,72	3,89 B	2,18 Bb	5,27 A	2,00 B
	48	4,46	2,93	3,76 B	1,98 Bb	5,02 A	1,90 B
0,05	24	4,40	3,20	4,23 B	2,77 Aa	5,69 B	2,52 A
	48	4,21	2,90	4,45 A	2,28 Ab	5,02 B	2,17 B
F (dose)		0,08	1,09	7,59**	23,46***	2,72	9,57**
F (Tempo)		0,25	0,04	0,06	13,72***	4,26*	2,96
F (Interação)		1,45	1,39	0,84	2,62	0,46	0,97

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott; Letras maiúsculas referem-se ao fator dose, enquanto letras minúsculas indicam o fator tempo; *** significativo ao nível de 0,1% de probabilidade de erro ($p < 0,001$); ** significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro ($p < 0,01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro ($0,01 < p < 0,05$)

O parâmetro de espessura das folhas teve aumento a 0,1% de significância para as cultivares MD 1480 e MD 1287, decorrente do fator dose. Em ambos os

tratamentos com colchicina (24 e 48 horas) foi observado esse aumento da espessura média. A espessura dos tratamentos e controles da cultivar MD 1296 não diferiram entre si significativamente. Quanto à área foliar, não foi observada diferença entre tratamentos e controles para nenhuma das três cultivares (Tabela 15).

Tabela 15. Espessura (E) e área foliar (AF) em condição *ex vitro*, decorrente do tratamento das plantas com colchicina por 24 e 48 horas *in vitro*

Dose (%)	Tempo (h)	MD 1480		MD 1296		MD 1287	
		E (cm)	AF (cm ²)	E (cm)	AF (cm ²)	E (cm)	AF (cm ²)
0,0	24	0,21 B	16,30	0,19	10,14	0,21 B	12,92
	48	0,22 B	16,14	0,23	10,45	0,20 B	12,56
0,05	24	0,29 A	18,33	0,21	10,21	0,26 A	12,03
	48	0,27 A	16,54	0,22	10,03	0,29 A	10,50
F (dose)		19,28***	1,42	0,56	0,91	25,56***	2,02
F (Tempo)		0,03	0,92	2,12	0,14	0,62	0,83
F (Interação)		0,07	0,64	0,56	1,76	1,46	0,32

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott; Letras maiúsculas referem-se ao fator dose, enquanto letras minúsculas indicam o fator tempo; *** significativo ao nível de 0,1% de probabilidade de erro ($p < 0,001$); ** significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro ($p < 0,01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro ($0,01 < p < 0,05$)

Ao observar os tetraploides obtidos da cultivar MD 1480 – tanto do tratamento com colchicina por 24 horas quanto por 48 horas - o comprimento foliar pareceu variar em comparação com os controles e com o mixoploide identificado (apesar de não diferir na estatística de forma significativa dos controles). A espessura das folhas e a área foliar apresentaram resultados similares, no entanto, todos os poliploides identificados (tetraploides e mixoploides) tiveram aumento nesses parâmetros em comparação com os controles, mas não entre si. Para largura das folhas, nenhum dos fatores foi significativo, mantendo as médias de controles e tratamentos similares. Essas variações acabam por desmistificar os poliploides de sua sempre crescente produção de metabólitos e maior vigor (Tabela 16). Na figura 6 é possível perceber que de fato há mudanças na morfologia das folhas. As folhas do tetraploide 1 por exemplo apresentam um aspecto circular, embora a estatística comparativa apresentou significância para diferença no comprimento e área foliar (perceptíveis na imagem), revelando certo “achatamento da folha” e mantendo a largura sem variações de importância maior (Figura 11; Tabela 16).

A espessura da folha para a cultivar MD 1296 foi o único parâmetro que não sofreu alteração entre poliploides e controles desta cultivar. O comprimento, largura e área foliar apresentaram diferenças significativas entre os grupos. Os dois mixoploides identificados apresentaram aumento médio do comprimento foliar, e apenas um mixoploide apresentou aumento da largura foliar. Quanto à área foliar, apenas um mixoploide identificado apresentou redução de área foliar em relação ao outro mixoploide e aos controles (Tabela 17). Na cultivar MD 1287, boa parte dos poliploides apresentaram variações (aumentos e reduções) nas médias de todos os parâmetros foliares avaliados – comprimento, largura, espessura e área foliar. O tetraploide 2 identificado no tratamento com colchicina por 24 horas por exemplo apresentou o mesmo comprimento médio dos controles, diminuição da largura e da área foliar médias e aumento da espessura foliar, enquanto que o tetraploide 3 do mesmo tratamento apresentou aumento de todos esses parâmetros em relação aos controles. Modificações na morfologia e nas dimensões, portanto ocorrem nos poliploides e não seguem necessariamente estão ligados um ao outro, com aumentos ou reduções em conjunto e no mesmo sentido (Tabela 18).

Tabela 16. Comprimento (C), largura (L), espessura (E) e área foliar (AF) em condição *ex vitro*, de poliploides identificados nos grupos da cultivar MD 1480 tratados com colchicina *in vitro* por 24 e 48 horas

Dose (%)	Tempo (h)	Ploidia	Folha			
			C (cm)	L (cm)	E (cm)	AF (cm ²)
0	24	Controle	4,34 a	2,72	0,22 b	16,30 b
	48	Controle	4,11 a	2,93	0,20 b	16,14 b
0,05	24	Mixoploide	4,66 a	3,47	0,31 a	20,93 a
		Tetraploide 1	3,87 b	3,21	0,31 a	21,67 a
	48	Tetraploide 2	3,48 b	2,65	0,27 a	18,61 a
		Tetraploide 3	3,65 b	3,19	0,32 a	20,58 a
		Tetraploide 4	4,31 a	3,04	0,30 a	19,39 a
		F (entre ploidias)	2,94*	2,20	9,20***	3,92**

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott; *** significativo ao nível de 0,1% de probabilidade de erro ($p < 0,001$); ** significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro ($p < 0,01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro ($0,01 < p < 0,05$)

Tabela 17. Comprimento (C), largura (L), espessura (E) e área foliar (AF) em condição *ex vitro*, de poliploides identificados nos grupos da cultivar MD 1296 tratados com colchicina *in vitro* por 24 e 48 horas

Dose (%)	Tempo (h)	Ploidia	Folha			
			C (cm)	L (cm)	E (cm)	AF (cm ²)
0	24	Controle	3,89 b	2,18 b	0,19	10,14 a
	48	Controle	3,77 b	1,99 b	0,22	10,28 a
0,05	24	Mixoploide 1	4,23 a	2,77 a	0,21	6,98 b
		Mixoploide 2	4,45 a	2,28 b	0,20	9,96 a
F (entre ploidias)			2,83*	13,27***	1,08	12,40***

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott; *** significativo ao nível de 0,1% de probabilidade de erro ($p < 0,001$); ** significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro ($p < 0,01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro ($0,01 < p < 0,05$)

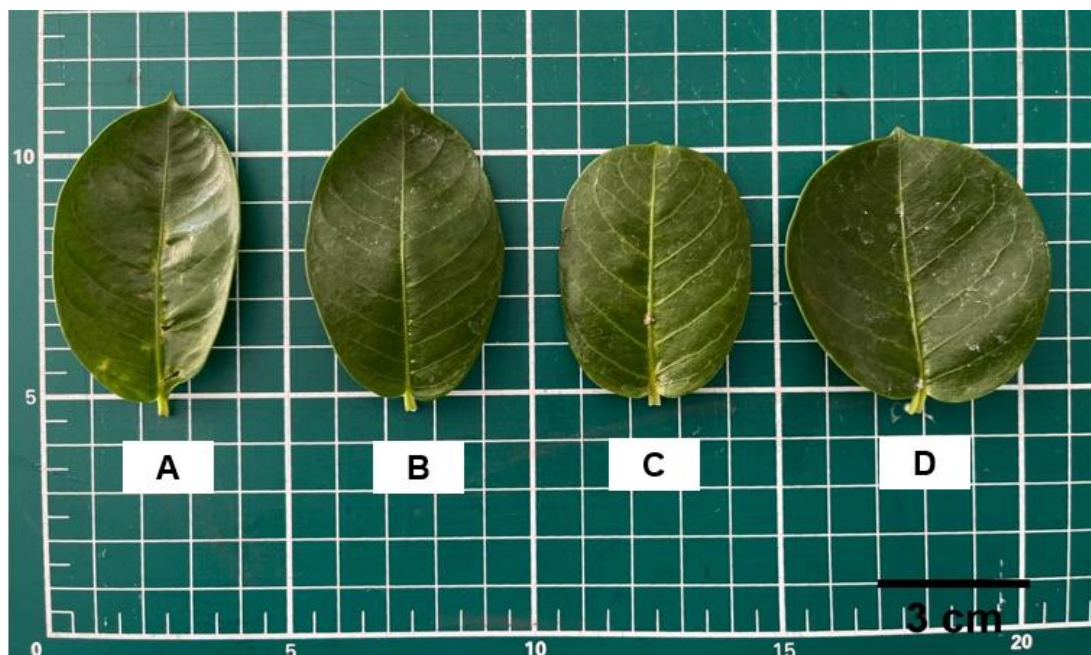
Tabela 18. Comprimento (C), largura (L), espessura (E) e área foliar (AF) em condição *ex vitro*, de poliploides identificados nos grupos da cultivar MD 1287 tratados com colchicina *in vitro* por 24 e 48 horas

Dose (%)	Tempo (h)	Ploidia	Folha			
			C (cm)	L (cm)	E (cm)	AF (cm ²)
0	24	Controle	5,13 c	2,00 e	0,21 b	12,92 a
	48	Controle	5,16 c	1,90 e	0,20 b	12,56 a
0,05	24	Tetraploide 1	5,51 b	2,96 b	0,24 b	10,99 a
		Tetraploide 2	5,26 c	2,55 d	0,31 a	6,74 c
		Tetraploide 3	6,31 a	3,28 a	0,28 a	11,96 a
		Tetraploide 4	5,68 b	2,79 c	0,29 a	8,94 b
	48	Tetraploide 5	4,55 d	1,96 e	0,25 a	5,53 c
		Tetraploide 6	4,53 d	2,50 d	0,25 a	7,08 c
		Tetraploide 7	5,32 c	2,62 d	0,29 a	9,17 b
		Tetraploide 8	5,65 b	2,85 c	0,26 a	11,63 a
F (entre ploidias)			8,16***	20,75***	3,95***	12,33***

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott; *** significativo ao nível de 0,1% de probabilidade de erro ($p < 0,001$); ** significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro ($p < 0,01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro ($0,01 < p < 0,05$)

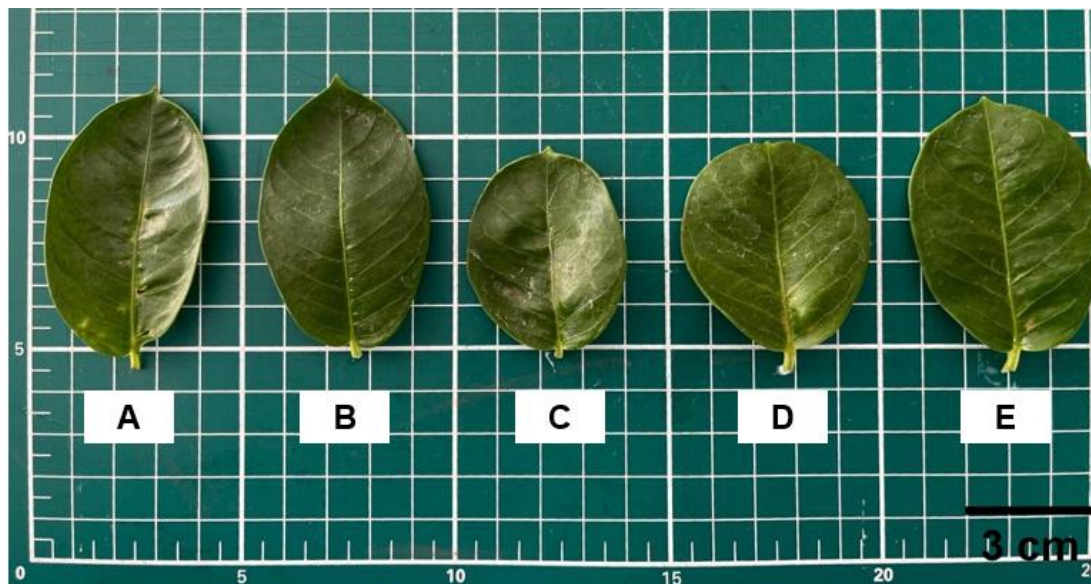
Na figura 12 é possível perceber que as folhas dos tetraploides aparentam também aumento na largura, contudo apenas o tetraploide 2 (tratamento com colchicina por 48 horas) apresentou diferença significativa dos outros indivíduos, sendo esta a redução no comprimento foliar.

Figura 11. Características morfológicas das folhas de MD 1480 tratadas ou não com colchicina por 24 horas



Folhas de plantas da cultivar MD 1480 (A e B) tratamento controle; (C) Mixoploide oriundo do tratamento com colchicina por 24 horas; (D) Tetraploide 1, oriundo do tratamento com colchicina por 24 horas.

Figura 12. Características morfológicas das folhas de MD 1480 tratadas ou não com colchicina por 48 horas



Folhas de plantas da cultivar MD 1480 (A e B) tratamento controle; (C) Tetraploide 2, oriundo do tratamento com colchicina por 48 horas; (D) Tetraploide oriundo do tratamento com colchicina por 48 horas; (E) Tetraploide 4, oriundo do tratamento com colchicina por 48 horas.

Em melancia, a exposição de sementes a uma dose de 0,5% de colchicina acarretou redução no tamanho de folhas totalmente desenvolvidas em metade do tamanho de folhas de controle (Khan *et al.* 2023). Isso, como observado neste trabalho, onde em alguns casos o tratamento com antimitótico promoveu redução dos parâmetros de poliploides, pode ser pautado pelo fato de que nem sempre o aumento no tamanho das células é acompanhado por um aumento no número de células (Robinson *et al.* 2018).

No estudo de Narukulla (2023), a dinâmica diversa de resultados aqui expostos sobre os poliploides encontra semelhante, com o aumento do comprimento foliar de tetraploides de limão rugoso e de Alemow em relação a diploides controles, e uma redução quase que pela metade do comprimento foliar de um tetraploide de lima Rangpur em comparação com um diploide correspondente. A largura foliar de todos os tetraploides foi significativamente superior aos diploides para as três cultivares de porta-enxerto, no entanto, os mixoploides identificados de limão rugoso e Alemow perderam largura foliar ou continuaram sem diferença significativa dos controles. A espessura foliar foi um fator altamente dependente do genótipo pois os valores encontrados para a cultivar limão rugoso foram 1.975c cm, 2.150a cm, e 1.050b cm para tetraploide, mixoploide e diploide respectivamente, 2.050a cm, 2.250b cm e 1.025c cm para tetraploide, mixoploide e diploide de Alemow, e 0.625b cm e 1.350^a cm para tetraploide e diploide, nessa ordem, de lima Rangpur.

Nesse mesmo sentido, Zhang, Y. *et al.* (2019) verificaram que o segundo, quarto e sexto pares de folhas - a partir do ápice - de *Populus* triploides apresentaram aumento significativo da área foliar em comparação com diploides. Em tetraploides de bétula (*Betula pendula* subsp. *pendula*) a área foliar também foi superior à de plantas diploides (Zhang, X. *et al.* 2022).

Em tetraploides induzidos de *Salvia officinalis* também foi verificado aumento da largura foliar em relação a plantas diploides, sendo igual a 1.3 ± 0.03 cm nas plantas tetraploides e 1.07 ± 0.04 cm nas diploides (Hassanzadeh, Zakaria e Azad, 2020). Bhattarai, Kareem e Deng (2021) investigando as alterações morfológicas em gérbera (*Gérbera hybrida*) exposta à colchicina, observaram que tetraploides obtidos possuíam largura e espessura foliar maior que a encontrada em plantas diploides, contudo o comprimento foliar não diferia significativamente entre elas.

No trabalho de Mo *et al.* (2020), as folhas de poliploides de *Rhododendron fortunei*, tetraploides e octaploides, eram mais arredondadas, mais grossas, com superfície mais áspera e mais duras que as de diploides, além de muito menores. A largura de folhas de plantas tetraploides (induzidos) de lírios (*Lilium davidii* var. *unicolor*) foi reportada como uma variação morfológica notável (Li *et al.* 2019), assim como em tetraploides de híbridos de gérbera (*Gérbera jamesonii* Bolus ex Hooker f.) (Mahanta *et al.* 2023).

Em síntese, os parâmetros foliares apresentaram bastante heterogeneidade, contudo, outro ponto que embora não tenha sido medido aqui, mas que foi facilmente observado, foi o desenvolvimento dos poliploides, visivelmente mais lento que o das plantas controles. Quando uma poda para coleta de material era realizada em uma planta poliploide e outra em uma planta do grupo controle, esta última brotava e crescia muito mais rapidamente. O crescimento atrofiado também foi relatado em plantas tetraploides (induzidas por colchicina) de Kiwi *Actinidia chinensis* em detrimento de plantas diploides (Li, S. *et al.* 2019) e de lírios (*Lilium davidii* var. *unicolor*) também, excetuando que neste último caso isso ocorreu somente durante o primeiro ano de cultivo das plantas (Li, S. *et al.* 2019). Mahanta *et al.* (2020) puderam observar que plantas tetraploides induzidas de gérbera apresentavam maior lentidão no crescimento geral e de novas brotações, embora fossem mais vigorosas.

Quando aplicada em sementes de melancia (condição *in vitro*), o uso de colchicina ocasionou velocidade de germinação reduzida, além disso o tempo até a floração das plantas foi diferente dos grupos controles - o tratamento com 0,05% de colchicina por 72 horas resultou no maior número de dias até a floração (primeira flor masculina) , com uma média de 61,0 dias enquanto que seu controle (contato com água por 72 h) levou em média 46,0 dias até a primeira flor masculina (Khan *et al.* 2023).

5.7 Dimensões das flores

As dimensões de comprimento, largura e altura das flores das três cultivares (controles e tratamentos) não apresentaram diferenças significativas para nenhum dos fatores, dose, tempo e sua interação (Tabela 19). Os botões, por sua vez, apresentaram resultados similares, sendo que o comprimento e a largura não

variaram para MD 1480 e MD 1296 entre controles e tratamentos. Na cultivar MD 1287 o comprimento dos botões também não apresentou variação entre tratamentos e controles, mas a largura sim, com aumento de seu valor médio nos tratamentos de exposição à colchicina em relação aos controles (Tabela 20).

Tabela 19. Comprimento (C), largura (L) e altura de flores (H) em condição *ex vitro*, decorrente do tratamento das plantas com colchicina por 24 e 48 horas *in vitro*

Dose (%)	Tempo (h)	MD 1480			MD 1296			MD 1287		
		C (cm)	L (cm)	H (cm)	C (cm)	L (cm)	H (cm)	C (cm)	L (cm)	H (cm)
0,0	24	4,657	4,880	2,476	3,783	3,712	2,005	4,022	4,113	2,624
	48	4,022	4,400	2,295	4,003	4,292	2,024	4,041	4,163	2,625
0,05	24	4,382	4,521	2,210	3,848	3,920	1,934	3,958	4,174	2,583
	48	4,376	4,569	2,245	4,036	4,195	1,980	4,611	4,834	2,636
F (dose)		0,04	0,17	4,29	0,05	0,06	0,46	0,78	1,24	0,02
F (Tempo)		2,43	0,87	0,92	0,85	3,31	0,15	1,38	1,17	0,06
F (Interação)		2,35	1,31	1,99	0,01	0,42	0,03	1,22	0,87	0,05

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott; Letras maiúsculas referem-se ao fator dose, enquanto letras minúsculas indicam o fator tempo; *** significativo ao nível de 0,1% de probabilidade de erro ($p < 0,001$); ** significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro ($p < 0,01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro ($0,01 < p < 0,05$)

Tabela 20. Comprimento (C) e largura (L) de botões em condição *ex vitro*, decorrente do tratamento das plantas com colchicina por 24 e 48 horas *in vitro*

Dose (%)	Tempo (h)	MD 1480		MD 1296		MD 1287	
		C (cm)	L (cm)	C (cm)	L (cm)	C (cm)	L (cm)
0,0	24	3,384	0,623	3,014	0,610	3,665	0,580 B
	48	3,482	0,700	2,791	0,583	3,473	0,551 B
0,05	24	3,417	0,776	2,969	0,673	3,436	0,665 A
	48	3,433	0,630	3,073	0,651	3,459	0,653 A
F (dose)		0,001	0,34	0,68	0,78	1,15	15,17***
F (Tempo)		0,05	0,24	0,17	0,11	0,56	0,75
F (Interação)		0,02	2,47	1,30	0,001	0,91	0,15

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott; Letras maiúsculas referem-se ao fator dose, enquanto letras minúsculas indicam o fator tempo; *** significativo ao nível de 0,1% de probabilidade de erro ($p < 0,001$); ** significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro ($p < 0,01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro ($0,01 < p < 0,05$)

As dimensões das corolas das flores dos poliploides puderam ser coletados apenas da cultivar MD 1287, devido ao fato de que a cultivar MD 1480, apesar de ter florescido ao longo de alguns meses, teve que passar por uma poda após o aparecimento de sintomas virais, a partir da qual sua floração não teve tempo de recomeçar até a completa coleta de dados. A cultivar MD 1296 não emitiu flores em momento algum. Dos 8 tetraploides da cultivar MD 1287 identificados, 3 não floriram,

destes 3, 2 apresentavam folhas com bordas irregulares e que quebravam com muita facilidade e destes 2, 1 morreu após uma troca de substrato. Das cinco plantas tetraploides que produziram flores – 3 oriundas do tratamento com colchicina por 24 horas e 2 do tratamento por 48 horas – apenas 2 oriundas do tratamento por 48 horas apresentaram aumento significativo do comprimento e da largura da corola floral em detrimento dos outros poliploides e dos controles diploides. A altura do tubo floral não mostrou alteração entre os tetraploides e controles exceto para um tetraploide obtido do tratamento com colchicina por 24 horas, que apresentou redução desse parâmetro (Tabela 21).

Tabela 21. Comprimento (C), largura (L), altura de flores (H) e comprimento (C) e largura (L) de botões em condição *ex vitro*, de poliploides identificados nos grupos da cultivar MD 1287 tratados com colchicina *in vitro* por 24 e 48 horas

Dose (%)	Tempo (h)	Ploidia	Flor			Botão	
			C (cm)	L (cm)	H (cm)	C (cm)	L (cm)
0	24	Controle	3,896 b	4,008 b	2,652 a	3,665 a	0,580 b
	48	Controle	4,016 b	4,178 b	2,668 a	3,473 a	0,551 b
0,05	24	Tetraploide 1	3,686 b	3,831 b	2,278 b	3,012 b	0,658 a
		Tetraploide 3	4,244 b	4,459 b	2,553 a	2,733 b	0,671 a
	48	Tetraploide 4	4,216 b	4,122 b	2,686 a	2,904 b	0,669 a
		Tetraploide 7	5,068 a	5,268 a	2,649 a	2,764 b	0,645 a
	48	Tetraploide 8	4,916 a	4,873 a	2,647 a	2,948 b	0,651 a
F (entre ploidias)			4,587***	3,607**	4,286**	5,359***	2,565*

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott; *** significativo ao nível de 0,1% de probabilidade de erro ($p < 0,001$); ** significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro ($p < 0,01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro ($0,01 < p < 0,05$)

Na figura 13 uma flor do tetraploide 3 (tratamento de exposição a colchicina por 24 horas) pode ser comparada com a flor de uma planta controle. Embora a estatística não tenha mostrado diferença significativa, é possível notar um leve aumento no tamanho da flor. Na figura 14, a pétala do mesmo tetraploide pode ser visualizada ao lado da pétala do controle diploide e verifica-se que a pétala poliploide ganhou um aspecto circular em comparação com o aspecto de meia lua, presente no diploide. Já na figura 15 a flor do tetraploide 4 aparenta aspecto menor que a do controle diploide, embora também não tenha apresentado diferença significativa na

estatística. Nesse mesmo tetraploide as pétalas apresentaram um efeito de ponta no centro da pétala, como um bico (figura 16).

Figura 13. Características morfológicas das flores de MD 1287 tratada e não tratada com colchicina (primeira amostra)



(a) Vista frontal de flores da cultivar MD 1287; (b) Vista lateral de flores da cultivar MD 1287- a esquerda em ambas as imagens a flor é um tetraploide (tetraploide 3), e a direita diploide

Figura 14. Pétalas da cultivar MD 1287 poliploide e diploide

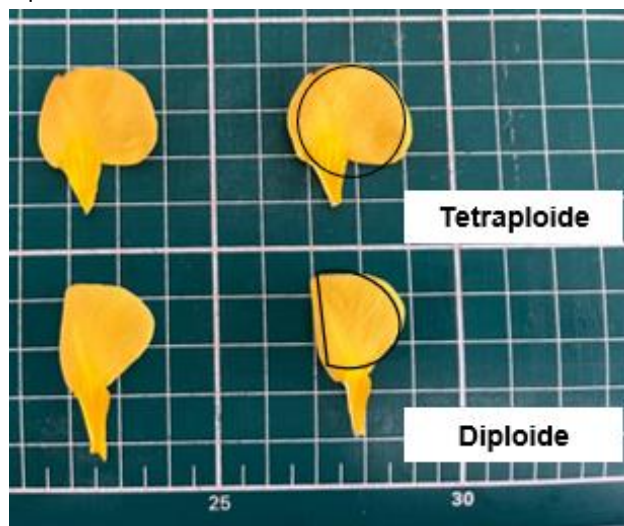
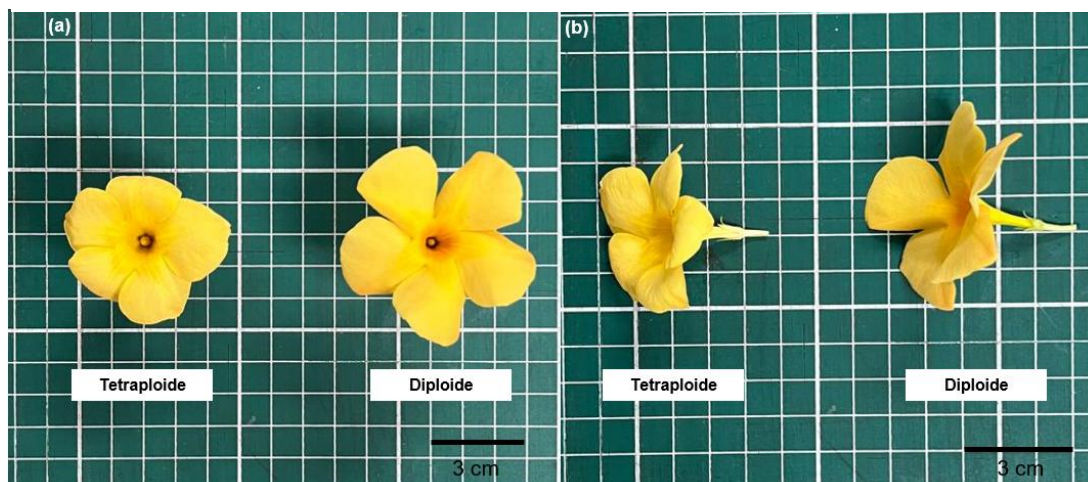
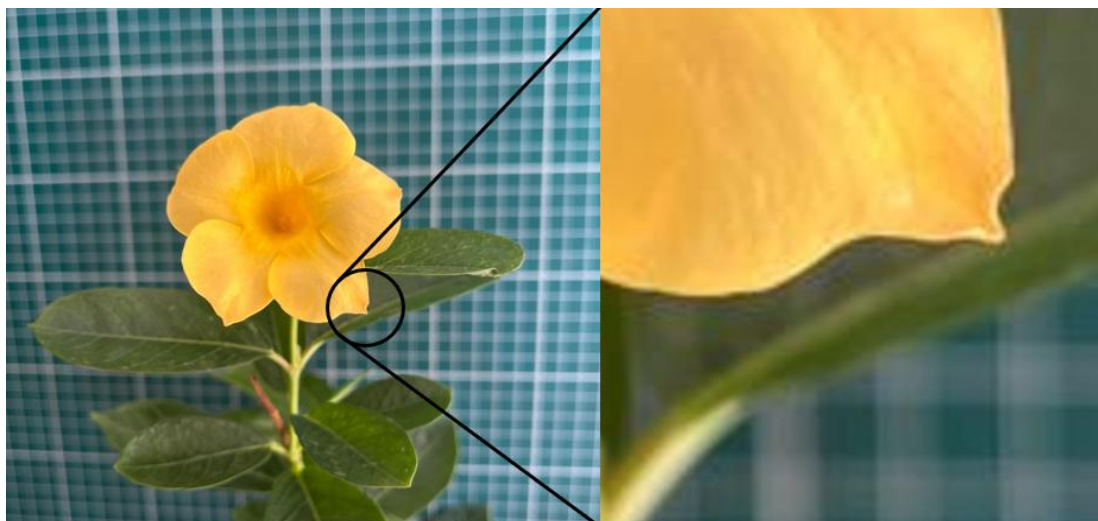


Figura 15. Características morfológicas das flores de MD 1287 tratada e não tratada com colchicina (segunda amostra)



(a)Vista frontal de flores da cultivar MD 1287; (b)Vista lateral de flores da cultivar MD 1287; A esquerda em ambas as imagens a flor é tetraploide (tetraploide 4), e a direita diploide

Figura 16. Flor de planta da cultivar MD 1287 tetraploide obtida do tratamento de exposição a colchicina por 24 horas



Detalhe da borda da pétala da flor tetraploide 4, com a formação de afilamento

Corroborando os resultados para flores de *Mandevilla* - enquanto grupo tratado - aqui expostos, no estudo de Becker *et al.* (2022) também não foi possível encontrar aumento consistente e confiável no tamanho das flores de *Oxalis purpurea* L. entre os poliploides e os diploides. Em resumo, embora existam evidências do efeito gigas a níveis celulares, os resultados gerais indicam que o aumento de tamanho não é consistente quando se observa características da flor.

No trabalho de Asoko *et al.* (2020) com crisântemos (*Dendranthemum grandiflora* cv.), a dosagem de 0,15% de colchicina por 12 horas de exposição

promoveu o surgimento de pétalas de dupla camada. Em *lisianthus* (*Eustoma grandiflorum*), embora tenham sido notadas alterações fenotípicas da flor entre tetraploide e diploide, a análise de regressão não revelou relação significativa entre a ploidia e o aumento no tamanho da flor (Li, F. *et al.* 2022). Também não houve variação significativa no tamanho das flores entre plantas controle e plantas tetraploides de *Nigella sativa* L. resultantes de tratamento com colchicina. No entanto, as pétalas das plantas tetraploides eram mais largas, e o número de loculações foi maior em comparação com as plantas diploides controle (Verma; Hariwal; Kumar, 2024).

Já em relação às análises comparativas entre indivíduos diploides e tetraploides, em *carambola* (*Averrhoa carambola* L. cultivar 'B17'), da mesma forma que para os tetraploides 7 e 8 da cultivar MD 1287, a corola de flores tetraploides apresentou aumento significativo de tamanho em relação a de flores triploides e de diploides, $10.76 \pm 0.17a$ cm, $9.91 \pm 0.09b$ cm, e $7.29 \pm 0.03c$ cm respectivamente (Hu *et al.* 2021). Nesse mesmo sentido, a corola floral de tetraploides de *Melissa officinalis* foi significativamente maior que de plantas diploides, resultando em valores médios de largura iguais a $6.19 \pm 0.32a$ e $4.76 \pm 0.28b$ respectivamente (Bharati *et al.* 2023).

A imersão de *Zinnia elegans* em colchicina levou a flores com alturas e diâmetros maiores. Especificamente, o tratamento com a imersão mais longa (72 horas) produziu flores com o maior tamanho, incluindo um diâmetro de flor mais largo. Além disso, o tratamento de imersão em colchicina por 48 horas resultou na maior largura de pétalas (Kusumawati; Haryanto; Wijaya, 2024).

Além das dimensões florais, o crescimento das plantas poliploides do presente trabalho foi notadamente mais lento que o de controles diploides como já relatado, e a floração também se mostrou mais demorada e em menor quantidade que a floração das plantas diploides. Enquanto os dados de floração das plantas diploides puderam ser completamente coletados em poucas semanas, os dados de floração das plantas tetraploides e mixoploides levaram meses e foram coletados com intervalos maiores que os primeiros.

Isso em um primeiro momento foi observado com cautela, uma vez que poderia ser resultado de fitotoxicidade pelo contato com a colchicina, no entanto, plantas diploides que foram submetidas ao contato com o antimitótico e não tiveram alteração

em sua ploidia floresciam ao mesmo ritmo de plantas que não foram expostas à colchicina.

5.8 Coloração das flores

As mudanças de coloração verificadas em flores de plantas poliploides podem ser resultado de fatores como o aumento do conteúdo de pigmentos – antocianinas ou carotenoides – nas pétalas, assim como a variação no tamanho das células cônicas na superfície da pétala, que pode gerar variação na reflexão do espectro de luz, modificando aspectos de profundidade da coloração (Ghanbari *et al.* 2019).

Contudo, a cor é algo extremamente subjetivo, dependente dos olhos do observador, o que torna difícil quantificá-la sem um sistema preciso. Em face de tal situação, o sistema CIELAB foi elaborado. Esse sistema permite a expressão da cor através de valores relacionados com a percepção dela, onde L mede a luminosidade da cor, a , uma coordenada entre o vermelho e o verde (cores opostas) e b , fornece uma coordenada entre o amarelo e o azul (cores opostas). O espectrofotômetro CM-26d (Konica Minolta®) mede a refletância espectral, fornecendo os dados em coordenadas $L^*a^*b^*$, que representam a cor percebida.

Entre os tratamentos, os parâmetros luminosidade (L), componente verde-vermelho (a) e componente azul-amarelo (b) se apresentaram distintos entre as três cultivares. Para a cultivar MD 1480, a dose teve efeito significativo sobre L e a , e a interação entre dose e tempo teve efeito significativo sobre b . O grupo exposto a colchicina por 48 horas apresentou redução da luminosidade (L) em comparação com os controles e o grupo exposto a colchicina por 24 horas, tornando a amostra mais escura. O grupo exposto ao antimitótico por 24 horas apresentou tendência para uma cor mais próxima do vermelho em relação aos controles e ao grupo exposto à colchicina por 48 horas, o que pode sugerir o acúmulo de pigmentos vermelhos ou a redução de pigmentos verdes, causando uma mudança na tonalidade da cor. Já em relação ao parâmetro b , os grupos expostos a colchicina tiveram uma redução de pigmentos amarelos ou aumento de pigmentos azuis (Tabela 22). Para a cultivar MD 1296 não houve diferença significativa entre os grupos para os parâmetros L e a . O parâmetro b apresentou aumento nos grupos expostos a colchicina (indistintos entre 24 horas ou 48 horas), um indicativo de aumento dos pigmentos amarelos, ou redução

dos azuis, decorrentes dos fatores dose e tempo (Tabela 22). Os três parâmetros de cor apresentaram-se com diferenças significativas para a cultivar MD 1287. Houve redução do brilho (L) no grupo tratado com colchicina por 24 horas, enquanto que o grupo tratado por 48 horas apresentou um valor de a menor que os controles e o tratamento com colchicina por 24 horas, indicando redução de pigmentos vermelhos ou aumento de pigmentos verdes. Os grupos expostos a colchicina ainda tiveram redução do parâmetro b em relação aos controles, permitindo deduzir diminuição de pigmentos amarelos ou aumento de pigmentos azuis (Tabela 22).

Tabela 22. Parâmetros de cor em flores de plantas submetidas ou não a colchicina em diferentes tempos de tratamento

Dose (%)	Tempo (h)	MD 1480			MD 1296			MD 1287		
		L	a	b	L	a	b	L	a	b
0,0	24	74,08 A	23,10 B	54,87 Aa	74,34	23,68	51,96 Ab	80,62 Aa	12,27 Aa	66,39 A
	48	74,80 A	22,06 B	52,57 Aa	73,45	25,76	60,48 Ab	80,29 Aa	12,56 Aa	66,02 A
0,05	24	74,98 A	27,37 A	46,59 Ab	72,13	27,09	63,78 Aa	77,75 Ab	12,69 Aa	55,40 B
	48	72,30 B	21,58 B	44,07 Ab	72,61	26,02	67,47 Aa	81,94 Aa	9,58 Ab	59,16 B
F (dose)		5,525*	6,864*	0,002	2,889	1,642	18,10***	0,386	2,119	12,311***
F (Tempo)		1,226	2,109	1,060	0,053	0,125	9,955**	3,942	2,706	0,462
F (Interação)		1,825	3,300	12,908***	0,593	1,215	1,946	5,196*	3,760*	0,658

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott; Letras maiúsculas referem-se ao fator dose, enquanto letras minúsculas indicam o fator tempo; *** significativo ao nível de 0,1% de probabilidade de erro ($p < 0,001$); ** significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro ($p < 0,01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro ($0,01 < p < 0,05$)

Nas comparações planta a planta, realizada apenas para a cultivar MD 1287 devido ao florescimento lento, os parâmetros L , a e b apresentaram diferenças significativas entre os controles e duas plantas tetraploides obtidas no tratamento de exposição a colchicina por 24 horas. Foi verificada redução de brilho (L) e do parâmetro a – menos pigmentos vermelhos ou mais verdes – para um dos tetraploides oriundos do grupo exposto a colchicina por 24 horas. Esse mesmo tetraploide apresentou o menor valor para o parâmetro b , indicativo de perda de pigmentos amarelos ou ganho de pigmentos azuis, enquanto que o outro tetraploide (3) apresentou um aumento destes parâmetros, ou seja, teve aumento da quantidade de pigmentos amarelos ou diminuição dos azuis (Tabela 23).

Tabela 23. Parâmetros de cor de flores de poliploides oriundos de plantas submetidas a diferentes tempos de exposição a colchicina

Dose (%)	Tempo (h)	Ploidia	Flor		
			L	a	b
0	24	Controle	80,62 a	12,27 a	66,39 b
	48	Controle	80,29 a	12,56 a	66,01 b
0,05	24	Tetraploide 3	80,24 a	13,24 a	71,76 a
		Tetraploide 4	76,21 b	7,56 b	52,08 c
F (entre ploidias)			56,33***	33,92***	112,6***

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott; *** significativo ao nível de 0,1% de probabilidade de erro ($p < 0,001$); ** significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro ($p < 0,01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro ($0,01 < p < 0,05$)

Além de avaliar parâmetro a parâmetro das cores, é possível calcular ΔE , como exposto na formula III a seguir. Esse valor evidencia a diferença entre as cores medidas, uma vez que une os três parâmetros em um só. Isso contudo depende do estabelecimento de padrões e referências que podem ou não ser subjetivos. Para efeito de compreensão da diferença entre os tetraploides e seus controles, na figura 17 são apresentados os valores calculados para ΔE de dois tetraploides e de dois controles da cultivar MD 1287. Quanto maior a diferença entre dois valores de ΔE mais fácil é diferenciar a cor entre duas amostras, considerando claro, o aspecto subjetivo.

$$(III) \quad \Delta E = [\Delta_L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2] \div 1/2$$

Figura 17. Quadro de diferença entre cores entre plantas tetraploides e diploides da cultivar MD 1287

Plantas	ΔE
Tetraploide 3 vs Controle 24h	2,68
Tetraploide 3 vs Controle 48 h	6,73
Tetraploide 4 vs Controle 24 h	19,08
Tetraploide 4 vs Controle 48 h	16,03

Em um estudo realizado *in vitro* com crisântemo (*Dendranthemum grandiflora* cv.), cujos tratamentos foram 4 concentrações de colchicina (0%, 0,05%, 0,1%, 0,15% e 0,2%) em dois tempos de contato (12 e 24 horas) foram verificadas alterações na morfologia das plantas e na coloração das flores. O tratamento com 0,1% por 12 horas alterou cor das flores de roxo para rosa-alaranjado enquanto que os tratamentos com 0,05% e 0,1% de colchicina por 24 horas alteraram para laranja claro e laranja sólido respectivamente (Asoko *et al.* 2020).

Xie *et al.* (2024) em seu estudo de indução de poliploidia em *Begonia x benariensis*, observou que algumas de suas plantas poliploides apresentavam flores em um tom vermelho mais forte que o da flor da planta controle, em tons rosados. Esse aumento de intensidade também foi observado por Deans *et al.* (2021), quando induziram poliploidia em três cultivares de hortênsia, *Hydrangea macrophylla* 'David Ramsey', *H. macrophylla* 'MAK20', e *Hydrangea macrophylla* 'Robert', que por meio da análise de cor utilizando os parâmetros CIELAB, verificaram que as plantas tetraploides de 'MAK20' e 'Robert' se tornaram um pouco mais escuras e avermelhadas em comparação com seus controles diploides, possivelmente devido a um aumento de antocianinas nas sépalas. No entanto, para a cultivar 'David Ramsey', não foram observadas diferenças significativas na cor entre os diploides e tetraploides.

Apesar de não medir um parâmetro diretamente relacionado com a percepção da cor pelo olho humano, o trabalho de Al-jubouri e Alqaisi (2023) avaliou a biossíntese de antocianinas em *Petunia hybrida* L., pigmentos relacionados a cor nas flores, e verificaram que o tratamento de exposição à dose de 0,5% de colchicina por 36 horas promoveu a maior porcentagem de antocianinas nas pétalas, igual a 7,01%, enquanto que a porcentagem encontrada no controle foi igual a 3,67%.

Em contrapartida Bharati *et al.* (2023) reportaram que em *Melissa officinalis* L., a cor das flores de plantas tetraploides permaneceu igual a cor das flores diploides. Já em flores de orquídea *Phalaenopsis* spp. cultivar Shu Long 'TS2904', botões

tratados com colchicina 0,1% por 2 dias, geraram flores com desvanecimento da cor original, perdendo intensidade em comparação com os controles (Samanhudi *et al.* 2023). Em poliploides induzidos de *Portulaca grandiflora*, apesar de surgirem modificações na cor e forma de caules e folhas, não foram verificadas alterações significativas na cor das flores em nenhum dos quatro genótipos analisados (Aisyah *et al.* 2024).

Em *Persicaria tinctoria*, não foi significativo o aumento no conteúdo de índigo por unidade de peso nas flores de plantas hexaploides em relação a flores de plantas tetraploides. Portanto, apesar das hexaploides terem características morfológicas aumentadas em relação a plantas tetraploides, como o tamanho das células estomáticas, o aumento da ploidia não se traduziu em um aumento no conteúdo de pigmento (Kawakami *et al.* 2021). O aumento da ploidia, portanto, nem sempre promove aumento da coloração, podendo reduzi-la, ou mesmo alterar sua tonalidade.

5.9 Eficiência fotossintética

As medidas realizadas com o fluorômetro e porômetro combinados (LI-600 da LI-COR®) forneceram parâmetros para avaliar simultaneamente a fluorescência da clorofila e a condutância estomática. O rendimento quântico do fotossistema II (Fv/Fm) e os dados de taxa de transporte de elétrons (ETR) permitiram estimar a capacidade fotossintética da planta e possíveis sinais de estresse.

Os dados de condutância estomática (gs) medem a abertura dos estômatos, indicando o quanto de vapor d'água está sendo perdido e o quanto de CO₂ está entrando na folha, e apresentaram significância em relação aos tratamentos apenas para a cultivar MD 1296, advinda da interação entre dose e tempo, a um nível de 5%. O grupo tratado com colchicina por 48 horas apresentou redução de tal parâmetro, portanto houve menor abertura estomática e menor troca gasosa nesse grupo (Tabela 24).

A eficiência quântica do PSII (Fv/Fm) mede a fração de fótons absorvidos pelo fotossistema II (PSII) que são usados efetivamente no transporte de elétrons, sendo que valores mais altos indicam maior eficiência no uso da luz para a fotossíntese. Nesse parâmetro, as três cultivares não apresentaram grupos com diferenças significativas entre os valores médios.

A Taxa de Transporte de Elétrons (ETR) indica o fluxo de elétrons no PSII, estimando a taxa de fotossíntese, e valores altos sugerem uma fotossíntese mais ativa. Entre as avaliações de tratamento, a única que não apresentou diferenças entre as médias foi a cultivar MD 1287. O fator tempo e a interação entre dose e tempo foram significativos a 5% para a cultivar MD 1480, sendo que o tratamento de exposição à colchicina por 24 horas apresentou uma fotossíntese menos ativa que o tratamento de 48 horas e os controles. Na cultivar MD 1296, os tratamentos expostos a colchicina também resultaram em fotossíntese menos ativa em oposição aos controles, decorrendo apenas do fator dose a 1% de significância (Tabela 24).

Tabela 24. Parâmetros fotossintéticos em plantas submetidas ou não a colchicina em dois tempos de tratamento

Dose (%)	Tempo (h)	MD 1480			MD 1296			MD 1287		
		gs (mol m ⁻² s ⁻¹)	Fv/Fm	ETR (μmol e ⁻ m ⁻² s ⁻¹)	gs (mol m ⁻² s ⁻¹)	Fv/Fm	ETR (μmol e ⁻ m ⁻² s ⁻¹)	gs (mol m ⁻² s ⁻¹)	Fv/Fm	ETR (μmol e ⁻ m ⁻² s ⁻¹)
0,0	24	0,10	0,73	48,892 Aa	0,07 Aa	0,76	45,081 A	0,15	0,75	47,494
	48	0,04	0,71	45,942 Aa	0,14 Aa	0,73	44,069 A	0,08	0,69	45,536
0,5	24	0,02	0,73	42,827 Ab	0,09 Aa	0,74	41,658 B	0,08	0,72	47,049
	48	0,13	0,72	50,413 Aa	0,04 Ab	0,77	41,854 B	0,11	0,73	48,435
F(dose)		0,008	0,024	0,151	2,112	0,529	7,713**	0,696	1,982	0,460
F(tempo)		1,786	1,048	4,432*	0,266	1,914	0,038	0,048	0,780	0,025
F(interação)		4,173	0,354	6,574*	5,473*	3,145	0,351	3,228	2,211	0,854

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott; Letras maiúsculas referem-se ao fator dose, enquanto letras minúsculas indicam o fator tempo; *** significativo ao nível de 0,1% de probabilidade de erro ($p < 0,001$); ** significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro ($p < 0,01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro ($0,01 < p < 0,05$). gs – Condutância estomática; Fv/Fm – Eficiência quântica do fotossistema II; ETR – Taxa de transporte de elétrons.

A comparação entre as plantas poliploides mostrou uma dinâmica um pouco diferente. Os poliploides da cultivar MD 1480 apresentaram valores de condutância estomática e taxa de transporte de elétrons distintos entre alguns poliploides e controles. O tetraploide 2 teve um aumento do valor de abertura estomática e troca gasosa, o que pode ser decorrente do aumento das células guarda estomáticas já que não vem acompanhado de maiores valores de taxa de transporte de elétrons indicando uma fotossíntese mais eficiente (Tabela 25).

A eficiência quântica do PSII não se mostrou diferente entre poliploides e diploides da cultivar MD1480, e a taxa de transporte de elétrons foi significativamente reduzida para a maior parte dos poliploides – o único mixoploide e os três tetraploides oriundos do tratamento por 48 horas – em relação aos controles e a um tetraploide (24h de exposição à colchicina), indicando uma fotossíntese menos ativa (Tabela 25).

Tabela 25. Parâmetros fotossintéticos de poliploides de MD 1480 obtidas da exposição a colchicina em dois tempos de tratamento

Dose (%)	Tempo (h)	Ploidia	MD 1480		
			gs (mol m ⁻² s ⁻¹)	Fv/Fm	ETR (μmol e ⁻ m ⁻² s ⁻¹)
0	24	Controle	0,04 b	0,75	42,586 a
	48	Controle	0,08 b	0,72	45,352 a
0,05	24	Mixoploide	0,05 b	0,76	38,743 b
		Tetraploide 1	0,02 b	0,72	41,157 a
	48	Tetraploide 2	0,28 a	0,75	33,985 b
		Tetraploide 3	0,04 b	0,74	35,131 b
		Tetraploide 4	0,02 b	0,73	38,416 b
		F (entre ploidias)	3,153*	0,912	5,298**

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott; *** significativo ao nível de 0,1% de probabilidade de erro ($p < 0,001$); ** significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro ($p < 0,01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro ($0,01 < p < 0,05$); gs – Condutância estomática; Fv/Fm – Eficiência quântica do fotossistema II; ETR – Taxa de transporte de elétrons.

Em relação a cultivar MD 1296, nenhum dos parâmetros de eficiência fotossintética foi significativamente distinto entre mixoploides e diploides. Uma possível explicação é a própria mixoploidia, que promove o crescimento de tecidos diploides junto a poliploides, com dinâmica fotossintética mista (Tabela 26).

Tabela 26. Parâmetros fotossintéticos de poliploides de MD 1296 obtidas da exposição a colchicina em dois tempos de tratamento

Dose (%)	Tempo (h)	Ploidia	MD 1296		
			Gs (mol m ⁻² s ⁻¹)	Fv/Fm	ETR (μmol e ⁻ m ⁻² s ⁻¹)
0	24	Controle	0,08	0,77	45,350
	48	Controle	0,03	0,76	41,486
0,05	24	Mixoploide 1	0,10	0,75	39,076
		Mixoploide 2	0,08	0,72	37,412
F (entre ploidias)			1,814	3,285	3,316

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott; *** significativo ao nível de 0,1% de probabilidade de erro ($p < 0,001$); ** significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro ($p < 0,01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro ($0,01 < p < 0,05$). gs – Condutância estomática; Fv/Fm – Eficiência quântica do fotossistema II; ETR – Taxa de transporte de elétrons.

Os resultados mais diversos foram observados na cultivar MD 1287, na qual todos os tetraploides apresentaram redução da abertura estomática e da troca gasosa em comparação com os controles, além de redução dos valores de eficiência no uso da luz em comparação com os controles e com dois tetraploides com valores intermediários. Já a taxa de transporte de elétrons foi mais ativa para dois tetraploides em relação às outras plantas (Tabela 27).

Mais uma vez é difícil colocar o desenvolvimento de plantas poliploides em um único perfil, e a grande quantidade de dados nos permite levantar hipóteses do que pode estar ocorrendo. É possível que esses dados todos sejam decorrentes das alterações na morfologia, com o espessamento das folhas ou de raízes ou mesmo do tamanho dos estômatos, alterações bioquímicas como o acúmulo de mais clorofila na folha, ou o desenvolvimento da planta, que pode ser mais lento, ou mesmo completo em um período diferente do controle. É possível ainda que seja o conjunto de tudo isso que promova resultados tão diversos. Uma vez que o tratamento foi feito sobre híbridos de *Mandevilla*, também é muito provável que a diversidade de perfis obtidos seja decorrente de tal circunstância (Pelé; Rousseau-Gueutin; Chèvre, 2018).

Tabela 27. Parâmetros fotossintéticos de poliploides de MD 1287 obtidas da exposição a colchicina em dois tempos de tratamento

Dose (%)	Tempo (h)	Ploidia	MD 1287		
			gs (mol m ⁻² s ⁻¹)	Fv/Fm	ETR (μmol e ⁻ m ⁻² s ⁻¹)
0	24	Controle	0,13 a	0,71 a	46,116 b
	48	Controle	0,11 a	0,75 a	46,216 b
0,05	24	Tetraploide 1	0,02 b	0,40 b	69,411 a
		Tetraploide 2	0,02 b	0,25 c	39,579 b
		Tetraploide 3	0,04 b	0,29 c	46,839 b
		Tetraploide 4	0,01 b	0,28 c	48,224 b
	48	Tetraploide 6	0,02 b	0,40 b	64,347 a
		Tetraploide 8	0,01b	0,20 c	34,419 b
F (entre ploidias)			6,437***	20,8***	4,02 **

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott; *** significativo ao nível de 0,1% de probabilidade de erro ($p < 0,001$); ** significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro ($p < 0,01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro ($0,01 < p < 0,05$). gs – Condutância estomática; Fv/Fm – Eficiência quântica do fotossistema II; ETR – Taxa de transporte de elétrons.

Em tetraploides induzidos artificialmente de *Melissa officinalis*, a performance fotossintética foi superior à de planta diploides. Embora alguns parâmetros de eficiência do sistema fotossintético, como o Φ PSII, não tenham se mostrado significativamente diferentes entre tetraploides e diploides ao longo do dia, outros parâmetros, como Plabs (Índice de Performance para Absorção) e ABS/RC (Taxa de Absorção por Centro de Reação) apresentaram distinções significativas, indicando maior eficiência na absorção e utilização da luz pelas plantas tetraploides. Além disso, o fluxo eletrônico linear (LEF) – semelhante ao ETR medido neste trabalho - foi significativamente maior nas plantas tetraploides durante manhã e tarde, indicando uma conversão mais eficiente da energia luminosa em transporte de elétrons. Em síntese, a indução de poliploidia melhorou a captura de luz, o que pode ter implicações para o manejo agrícola (Bharati *et al.* 2023).

A capacidade fotossintética da variedade tetraploide de *Acer buergerianum* também foi significativamente maior que a de seu controle diploide. Isso foi evidenciado pelas medições feitas com o fluorômetro, que mostraram que os parâmetros de eficiência fotossintética, como Fv/Fm e Fv/Fo, eram mais altos na variedade tetraploide (Wang, Y. *et al.* 2021).

De acordo com Ulum, Hadacek e Hörandl (2021), citótipos de *Ranunculus auricomus*, tetraploides e hexaploides naturais apresentaram maior eficiência no desempenho fotossintético em comparação com as plantas diploides. Os poliploides apresentaram níveis mais altos de quenching não fotoquímico (NPQ), o que indica que a poliploidia pode conferir uma vantagem adaptativa em condições de luz intensa, permitindo uma melhor regulação do estresse oxidativo oriundo de luz excessiva. Embora o NPQ também não tenha sido aqui medido, a eficiência quântica do PSII (Φ PSII) e a taxa de transporte de elétrons (ETR) permite uma inferência similar, pois quando o valor Φ PSII diminui, isso pode indicar que mais energia está sendo dissipada como calor, o que sugere um aumento no NPQ, ou mesmo quando o ETR é reduzido enquanto Φ PSII se mantém estável ou diminui, pode significar que a planta está dissipando mais energia via NPQ para evitar danos foto-oxidativos.

Em síntese, as medidas coletadas permitem compreender como a poliploidia é capaz de modificar a performance fotossintética. Em posse de dados essenciais sobre a eficiência do uso da luz e o estado fisiológico das plantas é possível avaliar melhorias agrônômicas resultantes da indução de poliploidia. Portanto, a poliploidia modifica a resposta fisiológica frente estresses ambientais, contribuindo para maior ou menor resiliência em cenários de variação climática.

5.10 Raízes

Ao longo da execução do projeto foi possível notar que alguns poliploides apresentavam um sistema radicular aparentemente mais fragilizado, menos espesso e com comprimento menor à primeira vista. A partir de tal situação, estabeleceu-se a necessidade de avaliar também parâmetros radiculares e assim o diâmetro das raízes (que na *Mandevilla* com bastante frequência se apresentam com aspecto tuberoso) e o comprimento delas foi comparado. As raízes das três cultivares não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos e controles para os parâmetros de diâmetro e comprimento de raízes, em nenhum dos fatores, dose, tempo e a interação entre eles (Tabela 28).

Tabela 28. Diâmetro (\emptyset) e comprimento (C) de raízes em condição *ex vitro*, decorrente do tratamento das plantas com colchicina por 24 e 48 horas *in vitro*

		Raiz					
Dose (%)	Tempo (h)	MD 1480		MD 1296		MD 1287	
		\emptyset (cm)	C (cm)	\emptyset (cm)	C (cm)	\emptyset (cm)	C (cm)
0,0	24	0,57	19,29	0,63	18,28	1,32	16,26
	48	0,61	16,88	0,61	15,78	1,57	17,85
0,05	24	0,64	22,81	0,50	17,06	1,41	16,14
	48	0,70	24,65	0,58	16,33	1,89	13,36
F (dose)		0,59	2,77	0,40	0,02	1,33	1,33
F (Tempo)		0,23	0,01	0,20	0,46	3,92	0,09
F (Interação)		0,01	0,39	0,46	0,14	0,39	1,21

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott; Letras maiúsculas referem-se ao fator dose, enquanto letras minúsculas indicam o fator tempo; *** significativo ao nível de 0,1% de probabilidade de erro ($p < 0,001$); ** significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro ($p < 0,01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro ($0,01 < p < 0,05$)

Quanto aos poliploides identificados e comparados entre si, houve redução do diâmetro médio das raízes de dois poliploides da cultivar MD 1480 (oriundos do tratamento com colchicina por 48 horas). O comprimento médio das raízes dos poliploides identificados não demonstrou diferença significativa dos controles, nem entre si (Tabela 29). Com os mixoploides da cultivar MD 1296 ocorreu o mesmo, somente a redução do diâmetro médio das raízes em detrimento do controle (Tabela 30). Quanto a cultivar MD 1287, não foi possível verificar variações significativas nas médias tanto do diâmetro quanto do comprimento das raízes (Tabela 31).

Tabela 29. Diâmetro (\emptyset) e comprimento (C) de raízes em condição *ex vitro*, de poliploides identificados nos grupos da cultivar MD 1480 tratados com colchicina *in vitro* por 24 e 48 horas

Dose (%)	Tempo (h)	Ploidia	Raiz	
			\emptyset (cm)	C (cm)
0	24	Controle	0,72 a	20,24
	48	Controle	0,64 a	19,85
0,05	24	Mixoploide	0,96 a	27,03
		Tetraploide 1	0,64 a	22,11
	48	Tetraploide 2	0,71 a	25,82
		Tetraploide 3	0,30 b	15,63
		Tetraploide 4	0,37 b	17,19
F (entre ploidias)			3,61**	0,61

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott; *** significativo ao nível de 0,1% de probabilidade de erro ($p < 0,001$); ** significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro ($p < 0,01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro ($0,01 < p < 0,05$)

Tabela 30. Diâmetro (\emptyset) e comprimento (C) de raízes em condição *ex vitro*, de poliploides identificados nos grupos da cultivar MD 1296 tratados com colchicina *in vitro* por 24 e 48 horas

Dose (%)	Tempo (h)	Ploidia	Raiz	
			\emptyset (cm)	C (cm)
0	24	Controle	0,75 a	19,06
	48	Controle	0,56 a	15,83
0,05	24	Mixoploide 1	0,26 b	14,03
		Mixoploide 2	0,38 b	16,46
F (entre ploidias)			4,46*	0,36

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott; *** significativo ao nível de 0,1% de probabilidade de erro ($p < 0,001$); ** significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro ($p < 0,01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro ($0,01 < p < 0,05$)

Tabela 31. Diâmetro (\emptyset) e comprimento (C) de raízes em condição *ex vitro*, de poliploides identificados nos grupos da cultivar MD 1287 tratados com colchicina *in vitro* por 24 e 48 horas

Dose (%)	Tempo (h)	Ploidia	Raiz	
			\emptyset (cm)	C (cm)
0	24	Controle	1,20	18,40
	48	Controle	1,62	17,41
0,05	24	Tetraploide 1	1,50	14,02
		Tetraploide 2	1,72	15,52
		Tetraploide 3	1,83	12,77
		Tetraploide 4	1,48	16,37
	48	Tetraploide 5	0,60	8,31
		Tetraploide 6	1,24	12,13
		Tetraploide 7	1,94	12,90
		Tetraploide 8	1,64	13,32
F (entre ploidias)			1,34	1,58

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott; *** significativo ao nível de 0,1% de probabilidade de erro ($p < 0,001$); ** significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro ($p < 0,01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro ($0,01 < p < 0,05$)

De acordo com Tossi *et al.* (2022) o aumento no tamanho das células de um organismo pela poliploidia pode modificar a arquitetura das raízes, tornando-as mais espessas, compridas, e ramificadas, impactando aspectos como a absorção de água e a resistência a solos salinos. A relação entre a ploidia e o crescimento radicular é, contudo, bastante complexa. Kikuchi *et al.* (2024) observaram que em autopoliploides tetraploides de *Arabidopsis thaliana* o crescimento radicular era favorecido, e suas células apresentavam maior volume, ao contrário do número de células, que diminuía, enquanto que hexaploides e octaploides apresentavam supressão do crescimento radicular e planta com aspecto anão, indicativo de “síndrome de alta ploidia”, ligada a complexidades na regulação do ciclo celular e à alteração da dinâmica cromossômica em poliploides.

Essa é uma explicação possível para o que se observa nos grupos tratados com colchicina neste estudo, que quando avaliados não demonstraram padrões de aumento de parâmetros morfoanatômicos para o sistema radicular e, embora, não sejam hexaploides ou octaploides, podem estar apresentando dificuldades com o ciclo celular decorrente das alterações nos conjuntos cromossômicos.

Em rabanete (*Raphanus sativus* L.) o peso e largura médios de raízes de populações foi significativamente menor em plantas tetraploides (1000 g e 9 cm) que

em plantas diploides (1200 g e 11 cm) e o comprimento permaneceu o mesmo, por volta de 20 cm. Uma possível causa para tal dinâmica é o crescimento retardado de tetraploides (Kim, Lee e Chae, 2022), também plausível para o observado nos tratamentos e para os poliploides da cultivar MD 1287 deste trabalho. Em contrapartida, em outro estudo com rabanete, tetraploides induzidos demonstraram aumento no tamanho de raízes tuberosas comparativamente a diploides (Pei *et al.* 2019), como os poliploides identificados da cultivar MD 1480 e MD 1296.

6 CONCLUSÕES

Com o aumento dos tempos de exposição à colchicina, as taxas de sobrevivência de explantes de cultivares de *Mandevilla* também foi decrescendo de forma bastante esperada devido a sua toxicidade. A maior eficiência de indução de poliploidia (15%) foi observada na cultivar MD 1480 tratada com colchicina por 48 h, seguido pela cultivar MD 1287 no tratamento com o antimetabólito por 48 horas (12.12%) e por 24 horas (10.8%) respectivamente. Os menores valores, 5,88% e 4,34% foram identificados em MD 1480 e MD 1296 (na ordem) expostos a colchicina por 24 horas. Em MD 1296 exposta a colchicina por 48 horas não foi possível identificar poliploides, o que é um indicativo de que a suscetibilidade a indução de poliploidia em *Mandevilla* é varietal. A avaliação de parâmetros morfofisiológicos de poliploides identificados por citometria de fluxo por sua vez e sua comparação com controles diploides revela a possibilidade de recorrer a tais parâmetros como forma de rastrear poliploides. Isso contudo não ocorreu em todos os casos, principalmente quando a análise não foi estabelecida entre plantas, mas entre tratamentos, além do fato de que muitos desses parâmetros por vezes se apresentaram reduzidos ao invés de aumentados. A avaliação de parâmetros morfofisiológicos deve, portanto, sempre ser considerada com cautela como método de identificação de indivíduos poliploides.

7 LITERATURA CITADA

- AHMADI, B.; EBRAHIMZADEH, H. *In vitro* androgenesis: spontaneous vs. artificial genome doubling and characterization of regenerants. **Plant Cell Reports**, v. 39, p. 299-316, 2020.
- AISYAH, S. I; MEININGRUM N. I; YUDHA Y. S; NURCHOLIS W. Variability of agromorphological traits in *Portulaca grandiflora* through induced mutation using colchicine. **Biodiversitas**, v. 25, n. 6, p. 2484-2493, 2024.

- AL-JUBOURI, A. A. A. K.; ALQAIISI, M. R. M. **Effect of Colchicine Concentration and Exposure Duration on the Growth and Flowering of *Petunia hybrid* L.** In: IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. IOP Publishing, p. 012038, 2023.
- ANATSKAYA, O.V.; VINOGRADOV, A.E. Polyploidy as a Fundamental Phenomenon in Evolution, Development, Adaptation and Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v.23, p.3542, 2022.
- ANSARI, E.; KHOSROWSHAHLI, M.; ETMINAN, A.; JAFARI, A. A. Polyploidy Induction and Ploidy Level Determination in Annual and Perennial Diploid *Medicago* Species Using the Enumeration of Chloroplasts of Stomata Guard Cells. **Cytology and Genetics**, v.56, p.164-171, 2022.
- ARAÚJO, L. D. A.; QUIRINO, Z. G. M.; MACHADO, I. C. High specialisation in the pollination system of *Mandevilla tenuifolia* (J.C. Mikan) Woodson (Apocynaceae) drives the effectiveness of butterflies as pollinators. **Plant Biology**, v. 16, p. 947 – 955. 2014.
- ASOKO, N.; RUAMRUNGSRI, S.; YOOSUMRAN, V.; SAETIW, K. Improvement of *Dendranthemum grandiflora* cv. canter with colchicine *in vitro*. **International Journal of Agricultural Technology**, v.16, p.237-246, 2020.
- BAGHERI, M.; MANSOURI, H. Effect of induced polyploidy on some biochemical parameters in *Cannabis sativa* L. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.175, p.2366–2375. 2015.
- BECKER, F. W.; OBERLANDER, K. C.; TRÁVNÍČEK, P.; DREYER, L. L. Inconsistent expression of the gigas effect in polyploid *Oxalis*. **American Journal of Botany** v.109, p.1607–1621, 2022.
- BHARATI R.; GUPTA, A.; NOVY, P.; SEVEROVÁ, L.; SRÉDL, K.; ZIAROVSKÁ, J.; FERNÁNDEZ-CUSIMAANI, E. Synthetic polyploid induction influences morphological, physiological, and photosynthetic characteristics in *Melissa officinalis* L. **Frontiers in Plant Science**, v.14, p.1332428, 2023.
- BHATTARAI, K.; KAREEM, A.; DENG, Z. In vivo induction and characterization of polyploids in gérbera daisy. **Scientia Horticulturae**, v.282, p.110054, 2021.
- BLASCO, M.; BADENES, M. L.; NAVAL, M. Colchicine-induced polyploidy in loquat *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.120, p.453-461, 2015.
- BOHANEK, B. Ploidy determination using flow cytometry. In: Maluszynski, M., Kasha, K.J., Forster, B.P., Szarejko, I. (eds) **Doubled Haploid Production in Crop Plants**, Dordrecht: Springer, p.397–403, 2003.
- BOLAÑOS-VILLEGAS, P.; CHEN, F.-C. Advances and perspectives for Polyploidy Breeding in Orchids. **Plants**, v.11, p.1421, 2022.
- BONA, D. A. O.; KARSBURG, I. V.; GALLO, R. INDUÇÃO E IDENTIFICACAO DE POLIPLÓIDIA EM *Hymenaea courbaril* L. var. *stilbocarpa* (Hayne) Lee et Lang. **Ciência Florestal**, v.26, p.1331–1337, 2016.
- BOTELHO, F. B. S.; RODRIGUES, C. S.; BRUZI, A. T. Melhoramento Genético de Plantas Ornamentais. **Ornamental Horticulture**, v.21, p.9-16, 2022.
- CABAHUG, R. A. M.; TRAN, M. K. H.; LIM, K.; HWANG, Y. J. Effects of colchicine treatment on phenotype and ploidy level of *Echeveria* 'Peerless'. **Toxicology and Environmental Health Sciences**, v.13, p.17–24, 2021.
- CASTAÑEDA-NAVA, J. J. (Ed.). **Tópicos de Herramientas Biotecnológicas para el Desarrollo Agrícola**. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, p.91, 2021.

- CASTILLO A.; LÓPEZ, V.; TAVARES, E.; SANTIÑAQUE, F.; DALLA-RIZZA, M. Polyploid induction of *Eucalyptus dunnii* Maiden to generate variability in breeding programs. **Agrociencia Uruguay**, v.24, e381, 2020.
- COSTA, Everton Gomes da. **Indução de mutantes em *Mandevilla bahiensis* e *Mandevilla* cv. Pretty Crimson visando o melhoramento genético**. 2018. Tese (Doutorado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, 2018.
- CUI, L.; LIU, Z.; YIN, Y.; ZOU, Y.; FAIZAN, M.; ALAN, P.; YU, F. Research progress of chromosome doubling and 2n gametes of ornamental plants. **Horticulturae**, v.9, p.752, 2023.
- DEANS, L. E.; PALMER, I. E.; TOUCHELL, D. H.; RANNEY, T. G. In Vitro Induction and Characterization of Polyploid *Hydrangea macrophylla* and *H. serrata*. **HortScience**, v.56, p.709-715, 2021.
- DHOOGHE, E., VAN LAERE, K., EECKHAUT, T., LEUS L., VAN HUYLENBROECK J. Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro. **Plant Cell and Tissue Organ Culture**, v.104, p.359–373, 2011.
- EECKHAUT, T.; VAN der VEKEN, J.; DHOOGHE, E.; LEUS, L.; VAN LAERE, K.; VAN HUYLENBROECK, J. Ploidy Breeding in Ornamentals. In: Van Huylenbroeck, J. (eds) **Ornamental Crops**. Handbook of Plant Breeding, Springer, Cham. 2018, p.145-173.
- ENG, W. H; Ho W. Polyploidization using colchicine in horticultural plants: A review. **Scientia Horticulturae**. v.246, p.604–617, 2018.
- ESMAEILI, N.; LAERE, K. V.; MUYLLE, H.; LEUS, L. Artificial Chromosome Doubling in *Calendula officinalis* L. by Colchicine. **Frontiers in Plant Science**, v.11, p.622, 2020.
- FAUZAN, Y. S. A.; SUPRIYANTO; MULYONO, J.; TAJUDDIN, T. THE EFFECTIVENESS OF COLCHICINE AND ORYZALIN ON POLYPLOIDY INDUCTION IN TEAK (*Tectona grandis* Linn. f.) *IN VITRO*. **Indonesian Journal of Forestry Research**, v.11, p.1–15, 2024.
- FU L.; ZHU, Y.; LI, M.; WANG, C.; SUN, H. Autopolyploid induction via somatic embryogenesis in *Lilium distichum* Nakai and *Lilium cernuum* Komar. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.139, p.237-248, 2019.
- GAYNOR, M. L.; LIM-HING, S.; MASON, C. M. Impact of genome duplication on secondary metabolite composition in non-cultivated species: a systematic meta-analysis. **Annals of Botany**. v.126, p.363-376, 2020.
- GHANBARI, M.; JOWKAR, A.; SALEHI, H.; ZAREI, M. Effects of polyploidization on petal characteristics and optical properties of *Impatiens walleriana* (Hook.). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.138, p.299–310, 2019.
- GHANBARI, M.A.; JOWKAR, A.; SALEHI, H.; ZAREI, M. Effects of polyploidization on petal characteristics and optical properties of *Impatiens walleriana* (Hook.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** v.138, p.299–310, 2019.
- HASSANZADEH, F.; ASGHARI-ZAKARIA R.; AZAD, N. H. Polyploidy induction in *Salvia officinalis* L. and its effects on some morphological and physiological characteristics. **Cytologia**, v.85, p.157-162, 2020.
- HU, Y.; SUN, D.; HU, H.; ZUO, X.; XIA, T.; XIE, J. A comparative study on morphological and fruit quality traits of diploid and polyploid carambola (*Averrhoa carambola* L.) genotypes. **Scientia Horticulturae** v.277 p.109843, 2021.
- IBRAFLOR** – Instituto Brasileiro de Floricultura. Panorama da floricultura no Brasil. Disponível em: <https://www.ibraflor.com.br/n%C3%BAmeros-do-setor-c%C3%B3pia>. Acesso em: 08 ago. 2024.

- INTERNATIONAL ASSOCIATION OF HORTICULTURAL PRODUCERS (AIPH).** International statistics flowers and plants 2023. AIPH, 2023.
- ISLAM, M. M.; DEEPO, D. M.; NASIF, O. S.; SIDDIQUE, A. B.; HASSAN, O.; SIDDIQUE, A. B.; PAUL, N. C. Cytogenetics and Consequences of Polyploidization on Different Biotic-Abiotic Stress Tolerance and the Potential Mechanisms Involved. **Plants**, v.11, p.2684, 2022.
- KAWAKAMI, S. M.; FUJIWASA, I.; MURAI, K.; KAWAKAMI, T.; KATO, J. Characteristics of Established Hexaploid Plants Derived from an Octoploid Plant Induced by Colchicine Treatment in *Persicaria tinctoria*. **Cytologia**, v. 87, p. 49-54, 2021.
- KHAN, M. N. E. A.; HASSAN, J.; BISWAS, A.; KHAN, A. I.; SULTANA, H.; SUBORNA, N. M.; RAJIB, M. R.; AKTER, J.; GOMASTA, J.; ANIK, A. A. M. Morphological and anatomical characterization of colchicine-induced polyploids in watermelon. **Horticulture, Environment and Biotechnology**. v.64, p.461-474, 2023.
- KIKUCHI, S.; SAKAMOTO, T.; MATSUNAGA, S.; SUGIYAMA, M.; IWAMOTO, A.; Plant chromosome polytenization contributes to suppression of root growth in high polyploids, **Journal of Experimental Botany**, v.75, p.5703–5716, 2024.
- KIM, H. L.; LEE, J.; CHAE, W. B. Polyploidization reduces the probability of selecting progenies with high root pithiness and yield potential in radish (*Raphanus sativus* L.). **Horticultural Environment and Biotechnology**. v.63, p.239–247, 2022.
- KUSUMAWATI, E.; HARYANTO, H.; WIJAYA, I.; MUZAKI, A.; ALAUDIN, N.; NURHAYATI, S.; FITRI, F. M.; GARCIA, R. Effect of colchicine treatment on plant growth and flower development in *Zinnia elegans*. **Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia**, v.11, p.43-52, 2024.
- LI M.; WEN, Z.; MENG, J.; CHENG, T.; ZHANG, Q.; SUN, L. The genomics of ornamental plants: current status and opportunities. **Ornamental Plant Research**. v.2, p.1-18, 2022.
- LI S.; LIU, X.; LIU, H.; ZHANG, X.; YE, Q.; ZHANG, H. Induction, identification and genetics analysis of tetraploid *Actinidia chinensis*. **Royal Society open science**. v.6, p.191052, 2019.
- LI, F.; CHENG, Y.; YU, R.; YANG, C. Genome Size and Ploidy Level of Commercial *Eustoma grandiflorum* (Raf) Shinners. **Journal of Agricultural Science and Technology**. v.24, p.739-748, 2022.
- LI, S.; LIN, Y.; PEI, H.; ZHANG, J.; ZHANG, J.; LUO, J. Variations in colchicine-induced autotetraploid plants of *Lilium davidii* var. *unicolor*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.141, p.479-488, 2020.
- LOBET, G.; PAGES, L.; DRAYE, X.; A Novel **Image Analysis Toolbox Enabling Quantitative Analysis of Root System Architecture**, 2011.
- MAHANTA, M.; GANTAIT, S.; SARKAR, S.; SADHUKHAN, R.; BHATTACHARYYA, S. Colchicine-mediated *in vitro* polyploidization in gébera hybrid. **Biotechnology**. v.13, p.74, 2023.
- MANDEVILLA** in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB4652>>. Acesso em: 08 ago. 2024
- MANIKAS, I.; MALINDRETOS, G.; ABELIOTIS, K. Sustainable Cities through Alternative Urban Farming: The Case of Floriculture. **Journal of International Food & Agribusiness Marketing**, V.32, p.1-17, 2019.
- MANZOOR A.; TOUQEER A.; NAVEED, M. S.; REHMAN, A. U.; BASHIR, M. A.; AHMAD, R.; AKHTAR, N. Assessment Of Biological Damage And Toxic Potency Of Colchicine In Gladiolus (*Gladiolus Grandiflorus*) Plants. **Agricultural Sciences Journal**. v.5, p.72-92, 2023.

- MASON A.; WENDEL J. Homoeologous Exchanges, Segmental Allopolyploidy, and Polyploid Genome Evolution. **Frontiers in Genetics**. v.11, p.1014, 2020.
- MO, L.; CHEN, J.; LOU, X.; XU, Q.; DONG, R.; TONG, Z.; HUANG, H.; LIN, E. Colchicine-Induced Polyploidy in *Rhododendron fortunei* Lindl. **Plants**, v.9, p.424, 2020.
- MOHAMMADI, M.; KAVIANI, B.; SEDAGHATHOOR, S. Indução de poliploidia in vivo de *Phalaenopsis amabilis* em sistema de biorreator de bolha usando colchicina. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.27, p.204-212, 2021.
- MOHAMMADI, V.; TALEBI, S.; AHMADNASAB, M.; MOLLAHASSANZADEH, H. The effect of induced polyploidy on phytochemistry, cellular organelles and the expression of genes involved in thymol and carvacrol biosynthetic pathway in thyme (*Thymus vulgaris*). **Industrial Crops and Products**, v.14, p.198, 2023.
- MONDIN, M.; MELLO e SILVA, P. A. K. X. de; LATADO, R. R.; MOURÃO FILHO, F. A. A. *In vitro* induction and regeneration of tetraploids and mixoploids of two cassava cultivars. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.18, p.176–183, 2018.
- MULAGALA, C. **Genetic characterization of *Mandevilla* spp. experimentais lines by gSSR genotyping and cpDNA barcoding.2022**. Lauree magistrali, Biotecnologie per L'alimentazione laurea magistrale, UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA.
- MURASHIGE, T., & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473–497, 1962.
- MWATHI M. W.; GUPTA, M.; QUEZADA-MARTINEZ, D.; PRADHAN, A.; BATLEY, J.; MASON, A. S. Fertile allohexaploid *Brassica* hybrid obtained from crosses between *B. oleracea* and *B. juncea* via ovule rescue and colchicine treatment of cuttings. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** v.140, p.301–313, 2020.
- NARUKULLA, V.; LAHANE, Y.; FISKE, K.; PANDEY, S.; ZIOGAS, V. Induction of Polyploidy in Citrus Rootstocks through In Vitro Colchicine Treatment of Seed-Derived Explants. **Agronomy**, v.13, p.1442, 2023.
- NATARAJAN, R.B.; PATHANIA, P.; SINGH, H.; AGRAWAL, A.; SUBRAMANI, R. A Flow Cytometry-Based Assessment of the Genomic Size and Ploidy Level of Wild *Musa* Species in India. **Plants**, v.12, p.3605, 2023.
- NIAZIAN, M.; MOLAAHMAD N. S. M. Agrobacterium-mediated genetic transformation of ajowan (*Trachyspermum ammi* (L.) Sprague): an important industrial medicinal plant. **Industrial Crops and Products**, v.132, p.29–40, 2020.
- ODER, A.; LANNES, R.; VIRUEL, M. A. A set of 20 new SSR markers developed and evaluated in *Mandevilla* Lindl. **Molecules** v.21, p.1316, 2016.
- PALUMBO F.; DRAGA, S.; SCARIOLO, F.; GABELLI, G.; SACILOTTO, G. B.; GAZZOLA, M.; BARCACCIA, G. First Genomic Insights Into The *Mandevilla* Genus. **Frontiers**, v.13, 2022.
- PEI Y.; YAO, N.; HE, L.; DENG, D.; LI, W.; ZHANG, W. Comparative study of the morphological, physiological and molecular characteristics between diploid and tetraploid radish (*Raphanus sativus* L.). **Scientia Horticulturae**, v.25, p.108739, 2019.
- Pelé A.; Rousseau-Gueutin M.; Chèvre A.M. Speciation Success of Polyploid Plants Closely Relates to the Regulation of Meiotic Recombination. **Frontiers in Plant Science**. v. 9, P. 907, 2018.
- PHAM, P.K.; LI, Y.X.; GUO, H.R.; ZENG, R.Z.; XIE, L.; ZHANG, Z.S. Changes in morphological characteristics, regeneration ability, and polysaccharide content in tetraploid *Dendrobium officinale* **Horticultural Science**, v.54, p.1879-1886, 2019

- POLIVANOVA, O.B.; BEDAREV, V.A. Hyperhydricity in Plant Tissue Culture. **Plants** v.11, p.3313, 2022.
- PURBIYA, R.; VERMA, R. C.; DASS, P.; CHOUHAN, C. S. Colchicine induced polyploidy in coriander (*Coriandrum sativum* L.). **Current Botany**. v.12, p.62-65, 2021.
- RASBAND, W.S., **ImageJ**, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.net/ij/>, 1997-2018.
- ROBINSON, D. O.; COATE, J. E.; SINGH, A.; HONG, L.; BUSH, M.; DOYLE, J. J.; ROEDER, A. H. K. Ploidy and size at multiple scales in the Arabidopsis sepal. **The Plant Cell** v.30, p.2308-2329, 2018.
- ROYAL HORTICULTURAL SOCIETY**. Mandevilla. Disponível em: <https://www.rhs.org.uk/advice>. Acesso em: 8 ago. 2024.
- RUBINI A. P.; MORÉ, M.; CISTERNAS, M.; RAGUSO, R. A.; BENITEZ-VIEYRA, S. Breakdown of species boundaries in Mandevilla: floral morphological intermediacy, novel fragrances and asymmetric pollen flow. **Plant Biology Journal**, v.21, p.206-215, 2019.
- SABOONI, N.; GHARAGHANI, A.; JOWKAR, A.; ESHGHI, A. Successful polyploidy induction and detection in blackberry species by using an *in vitro* protocol. **Scientia Horticulturae**, v.295, p.110850, 2021.
- SAMANHUDI, S.; HARTATI, S.; CAHYONO, O.; WIBOWO, A.; ARDIANI, F. **Morphological Characteristics of *Phalaenopsis* spp. by Colchicine Application Based on Qualitative**. 2023. In: ICSARD (International Conference on Agriculture Research and Development), 2022, Surakarta. *Anais...* Surakarta: Sebelas Maret University, 2023, p. 335–342.
- SAMATADZE, T.E.; YURKEVICH, O. Y.; KHAZIEVA, F. M.; BASALAEVA, I. V.; KONYAEVA, E. A.; BUROVA, A. E.; ZOSHCHUK, S. A.; MOROZOV, A. I.; AMOSOVA, A. V.; MURAVENKO, O. V. Agro-Morphological and Cytogenetic Characterization of Colchicine-Induced Tetraploid Plants of *Polemonium caeruleum* L. (Polemoniaceae). **Plants**, v.11, p.2585, 2022.
- SANTOS, Angeline Maria da Silva. **Evolução cromossômica em plantas de inselbergues com ênfase na família Apocynaceae Juss**. 2017. 137 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Centro de Ciências Agrárias, Areias, 2017.
- SATTLER, M.C.; CARVALHO, C.R.; CLARINDO, W.R. The polyploidy and its key role in plant breeding. **Planta**, v.243, p.281–296, 2016.
- TALEI, D.; FOTOKIAN, M. H. Improving growth indices and productivity of phytochemical compounds in lemon balm (*Melissa officinalis* L.) through induced polyploidy. **BioTechnologia**, v.101, p.215–226, 2020.
- TAMAYO-ORDÓÑEZ, M.C.; ESPINOSA-BARRERA, L.A. Advances and perspectives in the generation of polyploid plant species. **Euphytica**, v.209, p.1–22, 2016.
- TOSSI V.E.; TOSAR, L. J. M.; LAINO, L. E.; IANNICELLI, J.; REGALADO, J. J.; ESCANDÓN, A. S.; BAROLI, I.; CAUSIN, H. F.; PITTA-ÁLVAREZ, S. I. Impact of polyploidy on plant tolerance to abiotic and biotic stresses. **Frontiers in Plant Science**. v.13, p.869423, 2022.
- ULUM, F.B.; HADACEK, F.; HÖRANDL, E. Polyploidy Improves Photosynthesis Regulation within the *Ranunculus auricomus* Complex (Ranunculaceae). **Biology**, v.10, p.811, 2021.
- VERMA, S.; HARIWAL, M.; KUMAR, S. Exploratory analysis of agro-morphological characteristics in *Nigella sativa* L. plant genotypes to determine mutagen colchicine ameliorative/non-ameliorative impacts. **Scientific Reports**, v.14, p.24521, 2024.
- VICCINI L.F. Poliploidia em populações naturais: um paradigma na evolução de plantas. **Semin. Cienc. Biol. Saúde** [Internet]. 16º de fevereiro de 2018.

- VILCHERREZ-ATOCHÉ, J. A.; IYAMA, C. M.; CARDOSO, J. C. Polyploidization in Orchids: From Cellular Changes to Breeding Applications. **Plants**, v.11, p.469, 2022.
- VILCHERREZ-ATOCHÉ, J.; SILVA, J. C.; CLARINDO, W. R.; MONDIN, M.; CARDOSO, J. C. *In Vitro* Polyploidization of *Brassolaeliocattleya* Hybrid Orchid. **Plants**. v.12. p.281, 2023.
- VIRUEL, J.; CONEJERO, M.; HIDALGO, O.; POKORNY, L.; POWELL, R. F.; FOREST, F.; KANTAR, M. B.; GOMEZ, M. S.; GRAHAM, S. W.; GRAVENDEEL, B.; WILKIN, P.; LEITCH, I. J. A Target Capture-Based Method to Estimate Ploidy from Herbarium Specimens. **Frontiers in Plant Science**. V.10, p.937, 2019.
- VISHNUPANDI, S.; GANGA, M.; RAJAMANI, K.; MANONMANI, S.; BOOPATHI, N. M. Effect of varying concentrations of colchicine on polyploid induction in *Jasminum sambac* L. Aiton. **Electronic Journal of Plant Breeding**, v.14, p.496-501, 2023.
- WANG, F.; ZHUO, X.; ARSLAN, M.; ERCISLI, S.; CHEN, J.; LIU, Z.; LAN, S.; PENG, D. *In Vitro* Induction of Polyploidy by Colchicine in the Protocorm of the Orchid *Dendrobium wardianum* Warner. **Horticultural Science**, v.58, p.1368-1375, 2023.
- WANG, Y.; JIA, B.; REN, H.; FENG, Z. Ploidy level enhances the photosynthetic capacity of a tetraploid variety of *Acer buergerianum* Miq. **PeerJ** v.9, p.e12620, 2021.
- WOJTANIA, A.; YONGHONG, L. The influence of growth regulators and explant position on the growth and development of *Mandevilla sanderi* (Hemsl.) Woodson *in vitro*. **Acta Scientiarum Polonorum. Hortorum Cultus**, v.20, p.127–138, 2021.
- WU J.H. Establishment of *in vitro* culture systems for breeding new types of kiwi fruit and for Actinidia genomics studies. **Acta Horticulturae**, v.1224, p. 195-202, 2018.
- XIE, N.; ZHAO, Y.; HUANG, M.; CHEN, C.; CAO, C.; WANG, J.; SHI, Z.; GAO, J. Polyploid Induction and Identification of *Begonia x benariensis*. **Horticulturae**, v.10, p.47, 2024.
- XU H.; ZHANG, W.; ZHANG, T.; LI, J.; WU, X.; DONG, L. Determination of Ploidy Level and Isolation of Genes Encoding Acetyl-CoA Carboxylase in Japanese Foxtail (*Alopecurus japonicus*). **Plos One**. v.9, p. e114712, 2014.
- YUE, Y.; FAN, X.; HU, Y.; HAN, C.; LI, H.; TENG, W.; ZHANG, H.; TENG, K.; WEN, H.; YANG, X.; WU, J. *In vitro* induction and characterization of hexaploid *Pennisetum × advena*, an ornamental grass. **Plant Cell and Tissue Organ Culture**, v.142, p.221-228, 2020.
- ZAKIZADEH, S.; LIVANI B. K.; HASHEMABADI, D. In vivo-induced polyploidy in *Dendrobium* ‘Sonia’ in a bubble bioreactor system using colchicine and oryzalin. **Brazilian Journal of Botany**. v.43, p.1-12, 2020.
- ZHANG, X.; CHEN, K.; WANG, W.; LIU, G.; YANG, C.; JIANG, J.; Differences in Leaf Morphology and Related Gene Expression between Diploid and Tetraploid Birch (*Betula pendula*). **International Journal of Molecular Science**, v.23, p.12966, 2022.
- ZHANG, Y.; WANG, B.; QI, S.; DONG, M.; WANG, Z.; LI, Y.; CHEN, S.; LI, B.; ZHANG, J.; Ploidy and hybridity effects on leaf size, cell size and related genes expression in triploids, diploids and their parents in *Populus*. **Planta** v.249, p.635–646, 2019.
- ZOU, P.; ZHENG, Y.; WANG, Y.; HU, X.; DAI, S.; WANG, W.; LEE, S. Y.; LIU, G. **In vitro induction of tetraploids in the ornamental plant *Melastoma candidum* using colchicine treatment**. 2024. *Research Square* [preprint]. Disponível em: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-4072444/v1>. Acesso em: 1 abr. 2025.
- ENG WH, HO WS, LING KH. *In vitro* induction and identification of polyploid *Neolamarckia cadamba* plants by colchicine treatment. **PeerJ** 9:e12399, 2021.