

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Camila Siqueira Neves**

**DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA EM PLANTAS: *Solanum  
melongena* L. COMO MODELO**

**TESE DE DOUTORADO**

JUIZ DE FORA

2017

**CAMILA SIQUEIRA NEVES**

**DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA EM PLANTAS: *Solanum melongena* L. COMO MODELO**

Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia, para obtenção do Título de Doutora em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia.

**Orientador: Professor Doutor José Marcello Salabert de Campos**

JUIZ DE FORA

2017

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Neves, Camila Siqueira.

DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA EM PLANTAS – UM MODELO DE ESTUDO EM *Solanum melongena* L. / Camila Siqueira Neves. -- 2017.

131 p. : il.

Orientador: José Marcello Salabert de Campos

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2017.

1. berinjela. 2. colchicina. 3. duplicação cromossômica. 4. hibridização fluorescente in situ. 5. hidroxíureia. I. Campos, José Marcello Salabert de , orient. II. Título.

**CAMILA SIQUEIRA NEVES**

**DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA EM PLANTAS- UM MODELO DE ESTUDO EM *Solanum melongena* L.**

Tese de Doutorado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Genética e Biotecnologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 24 / 03 / 2017.

**BANCA EXAMINADORA:**



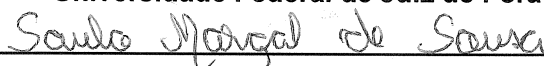
**Prof. Dr. José Marcello Salabert de Campos**

**Orientador**

**Universidade Federal de Juiz de Fora**

  
**Prof. Dr. Lyderson Facio Viccini**

**Universidade Federal de Juiz de Fora**



**Prof. Dr. Saulo Marçal de Sousa**

**Universidade Federal de Juiz de Fora**

  
**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Larissa Fonseca Andrade Vieira**

**Universidade Federal de Lavras**

  
**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Luisa Sousa Azevedo**

**Embrapa Gado de Leite**

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus amados pais, Suziengladys da Silva Siqueira e João Francisco de Assis Neves, meus maiores exemplos

## AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro para a realização do projeto e participação em eventos.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas e à Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) pela oportunidade de realizar o curso.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas pelos ensinamentos transmitidos durante as disciplinas.

A todos os professores do Laboratório de Genética da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Ao meu orientador, professor Dr. José Marcello Salabert de Campos, primeiramente por ter me recebido de braços abertos, ainda no Mestrado, quando vim de outra Universidade. Desde então, foram seis anos de orientação, ensinamentos, conselhos e, é claro, alguns puxões de orelha. Obrigada por me ensinar a ser menos ansiosa e a acreditar que, no final, tudo daria certo. Não posso deixar de agradecer também pelas horas que passou naquela sala fria do citômetro, lendo minhas amostras.

Ao professor Doutor Lyderson Facio Viccini por estar sempre disposto a ajudar.

Ao professor Doutor Saulo Marçal Sousa pela disponibilidade para tirar dúvidas e discutir resultados, principalmente em relação aos experimentos de FISH.

A todos os amigos do Laboratório de Genética pelos ótimos momentos que passamos juntos. Shaiany, Aryane, Victória, Ana Luiza, Juliana, Sirlei, Elyabe, Amanda e Rafaela. Obrigada pela companhia diária na hora do café (e foram muitos cafés), pelas risadas compartilhadas e pelos conselhos, tanto pessoais quanto acadêmicos.

À doutoranda Shaiany Sabrina Lopes Gomes que além de colega de profissão se tornou uma grande amiga. Agradeço a ajuda na realização dos experimentos de FISH e citometria, mas sou ainda mais grata por me emprestar seus ouvidos nos momentos de dúvidas e angústia, pelo apoio, pelos conselhos, pela amizade e ótima convivência desde o Mestrado.

Ao Dr. Elyabe Monteiro de Matos por colocar-se sempre à disposição para realizar a leitura das amostras de citometria.

À doutoranda Sirlei Julião por compartilhar comigo seus conhecimentos sobre cultura de tecidos e indução de poliploidia.

À aluna de Iniciação Científica Amanda Kássia Lima, sempre atenciosa e prestativa, mesmo não estando diretamente envolvida no projeto.

A Deus, pela vida e por todas as oportunidades que tive até aqui.

Aos meus pais, Suziengladys da Silva Siqueira e João Francisco de Assis Neves por não medirem esforços para que eu alcançasse meus objetivos. Obrigada pelo incentivo, pelo amor incondicional, pela preocupação constante e, principalmente, por compreenderem minha ausência em muitos momentos importantes. Agradeço a Deus todos os dias por ter em vocês grandes amigos, além de pais.

A toda a minha família, em especial às tias Vera e Iracema pela torcida e apoio incondicionais, mesmo à distância.

Às amigas e companheiras de apartamento da “família 302” pelo apoio e torcida de sempre. Obrigada por todas as conversas e conselhos na mesa da cozinha, pela amizade, pelos cafezinhos, bolos e comidas “fit” que dividimos nos bons e maus momentos.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## EPÍGRAFE

“De tudo ficaram três coisas:  
A certeza de que estamos começando,  
A certeza de que é preciso continuar e  
A certeza de que podemos ser  
interrompidos antes de terminar.  
Façamos da interrupção um caminho novo;  
Da queda, um passo de dança;  
Do medo, uma escada;  
Do sonho, uma ponte;  
Da procura, um encontro.”  
(Fernando Sabino)



## RESUMO

A indução de poliploidia é uma ferramenta muito empregada em programas de melhoramento de plantas, mas geralmente resulta em baixa eficiência e elevada taxa de indivíduos mixoploides ou aneuploides. Poliploides artificiais podem ser obtidos pela utilização de antimitóticos, que interferem na formação do fuso durante a divisão celular. Dentre eles, a colchicina é o mais empregado em estudos de poliploidia. No entanto, os mecanismos responsáveis por sua ação sobre as células ainda não foram totalmente elucidados. *Solanum melongena* L. (berinjela) apresenta tecidos com elevado potencial de regeneração *in vitro*, característica interessante para o desenvolvimento de estudos básicos e biotecnológicos. O presente trabalho teve como objetivo utilizar a berinjela como modelo para o estudo do processo de duplicação cromossômica em plantas. Foram empregadas técnicas de citogenética, citometria de fluxo e indução de poliploidia *in vitro*. O capítulo I destinou-se à caracterização citogenética da cultivar Embu de berinjela, que foi empregada em todos os experimentos. Esta cultivar apresentou 24 cromossomos, com tamanho variando entre 1,77 e 2,63  $\mu\text{m}$ . O cariótipo mostrou-se simétrico e foram observadas duas constrições secundárias. Através do bandeamento com fluorocromos CMA<sub>3</sub> e DAPI, foram observadas quatro bandas CMA positivas. A técnica de FISH permitiu a visualização de um par de sinais para a sonda DNAr 5S e dois pares para a sonda DNAr 45S. O capítulo II teve como objetivo avaliar os efeitos da colchicina (0,2% e 0,02%) sobre o ciclo celular de berinjela e a eficiência destas concentrações no processo de indução de poliploidia. De forma pioneira, a hidroxiureia foi utilizada como sincronizador do ciclo celular, com o intuito de aumentar a eficiência da poliploidização. A avaliação do ciclo celular foi conduzida em meristemas radiculares com e sem a sincronização e as análises foram realizadas por microscopia e citometria de fluxo. A indução de poliploides *in vitro*, por sua vez, foi realizada em sementes e segmentos nodais sincronizados e não sincronizados. Não foram observadas diferenças significativas em relação ao índice mitótico. Maiores percentuais de c-metáfases, metáfases duplicadas e núcleos poliploidizados (2xG2) foram observados em resposta à maior concentração de colchicina (0,2%). Os protocolos de indução de poliploidia testados mostraram-se eficientes, sendo regeneradas plantas poliploides após todos os tratamentos. Dos 480 explantes tratados com colchicina, 342 foram regenerados com sucesso, sendo 45 tetraploides e 90 mixoploides.

**Palavras-chave:** berinjela; colchicina; duplicação cromossômica; hibridização fluorescente *in situ*, hidroxiureia.

## ABSTRACT

Polyploidy induction is an important tool in plant breeding, but usually results in low efficiency and high rates of mixoploid and aneuploid plants. Synthetic polyploids can be obtained by the exposure to antimitotic agents, which interfere with the spindle formation during cell division. Colchicine is the most widely used antimitotic in polyploidy induction studies. However, the underlying mechanisms of its action on cells are not completely clear. *Solanum melongena* L. (eggplant) has a great *in vitro* regeneration capacity, an interesting feature to the development of basic and biotechnological studies. This work aimed to use eggplant as a model to study the process of chromosome doubling in plants. Cytogenetic techniques, flow cytometry and *in vitro* polyploidy induction were performed. Chapter I focused on the cytogenetic characterization of the cultivar Embu of eggplant, which was used in all experiments. This cultivar presented 24 chromosomes with length ranging from 1.77 to 2.63  $\mu\text{m}$ . The karyotype was symmetrical and two secondary constrictions were observed. The CMA<sub>3</sub>/DAPI banding showed four CMA positive bands. The FISH technique allowed the observation of one pair of sites of 5S rDNA and two pairs of 45S. The objective of chapter II was to evaluate the effects of colchicine (0.2% and 0.02%) on the eggplant cell cycle and the efficiency of these concentrations in the polyploidy induction. Innovatively, hydroxyurea was used as a cell cycle synchronizer, in an attempt to increase the efficiency of polyploidization. The cell cycle evaluation was conducted in root meristems with and without cell synchronization and the analysis were performed by light microscopy and flow cytometry. *In vitro* induction of polyploidy was performed on synchronized and non-synchronized seeds and nodal segments. No significant differences were detected in the mitotic index. Higher frequencies of c-metaphases, polyploid metaphases and polyploid nuclei (2xG2) were observed after the exposure to the higher treatment with colchicine (0.2%). The polyploidy induction protocols tested were efficient, with the regeneration of polyploid plants after all colchicine treatments. Of the 480 treated explants, 342 were successfully regenerated, being 45 tetraploids and 90 mixoploids.

**Key words:** colchicine; chromosome doubling; eggplant; fluorescent *in situ* hybridization; hydroxyurea.

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

**Figura 1.** Desafio em parceria com a Nature, lançado em 2009 pela Organização Innocentive para projetos que tivessem como objetivo o desenvolvimento de um protocolo eficiente de duplicação cromossômica em plantas. 24

**Figura 2.** Frutos da cultivar Embu de berinjela. 41

### CAPÍTULO I

**Figura 1.** (A) Metáfase mitótica de *Solanum melongena* corada com Giemsa. (B) Cariograma montado a partir da metáfase mitótica de *S. melongena*. 80

**Figura 2.** Técnica de bandeamento cromossômico aplicada aos cromossomos de berinjela, cultivar Embu. 80

**Figura 3.** Técnica de Hibridização in situ Fluorescente (FISH) com sondas para DNAr 5s e 45S aplicada aos cromossomos de *Solanum melongena*, cultivar Embu. 81

### CAPÍTULO II

**Figura 1.** Fluxograma representativo das estratégias empregadas. 92

**Figura 2.** Alterações cromossômicas observadas após exposição de meristemas radiculares de *S. melongena* à colchicina 103

**Figura 3.** Histogramas representativos das avaliações por citometria de fluxo após exposição à colchicina. 108

**Figura 4.** Distribuição dos explantes regenerados entre os diferentes níveis de ploidia após a indução de poliploidia em sementes e segmentos nodais de *Solanum melongena*. 110

**Figura 5.** Histogramas representativos dos níveis de ploidia observados após os experimentos de indução de poliploidia com colchicina. 111

## LISTA DE TABELAS

### INTRODUÇÃO

<b>Tabela 1.</b>	Variações na metodologia de indução de poliploidia em plantas.	29
<b>Tabela 2.</b>	Produção de <i>Solanum melongena</i> (berinjela) pelo Mundo.	39
<b>Tabela 3.</b>	Principais cultivares de berinjela produzidas e comercializadas no Brasil.	40

### CAPÍTULO I

<b>Tabela 1.</b>	Dados morfométricos médios dos cromossomos de <i>Solanum melongena</i> , cultivar Embu.	79
------------------	---	----

### CAPÍTULO II

<b>Tabela 1.</b>	Índice mitótico de meristemas radiculares de <i>Solanum melongena</i> expostos aos tratamentos com colchicina, após períodos de recuperação.	101
<b>Tabela 2.</b>	Índice metafásico de meristemas radiculares de <i>Solanum melongena</i> expostos aos tratamentos com colchicina, após períodos de recuperação.	101
<b>Tabela 3.</b>	Percentual total de alterações em meristemas radiculares de <i>Solanum melongena</i> expostos aos tratamentos com colchicina, após períodos de recuperação.	104
<b>Tabela 4.</b>	Percentual de c-metáfases em meristemas radiculares de <i>Solanum melongena</i> expostos aos tratamentos com colchicina, após períodos de recuperação.	104
<b>Tabela 5.</b>	Percentual de metáfases duplicadas ( $2n=48$ ) após exposição de meristemas radiculares de <i>Solanum melongena</i> L. aos tratamentos com colchicina.	105
<b>Tabela 6.</b>	Percentual de núcleos detectados em diferentes fases do ciclo celular (sub-G1, G1, S, G2 e 2xG2) após a exposição de meristemas radiculares de	107

*Solanum melongena* não sincronizados à colchicina.

<b>Tabela 7.</b>	Percentual de núcleos detectados em diferentes fases do ciclo celular (sub-G1, G1, S, G2 e 2xG2) após a exposição de meristemas radiculares de <i>Solanum melongena</i> sincronizados à colchicina.	108
<b>Tabela 8.</b>	Percentual de sobrevivência e avaliação dos níveis de ploidia, por citometria de fluxo, em <i>Solanum melongena</i> após tratamentos com colchicina em explantes sincronizados e não sincronizados.	112

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Grau de assimetria
Ai	Grau de heterogeneidade
BC	Braço curto
BL	Braço longo
CC	Classificação cromossômica
CDKs	Quinases dependentes de ciclinas
CFU	Unidade formadora de colônia
CLH	Comprimento do lote haploide
cm	Centímetro
CMA	Cromomicina
CR	Comprimento relativo
CT	Comprimento total
DA	Distamicina
DAPI	diamino-2-phenylindole
ddH <sub>2</sub> O	Água deionizada
DIG	Digoxigenina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNAr	DNA ribossomal
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FISH	Hibridização in situ Fluorescente
h	hora

HU	Hidroxiureia
IC	Índice centromérico
kV	Quilovolt
L	Litro
LB	Luria-Bertani
M	Metacêntrico
mg	Miligramas
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
nm	nanômetro
°C	Graus Celsius
p/v	Peso por volume
PBS	Tampão fosfato salino
pg	picogramas
r	Razão entre os braços
RNA	Ácido ribonucleico
RNR	Ribonucleotídeo redutase
RONs	Regiões organizadoras de nucléolo
rpm	Rotações por minuto
SSC	Tampão citrato de sódio
TRITC	Tetrametilrodamina
UBQ	Ubiquitina
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
USA	United States of America (Estados Unidos da América)
v/v	Volume por volume

W	Watts
$\mu$ F	Microfarad
$\mu$ g	Microgramas
$\mu$ L	Microlitros



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>19</b>
<b>1.1</b>	<b>A poliploidia</b>	<b>19</b>
<b>1.2</b>	<b>A poliploidia e o melhoramento de plantas</b>	<b>21</b>
<b>1.3</b>	<b>A indução de poliploidia artificial e seus desafios</b>	<b>23</b>
<b>1.4</b>	<b><i>Solanum melongena</i> Linn (berinjela) como modelo para o estudo da poliploidia</b>	<b>38</b>
<b>1.5</b>	<b>Ferramentas de auxílio ao estudo de poliploidia</b>	<b>43</b>
<b>1.5.1</b>	<b>Caracterização citogenética em espécies vegetais e em berinjela</b>	<b>43</b>
<b>1.5.2</b>	<b>Citometria de fluxo</b>	<b>47</b>
<b>1.5.3</b>	<b>Sincronização do ciclo celular com hidroxiureia nos experimentos de poliploidização</b>	<b>50</b>
<b>2</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>52</b>

### **CAPÍTULO I - CARACTERIZAÇÃO CITOGÊNÉTICA DE *Solanum melongena* Linn.**

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>71</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>73</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral</b>	<b>73</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b>	<b>73</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>74</b>
<b>3.1</b>	<b>Material Biológico</b>	<b>74</b>
<b>3.2</b>	<b>Preparo das lâminas</b>	<b>74</b>
<b>3.3</b>	<b>Contagem e Morfometria Cromossômica</b>	<b>75</b>
<b>3.4</b>	<b>Bandeamento CMA<sub>3</sub>/DA/DAPI</b>	<b>75</b>
<b>3.5</b>	<b>Hibridização in situ Fluorescente (FISH)</b>	<b>76</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>79</b>
<b>4.1</b>	<b>Contagem e Morfometria Cromossômica</b>	<b>79</b>

4.2	Bandeamento CMA3/DA/DAPI	80
4.3	Hibridização in situ Fluorescente (FISH)	81
5	DISCUSSÃO	82
6	CONCLUSÕES	85
7	REFERÊNCIAS	86

**CAPÍTULO II - INDUÇÃO DE POLIPLOIDIA IN VITRO E EFEITOS DA COLCHICINA SOBRE O CICLO CELULAR DE *Solanum melongena* Linn, VARIEDADE EMBU**

1	INTRODUÇÃO	89
2	OBJETIVOS	91
2.1	Objetivo geral	91
2.2	Objetivos específicos	91
3	MATERIAL E MÉTODOS	92
3.1	Desenho experimental	92
3.2	Material Biológico	93
3.3	Avaliação dos efeitos de antimitóticos/sincronizadores sobre o ciclo celular de <i>Solanum melongena</i> L.	93
3.3.1	Meristemas radiculares não sincronizados	93
3.3.2	Meristemas radiculares sincronizados com HU	93
3.3.3	Análise citogenética	94
3.3.4	Análise por citometria de fluxo	95
3.4	Indução de poliploidia em <i>S. melongena</i> L.	96
3.4.1	Indução de poliploidia em sementes	97
3.4.2	Indução de poliploidia em segmentos nodais	98
4	RESULTADOS	100
4.1	Avaliação dos efeitos de antimitóticos/sincronizadores sobre o ciclo celular de <i>S. melongena</i> L.	100
4.1.1	Análise citogenética	100
4.1.2	Análise por citometria de fluxo	106

<b>4.2</b>	<b>Indução de poliploidia <i>in vitro</i></b>	<b>109</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>113</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>125</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>126</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A poliploidia

De acordo com a definição clássica, organismos poliploides são aqueles que apresentam três ou mais conjuntos cromossômicos completos (MADLUNG, 2013; STEBBINS, 1950). A poliploidia pode estar presente em células de um tecido específico, em partes de um organismo ou em organismos inteiros e é considerada uma das características mais importantes na evolução dos eucariotos (COMAI, 2005; OTTO e WHITTON, 2007; RAMSEY e SCHEMSKE, 1998; SONG et al., 2012).

Os poliploides são classificados de acordo com sua origem em auto ou alopoliploides (STEBBINS, 1950). Os autopoliploides são produzidos pela duplicação do número cromossômico de uma única espécie, resultando em dois ou mais pares de cromossomos homólogos (STEBBINS, 1971; SYBENGA, 1992). Já nos alopoliploides, ocorre hibridização entre duas espécies distintas seguida da duplicação cromossômica (THOMAS, 1993) e, neste caso, o pareamento correto pode acontecer apenas entre os cromossomos do mesmo genoma (STEBBINS, 1971; SYBENGA, 1992).

Em relação ao processo de formação, os poliploides podem ocorrer por poliploidização meiótica (sexual) ou mitótica (somática). A poliploidização sexual envolve a junção de dois gametas não reduzidos, originando organismos com mais de dois conjuntos cromossômicos em um mesmo núcleo (RAMSEY e SCHEMSKE, 1998; SOLTIS, SOLTIS e TATE, 2003). Neste processo, a falha na redução gamética afeta a formação e a função do fuso acromático e a citocinese (COMAI, 2005; ACQUAAH, 2007). A poliploidização mitótica, por sua vez, ocorre devido a falhas no curso normal da divisão celular e, conseqüentemente, a célula duplica seu material genético sem completar a divisão, entrando em interfase com o dobro do material genético (RAMSEY e SCHEMSKE, 1998; OTTO e WHITTON, 2007).

A poliploidia é considerada uma das alterações citogenéticas mais importantes no processo de evolução e especiação vegetal (STEBBINS, 1950). É uma das maiores forças evolutivas em plantas superiores, uma vez que a duplicação do genoma dentro de um único organismo se torna uma fonte de inovação genética e tem potencial para gerar especiação (HEGARTY et al., 2013). A frequência natural de poliploides em angiospermas é extremamente elevada e é provável que 100% delas já tenham sofrido pelo menos um evento de poliploidização durante seu processo evolutivo (GOLDBLATT, 1980; MASTERSON, 1994; CHIES et al., 2014; CUI et al., 2006). A ocorrência de poliploides em gimnospermas é bastante rara (WU et al., 2016), sendo em torno de 5%, ao passo que cerca de 95% das pteridófitas apresentam origem poliploide (SOLTIS e SOLTIS, 1989; AHUJA, 2005).

Organismos poliploidizados geralmente apresentam novos fenótipos que podem contribuir para seu sucesso na natureza ou para seu uso na agricultura (OSBORN et al., 2003). Geralmente, poliploides apresentam folhas e flores maiores, hastes mais grossas, folhas mais verdes e maior tolerância ao estresse (KEHR 1996; KERMANI et al. 2003; SHAO et al., 2003). Alguns passam a apresentar a capacidade de produzir maior quantidade de determinado produto gênico ou até mesmo de sintetizar uma nova substância (MAYO et al, 1970). Um conhecido efeito da poliploidia é o efeito “giga”, caracterizado pelo aumento do tamanho dos órgãos dos vegetais em consequência do aumento do volume nuclear. Nestes casos, o núcleo aumenta para que seja possível acomodar o número de cromossomos duplicados e, como consequência, a planta poliploide tende a ser maior que seu correspondente diploide (CAVALIER-SMITH, 1985).

As causas dessas alterações ainda não são bem entendidas, mas sabe-se que podem envolver variações na expressão gênica regulada pela dose e rápidas mudanças genéticas e/ou epigenéticas (OSBORN et al., 2003). A duplicação gênica é uma consequência da duplicação genômica induzida pela poliploidia e traz consigo consequências evolutivas, como genes com funções diferentes, silenciamento de uma ou duas das cópias duplicadas, retenção da função original ou semelhante, ou ainda a interação entre genes duplicados, onde ocorre o efeito de dose (ADAMS e WENDEL, 2005).

Estudos mostram que a duplicação cromossômica pode também aumentar as taxas de apomixia, um efeito interessante que permite restaurar a fertilidade de híbridos e ainda manter o vigor, uma vez que a apomixia permite perpetuar caracteres favoráveis que se encontram na planta materna (NASSAR, 2006). Segundo Chen (2007), organismos poliploides podem sobreviver melhor do que seus progenitores diploides quando em ambientes adversos (frio, altas latitudes, altitudes elevadas, seca, etc.), pois a condição de poliploidia permite uma melhor adaptação a novos nichos (CHEN, 2007).

## 1.2 A poliploidia e o melhoramento de plantas

A poliploidia é interessante do ponto de vista do melhoramento genético porque produz novos fenótipos desejáveis ou fornece suporte para cruzamentos entre plantas. Organismos poliploides são ainda fontes valiosas de genes que conferem resistência a doenças e pragas, tolerância ao estresse e variação genética (PLAISTED e HOOPES, 1989). Muitas espécies cultivadas são poliploides, como alfafa (*Medicago sativa*), algodão (*Gossypium hirsutum*), batata (*Solanum tuberosum*), batata doce (*Ipomoea batatas*), café (*Coffea arabica*), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), fumo (*Nicotiana tabacum*), morango (*Fragaria ananassa*), trigo (*Triticum aestivum*), soja (*Glycine max*), canola (*Brassica napus*), aveia (*Avena sativa*), entre outras (CHEN, 2010; GOTTLIEB, 2003).

A poliploidia natural não está presente em todas as espécies de interesse econômico e agrônômico e, por isso, a indução de poliploides sintéticos vem sendo cada vez mais empregada para a manipulação do genoma vegetal (DHOOGHE et al., 2011). Várias aplicações desta técnica são descritas, como a quebra de barreiras sexuais e a restauração da fertilidade de híbridos (ISSHIKI e TAURA, 2003), a produção de plantas dihaploides, triploides e tetraploides (TOMICZAK et al., 2015), o desenvolvimento de variações fenotípicas vantajosas, como o aumento do tamanho de frutos, folhas e caules (DO AMARAL et al., 2015), a diversificação de características ornamentais (KAZI et al., 2015), o desenvolvimento de novas

variedades (WEILER et al, 2015), a indução de apomixia (RESENDE et al., 2014), o aumento da biomassa em espécies de interesse econômico ou medicinal (SERAPIGLIA et al., 2015), entre outros (NONAKA et al., 2011; RAMSEY e SCHEMSKE 1998).

Tetraploides induzidos em lírio apresentaram caules mais espessos (VAN TUYL e VAN HOLSTEIJN, 1996); em *Platanus*, a poliploidização resultou em plantas com um hábito de crescimento mais compacto (LIU; LI; BAO; 2007), a duplicação do número de cromossomos reduziu a quantidade de sementes em *Chaenomeles japônica*, mas aumentou a produção de frutos (STANYNS et al., 2006); em *Zizyphus jujube*, uma importante árvore frutífera da Ásia, a tetraploidização resultou em caules mais espessos, folhas suculentas e arredondadas, grandes flores e atraso do tempo de florescimento de três a quatro dias (GU et al., 2005); em uva (*Vitis* spp.), a poliploidia resultou em plantas com frutos maiores (NOTSUKA et al., 2000).

Em adição às mudanças morfológicas e anatômicas, os poliploides podem também exibir mudanças fisiológicas como a resistência a doenças e tolerância à seca, características de grande interesse para o sucesso comercial de plantas cultivadas (XIONG et al., 2006). Em *Lonicera japonica*, *Prunus salicina* e *Betula papyrifera*, por exemplo, os poliploides apresentam alta tolerância ao estresse hídrico (LI et al., 2009). Outros exemplos podem ser encontrados em *Lolium perene* e *Lolium multiflorum* (resistência a doenças, alta palatabilidade, aumento de carboidratos não estruturais, diminuição na produção de fibras e maior digestibilidade) (DEWEY, 1980) e em *Dioscorea* (tolerância a altas temperaturas) (ZHANG et al., 2010).

Em espécies medicinais a poliploidia pode representar um ganho devido ao aumento de biomassa e do conteúdo de compostos com ação medicinal (GAO et al., 1996). Em *Datura stramonium*, por exemplo, Berkov e Philipov (2002) relataram um aumento no conteúdo de alcaloides nas raízes e folhas (BERKOV e PHILIPOV, 2002). Ao induzir poliploidia em *Pfaffia glomerata*, conhecida como ginseng brasileiro, Gomes et al. (2014) observaram um aumento de 50% na produção de  $\beta$ -

ecdisona, a substância responsável pelas propriedades terapêuticas da espécie (GOMES et al., 2014).

A duplicação cromossômica também pode ser utilizada para quebrar as barreiras sexuais entre espécies relativamente próximas. Van Laere (2008) duplicou o número cromossômico de *Buddleja globosa* ( $2n=2x=38$ ) para permitir a hibridação interespecífica com *Buddleja davidii* ( $2n=4x=76$ ) (VAN LAERE, 2008). Exemplos de restauração da fertilidade de híbridos interespecíficos com a duplicação cromossômica também são encontrados na literatura (DUNN e LINDSTROM, 2007; CAMPOS et al., 2009). A obtenção de plantas tetraploides também pode ser um passo importante na obtenção de cultivares triploides resultantes do cruzamento entre um material diploide com um tetraploide, como descrito em *Musa* (BAKRY et al., 2007), *Weigela* (ARENE et al., 2007) e *Hibiscus* (VAN LAERE et al., 2006).

### **1.3 A indução de poliploidia artificial e seus desafios**

Embora constitua uma estratégia importante, a duplicação cromossômica induzida em plantas ainda está associada a um processo com baixa eficiência e um alto percentual de produção de plantas mixoploides e aneuploides (DHOOGHE et al., 2011). Essa ineficiência sustenta-se pela carência na literatura de trabalhos que tenham como objetivo entender o processo de duplicação, abordando aspectos básicos do efeito dos antimitóticos sobre as células, o conhecimento de características do ciclo celular das plantas, entre outros. De modo geral, os trabalhos procuram apenas a produção de plantas com o número de cromossomos duplicados, o que geralmente é alcançado com o tratamento de um número grande de plantas com os antimitóticos. Entretanto, a grande maioria dos estudos já realizados não se preocupa em contribuir para o entendimento básico do processo e possivelmente cooperar para o aumento da eficiência do mesmo.

A importância desta abordagem pode ser demonstrada por uma das ações da Organização Innocentive, que possui como objetivo incentivar a inovação e a solução de problemas relacionados à Ciência. (<http://www.innocentive.com>).



Contando com parceiros como governos e empresas como a Eli Lilly, Life Technologies, NASA, nature.com, Popular Science, Procter & Gamble, Roche e Rockefeller Foundation, a Innocentive lança desafios nas mais diversas áreas do conhecimento. O desafio lançado em 2009, por exemplo, teve como objetivo a premiação de trabalhos sobre o desenvolvimento de um protocolo eficiente de duplicação cromossômica em plantas (Figura 1). Mesmo após oito anos desta iniciativa ainda estamos à procura de um protocolo eficiente, evidenciando a importância e a necessidade deste tipo de abordagem em plantas.

The image shows a screenshot of the Innocentive website. At the top, there is a navigation bar with the Innocentive logo and links for News & Events, Blog, Contact Us, Register, and Login. Below this is a secondary navigation bar with links for My InnoCentive, Products & Solutions, For Solvers, Challenge Center, and About Us, along with a search bar. The main content area features a yellow warning box stating that the challenge is no longer open. Below this is a large card for the challenge 'Efficient Chromosome Doubling: Plant Cell Division'. The card includes a microscopic image of plant cells, the challenge title, a list of TAGS (Engineering/Design, Chemistry, Physical Sciences, Nature, Math/Statistics, Life Sciences, Food/Agriculture, Theoretical/Licensing), status (Awarded), and a description of the challenge. To the right of the main card are two smaller boxes: 'Partner Pavilion Challenge' featuring nature.com and 'InnoCentive Trust Partners' featuring BDB Accredited Business and SafeHarbor.

Figura 1 - Desafio em parceria com a Nature, lançado em 2009 pela Organização Innocentive para premiação de projetos que tivessem como objetivo o desenvolvimento de um protocolo eficiente de duplicação cromossômica em plantas. Disponível em <http://www.innocentive.com>

A indução de poliploides sintéticos pode ser feita com o uso de agentes físicos como temperatura e pressão ou de antimitóticos, que são agentes químicos que interferem na formação do fuso mitótico durante a divisão celular (DERMEN, 1938; HÄNTZSCHE e WEBER, 2010). Os antimitóticos são os mais comumente empregados e agem através da desestabilização ou da estabilização dos microtúbulos. A interrupção do processo de montagem ou desmontagem dessas estruturas impede a segregação cromossômica durante a divisão, levando à duplicação do número de cromossomos (PANSUKSAN et al., 2014; MCNULTY et al., 2015).

Dentre os antimitóticos mais conhecidos estão a colchicina, colcemide, vinblastina, acenafteno, orizalina e trifluralina. Destes, a colchicina é um dos mais empregados em estudos de duplicação cromossômica (DHOOGHE et al., 2011). A

colchicina é um alcaloide extraído de sementes e bulbos de *Colchicum autumnale* que apresenta a grande vantagem de não perder sua capacidade poliploidizante após o processo de autoclavagem (ZHANG; ZHANG; DENG; 2007).

Segundo Hegarty et al. (2013), os primeiros poliploides artificiais foram produzidos acidentalmente em 1916 por Winkler em espécies de *Solanum*. Em 1939, Blakeslee relatou sucesso na indução de poliploides em 48 diferentes espécies utilizando a colchicina (BLAKESLEE, 1939). Poliploides de beterraba, açúcar, azevém e trevo vermelho também foram induzidos após o tratamento com colchicina nos anos seguintes (DEWEY, 1980). Em 1966, Murashige e Nakano obtiveram poliploides de tabaco *in vitro* pela primeira vez. Os resultados desse estudo demonstraram o grande potencial da propagação *in vitro* para os experimentos de poliploidia, uma vez que a cultura de tecidos oferece condições mais controladas e padronizadas do que as casas de vegetação. Desde então, a indução de poliploides *in vitro* vem se tornando cada vez mais difundida (ZHANG et al., 2016; TOKUMOTO et al., 2016; HEO et al., 2016; HANNWEG; STEYN; BERTLING, 2016; SOONTHORNKALUMP et al., 2017; KHARDE et al., 2017).

Inúmeros trabalhos relatam a utilização da colchicina em experimentos de duplicação, abrangendo espécies de importância alimentícia como frutas e vegetais, cultivares agrícolas e forrageiras, espécies ornamentais e de aplicação medicinal (DHOOGHE et al., 2011). Essas espécies estão distribuídas entre os mais variados gêneros, como *Citrus* (ZHANG; ZHANG; DENG; 2007; WU e MOONEY, 2002; ALEZA et al., 2009; DUTT et al., 2010), *Musa* (GANGA e CHEZHIAN., 2002; HAMILL et al., 1992; VANDUREN et al., 1996), *Vitis* (NOTSUKA et al., 2000; YANG et al., 2006), *Allium* (SONG et al., 1997), *Solanum* (GREPLOVA; POLZEROVA; DOMKAROVA, 2009), *Paspalum* (QUESENBERRY et al., 2010) *Pennisetum* (CAMPOS et al., 2009), *Pfaffia* (GOMES et al., 2014), *Rosa* (KERMANI et al., 2003; KHOSRAVI et al., 2008; ALLUM et al., 2007) *Cattleya* (DE MELLO e SILVA et al., 2000) e *Lilium* (TAKAMURA et al., 2002).

Embora seja uma técnica bem estabelecida para espécies vegetais, a indução de poliploides *in vitro* é um processo complexo, altamente laborioso e, na grande maioria dos casos, apresenta baixas taxas de sucesso. Isso porque os mecanismos

que envolvem a duplicação cromossômica não foram completamente elucidados e ainda há muito a ser investigado. Muitas variáveis estão envolvidas nos experimentos de indução, como a escolha do agente e da concentração a ser empregada, do tipo de explante, do método de aplicação e dos períodos de exposição (DHOOGHE et al., 2011).

Diferentes explantes podem ser utilizados na duplicação *in vitro*, como sementes, segmentos nodais e intermodais, gemas apicais, protoplastos, primórdios de brotos, calos, discos foliares e caulinares, cotilédones, raízes, epicótilos e hipocótilos (MAGIOLI e MANSUR, 2005). Segundo Petersen et al. (2003), o tipo de explante utilizado irá afetar a eficiência do processo e, por isso, a sua escolha é um passo crucial no desenvolvimento de protocolos (KERMANI et al., 2003). Outro parâmetro importante a ser avaliado é o genótipo da planta a ser induzida, pois genótipos variados podem apresentar diferentes respostas a um mesmo agente indutor (STANYS et al., 2006). Muitos trabalhos mostram que o sucesso na indução está intimamente ligado à relação entre a concentração do antimitótico e os períodos de exposição e que a determinação desta relação é um dos maiores desafios enfrentados em estudos de poliploidia. A concentração ideal e o tempo de exposição variam até mesmo entre espécies de uma mesma família (CHUNG et al., 2014; KAZI et al., 2015).

O solvente no qual o antimitótico é diluído também pode influenciar nas taxas de sucesso. A diluição em DMSO é bastante comum, por aumentar a permeabilidade dos tecidos, permitindo uma maior absorção do agente químico (AWOLEYE et al., 1994; GREPLOVA; POLZEROVA; DOMKAROVA, 2009; SUBRAHMANYAM e KASHA 1975). No entanto, estudos mostram que o DMSO pode levar à morte celular (HAMILL et al., 1992). No caso da colchicina, a diluição geralmente é feita em meio de cultura líquido, água (DHOOGHE et al., 2009; HAMILL et al., 1992; PETERSEN et al., 2003; ROSE et al., 2000) ou etanol (GREPLOVA; POLZEROVA; DOMKAROVA, 2009).

Segundo Vajrabhaya (1983), a diluição da droga diretamente no meio de cultura pode aumentar consideravelmente a eficiência do processo para algumas espécies. Em um estudo com o gênero *Dendrobium*, por exemplo, Vajrabhaya

(1983) afirma que a taxa de duplicação cromossômica aumentou de 63 para 72% quando o antimetabólito foi diluído diretamente no meio. Uma possível explicação para essa diferença é que o meio aumenta a disponibilidade de nutrientes e o efeito do antimetabólito é intensificado, pois em nenhum momento irá faltar energia para a migração dos cromossomos durante a divisão celular (VAJRABHAYA, 1983).

A avaliação da eficiência do processo de duplicação é realizada após o período de regeneração dos explantes. Essa análise pode ser feita por citometria de fluxo e contagem cromossômica ou pela avaliação de parâmetros morfológicos e anatômicos (ZLESÁK et al., 2005; DOLEZEL et al., 2007). A contagem de cromossomos é considerada a técnica com resultado mais concreto, uma vez que fornece o número cromossômico exato após a indução (KIHARA, 1951; GUERRA, 1983; DOLEZEL et al., 2007). No entanto, é uma metodologia que requer conhecimento do pesquisador acerca da morfologia e caracterização cromossômica, além de ser uma análise demorada e trabalhosa, principalmente considerando que estudos de poliploidia envolvem a manipulação de um grande número de plantas.

De acordo com revisão realizada por Dhooghe et al. (2011), a citometria de fluxo é a técnica mais empregada para confirmar a poliploidia. A citometria apresenta algumas vantagens em relação à contagem convencional de cromossomos, como o preparo rápido das amostras e a possibilidade de analisar um elevado número de núcleos/células em poucos minutos. Além disso, a técnica demanda o uso de pouco material vegetal, conservando assim a integridade da planta potencialmente poliploide. Outra vantagem é a possibilidade de avaliar tecidos em estágios bem iniciais do desenvolvimento, uma vez que não é necessário esperar a emissão de raízes ou a aclimatização das plantas para a análise (VAÏNÖLÄ, 2000).

Aspectos morfológicos e anatômicos como tamanho do grão de pólen, quantidade de cloroplastos, tamanho e densidade de estômatos também podem ser empregados para a avaliação dos níveis de ploidia, mas nem sempre fornecem resultados precisos (SOUZA, 2000). Estes aspectos devem então ser utilizados como uma forma de seleção primária de poliploides, seguida da confirmação por citometria de fluxo e/ou contagem de cromossomos (DHOOGHE et al., 2011).

Sempre que possível, o maior número de métodos de detecção deve ser empregado, dando mais confiabilidade aos resultados.

Uma breve revisão de literatura é mostrada na Tabela 1, com o objetivo de ilustrar como todos estes parâmetros podem variar entre os trabalhos de indução de poliploidia com diferentes espécies. A tabela mostra dados metodológicos de 50 artigos, com datas de publicação variando entre os anos de 1972 a 2017. Destes, 46 trabalhos (92%) utilizaram a colchicina como agente antimitótico, sendo que 37 testaram apenas a colchicina (74%), 7 testaram colchicina e orizalina (14%), outros 5 testaram colchinha/orizalina e outros agentes (10%) e 2 testaram apenas a orizalina (4%).

Ainda que o uso predominante da colchicina esteja claro, é possível observar uma grande variação tanto nas concentrações empregadas (0,005% a 1%) quanto nos períodos de exposição (15 min a 30 dias). De todas as concentrações testadas, a mais frequente foi 0,1%, seguida de 0,05%, 0,01%, 0,2%, 0,3% e 0,5%, respectivamente. Em relação aos tempos de exposição, a maioria dos trabalhos investigou os efeitos da colchicina após 24 e 48h de exposição (Tabela 1).

A indução de mixoploides mostrou-se frequente em 24 (48%) dos 50 trabalhos que empregaram colchicina, confirmando que a mixoploidia é um evento comum em estudos de duplicação. Observa-se também grande variação na escolha dos explantes, sendo que a maioria dos trabalhos utilizou sementes como fonte de material para indução. Plântulas, calos, flores, segmentos nodais, meristemas e brotos também foram utilizados. Em 34,28% dos trabalhos, a colchicina foi diluída em água destilada, sendo a diluição em meio de cultura o segundo método mais frequente (24%). A citometria de fluxo foi o método empregado para a detecção de poliploides na maioria dos trabalhos (70%), e foi utilizada sozinha ou em conjunto com análises citogenéticas e morfológicas (Tabela 1).

Tabela 1. Variações na metodologia de indução de poliploidia em plantas.  
“-“ = dados não informados no artigo.

Espécie	Explante	Antimitótico	Concentrações avaliadas	Períodos de exposição	Solvente para diluição do antimitótico	Tratamento mais eficiente	Deteção de mixoploides	Método de deteção de ploidia	Referência
<i>Solanum melongena</i> (berinjela)	Sementes	Colchicina	0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,4% e 0,6%	Até a germinação	*	0,2% e 0,4% (apenas mixoploides)	Sim	Morfologia, análise do pólen e contagem de cromossomos.	Medina et al., 1972.
<i>Acacia mearnsii</i>	Sementes	Colchicina	0,01%; 0,03%; 0,05%; 0,07%; 0,1%	6, 12, 24 e 48h	Água destilada	0,01% - 6h	Não	Quantidade de estômatos e tamanho de células-guarda.	Beck, Dunlop e Fossey 2003.
<i>Solanum</i>	Meristemas apicais	Orizalina	2,88, 14,4 e 28,8 $\mu$ M	6 e 24h	DMSO	28,8 $\mu$ M – 24h	Sim	Citometria de fluxo e caracteres morfológicos.	Chauvin et al., 2003.
<i>Allium cepa</i>	Embriões	Orizalina APM	2,5, 5, 7,5, 10, 25, 50 e 75 $\mu$ M,	Meio líquido: 30 min e 1h Meio sólido: 1, 2 e 3 dias	Hidróxido de potássio + água destilada Metanol + água destilada	APM 50 $\mu$ M – 2 dias.	Sim	Citometria de fluxo.	Jakse, Havey e Bohanec, 2003.
<i>Solanum</i> spp. (batata)	Meristemas apicais	Colchicina	12 $\mu$ M e 25 $\mu$ M	24 e 48h	Água destilada + DMSO	Orizalina 28 $\mu$ M – 24h	Sim	Citometria de fluxo e caracteres morfológicos.	Barandalla et al., 2006.

Espécie	Explante	Antimitótico	Concentrações avaliadas	Períodos de exposição	Solvente para diluição do antimitótico	Tratamento mais eficiente	Deteção de mixoploides	Método de deteção de ploidia	Referência
<i>Platanus acerifolia</i> (plátano)	Sementes e meristemas apicais	Colchicina	0.1, 0.2, 0.3, 0.4 e 0.5%	24h	Água destilada	0,4% - 24h (em sementes)	Sim	Triagem pelo tamanho dos estômatos, seguida de citometria de fluxo.	Liu, Li e Bao, 2007.
<i>Colophospermum mopane</i>	Sementes	Colchicina	0.05, 0.1 e 1.0%	24, 48 e 96h	Água destilada	0,1% - 48h	Sim	Citometria de fluxo.	Rubuluza et al., 2007.
<i>Pennisetum</i> spp.	Plântulas, meristemas e segmentos nodais.	Colchicina	0,05% e 0,1%	6, 12, 15 e 24h	Água destilada	0,1% - 24h (em plântulas)	Sim	Contagem de cromossomos e viabilidade polínica.	Barbosa et al., 2007.
<i>Lavandula angustifolia</i>	Sementes	Colchicina	0, 3,6, 7,8, 15,6, 31,3, 62,5, 125, 500 e 1000 mg l <sup>-1</sup>	7 dias	*	*	Sim	Citometria de fluxo.	Urwin; Horsnel; Moon, 2007.
<i>Citrus sinensis</i>	Calos	Colchicina	1000 mg l <sup>-1</sup> .	0, 2, 4, 6, e 10 dias	DMSO	1000 mg l <sup>-1</sup> – 4 e 6 dias.	Não	Citometria de fluxo.	Zhang, Zhang e Deng, 2007.
<i>Phlox subulata</i>	Meristemas	Colchicina	0.005, 0.01, 0.02 e 0.04%	10, 20 e 30 dias	*	0.005% - 20 dias	Sim	Contagem de cromossomos e análise morfológica.	Zhang et al., 2008.
<i>Rosa</i> spp.	Segmentos nodais.	Orizalina Trifluralina AMP	0, 3, 6, 12 e 24 µM	12, 24 e 48h.	DMSO	APM – 48h	Sim	Citometria de fluxo.	Khosravi et al., 2008.

Espécie	Explante	Antimitótico	Concentrações avaliadas	Períodos de exposição	Solvente para diluição do antimitótico	Tratamento mais eficiente	Deteção de mixoploides	Método de deteção de ploidia	Referência
<i>Pennisetum</i> spp.	Plântulas	Colchicina	0,1%	24h	Água destilada	*	Sim	Contagem de cromossomos, análise estomática e citometria de fluxo.	Campos et al., 2009.
<i>Miscanthus X giganteus</i>	Calos	Colchicina	313, 626, e 939 $\mu$ M	2, 4 e 7 dias	Meio líquido	15 $\mu$ M orizalina – 2 dias	Sim	Citometria de fluxo e análise morfológica.	Yu et al, 2009.
<i>Solanum lycopersicum</i> L. (tomate)	Raízes	Colchicina	5, 6.5 e 8 mM	96 e 120h	Meio de cultura	8mM – 96h	Sim	Citometria de fluxo e análise citogenética.	Praça et al., 2009.
<i>Solanum</i> spp.	Segmentos nodais	Colchicina	0.5; 2.0; 3.5 e 5 mM	8, 24 e 48h	Etanol + água destilada	Orizalina 25 e 30 $\mu$ M (tempo ideal não foi estabelecido)	Sim	Citometria de fluxo.	Greplova, Polzerova e Domkarova, 2009.
		Orizalina	15; 20; 25; 30 $\mu$ M		DMSO				
<i>Paulownia tomentosa</i>	Calos embrionários	Colchicina	0.01, 0.05 e 0.1%	24, 48 e 72h	Meio líquido	0,05 – 48h	Não	Citometria de fluxo, análise de estômatos e análise cromossômica.	Tang et al., 2010.
<i>Citrus reticulata</i>	Suspensão de células	Colchicina	1 $gL^{-1}$	4 e 8 dias	DMSO + água destilada	1 $gL^{-1}$ – 4 dias	Não	Citometria de fluxo e contagem de cromossomos.	Dutt et al., 2010.



Espécie	Explante	Antimitótico	Concentrações avaliadas	Períodos de exposição	Solvente para diluição do antimitótico	Tratamento mais eficiente	Deteção de mixoploides	Método de deteção de ploidia	Referência
<i>Miscanthus sinensis</i> e <i>M. x giganteus</i> .	Brotos	Colchicina	156.5, 313, 626 e 1252 $\mu\text{M}$	6, 18 e 24h	Água destilada	313 $\mu\text{M}$ – 18h	Não	Citometria de fluxo, estômatos e pólen.	Głowaca, Jezowski e Kaczmarek, 2010.
<i>Paspalum Notatum</i> (grama-batatais)	Calos	Colchicina	313, 626 e 900 $\mu\text{M}$	48h	Água destilada	Orizalina 20 $\mu\text{M}$	Não	Citometria de fluxo e contagem de cromossomos.	Quesenberry et al., 2010.
		Orizalina			DMSO				
		Trifluralina	5, 10 e 20 $\mu\text{M}$						
<i>Zea mays</i>	Sementes	Tratamentos físicos e antimitóticos (colchicina, griseoflúvina, APM, orizalina, pronamida, trifluralina e cafeína) e a combinação de métodos físicos e químicos	Colchicina (1,25mM), griseoflúvina (80 $\mu\text{M}$ ), APM (40 $\mu\text{M}$ ), orizalina (10 $\mu\text{M}$ ), trifluralina (40 $\mu\text{M}$ ) e cafeína (5mM).	8h	Água destilada: (colchicina e cafeína)  DMSO: griseoflúvina, APM, orizalina, pronamida, trifluralina	APM, pronamida e orizalina	Não	Contagem de cromossomos e citometria de fluxo.	Häntzschel e Weber, 2010.
<i>Dendranthema nankingense</i>	Segmentos nodais	Colchicina	500mgL <sup>-1</sup>	48h	*	*	Não	Citometria de fluxo, análise morfológica e contagem de cromossomos.	Liu et al., 2011.

Espécie	Explante	Antimitótico	Concentrações avaliadas	Períodos de exposição	Solvente para diluição do antimitótico	Tratamento mais eficiente	Deteção de mixoploides	Método de deteção de ploidia	Referência
<i>Lychnis</i> spp.	Segmentos nodais	Colchicina	100, 500 e 1000 mg l <sup>-1</sup> 10,	24h	DMSO	Orizalina 10 mg l <sup>-1</sup>	Sim	Citometria de fluxo e análise morfológica.	Nonaka et al., 2011.
		Orizalina	20 e 50 mg l <sup>-1</sup>						
		APM	1, 5 e 10 mg l <sup>-1</sup>						
<i>Hylocereus</i> spp.	Brotos axilares	Colchicina	0.1, 0.2 e 0.4%	24 e 48h	Água destilada + 0,1% Triton X- 100	Colchicina 0,3% - 48h (em sementes).	Sim	Contagem de cromossomos e citometria de fluxo.	Tel-Zur et al, 2011.
	Sementes		0.05, 0.1, 0.2, 0.3 e 0.4%						
	Brotos axilares	Orizalina	0.001, 0.05 e 0.01%		Água destilada				
	Sementes		0.0001, 0.001, 0.005, 0.01 e 0.05%						
<i>Actinidia chinensis</i> (kiwi)	Brotos	Colchicina	0,05 e 0,1%	4h	*	0,05% – 4h	Sim	Citometria de fluxo.	Wu, Ferguson e Murray, 2011
<i>Musa acuminata</i> (banana)	Ápices caulinares	Colchicina	1,25, 2,5, 3,75 e 5 mmol L <sup>-1</sup>	24 e 48h	Meio líquido	Colchicina 1,25 e 3,75 mmol L <sup>-1</sup>	Não	Caracteres morfofisiológicos	Costa et al., 2011.
		Orizalina	15, 22,5 e 30 µmol L <sup>-1</sup>	3 e 7 dias					
<i>Torenia</i>	Folhas	Colchicina	5, 10 , 15 e 20 mol mol <sup>-1</sup>	1,2 e 3 dias	Água destilada	15 µmol mol <sup>-1</sup> - 2 dias	Não	Tamanho dos estômatos e contagem de cromossomos.	Jiranapapan et al., 2011.

Espécie	Explante	Antimitótico	Concentrações avaliadas	Períodos de exposição	Solvente para diluição do antimitótico	Tratamento mais eficiente	Deteção de mixoploides	Método de deteção de ploidia	Referência
<i>Trifolium alexandrinum</i>	Sementes	Colchicina	Imersão: 0,05%	2h 30 min	*	Colchicina 0,1% (em plântulas).	Não	Contagem de cromossomos e caracterização morfológica.	El-Naby et al., 2012.
	Plântulas		Aplicação no meristema apical: 0.1, 0.2 e 0.3%	3x com intervalo de 3h					
<i>Clivia miniata</i>	Embriões	Colchicina	0.00, 0.01, 0.03 e 0.05%	10, 20 e 30 dias	Meio MS	0,03% - 20 dias	Sim	Caracteres morfogenéticos.	Wang e Lei, 2012.
<i>Drosera capensis</i>	Folhas	Orizalina	20, 40, 60 e 80 µM	12, 24 e 48h	*	20 µM - 48 h, 60 µM - 24 h e 80 µM - 12 h	Não	Citometria de fluxo.	Zahumenicka et al., 2013.
<i>Panicum virgatum</i>	Calos	Colchicina	Meio sólido: 0,01 %, 0,02 % e 0,03 %	2, 6 e 13 dias	Etanol	0,04% - 13 dias	Não	Citometria de fluxo e caracteres morfogenéticos.	Yang et al., 2014.
			Meio líquido: 0,02 %, 0,04 %, e 0,06 %	2, 4, 6, e 13 dias					
<i>Brassica campestris</i>	Sementes e plântulas	Colchicina	0.3, 0.4, 0.5, e 0.6%	12, 24 e 36h	Água destilada	0,6% - 12h (em plântulas)	Sim	Análise estomática e contagem de cromossomos.	Kumar e Dwivedi, 2014.
<i>Echium amoenum</i>	Sementes	Colchicina	0, 0.25, 0.5, 0.75 e 1%	6, 12, 24, 36 e 48h	*	1% - 48h	Não	Análise do cariótipo, análise estomática e marcadores ISSR.	Azoush, Kazemitaba, e Heidari, 2014.
<i>Citrus reticulata</i>	Sementes	Colchicina	.01%, 0.05%, 0.1% e .0,2%	12, 24 e 48h	-	0,2% por 24h	Não	Análise de estômatos e avaliação citogenética.	Elyazid e Shereif, 2014.

Espécie	Explante	Antimitótico	Concentrações avaliadas	Períodos de exposição	Solvente para diluição do antimitótico	Tratamento mais eficiente	Deteção de mixoploides	Método de deteção de ploidia	Referência
<i>Eriobotrya japonica</i>	Plântulas	Colchicina	0,1 %	15, 30, 45 e 60 min	Água destilada	0.5 % - 24h (em sementes)	Não	Citometria de fluxo, contagem de cromossomos e caracterização morfológica.	Blasco et al., 2015.
			0.01 e 0.05 %	24h, 48 e 72h					
			0.1, 0.3 e 0.5 %	24 e 48h					
<i>Pfaffia glomerata</i>	Segmentos nodais	Colchicina e orizalina	10, 15, 20, 25, e 30 µM	1 a 2 semanas	Meio MS	Colchicina 15-30 µM (1 semana)	Sim	Citometria de fluxo	Gomes et al., 2014
<i>Calanthe discolor</i> x <i>Calanthe sieboldii</i>	Sementes	Colchicina e orizalina	0,05 0,1 % (colchicina) e 0,0003% (orizalina)	3 e 7 dias (colchicina) 1, 2,4 e 7 dias (orizalina)	-	0.003% de orizalina por 1 e 2 dias	Sim	Citometria de fluxo	Chung et al., 2014
<i>Hebe 'Oratia Beauty'</i>	Segmentos nodais	Colchicina e orizalina	500 e 1000 µM (colchicine) e 11.5, 58 e 289 µM (orizalina)	48h, com agitação	DMSO	289 µM de orizalina	Sim	Citometria de fluxo	Gallone; Hunter; Douglas, 2014.
<i>Mitracarpus hirtus</i>	Meristemas apicais	Colchicina	0,01, 0,1 e 1%	24h	-	0,1%	Não	Citometria de fluxo e contagem cromossômica.	Pansuksan et al., 2014.
<i>Cannabis sativa</i>	Brotos	Colchicina	0, 0.1, e 0.2 %	24 e 48h	-	0,2 e 0,1%, por 24h	Sim	Citometria de fluxo	Bagheri e Mansouri, 2015.

Espécie	Explante	Antimitótico	Concentrações avaliadas	Períodos de exposição	Solvente para diluição do antimitótico	Tratamento mais eficiente	Deteção de mixoploides	Método de deteção de ploidia	Referência
<i>Thymus persicus</i>	Segmentos nodais	Colchicina	0, 0.05, 0.1, 0.3 e 0.5 %	12 a 48h	DMSO	0,3% por 12h	Sim	Citometria de fluxo e contagem cromossômica.	Tavan; Mirjalili; Karimzadeh, 2015.
<i>Phalaenopsis amabilis</i>	Flores	Colchicina	0, 50, 500, 1000, e 2000 mg.L <sup>-1</sup>	3 e 4 dias	-	500 mg.L <sup>-1</sup> , por 5 dias	Não	Avaliação morfológica.	Azmi et al., 2016.
<i>Dioscorea rotundata e Dioscorea cayenensis</i>	Segmentos nodais	Colchicina	0.1, 0.2 e 0.3%	8h	Água destilada	0,1%	Não	Citometria de fluxo e análise de estômatos	Babil et al., 2016.
<i>Lilium leichtlinii</i>	Bulbos	Colchicina	0,05, 0,1 e 0,2%	1, 6 e 9h	-	0,2% por 9h	Não	Citometria de fluxo e contagem cromossômica.	Heo et al., 2016.
<i>Siphonochilus aethiopicus</i>	Segmentos nodais	Colchicina	0,01, 0,10, 1,0 e 10 g.L <sup>-1</sup>	Overnight e 3 dias	-	1 g.L <sup>-1</sup> , por 3 dias	Sim	Citometria de fluxo.	Hannweg; Steyn; Bertling, 2016.
<i>Kaempferia rotunda</i>	Raízes	Colchicina	0,2%	4 dias	-	0,2% por 4 dias	Sim	Citometria de fluxo e análise de estômatos.	Soonthornkalump et al., 2017.
<i>Bacopa monnieri</i>	Folhas	Colchicina	0.1% e 0.2%	1, 2, 3, 4 e 5 h	DMSO	0,1% por 5h	Não	Avaliação morfológica.	Kharde et al., 2017.

Espécie	Explante	Antimitótico	Concentrações avaliadas	Períodos de exposição	Solvente para diluição do antimitótico	Tratamento mais eficiente	Deteção de mixoploides	Método de deteção de ploidia	Referência
<i>Tagetes erecta</i>	Sementes	Colchicina	0,05%, 0,1%, 0,2% e 0,4%	3h, 6h e 9h	-	0,05% por 3-6h	Sim	Análises morfológicas e citometria de fluxo.	He et al., 2017.
<i>Fagopyrum tataricum</i>	Meristema apical	Colchicina	0,25%	48h, 72h e 96h	-	0,25% por 72h	Não	Análises morfológicas e contagem de cromossomos.	Wang et al., 2017.
<i>Petunia hybrida</i>	Folhas	Colchicina	0,2g.L <sup>-1</sup>	15 e 30 dias	Meio de cultura	0,2g.L <sup>-1</sup> , por 15 dias	Não	Caracterização morfológica e citometria de fluxo.	Regalado et al., 2017.

Os dados obtidos através da revisão de literatura mostrada na Tabela 1 reforçam as dificuldades enfrentadas no desenvolvimento de protocolos de indução de poliploidia. No entanto, algumas considerações se repetem em vários trabalhos e podem auxiliar durante o processo. Assim, antes de se iniciar a indução artificial de poliploidia em uma espécie as seguintes questões devem ser consideradas: a) diferentes explantes geralmente requerem diferentes metodologias de indução; b) diferentes agentes antimitóticos levam a diferentes taxas de sucesso; c) há uma forte relação entre concentração e período de exposição; d) doses e/ou períodos de exposição muito baixos podem gerar plantas mixoploides, enquanto doses muito altas levam à reduplicação ou à morte celular; e) o genótipo da planta influencia nas taxas de sucesso e f) a combinação do maior número de métodos de confirmação possíveis é a melhor estratégia para comprovar a poliploidia e excluir a possibilidade de mixoploida (DHOOGHE et al., 2011).

#### **1.4 *Solanum melongena* Linn (berinjela) como modelo para o estudo da poliploidia**

*Solanum melongena* (berinjela) é uma espécie diploide ( $2n=2x=24$ ), preferencialmente autógama, auto compatível e hermafrodita (SEKARA et al., 2007), com temperatura ótima para crescimento e produção de frutos variando entre 25 e 35°C (GEORGE, 2004). A espécie teve como centros de origem o Oriente e a Ásia (GLEDDIE et al., 1986) e nos dias atuais é cultivada em diversas partes do mundo, principalmente em regiões tropicais e temperadas (FILGUEIRA, 2012). A berinjela é uma das principais culturas da família Solanaceae e é considerada o quarto vegetal mais consumido em todo o mundo, ficando atrás apenas da batata, da pimenta e do tomate (COLLONNIER et al., 2001).

No Brasil, a berinjela foi introduzida pelos portugueses no século XVI e é cultivada principalmente nos estados de São Paulo e Minas Gerais (RIBEIRO, 1998). É uma espécie que apresenta grande importância econômica, graças a seu fruto altamente nutritivo, fonte de proteínas, carboidratos, vitaminas e minerais (RAY

et al., 2011). Dados da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) mostram que só em 2013 foram produzidas mais de 49 milhões de toneladas de berinjela em todo o mundo, sendo a Ásia e a África os principais centros de produção (Tabela 2).

Tabela 2. Produção de *Solanum melongena* (berinjela) pelo Mundo. Fonte: FAO, 2013.

Região	Área colhida (há)	Rendimento (Kg/ha)	Produção (t)
Mundo	1867350.49	26464.347	49418212.00
Ásia	1739507.00	26797.704	46614794.00
África	1739507.00	21361.139	1696523.00
Europa	36350.10	233103.35	847333.00
América do Norte	2034.00	33325.467	67784.00
América Central	2046.00	66631.476	136328.00
América do Sul	2377.86	9639.760	22922.00
Oceania	670.00	6016.418	4031.00

Na medicina popular, o consumo do fruto da berinjela é indicado para o tratamento de diversas doenças como diabetes, bronquite e disúria e pode ser empregado ainda no combate a altos níveis de colesterol (JORGE et al., 1998; KASHYAP et al, 2003; ALIM et al., 2015). Segundo Antonini et al. (2002), o consumo desta hortaliça aumentou significativamente após a atribuição de propriedades fitoterápicas à espécie, principalmente em relação ao combate à hipercolesterolemia. A berinjela contém fenóis com atividade antioxidante e anti-inflamatória que evitam a aglomeração de plaquetas no sangue e combatem a ação de radicais livres. O mecanismo de ação dos princípios ativos presentes no fruto ainda não foram totalmente elucidados, mas muitos pesquisadores afirmam que seu consumo auxilia o processo de digestão, combate o colesterol e inibe a absorção intestinal de gorduras (GUIMARÃES et al., 2000; MORENO-PEÑA; ORANDAY-CÁRDENAS; CORDERO-PÉREZ, 2016). Por todas essas características, a berinjela vem sendo citada por diversos autores como um alimento funcional (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1999).



*Solanum melongena* L. sp. compreende uma ampla gama de variedades e cultivares que podem apresentar características agrônômicas e morfológicas distintas, tais como taxa de produtividade, formato, coloração, brilho dos frutos e resistência a doenças. Os dados mais recentes da Embrapa em relação ao cultivo de berinjela no Brasil registram a comercialização de pelo menos 19 diferentes cultivares, conforme pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3. Principais cultivares de berinjela produzidas e comercializadas no Brasil.

Cultivar/variedade	Cor do fruto	Formato do fruto
Embu	Vinho-escuro e brilhante	Oblongo
Flórida Market	Roxo -escuro	Oblongo
Preta Comprida	Roxo	Cilíndrico e alongado
Comprida Roxa	Roxo	Cilíndrico e alongado
Redonda Roxa	Roxo e brilhante	Redondo
Redonda Rosa	Rosa-degradê e brilhante	Redondo
Ciça	Roxo-escuro e brilhante	Oblongo e alongado
Solara	Negro	Cilíndrico e bojudo
Nápoli	Vinho-escuro e brilhante	Cilíndrico e bojudo
Napolitana	Vinho –escuro e brilhante	Cilíndrico e bojudo
Roma	Vinho-escuro e brilhante	Cilíndrico
Romanita	Roxo e brilhante	Cilíndrico e alongado
Milaneza	Roxo e brilhante	-
Ryoma	Preto e brilhante, com cálice roxo	Ovalado
Kokuyo	Preto e brilhante, com cálice roxo	Alongado
Shoya Long	Preto e brilhante, com cálice roxo	Alongado
Kumamoto Naganassu	Roxo–escuro e brilhante	Alongado e pontudo
Kokushi Oonaga	Roxo–escuro e brilhante	Alongado
Kuro Kunishiki	Roxo-escuro	Alongado

Adaptada de Reis et al., 2007.

“-“ = informação não encontrada.

A berinjela Embu apresenta fruto oblongo e bojudo, de cor vinho escuro brilhante (Figura 2), com comprimentos que podem variar entre 18 e 20 cm. O período de colheita desta cultivar varia entre 120 e 150 dias e ela se destaca por apresentar ampla adaptação climática e frutos de boa qualidade (SILVA; OLIVEIRA; HRNCIR, 2016).



Figura 2. Frutos da cultivar Embu de berinjela.

Além de alterações nas características morfológicas e agrônômicas, cultivares/variedades distintas de uma mesma espécie podem apresentar diferenças citogenéticas, tais como alterações no tamanho, no número e na forma dos cromossomos e variações nos padrões de bandas cromossômicas (BONASORA; POGGIO; GREIZERSTEIN, 2013). Por isso, a caracterização adequada de cada cultivar é importante, principalmente quando a espécie é empregada como modelo de estudo.

Em adição à sua clara importância econômica e de suas aplicações na medicina popular, *S. melongena* apresenta tecidos com elevado potencial morfogenético, característica extremamente útil em trabalhos com abordagens biotecnológicas, como a produção de variedades melhoradas, o resgate de embriões, seleção *in vitro*, hibridização somática e transformação genética (MAGIOLI e MANSUR, 2005). Esta plasticidade faz da espécie um modelo completo para estudos em diferentes áreas de pesquisa, como a avaliação e controle da expressão gênica e da estabilidade de somaclones derivados de processos

morfogenéticos. No entanto, até o momento, os estudos empregando a berinjela como planta modelo são focados principalmente no melhoramento de recursos genéticos e de características agronômicas (COLLONIER et al. 2001; KASHYAP et al. 2003) e no potencial de regeneração da espécie *in vitro* (KUMARI, GAMBHIR e SRIVASTAVA, 2013; BHATTI, JAMIL e TUFAIL, 2014; DHATT e SIDHU, 2014).

Assim, a berinjela proporciona um sistema promissor para estudos básicos, principalmente aqueles referentes à fisiologia, bioquímica, genética e biologia celular, durante o crescimento e diferenciação *in vitro*, visando um melhor entendimento dos processos de morfogênese. Até o momento, não há registros da utilização da berinjela como modelo para o estudo do processo de duplicação cromossômica propriamente dito, ou de uma avaliação sistemática das alterações cromossômicas induzidas pelos agentes antimitóticos empregados nos processos de indução. Dessa forma, a proposta do presente trabalho foi uma abordagem inédita do uso da espécie.

Em um dos poucos trabalhos que objetivou induzir a poliploidia em berinjela, Medina et al., (1972) trataram sementes da cultivar Santa Genebra com diferentes concentrações de colchicina. Os autores não relataram plantas completamente poliploides e apenas plantas quiméricas foram obtidas a partir das concentrações de colchicina avaliadas 0,4 e 0,6% (MEDINA et al., 1972).

Além de representar uma planta modelo, os estudos de duplicação cromossômica podem ainda constituir uma ferramenta útil ao melhoramento de berinjela. Em uma das estratégias utilizadas no melhoramento, espécies selvagens, especialmente *S. indicum*, *S. gilo* e *S. incanum* são hibridizadas com *S. melongena*. Tal estratégia tem como objetivo a transferência de características como a resistência a doenças e tolerância a fatores abióticos (BEHERA E SINGH, 2002). Entretanto, os resultados alcançados com os cruzamentos entre essas espécies ainda são contraditórios e muito pouco se conhece, por exemplo, sobre o comportamento dos cromossomos nos híbridos.

Como já comentado anteriormente, a restauração da fertilidade em possíveis híbridos que não apresentem comportamento meiótico estável pode representar um ganho para o uso dos híbridos entre essas espécies nos programas de

melhoramento. Como exemplo, um dos principais problemas para a cultura da berinjela é o ataque por ácaros (*Tetranychus urticae*), o que conduz a redução de produtividade, deterioração da qualidade do fruto e morte das plantas. A variabilidade genética para a resistência dentro do germoplasma da berinjela é pequena (SCHAFF et al., 1982), mas tem sido relatada, contudo, que a espécie selvagem, *Solanum macrocarpon* L., é resistente a este ácaro (SCHAFF et al., 1982). Entretanto, sucesso na introgressão dessa resistência no germoplasma de berinjela não tem sido alcançado e Gowda et al., (1990) e Bletsos et al., (2004) relataram que o híbrido entre essas espécies é estéril. A duplicação do número de cromossomos pode representar, neste caso, uma estratégia para a restauração da fertilidade. Outros exemplos são a resistência contra *Ralstonia solanacearum* em híbridos entre *S. melongena* e *S. aethiopicum* (COLLONNIER et al., 2001) e a resistência contra *Ralstonia solanacearum* e *Verticillium dahliae* em híbridos de *S. melongena* e *S. torvum* (COLLONNIER et al., 2003). A manipulação de ploidia nestes e em outros híbridos pode representar então uma boa estratégia para o melhoramento da berinjela.

## **1.5 Ferramentas de auxílio ao estudo de poliploidia**

### **1.5.1 Caracterização citogenética em espécies vegetais e em berinjela**

A caracterização citogenética envolvendo a avaliação de dados como tamanho dos cromossomos, relação entre os braços, presença de constrições secundárias e de satélites pode trazer informações valiosas, principalmente quando se quer comparar espécies diferentes ou examinar a variação entre indivíduos ou variedades de uma mesma espécie (LAVANIA, 2016). Rearranjos estruturais, por exemplo, podem ser detectados por meio de diferenças no tamanho relativo, na posição dos centrômeros, no número básico de cromossomos ( $x$ ) e no número, tamanho e posição de satélites (SOARES-SCOTT et al., 2005). Essas características também podem ser empregadas em estudos de relações evolutivas e

filogenéticas e na avaliação de alterações cromossômicas (GUERRA, 1988; PRINGLE e MURRAY, 1991; DIOSDADO e PASTOR, 1993; PANDIT e BABU, 1993).

Nos últimos anos, as técnicas citogenéticas apresentaram um grande desenvolvimento, permitindo que a citogenética contribua de forma mais efetiva tanto em estudos taxonômicos e filogenéticos quanto na compreensão da estrutura dos cromossomos em si (PESSOA; FELIX; ALVES, 2014). As técnicas de coloração diferencial dos cromossomos começaram a surgir na década de 70, com destaque para o bandeamento C e o bandeamento com os fluorocromos cromomicina ( $CMA_3$ ) e 4'6-diamino-2-phenylindole (DAPI). Essas duas metodologias geram blocos de coloração diferenciada chamadas de bandas, que possibilitam uma melhor visualização dos cromossomos individuais em comparação com as técnicas convencionais (BRASILEIRO-VIDAL e GUERRA, 2002).

O bandeamento com fluorocromos  $CMA_3$ /DAPI baseia-se na ligação específica com, no mínimo, quatro pares de bases repetidas em tandem no DNA, através da formação de pontes de hidrogênio e outras interações eletrostáticas (MANZINI et al., 1985). A técnica produz padrões de bandas de acordo com suas afinidades pelas bases nitrogenadas do DNA, sendo emitida uma banda fluorescente azul brilhante em regiões cromossômicas ricas em AT e uma fluorescência amarela brilhante em regiões ricas em CG (BAGULEY, 1982). Segundo Zanela (2009), o contraste entre os dois corantes pode ser aumentado pelo uso de distamicina (DA) e a actinomicina D (ZANELA, 2009).

Em plantas, a coloração diferencial com  $CMA_3$ /DAPI possibilita a caracterização de regiões heterocromáticas, revelando um número variável de regiões cromossômicas mais brilhantes ou positivas (+), a ausência de bandas ou bandas negativas (-) ou regiões neutras (0) (SCHWEIZER, 1981). Os resultados obtidos com esta metodologia permitem uma caracterização mais eficiente dos cariótipos do que a coloração convencional com Giemsa e o bandeamento C (GUERRA, 2000).

Diversas aplicações são descritas, como em estudos sobre a origem e a evolução de cariótipos de plantas, já relatados para espécies dos gêneros *Spondias*

(ALMEIDA et al., 2007), *Epidendrum* (PESSOA; FELIX; ALVES, 2014) e *Selaginella* e para as espécies *Emilia fosbergii* (MORAES e GUERRA, 2010) e *Clivia mirabilis* (MURRAY et al., 2011). O bandeamento também pode ser empregado para auxiliar no estudo e na caracterização de diferentes variedades e espécies, como é o caso de *Citrus* (GUERRA, 1993), cultivares de mandioca (GUERRA e CARVALHO, 2002), *Lilium* (SILJAK-YAKOVLEV et al., 2003), *Crinum* (Amaryllidaceae) (AHMED et al., 2004), *Crotalaria juncea* (Fabaceae) (MONDIN et al., 2007), *Alismataceae* e *Limnocharitaceae* (FEITOZA et al., 2010).

Outra metodologia importante que surgiu para aperfeiçoar os estudos citogenéticos foi a Hibridização in situ Fluorescente (FISH), empregada para a visualização de regiões definidas de ácidos nucleicos, DNA alvo (DNA ou RNA), em preparações celulares, através da hibridação com sequências complementares conhecidas (sondas). A técnica possibilita, por exemplo, a localização de sequências específicas de ácidos nucleicos, genes ribossômicos ou sequências repetitivas em tandem localizadas nos centrômeros ou telômeros. É possível assim, construir mapas físicos dos cromossomos, que auxiliam na análise de sua estrutura, função e evolução (BRASILEIRO-VIDAL e GUERRA, 2002). Esse tipo de abordagem citogenética a nível molecular permite obter informações mais precisas acerca de determinadas sequências de DNA, detectar rearranjos cromossômicos, determinar a origem dos cromossomos, construir mapas gênicos e até mesmo estabelecer relações filogenéticas (PHILLIPS e REED, 1996).

A técnica de FISH foi descrita pela primeira vez por Gall e Pardue em 1969 e tem como objetivo, basicamente, verificar se a célula, tecido ou cromossomo em estudo possui as sequências de nucleotídeos empregadas como sonda. Dessa forma, a hibridização in situ possibilita a integração entre os conhecimentos de biologia celular, citogenética clássica e genética molecular (ZANELLA, 2009).

Em plantas, as sondas mais empregadas são aquelas feitas a partir de regiões repetitivas, uma vez que estas são mais facilmente detectadas. Destacam-se as sondas de sequências de DNA ribossomal 5S e 45S, por serem regiões altamente conservadas em espécies vegetais (LAWRENCE e APPELS, 1986; FLAVELL, 1989). É sabido que graças à sua relação com as regiões organizadoras

de nucléolo (RONS), a localização, o polimorfismo e o número de sítios de DNAr 45S podem ser empregados como ferramenta útil em estudos de citotaxonomia e evolução cromossômica (HESLOP-HARRISON, 2000; RAINA et al., 2001). As RONS são segmentos específicos dos cromossomos que apresentam cópias em tandem dos genes 5S, 18S, ou 26S do DNAr, e codificam RNA ribossômico. Geralmente, apresentam-se como constrições secundárias dos cromossomos, sendo responsáveis pela formação dos nucléolos, estruturas presentes nas células eucariotas responsáveis pela biogênese dos ribossomos (SUMNER, 2003). A localização de RONS pode ser uma estratégia útil na diferenciação tanto intra quanto interespecífica e também pode ajudar em questões de posicionamento taxonômico de uma espécie em termos de evolução do cariótipo (KLINKHARDT, 1998).

A FISH é uma técnica versátil que pode ser aplicada com as mais diversas abordagens, como na distinção estrutural entre citótipos similares, cultivares ou variedades distintas (NETO, 2014), mesmo quando apresentam número cromossômico idêntico e morfologia cromossômica similar, como já descrito em espécies de *Citrus* (CARVALHO et al., 2005).

Há um consenso entre os autores de que a família Solanaceae apresenta uniformidade cariotípica dentro de um mesmo gênero (FREGONEZI et al., 2006), principalmente quanto ao número e à forma dos cromossomos. Este fato vem sendo confirmado para berinjela principalmente em relação ao número cromossômico. Para berinjela, o número cromossômico de  $2n=24$  foi descrito pela primeira vez em 1925 por Kojima (KOJIMA, 1925; AMMAL, 1934). Desde então, diversos autores confirmaram a presença de 24 cromossomos para a espécie, mesmo quando diferentes variedades foram analisadas (AMMAL, 1934; RAI, 1959; BIR E NEELAM, 1980; OMIDIJI, 1983; RUSSO; VENORA; ERRICO, 1991; OLATUNJI, 2005; OBUTE; NDUKWU; OKOLI, 2006; CATTELAN, 2008; MELO, 2009; RAY, 2010; FAWZIA E ALAM, 2011).

Em relação ao tamanho e à morfologia dos cromossomos, algumas diferenças já foram descritas quando se compara variedades distintas de berinjela. Catellan (2008), por exemplo, observou uma variação média entre 1,87 e 4,02  $\mu\text{m}$  para a variedade Preta Comprida, enquanto Fawzia e Alam (2011) encontraram

valores entre 0,93 e 1,50  $\mu\text{m}$  para a variedade Islampuri, entre 1,02 e 1,88  $\mu\text{m}$  para BARI Begun-3, entre 0,97 e 1,77  $\mu\text{m}$  para BARI Begun-1 e entre 1,11 e 2,13  $\mu\text{m}$  para BARI Begun-5 (FAWZIA e ALAM, 2011).

Poucos trabalhos avaliaram os padrões de bandeamento CMA<sub>3</sub>/DAPI e as regiões hibridizadas por FISH em berinjela. No entanto, com base nos poucos registros disponíveis, já é possível observar variações nos padrões de bandeamento por fluorocromos CMA<sub>3</sub> e DAPI quando diferentes variedades de berinjela foram avaliadas. No trabalho de Fawzia e Alam (2011), por exemplo, foram observadas quatro bandas DAPI positivas para a variedade BARI Begun-5, mas nenhuma banda foi registrada para as outras três variedades estudadas. Ainda no mesmo estudo, foram encontrados diferentes padrões de bandeamento CMA<sub>3</sub> para cada uma das variedades, sendo duas bandas CMA positivas para a variedade local (regiões terminais), quatro bandas para BARI Begun-4 e BARI Begun-5 e nenhuma banda CMA para a variedade BARI Begun-1 (FAWZIA e ALAM, 2011).

Em relação à técnica de FISH, apenas um trabalho foi realizado em *S. melongena*, com a hibridização da região de DNAr 45S e, neste caso, foram observadas duas marcas (MELO et al., 2011). A carência de dados na literatura acerca de regiões de DNAr 5S e 45S evidencia, portanto, a necessidade de uma melhor caracterização citogenética molecular da espécie.

### **1.5.2 Citometria de fluxo**

O uso da citometria de fluxo em estudos com espécies vegetais está comumente relacionado à análise do conteúdo de DNA nuclear, que pode ser medido em termos relativos, como é o caso da avaliação de níveis de ploidia ou de forma absoluta, através da estimativa do tamanho do genoma (LOUREIRO et al., 2007).

A técnica, inicialmente descrita por Galbraith et al. (1983), baseia-se na análise de propriedades ópticas de partículas que fluem em uma suspensão líquida



(WEAR et al., 2016). As amostras são preparadas pela maceração do material vegetal fresco em uma solução tampão que promove a lise celular, mas mantém a integridade dos núcleos. A solução é então corada com corantes específicos para o DNA (ex: iodeto de propídeo, brometo de etídeo e DAPI) e as análises são feitas em citômetro de fluxo. Os núcleos intersectam um feixe de laser, um a um, ocorrendo a dispersão da luz ou a emissão de fluorescência. Através da intensidade de fluorescência emitida é possível caracterizar as partículas que estão sendo avaliadas e medir, por exemplo, a quantidade de DNA presente em um núcleo (DOLEZEL e BARTOS, 2005).

A citometria de fluxo é uma metodologia relativamente simples que permite a quantificação do número de células em cada uma das fases do ciclo celular (G1, S e G2). Uma célula diploide normal apresenta conteúdo de DNA 2C em G1. Com o prosseguimento do ciclo, ocorre a duplicação do material genético (fase S) e, portanto, o conteúdo de DNA nuclear de um diploide em G2 é igual a 4C. Nestas condições, o histograma gerado por citometria apresenta um pico dominante correspondente aos núcleos em G1 e um pico menor, correspondente aos núcleos em G2 (LOUREIRO et al., 2007).

A estimativa do conteúdo de DNA de uma espécie é realizada através da análise de uma amostra contendo simultaneamente a planta de interesse com uma espécie cujo tamanho do genoma já tenha sido previamente determinado (DOLEZEL, 1997). Os padrões de referência mais utilizados são a ervilha (*Pisum sativum*), o tomate (*Solanum lycopersicum*), o rabanete (*Raphanus sativus*) e a fava (*Vicia faba*). A escolha do padrão deve ser feita de acordo com a espécie estudada e deve ter um conteúdo de DNA próximo, mas que não cause sobreposição entre os picos 2C e 4C. A análise dos níveis de ploidia, por sua vez, é realizada através da comparação do pico G1 da planta de interesse com o pico de uma amostra da mesma planta, porém de ploidia conhecida. Geralmente, plantas diploides são utilizadas como controle para verificar os níveis de ploidia alcançados em experimentos de indução (DOLEZEL, 1997).

A análise por citometria apresenta diversas aplicações em estudos com plantas, desde a pesquisa básica até estudos de melhoramento. A técnica pode ser

empregada, por exemplo, para estimar o tamanho do genoma, avaliar o nível de ploidia, detectar mixoploidia e aneuploidia e ainda para avaliar a dinâmica do ciclo celular (DOLEZEL e BARTOS, 2005). É uma abordagem interessante e prática, uma vez que é possível obter milhões de núcleos em suspensão a partir de poucas gramas de tecido foliar (GALBRAITH et al., 1983).

Em estudos de duplicação, a avaliação dos níveis de ploidia pode ser feita pela análise de características morfológicas e anatômicas (ex: grãos de pólen e estômatos), pela contagem cromossômica e por citometria de fluxo (ÇÖRDÜ et al., 2017). As análises morfológicas e anatômicas nem sempre geram resultados precisos e, por isso, devem ser associadas à contagem de cromossomos e/ou à citometria. No entanto, a contagem cromossômica é muito trabalhosa, principalmente porque os experimentos de indução envolvem um grande número de plantas (DHOOGHE et al., 2011). A citometria de fluxo é uma técnica de fácil execução e que apresenta boa reprodutibilidade, além de permitir a obtenção de resultados rápidos a partir de pouca quantidade de material vegetal (SOUZA et al., 2008).

Atualmente, a citometria é considerada a técnica mais prática e confiável para determinar o nível de ploidia de plantas regeneradas *in vitro* em estudos de indução (REGALADO et al., 2017). Sua utilização já foi descrita para avaliar a ploidia de inúmeras espécies, como cebola, (JAKSE; HAVEY; BOHANEK, 2003), *Lilium longiflorum* (SANGTHONG et al., 2005), *Solanum* spp. (BARANDALLA et al., 2006), *Lavandula angustifolia* (URWIN; HORSNEL; MOON, 2007), *Platanus acerifolia* (LIU; LI; BAO, 2007), limão (ORBOVIC et al., 2008), *Rosa* spp. (KHOSRAVI et al., 2008), *Carica papaya* (CLARINDO et al., 2008), *Pennisetum* spp. (CAMPOS et al., 2009), *Citrus reticulata* (DUTT et al., 2010), *Passiflora cincinnata* (PINTO et al., 2010), *Dendranthema nankingense* (LIU et al., 2011), *Drosera capensis* (ZAHUMENICKA et al., 2013), *Pfaffia glomerata* (GOMES et al., 2014), *Iris sibirica* (STANISIC et al., 2015), *Eriobotrya japonica* (BLASCO et al., 2015), *Lilium leichtlinii* (HEO et al., 2016), *Kaempferia rotunda* (SOONTHORNKALUMP et al., 2017). Outros exemplos podem ser observados na Tabela 1.

### **1.5.3 Sincronização do ciclo celular com hidroxiiureia nos experimentos de poliploidização**

A sincronização celular vem sendo empregada como ferramenta em estudos moleculares e na análise de eventos bioquímicos relacionados ao ciclo celular, pois permite a obtenção de um grande número de células em determinado estágio da divisão (TECHIO et al., 2002; DE ABREU et al., 2016). Uma população de células sincronizadas pode ser obtida pela restrição de fatores de crescimento ou pela adição de agentes químicos, sendo os agentes químicos mais usados, pois geram resultados mais efetivos e reprodutíveis (HARPER, 2005; PLANCHAIS et al., 2000).

Em plantas, a sincronização pode ser alcançada por meio de substâncias que atrasam o ciclo celular como quinases dependentes de ciclinas (CDKs), enzimas envolvidas na síntese de DNA e na proteólise de reguladores do ciclo celular ou ainda por substâncias que atuam diretamente sobre o fuso mitótico. A replicação do DNA depende da síntese de desoxirribonucleotídeos e da atividade das enzimas que compõem maquinaria de replicação, e os inibidores da síntese do DNA atuam exatamente nestas vias, levando ao acúmulo de células na mesma fase do ciclo celular (DE ABREU, 2016).

Diferentes sincronizadores já se mostraram eficientes em plantas, como hidroxiiureia (HU), mimosina e afidicolina (PLANCHAIS et al., 2000). A HU inibe a atividade da enzima ribonucleotídeo redutase (RNR), impedindo assim a formação de novos desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs). A falta de dNTPs, por sua vez, impede a replicação do DNA e leva ao acúmulo de células em interfase. O processo é reversível e, após a remoção da HU, o ciclo celular prossegue normalmente, com um elevado número de células em sincronia (PAN; HOUBEN; SCHLEGEL, 1993).

O uso de sincronizadores em estudos de citogenética constitui uma estratégia interessante, pois permite a obtenção de maiores índices de células em divisão (TORRES; DAVIDE; BEARZOTI, 2003). Neste caso, a sincronização celular é geralmente realizada pela aplicação da HU em células somáticas de raízes, seguida

do bloqueio de células em metáfase pelo uso de bloqueadores. Esta estratégia se mostrou eficiente em diversas espécies, como *Zea mays* (LEE et al., 1996), *Triticum aestivum* (LEE et al., 1997), *Pisum sativum* (GUALBERTI et al., 1996), *Vicia faba* (DOLEŽEL; ČÍHALÍKOVÁ; LUCRETTI, 1992), *Hordeum vulgare* (PAN; HOUBEN; SCHLEGEL, 1993) e *Dipteryx alata* (TORRES; DAVIDE; BEARZOTI, 2003).

A utilização de sincronizadores em estudos de duplicação em plantas ainda não foi descrita na literatura, mas a questão já vem sendo discutida por alguns autores (HALFMANN, 2004; COSTA, 2010). Acredita-se que, neste caso, a sincronização do ciclo celular possa aumentar o efeito dos antimitóticos sobre os explantes, uma vez que após a retirada do agente sincronizador todas as células iniciam a divisão celular ao mesmo tempo.

## 2 REFERÊNCIAS

- ACQUAAH, G. Principles of plant genetics and breeding. Polyploidy in plant breeding, Wiley-Blackwell, Malden, v. 13, p. 214-230, 2007.
- ADAMS, K.; WENDEL, J. F. Polyploidy and genome evolution in plants. Current Opinion in Plant Biology, v. 8, p. 135-141, 2005.
- AHMED, L.; BEGUM, R.; NOOR, S. S.; ZAMAN, M. A.; ALAM, S. S. Reversible fluorescent chromosome banding in three *Crinum* spp. (Amaryllidaceae). Cytologia, v. 69, n. 1, p. 69-74, 2004.
- AHUJA, M. R. Polyploidy in gymnosperms: Revisited. Silvae Genetica, v. 54, p. 59-69, 2005.
- ALEZA, P.; JUAREZ, J.; OLLITRAULT, P.; NAVARRO, L. Production of tetraploid plants of non apomictic citrus genotypes. Plant Cell Reports, v. 28, p. 1837-1846, 2009.
- ALIM, M. A.; BISWAS, B. K.; HASANUZZAMAN, M.; BALA, P.; ROY, S. Shoot regeneration and root induction in brinjal by growth regulators. Research in agriculture, livestock and fisheries, v. 2, n. 1, p. 43-51, 2015.
- ALLUM, J. F.; BRINGLOE, D. H.; ROBERTS, A. V. Chromosome doubling in a *Rosa rugosa* Thunb. hybrid by exposure of *in vitro* nodes to oryzalin: the effects of node length, oryzalin concentration and exposure time. Plant Cell Reports, v. 26, p. 1977-1984, 2007.
- ALMEIDA, C. C. S.; CARVALHO, P. C. L.; GUERRA, M. Karyotype differentiation among *Spondias* species and the putative hybrid Umbu-cajá (Anacardiaceae). Botanical Journal of the Linnean Society, v. 155, n. 4, p. 541-547, 2007.
- AMMAL, E. K. J. Polyploidy in *Solanum melongena* Linn. Cytologia, v. 5, n. 1, p. 453-459, 1934.
- ANTONINI, A. C. C.; ROBLES, W. G. R.; NETO, J. T.; KLUGE, R. A. Capacidade produtiva de cultivares de berinjela. Horticultura Brasileira, v. 20, n. 4, p. 646-648, 2002.
- ARENE, L.; BELLENOT-KAPUSTA, V.; BELIN, J.; CADIC, A.; CLERAC, M.; DECOURTYE, L.; DURON, M. Breeding program on woody ornamental plants in Angers-France: a collaboration of 32 years between INRA and SAPHO. Acta Horticulturae, v. 743, p. 35-38, 2007.
- AWOLEYE, F. M. M.; VANDUREN, J.; DOLEZEL, F. J. Nuclear DNA content and *in vitro* induced somatic polyploidization in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) breeding. Euphytica, v. 76, p. 195-202, 1994.

AZMI, T. K. K.; SUKMA, D.; AZIZ, S. A.; SYUKUR, M. Polyploidy Induction of Moth Orchid (*Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume) by Colchicine Treatment on Pollinated Flowers. *Journal of Agricultural Sciences*, v. 11, n. 2, p. 62-73, 2016.

AZOUSH, S.; KAZEMITABAR, S. K.; HEIDARI, P. Polyploidy induction in Iranian Borage (*Echium amoenum* L.) by colchicine treatment. *Biharean Biologist*, v. 8, n. 2, p. 87-89, 2014.

BABIL, P.; IINO, M.; KASHIHARA, Y.; MATSUMOTO, R.; KIKUNO, H., LOPEZ-MONTES, A.; SHIWACHI, H. Somatic polyploidization and characterization of induced polyploids of *Dioscorea rotundata* and *Dioscorea cayenensis*. *African Journal of Biotechnology*, v. 15, n. 38, p. 2098-2105, 2016.

BAGHERI, M.; MANSOURI, H. Effect of induced polyploidy on some biochemical parameters in *Cannabis sativa* L. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 175, n. 5, p. 2366-2375, 2015.

BAGULEY, B. C. Nonintercalative DNA-binding antitumour compounds. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 43, n. 3, p. 167-181, 1982.

BAKRY, F.; DE LA REBERDIERE, N. P.; PICHOT, S.; JENNY, C. In liquid medium colchicine treatment induces non chimerical doubled-diploids in a wide range of mono-and interspecific diploid banana clones. *Fruits*, v. 62, n. 1, p. 3-12, 2007.

BARANDALLA, L.; RITTER, E.; DE GALARRETA, J. I. R. Oryzalin treatment of potato diploids yields tetraploid and chimeric plants from which euploids could be derived by callus induction. *Potato Research*, v. 49, n. 2, p. 143-154, 2006.

BARBOSA, S.; DAVIDE, L. C.; PEREIRA, A. V.; ABREU, J. D. Duplicação cromossômica de híbridos triplóides de capim-elefante e milho. *Bragantia*, v. 66, n. 3, p. 365-372, 2007.

BECK, S. L.; DUNLOP, R. W.; FOSSEY, A.; BOTHA, C. E. J. Evaluation of induced polyploidy in *Acacia mearnsii* through stomatal counts and guard cell measurements. *South African Journal of Botany*, v. 69, n. 4, p. 563-567, 2003.

BEHERA, T.K .; SINGH, N. Inter-specific crosses between eggplant (*Solanum melongena* L.) with related *Solanum* species. *Scientia Horticulturae*, v. 95, p. 165-172, 2002.

BERKOV, S.; PHILIPOV, S. Alkaloid production in diploid and autotetraploid plants of *Datura tramonium*. *Pharmaceutical Biology*, v. 40, p. 617-621, 2002.

BHATTI, K. H.; JAMIL, M. D.; TUFAIL, M. Direct organogenesis (shoot and root) of eggplant (*Solanum melongena* L.) through tissue culture. *World Applied Sciences Journal*, v. 3, n. 3, p. 317-321, 2014.

BIR, S. S.; NEELAM, S. Chromosome number reports LXV. *Taxon*, v. 29, p. 711, 1980.

BLAKESLEE, A. The present and potential service of chemistry to plant breeding. *American Journal of Botany*, v. 26, p. 163-172, 1939.

BLASCO, M.; BADENES, M. L.; DEL MAR NAVAL, M. Colchicine-induced polyploidy in loquat (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 120, n. 2, p. 453-461, 2015.

BLETOS, F.; ROUPAKIAS, D.; TSAKTISIRA, M.; SCALTSOYJANNES, A. Production and characterization of interspecific hybrids between three eggplant (*Solanum melongena* L.) cultivars and *Solanum macrocarpon* L. *Scientia Horticulturae*, v. 101, p. 11-21, 2004.

BONASORA, M. G.; POGGIO, L.; GREIZERSTEIN, E. J. Cytogenetic studies in four cultivated *Amaranthus* (Amaranthaceae) species. *Comparative Cytogenetics*, v. 7, n.1, p.53-61, 2013.

BRASILEIRO-VIDAL, A. N.; GUERRA, M. Citogenética molecular em cereais. Atualização em técnicas celulares e moleculares aplicadas ao melhoramento genético vegetal. Passo Fundo, Embrapa Trigo, p. 277-298, 2002.

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

CARVALHO, R.; SOARES FILHO, W. S.; BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; GUERRA, M. The relationship among lemons, limes and citron: a chromosomal comparison. *Cytogenetic and Genome Research*, v. 109, p. 276-282, 2005.

CATTELAN, L. V. Aspectos anatômicos, citogenéticos e palinológicos de espécies de *Solanum*. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 30f, 2008.

CAVALIER-SMITH, T. The evolution of genome size. London: Wiley-Interscience, 420p. 1985.

CHAUVIN, J. E.; SOUCHET, C.; DANTEC, J. P.; ELLISSECHE, D. Chromosome doubling of 2x *Solanum* species by oryzalin: Method development and comparison with spontaneous chromosome doubling *in vitro*. *Plant cell, tissue and organ culture*, v. 73, n. 1, p. 65-73, 2003.

CHEN, Z. J. Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. *Annual Review of Plant Biology*, v. 58, p. 377-406, 2007.

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

CHIES, T. T.S.; BURCHARDT, P.; ALVES, E. M. S.; ESSI, L.; DOS SANTOS, E. K. O estudo da biodiversidade e evolução vegetal através de marcadores de DNA e citogenética: exemplos em Iridaceae e Poaceae. *Ciência e Natura*, v. 36, p. 279-293, 2014.

CHUNG, M. Y.; KIM, C. Y.; MIN, J. S.; LEE, D. J.; NAING, A. H.; CHUNG, J. D.; KIM, C. K.; *In vitro* induction of tetraploids in an interspecific hybrid of *Calanthe* (*Calanthe discolor* x *Calanthe sieboldii*) through colchicine and oryzalin treatments. *Plant Biotechnology Reports*, v. 8, p. 251-257, 2014.

CLARINDO, W. R.; DE CARVALHO, C. R.; ARAÚJO, F. S.; DE ABREU, I. S.; OTONI, W. C. Recovering polyploid papaya *in vitro* regenerants as screened by flow cytometry. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 92, n. 2, p. 207-214, 2008.

COLLONNIER, C.; FOCK, I.; KASHYAP, V.; ROTINO, G. L.; DAUNAY, M. C.; LIAN, Y.; MARISKA, I. K. Applications of biotechnology in eggplant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 65, p. 91-107 2001.

COLLONNIER, C.; FOCK, I.; MARISKA, I.; SERVAES, A.; VEDEL, F.; ILJAK-YAKOVLEV, S.; SOUVANNAVONG, V.; SIHACHAKR, D. GISH confirmation of somatic hybrids between *Solanum melongena* and *S. torvum*: assessment of resistance to both fungal and bacterial wilts. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 41, p. 459-470, 2003.

COMAI, L. The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Reviews Genetics*, v. 6, p. 836-846, 2005.

ÇÖRDÜK, N.; YÜCEL, G.; AKINCI, N.; TUNA, M. Assessment of the genetic stability of indirect shoot organogenesis-derived plantlets of *Digitalis trojana* Ivanina by flow cytometry and cytological analyses. *Journal of Tekirdag Agricultural Faculty*, v. 14, n. 1, p. 69-76, 2017.

COSTA, F. H. S. Respostas morfo genéticas de bananeira submetida à poliploidização. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Lavras, 136p, 2010.

COSTA, F. H. S.; PASQUAL, M.; DE OLIVEIRA, S.; DA SILVA NETO, H. P.; AMORIM, E. P.; DOS SANTOS-SEREJO, J. A. Poliploidização em ápices caulinares de bananeira e seus efeitos morfofisiológicos *in vitro*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 46, n. 8, p. 805-813, 2011.

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

DE ABREU, J. C.; DAVIDE, L. C.; VANDER PEREIRA, A.; BARBOSA, S. Mixoploidia em híbridos de capim-elefante x milho tratados com agentes antimitóticos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 41, n. 11, p. 1629-1635, 2006.



- DE MELLO E SILVA, M.; CALLEGARI, J.; ZANETTINI, B. Induction and identification of polyploids in *Cattleya intermedia* Lindl. (Orchidaceae) by *in vitro* techniques. *Ciência Rural*, v. 30, p. 105-111, 2000.
- DERMEN, H. A cytological analysis of polyploidy induced by colchicine and by extremes of temperature. *Journal of Heredity*, v. 29, n. 6, p. 211-229, 1938.
- DEWEY, D. R. Some applications and misapplications of induced polyploidy to plant breeding. *Basic Life Sciences*, v. 13, p. 445-470, 1980.
- DHATT, A. S; SIDHU, G. S. Plant regeneration in eggplant (*Solanum melongena* L.): a review. *African Journal of Biotechnology*, v. 13, n. 6, p. 714-722, 2014.
- DHOOGHE, E.; DENIS, S.; EECKHAUT, T.; REHEUL, D.; VAN LABEKE, M. C. *In vitro* induction of tetraploids in ornamental *Ranunculus*. *Euphytica*, v. 168, p. 33-40, 2009.
- DHOOGHE, E.; VAN LAERE, K.; EECKHAUT, T.; LEUS, L.; VAN, H. Mitotic chromosome doubling of plant tissues *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 104, p. 359-373, 2011.
- DIOSDADO, J. C.; PASTOR, J. Karyological studies of some orophyte taxa of the genus *Ranunculus* L. from the Iberian peninsula. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 111, p. 23-35, 1993.
- DO AMARAL, C. M.; DOS SANTOS-SEREJO, J. A.; SILVA, S. O.; LEDO, C. A. S.; AMORIM, E.P. Agronomic characterization of autotetraploid banana plants derived from Pisang Lilin (AA) obtained through chromosome doubling. *Euphytica*, v. 202, p. 435-443, 2015.
- DOLEŽEL, J.; ČÍHALÍKOVÁ, J.; LUCRETTI, S. A high-yield procedure for isolation of metaphase chromosomes from root tips of *Vicia faba* L. *Planta*, v. 188, n. 1, p. 93-98, 1992.
- DOLEŽEL, J. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. *Journal of Applied Genetics, Pozman*, v. 38, n. 3, p. 285-302, 1997.
- DOLEŽEL L, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany*, v. 95, n. 1, p. 99-110, 2005.
- DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. Flow cytometry with plants: an overview. *Weinheim*, p. 41-65, 2007.
- DUNN, B. L.; LINDSTROM, J.T. Oryzalin-induced chromosome doubling in *Buddleja* to facilitate interspecific hybridization. *Hortscience*, v. 42, p. 1326-1328, 2007.

- DUTT, M.; VASCONCELLOS, M.; SONG, K. J.; GMITTER, J. R.; F. G.; GROSSER, J. W. *In vitro* production of autotetraploid Ponkan mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) using cell suspension cultures. *Euphytica*, v. 173, p. 235-242, 2010.
- EL-NABY.; Z. A.; MOHAMED, N. A.; RADWAN, K. H.; EL-KHISHIN, D. A. Colchicine induction of polyploidy in Egyptian clover genotypes. *Journal of American Science*, v. 8, n. 10, p. 221-227, 2012.
- ELYAZID, D. M. A.; EL-SHEREIF, A. R. *In vitro* induction of polyploidy in *Citrus reticulata* Blanco. *American Journal of Plant Sciences*, v. 5, n. 11, p. 16740-1679, 2014.
- FAO. 2013. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/>
- FAWZIA, R.; ALAM, S. S. Fluorescent karyotype analysis in four varieties of *Solanum melongena* L. *Cytologia*, v. 76, n. 3, p. 345-351, 2011.
- FEITOZA, L. L.; MARTINS, M. I. G.; CASTRO, A. A. J. F.; FÉLIX, L. P.; CARVALHO, R. Cytogenetics of Alismataceae and Limncharitaceae: CMA/DAPI banding and 45S rDNA sites. *Journal of Plant Research*, v. 286, p. 199-208, 2010.
- FILGUEIRA, F. A. R. 2007. Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Editora UFV, 3ª ed., 421p.
- FLAVELL, R. B. Variation in structure and expression of ribosomal DNA loci in wheat. *Plant Molecular Genetics*, v. 31, p. 963-968, 1989.
- FREGONEZI, J. N.; FERNANDES, T.; TOREZAN, J. M. D.; VIEIRA, A. O. S.; VANZELA, A. L. F. Karyotype differentiation of four *Cestrum* species (Solanaceae) based on the physical mapping of repetitive DNA. *Genetics and Molecular Biology*, v. 29, n. 1, p. 97-104, 2006.
- GALBRAITH, D. W.; HARKINS, K. R.; MADDON, J. M.; AYRES, N. M.; SHARMA, D. P.; FIROOZABADY, E. Rapid flow cytometric analysis of the cell-cycle in intact plant-tissues. *Science*, Washington, v. 220, n. 4601, p. 1049- 1051, 1983.
- GALL, J. G; PARDUE, M. L. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 63, p. 378-383, 1969.
- GALLONE, A.; HUNTER, A.; DOUGLAS, G. C. Polyploid induction *in vitro* using colchicine and oryzalin on Hebe 'Oratia Beauty': Production and characterization of the vegetative traits. *Scientia Horticulturae*, v. 179, p. 59-66, 2014.
- GANGA, M.; CHEZHIAN, N. Influence of the antimetabolic agents colchicine and oryzalin on *in vitro* regeneration and chromosome doubling of diploid bananas (*Musa* spp.). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, v. 77, p. 572-575, 2002.

- GAO, S. L.; ZHU, D. N.; CAI, Z. H.; XU, D. R. Autotetraploid plants from colchicine treated bud culture of *Salvia miltiorrhiza* Bge. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 47, p. 73-77, 1996.
- GEORGE, R. Vegetable seed production. 2nd ed. CABI, Wallingford, United Kingdom, 328p, 2004.
- GLEDDIE, S.; KELLER, W.; SETTERFIELD, G. Eggplant. *Handbook of Plant Cell Culture*, vol 3. Techniques for propagation and breeding. MacMillan, New York, p. 500-511, 1986.
- GLOWACKA, K.; JEZOWSKI, S.; KACZMAREK, Z. *In vitro* induction of polyploidy by colchicine treatment of shoots and preliminary characterisation of induced polyploids in two *Miscanthus* species. *Industrial Crops and Products*, v. 32, p. 88-96, 2010.
- GOLDBLATT, P. Polyploidy in angiosperms: monocotyledons. *Basic Life Sciences*, v. 13, p. 219-239, 1980.
- GOMES, S. S. L.; SALDANHA, C. W.; NEVES, C. S.; TREVIZANI, M.; RAPOSO, N. R. B.; NOTINI, M. M.; DE OLIVEIRA, M.; CAMPOS, J. M. S.; OTONI, W.; VICCINI, L. F. Karyotype, genome size, and *in vitro* chromosome doubling of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 118, n. 1, p. 45-56, 2014.
- GOTTLIEB, L. D. Plant polyploidy: gene expression and genetic redundancy. *Heredity*, v. 91, p. 91-92, 2003.
- GOWDA, P. H. R.; SHIVASHANKAR, K. T.; JOSHI, S. Interspecific hybridization between *Solanum melongena* and *Solanum macrocarpon*: study of the F1 hybrid plants. *Euphytica*, v. 48, p. 59-61, 1990.
- GREPLOVA, M.; POLZEROVA, H.; DOMKAROVA, J. Intra-and interspecific crosses of *Solanum* materials after mitotic polyploidization *in vitro*. *Plant Breeding*, v. 128, p. 651-657, 2009.
- GU, X.F.; YANG, A. F.; MENG, H.; ZHANG, J. R. *In vitro* induction of tetraploid plants from diploid *Zizyphus jujuba* Mill. Cv. Zhanhua. *Plant Cell Reports*, v. 24, p. 671-676, 2005.
- GUALBERTI, G.; DOLEZEL, J.; MACAS, J.; AND LUCRETTI, S. Preparation of pea (*Pisum sativum* L.) chromosome and nucleus suspensions from single root tips. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 92, p. 744-751, 1996.
- GUERRA, M.; CARVALHO, R. Cytogenetics of *Manihot esculenta* Crantz (cassava) and eight related species. *Hereditas*, v. 136, p. 159-168, 2002.
- GUERRA, M. O uso de Giemsa na citogenética vegetal – comparação entre a coloração simples e o bandeamento. *Ciência e Cultura*, v. 35, n. 2, 190-193, 1983.

GUERRA, M. Introdução à citogenética geral. Rio de Janeiro, Guanabara, 142p, 1988.

GUERRA, M. Cytogenetics of Rutaceae. V. High chromosomal variability in Citrus species revealed by CMA/DAPI staining. *Heredity*, v. 71, p. 234-241, 1993.

GUERRA, M. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genetics and Molecular Biology*, v. 23, p. 1029-1041, 2000.

GUIMARÃES, P.R.; GALVÃO, A. M. P.; BATISTA, C. M.; AZEVEDO, G. S.; OLIVEIRA, R. D.; LAMOUNIER, R. P. Eggplant (*Solanum melongena*) infusion has a modest and transitory effect on hypercholesterolemic subjects. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 33, n. 9, p. 1027-1036, 2000.

HALFMANN, R. Improved cell cycle synchronization and chromosome doubling methods in cotton . Doctoral dissertation, Texas A&M University, 44p., 2004.

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

HANNWEG, K.; STEYN, W.; BERTLING, I. *In vitro* induced tetraploids of *Plectranthus esculentus* are nematode-tolerant and have enhanced nutritional value. *Euphytica*, v. 207, n. 2, p. 343-351, 2016.

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

HARPER, J. V. Synchronization of cell populations in G1/S and G 2/M phases of the cell cycle. *Cell Cycle Control: Mechanisms and Protocols*, v. 296, p. 157-166, 2005.

HE, Y.; SUN, Y.; ZHENG, R.; AI, Y.; CAO, Z.; BAO, M. Induction of tetraploid male sterile *Tagetes erecta* by colchicine treatment and its application for interspecific hybridisation. *Horticultural Plant Journal*, v. 2, n. 5, p. 284-292, 2017.

HEGARTY, M.; COATE, J.; SHERMAN-BROYLES, S.; ABBOTT, R.; HISCOCK, S.; DOYLE, J. Lessons from natural and artificial polyploids in higher plants. *Cytogenetic and Genome Research*, v. 140, p. 204-225, 2013.

HEO, J. Y.; JEONG, S. H.; CHOI, H. R.; PARK, S. M. Polyploid production in *Lilium leichtlinii* var. *maximowiczii* using colchicine: *Journal of Animal & Plant Sciences*, v. 26, n. 4, p. 1111-1116, 2016.

HESLOP-HARRISON, J. S. Comparative genome organization in plants: From sequence and markers to chromatin and chromosomes. *The Plant Cell*, v. 12, p. 617-635, 2000.

ISSHIKI, S.; TAURA, T. Fertility restoration of hybrids between *Solanum melongena* L. and *S. aethiopicum* L. Gilo Group by chromosome doubling and cytoplasmic effect on pollen fertility. *Euphytica*, v. 134, p. 195-201, 2003.

JAKŠE, M.; HAVEY, M. J.; BOHANEK, B. Chromosome doubling procedures of onion (*Allium cepa* L.) gynogenic embryos. *Plant Cell Reports*, v. 21, n. 9, p. 905-910, 2003.

JIRANAPAPAN, J.; KIKUCHI, S.; MANOCHAI, B.; TAYCHASINPITAK, T.; TANAKA, H.; TSUJIMOTO, H. A simple method of chromosome doubling using colchicine in *Torenia* (Linderniaceae), and the behavior of meiotic chromosomes in amphidiploids. *Chromosome Science*, v. 14, n. 1 e 2, p., 29-32, 2011.

JORGE, P. A. R.; NEYRA, L. C.; OSAKI, R. M.; ALMEIDA, E.; BRAGAGNOLO, N. Efeito da berinjela sobre os lípidos plasmáticos, a peroxidação lipídica e a reversão da disfunção endotelial na hipercolesteromia experimental. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, n. 70, p. 87-91, 1998.

KASHYAP, V.; KUMAR, S. V.; COLLONIER, C.; FUSARI, F.; HAICOUR, R.; ROTINO, G. L.; SIHACHAKR, D.; RAJAM, M. V. Biotechnology of eggplant. *Scientia Horticulturae*, n. 97, p. 1-25, 2003.

KAZI, N. A. Polyploidy in Solanaceous crops. *Asian Journal of Multidisciplinary Studies*, v. 3, n. 4, p. 69-73, 2015.

KEHR, A. E. Woody plant polyploidy. *Am Nurseryman*, v. 183, p. 38-47, 1996.

KERMANI, M. J.; SARASAN, V.; ROBERTS, A. V.; YOKOYA, K.; WENTWORTH, J.; SIEBER, V. K. Oryzalin-induced chromosome doubling in *Rosa* and its effect on plant morphology and pollen viability. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 107, p. 1195-1200, 2003.

KHARDE, A. V.; CHAVAN, N. S.; CHANDRE, M. A.; AUTADE, R. H.; KHETMALAS, M. B. *In vitro* enhancement of bacoside in Brahmi (*Bacopa monnieri*) using colchicine. *Journal of plant Biochemistry and Physiology*, v. 5, n. 172, p. 2-7, 2017.

KHOSRAVI, P.; KERMANI, M. J.; NEMATZADEH, G. A.; BIHAMTA, M. R.; YOKOYA, K. Role of mitotic inhibitors and genotype on chromosome doubling of *Rosa*. *Euphytica*, v. 160, p. 267-275, 2008.

KIHARA, H. Triploid watermelons. *American Society for Horticultural Science*, v. 58, p. 217-230, 1951.

KLINKHARDT, M. B. Some aspects of karyoevolution in fishes. *Animal Resources Development*, v. 47:7-36, 1998.

KOJIMA, H. On the meiosis and chromosome number in different races of *Solanum melongena*. *Botanical magazine, Tokyo*, n. 24, p. 119-123, 1925.

KUMAR, G.; DWIVEDI, K. Induced polyploidization in *Brassica campestris* L.(Brassicaceae). *Cytology and Genetics*, v. 48, n. 2, p. 103-110, 2014.

KUMARI, A.; GAMBHIR, G.; SRIVASTAVA, D. K. Plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated gene transfer in brinjal (*Solanum melongena* L.). *Vegetable Science*, v. 40, n. 2, p. 143-148, 2013.

LAVANIA, U. C. *Plant Cytogenetics*, 3rd edition. Ram J. Singh, CRC Press, 2016, 528p.

LAWRENCE, G. J.; APPELS, R. Mapping the nucleolus organizer region, seed protein loci and isozyme loci on chromosome 1R in rye. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 71, p. 742-749, 1986.

LEE, J.; ARUMUGANATHAN, K.; KAEPLER, S. M.; KAEPLER, H. F.; PAPA, C. M. Cell synchronization and isolation of metaphase chromosomes from maize (*Zea mays* L.) root tips for flow cytometric analysis and sorting. *Genome*, v. 39, p. 697-703, 1996.

LEE, J.; ARUMUGANATHAN, K.; YEN, Y.; KAEPLER, S. M.; KAEPLER, H. F.; BAENZIGER, P. S. Root tip cell synchronization and metaphase chromosome isolation suitable for flow sorting in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genome*, v. 40, p. 633-638, 1997.

LI, W. D.; BISWAS, D. K.; XU, H.; XU, C. Q.; WANG, X. Z.; LIU, J. K.; JIANG, G. M. Photosynthetic responses to chromosome doubling in relation to leaf anatomy in *Lonicera japonica* subjected to water stress. *Functional Plant Biology*, v. 36, n. 9, p. 783-792, 2009.

LIU, G.; LI, Z.; BAO, M. Colchicine-induced chromosome doubling in *Platanus acerifolia* and its effect on plant morphology. *Euphytica*, v. 157, p. 145-154, 2007.

LIU, S.; CHEN, S.; CHEN, Y.; GUAN, Z.; YIN, D.; CHEN, F. *In vitro* induced tetraploid of *Dendranthema nankingense* (Nakai) Tzvel. shows an improved level of abiotic stress tolerance. *Scientia Horticulturae*, v. 127, n. 3, p. 411-419, 2011.

LOUREIRO, J.; RODRIGUEZ, E.; DOLEŽEL, J.; SANTOS, C. Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: a test with 37 species. *Annals of botany*, v. 100, n. 4, p. 875-888, 2007.

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

MAGIOLI, C.; MANSUR, E. Eggplant (*Solanum melongena* L.): tissue culture, genetic transformation and use as an alternative model plant. *Acta Botanica Brasilica*, v. 19, p. 139-148, 2005.

MANZINI, G.; BARSELONA, M. L.; AVITABILE, M.; QUADRIFOGLIO, J. C. Interaction of diamidino-2-phenylindole (DAPI) with natural and synthetic nucleic acids. *Nucleic Acids Research*, v. 11, p. 8861-8876, 1983.

MASTERSON, J. Stomatal size in fossil plants: Evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science*, v. 264, p. 421-423, 1994.

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

MCNULTY, J.; NAN DEN BERG, S.; MAB, D.; TARADE, D.; JOSHI, S.; CHURCH, J.; PANDEY, S. Antimitotic activity of structurally simplified biaryl analogs of the anticancer agents colchicine and combretastatin A4. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 25, p. 117-121, 2015.

MEDINA, D. M.; CRUZ, N. D.; LONGO, C. R. L.; CONAGIN, C. H. T. M.; AZZINI, L.E. Poliploidização em berinjela (*Solanum melongena* L.). Observações em plantas resultantes de tratamentos com colquicina. *Bragantia*, v. 31, p. 289-303, 1972.

MELO, C. A. F.; MARTINS, M. I. G.; OLIVEIRA, M. B. M.; BENKO-ISEPPON, A. M.; CARVALHO, R. Karyotype analysis for diploid and polyploid species of the *Solanum* L. *Plant Systematics and Evolution*, 293: 227-235. 2011.

MELO, C. A. F. Estudo citogenético e molecular em nove espécies do gênero *Solanum* L. (*Solanaceae* A. Juss.). 88f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. 1999. Secretaria de Vigilância Sanitária. Alimentos funcionais. Disponível em: <http://www.saude.gov.br>

MONDIN, M.; SANTOS-SEREJO, J. A.; AGUIAR-PERECIN, M. L. R. Karyotype characterization of *Crotalaria juncea* (L.) by chromosome banding and physical mapping of 18S-5.8S-26S and 5S rDNA gene sites. *Genetics and Molecular Biology*, v. 30, n. 1, p. 65-72, 2007.

MORAES, A. P.; GUERRA, M. Cytological differentiation between the two subgenomes of the tetraploid *Emilia fosbergii* Nicolson and its relationship with *E. sonchifolia* (L.) DC.(Asteraceae). *Plant Systematics and Evolution*, v. 287, n. 3-4, p. 113-118, 2010.

MORENO-PEÑA, D. P.; ORANDAY-CÁRDENAS, M. A.; CORDERO-PÉREZ, P. Actividad antihipercolesterolémica. Investigación en plantas de importância médica. Barcelona, España: OmniaScience. P. 129 -160, 2016.

MURRAY, B. G.; WONG C.; HAMMETT, K. R. W.. The karyotype of *Clivia mirabilis* analyzed by differential banding and fluorescence in-situ hybridization. *Journal of Plant Research*, v. 293, p. 193-196, 2011.

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

NETO, M. F. Tamanho do genoma e cariotipagem convencional e diferencial em coqueiro (*Cocos nucifera* L.). Tese de Doutorado. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Genética e Melhoramento de Plantas. 44p. 2014.

NONAKA, T.; OKA, E.; ASANO, M.; KUWAYAMA, S.; TASAKI, H.; HAN, D. S.; GODO, T.; NAKANO, M. Chromosome doubling of *Lychnis* spp. by *in vitro* spindle toxin treatment of nodal segments. *Scientia Horticulturae*, v. 129, p. 832-839, 2011.

NOTSUKA, K.; TSURU, T.; SHIRAISHI, M. Induced polyploid grapes via *in vitro* chromosome doubling. *Japanese Society for Horticultural Science*, v. 69, p. 543-551, 2000.

OBUTE, G. C.; NDUKWU, B. C.; OKOLI, B. E. Cytogenetic studies on some Nigerian species of *Solanum* L. (Solanaceae). *African Journal of Biotechnology*, v. 5, n. 9, p. 689-692, 2006.

OLATUNJI, O. A. Karyotypic analysis and meiotic chromosomes in eight taxa of *Solanum* species (Solanaceae). *Acta SATECH*, v. 2, n. 1, p. 24-29, 2005.

OMIDIJI, M. O. Cytomorphological studies of *Solanum aethiopicum* x *S. macrocarpon* F1 hybrid. *Cytologia*, v. 48, p. 35-40, 1983.

OMIDIJI, M. O.. Cytomorphological studies of *Solanum aethiopicum* x *S. macrocarpon* F1 hybrid. *Cytologia*, v. 48, p. 35-40, 1983.

ORBOVIĆ, V.; ČALOVIĆ, M.; VILORIA, Z.; NIELSEN, B.; GMITTER, F. G.; CASTLE, W. S.; GROSSER, J. W. Analysis of genetic variability in various tissue culture-derived lemon plant populations using RAPD and flow cytometry. *Euphytica*, v. 161, n. 3, p. 329-335, 2008.

OSBORN, T.; PIRES, C.; BIRCHLER, J. A.; AUGER, D. L.; CHEN, Z. J.; LI, H. S.; CORNAI, L.; MADLUNG, A.; DOERGE, R. W.; COLOT, V.; MARTIENSSEN, R.A. Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *Trends in Genetics*, v. 19, n. 3, p. 141-147, 2003.

OTTO, S. P.; WHITTON, J. The evolutionary consequences of polyploidy. *Cell*, v. 131, p. 452-462, 2007.

PAN, W. H.; HOUBEN, A.; SCHLEGEL, R. Highly effective cell synchronization in plant roots by hydroxyurea and amiprofos-methyl or colchicine. *Genome*, v. 36, p. 387-390, 1993.

PANDIT, M. K.; BABU, C. R. Cytology and Taxonomy of *Coptis teeta* Wall. (Ranunculaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 111, p. 371-378, 1993.

PANSUKSAN, K.; SANGTHONG, R.; NAKAMURA, I.; MII, M.; SUPAIBULWATANA, K. Tetraploid induction of *Mitracarpus hirtus* L. by colchicine and its characterization including antibacterial activity. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 117, p. 381-391, 2014.



PESSOA, E.; FELIX, L. P.; ALVES, M. A new *Epidendrum* (Laeliinae-Orchidaceae) from the Atlantic Forest of northeastern Brazil: evidence from morphology and cytogenetics. *Brittonia*, v. 66, n. 4, p. 347-352, 2014.

PETERSEN, K. K.; HAGBERG, P.; KRISTIANSEN, K. Colchicine and oryzalin mediated chromosome doubling in different genotypes of *Mischantus sinensis*. *Plant Cell and Tissue Organ Culture*, v. 73, p. 137-146, 2003

PFÄFFL, M. W.; TICHOPAD, A.; PRGOMET, C.; NEUVIANS, T. P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, v. 26, n. 6, p. 509-515, 2004.

PHILLIPS, R. B.; REED, K. M. Application of fluorescence in situ hybridization (FISH) techniques to fish genetics: a review. *Aquaculture*, v. 140, n. 3, p. 197-216, 1996.

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

PLAISTED, R. L.; HOOPES, R. W. The past record and future prospects for the use of exotic potato germplasm. *American Journal of Potato Research*, v. 66, p. 603-627, 1989.

PLANCHAIS, S.; GLAB, N.; INZE, D.; BERGOUNIOUX, C. Chemical inhibitors: a tool for plant cell cycle studies. *FEBS Letters*, v. 476, p. 78-83, 2000.

PRAÇA, M. M.; CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R. A practical and reliable procedure for *in vitro* induction of tetraploid tomato. *Scientia Horticulturae*, v. 122, n. 3, p. 501-505, 2009.

PRINGLE, G. J.; MURRAY, B. G. Karyotype diversity and nuclear DNA variation in *Cyphomandra*. *Taxonomy, Chemistry, Evolution*. Royal Botanical Garden, Kew. p. 247-252, 1991.

QUESENBERRY, K. H.; DAMPIER, J. M.; LEE, Y. Y.; SMITH, R. L.; ACUNA, C.A. Doubling the chromosome number of bahiagrass via tissue culture. *Euphytica*, v. 175, n.1, p. 43-50, 2010.

RAI, U. K. Cytogenetic studies in *Solanum melongena* L. *Caryologia*, v. 12, n. 2, p. 299-316, 1959.

RAINA, S. N.; MUKAI, Y.; KAWAGUCHI, K; GOEL, S.; JAIN, A. Physical mapping of 18S-5.8S-26S and 5S ribosomal RNA gene families in three important vetches (*Vicia* species) and their allied taxa constituting three species complexes. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 103, p. 839-845, 2001.

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

RAY, D. P. Karyotype and genome size variation in five new cultivars of Indian Brinjal (*Solanum melongena* var. *Esculentum* L. *Cytologia*, v.75, n. 1, p. 41-47, 2010.

RAY, B. P.; HASSAN, L.; NASIRUDDIN, K.M. *In vitro* regeneration of brinjal (*Solanum melongena* L.). *Bangladesh Journal of Agricultural Research*, v. 36, n. 3, p. 397-406, 2011.

REGALADO, J. J.; CARMONA-MARTÍN, E.; QUEROL, V.; VELÉZ, C. G.; ENCINA, C. L.; PITTA-ALVAREZ, S. I. Production of compact petunias through polyploidization. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, p. 1-11, 2017.

REIS, A.; LOPES, C. A.; MORETTI, C. L.; RIBEIRO, C. S. C.; CARVALHO, C. M. M.; FRANÇA, F. H.; BÔAS, G. L. B. V.; HENZ, G. P.; SILVA, H. R.; BIANCHETTI, L. B.; VILELA, N. J.; MAKISHIMA, N.; FREITAS, R. A.; SOUZA, R. B.; CARVALHO, S. I. C.; BRUNE, S.; MAROUELLI, W. A.; NASCIMENTOS W. M.; PEREIRA, W.; MELO, W. F. Berinjela (*Solanum melongena* L.). *Cultivares. Embrapa Hortaliças, Sistemas de Produção*, v. 3 ISSN 1678-880x, Versão Eletrônica, 2007.

RESENDE, K.; PRADO, C.; DAVIDE, L.; TORRES, L. 2014. Polyploidy and apomixis in accessions of *Senna rugosa* (G.Don) H.S.Irwin & Barneby. *Turkish Journal of Biology*, 38: 510-515.

RIBEIRO, C. S. C.; BRUNE, S.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. Cultivo da berinjela (*Solanum melongena* L.). Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 23 p. 1998.

ROSE, J. B.; KUBBA, J.; TOBUTT, K. R. Induction of tetraploidy in *Buddleia globosa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 63, n. 2, p. 121-125, 2000.

RUBULUZA, T.; NIKOLOVA, R. V.; SMITH, M. T.; HANNWEG, K. *In vitro* induction of tetraploids in *Colophospermum mopane* by colchicine. *South African Journal of Botany*, v. 73, n. 2, p. 259-261, 2007.

RUSSO, C.; VENORA, G.; ERRICO, A. Karyotype analysis in *Solanum melongena* L. Instituto Di Agronomia e Coltivazioni Erbacee, Della Torre – Portici, p. 13-21, 1991.

SANGTHONG, R.; MII, M.; SOONTHORNCHAINAKSAENG, P.; SUPAIBULWATANA, K. Characteristics of the tetraploid plant derived as a somaclonal variation in *Lilium longiflorum*. In IX International Symposium on Flower Bulbs, v. 673, p.167-174, 2004.

SCHAFF, D. A.; JELENKOVIC, G.; BOYER, C. D.; POLLACK, B. L. Hybridization and fertility of hybrid derivatives of *Solanum melongena* L. and *Solanum macrocarpon* L. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 62, p. 149-153, 1982.

SCHWEIZER, D. Reverse fluorescent chromosome banding with cromomicin and DAPI. *Chromosoma*, n. 58, p. 307-354, 1976.

SEKARA, A.; CEBULA, S.; KUNICK, E. Cultivated eggplants – origin, breeding objectives and genetic resources, a review. *Folia Horticulturae*, v. 19, p. 97-114, 2007.

SERAPIGLIA, M. J.; GOUKER, F. E.; HART, F.; UNDA, F.; MANSFIELD, S.; STIPANOVIC, A. J.; SMART, L. B. Ploidy level affects important biomass traits of novel ShrubWillow (*Salix*) Hybrids. *Bioenergy Research*, v. 8, p. 259-269, 2015.

SHAO, J.; CHEN, C.; DENG, X.. *In vitro* induction of tetraploid in pomegranate (*Punica granatum*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 75, p. 241-246, 2003.

SILJAK-YAKOVLEV, S.; PECCENINI, S.; MURATOVIC, E.; ZOLDOS, V.; ROBIN, O.; VALLÈS, J. Chromosomal differentiation and genome size in three European mountain *Lilium* species. *Plant Systematic and Evolution*, v. 236, p. 165-173, 2003.

SILVA, M. A.; OLIVEIRA, F. A.; HRNCIR, M. Efeito de diferentes tratamentos de polinização em berinjela em casa de vegetação. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, v. 11, n. 1, p. 30-36, 2016.

SOARES-SCOTT, M. D.; MELETTI, L. M. M.; BERNACCI, L. C.; PASSOS, I. R. S.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. Citogenética clássica e molecular em passifloras. *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. 30p, 2005.

SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S. Polyploidy, breeding systems, and genetic differentiation in homosporous pteridophytes. In *Isozymes in plant biology*, v. 1, p. 241-258, 1989.

SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; TATE, J. A. Advances in the study of polyploidy since plant speciation. *New Phytologist*, v. 161, p. 173-191, 2003.

SONG, P.; KONG, W.; PEFFLEY, E.B. Chromosome doubling of *Allium fistulosum* x *A. cepa* interspecific F1 hybrids through colchicine treatment of regenerating callus. *Euphytica*, v. 93, p. 257-262, 1997.

SONG, C.; LIU, S.; XIAO, J.; ZHOU, Y.; QIN, Q.; ZHANG, C.; LIU, Y. Polyploid organisms. *Science China LifeScience*, v. 55, p. 301-311, 2012.

SOONTHORNKALUMP, S.; CHUENBOONNGARM, N.; JENJITTIKUL, T.; THAMMASIRI, K.; SOONTORNCHAINAKSAENG, P. Morphological and stomatal guard cell characteristics of *in vitro* *Kaempferia rotunda* L.(Zingiberaceae) through colchicine induced polyploidy. *Agricultural Technology and Biological Sciences*, v. 14, n. 3, p. 235-242., 2017.

SOUZA, F. F. Desenvolvimento e avaliação de híbridos triplóides de melancia (*Citrullus lanatus*). Dissertação de Mestrado. 121p. Recife, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2000.

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; VIEIRA, M. L. C. Cytogenetic studies in some species of *Passiflora* L. (Passifloraceae): a review emphasizing Brazilian species. Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 51, n. 2, p. 247- 258, 2008.

STANIŠIĆ, M.; RASPOR, M.; NINKOVIĆ, S.; MILOŠEVIĆ, S.; ČALIĆ, D.; BOHANEK, B.; JEVREMOVIĆ, S. Clonal fidelity of *Iris sibirica* plants regenerated by somatic embryogenesis and organogenesis in leaf-base culture-RAPD and flow cytometer analyses. South African Journal of Botany, v. 96, p. 42-52, 2015.

STANYS, V.; WECKMAN, A.; STANIENE, G.; DUCHOVSKIS, P. *In vitro* induction of polyploidy in japanese quince (*Chaenomeles japonica*). Plant Cell Tissue and Organ Culture, v. 84, p. 263-268, 2006.

STEBBINS, G.L. Variation and evolution in plants. Columbia University Press, New York, 1950.

STEBBINS, G.L. Chromosome evolution in higher plants. Edward Arnold, London, 1971.

SUBRAHMANYAM, N.; KASHA, K. Chromosome doubling of barley haploids by nitrous oxide and colchicine treatments. Canadian Journal of Genetics and Cytology, v. 17, p. 573-583, 1975.

SUMNER, A. T. Chromosome banding. London: Unwin Human, 434p, 1990.

SYBENGA, J. Cytogenetics in plant breeding. Berlin: Springer. 469p, 1992.

TAKAMURA, T.; LIM, K. B.; VAN, T. J. M. Effect of a new compound on the mitotic polyploidisation of *Lilium longiflorum* and Oriental hybrid lilies. Acta Horticulturae, v. 572, p. 37-40, 2002.

TANG, Z. Q.; CHEN, D. L.; SONG, Z. J.; HE, Y. C.; CAI, D. T. *In vitro* induction and identification of tetraploid plants of *Paulownia tomentosa*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 102, n. 2, p. 213-220, 2010.

TAVAN, M.; MIRJALILI, M. H.; KARIMZADEH, G. *In vitro* polyploidy induction: changes in morphological, anatomical and phytochemical characteristics of *Thymus persicus* (Lamiaceae). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 122, n. 3, p. 573-583, 2015.

TECHIO, V.H.; DAVIDE, L.C.; PEREIRA, A.V.; BEARZOTI, E. Cytotaxonomy of some species and of interspecific hybrids of *Pennisetum* (Poaceae, Poales). Genetics and Molecular Biology, v. 25, p. 203-209, 2002.

TEL-ZUR, N.; DUDAI, M.; RAVEH, E.; MIZRAHI, Y. In situ induction of chromosome doubling in vine cacti (Cactaceae). *Scientia Horticulturae*, v. 129, n. 4, p. 570-576, 2011.

THOMAS, H. Chromosome manipulation and polyploidy. *Plant breeding: principles and prospects*. Chapman and Hall, London, p. 79-92, 1993.  
Tokumoto et al., 2016.

TOKUMOTO, Y.; KAJIURA, H.; TAKENO, S.; HARADA, Y.; SUZUKI, N.; HOSAKA, T.; NAKAZAWA, Y. Induction of tetraploid hardy rubber tree, *Eucommia ulmoides*, and phenotypic differences from diploid. *Plant Biotechnology*, v. 33, n. 1, p. 51-57, 2016.

TOMICZAK, K.; MIKUŁA, A.; SLIWINSKA, E.; RYBCZYŃSKI, J. Autotetraploid plant regeneration by indirect somatic embryogenesis from leaf mesophyll protoplasts of diploid *Gentiana decumbens* L.f. *In vitro Cellular and Developmental Biology*, v. 51, p. 350-359, 2015.

TORRES, A. G.; DAVIDE, L. C.; BEARZOTI, E. Sincronização do ciclo celular em meristema radicular de baru (*Dipteryx alata* vog.) *Ciência Agrotécnica, Lavras*. v. 27, n.2, p.398-405, 2003.

URWIN, N. A.; HORSNELL, J.; MOON, T. Generation and characterisation of colchicine-induced autotetraploid *Lavandula angustifolia*. *Euphytica*, v. 156n. 1-2, p. 257-266, 2007.

VÄINÖLÄ, A. Polyploidization and early screening of *Rhododendron* hybrids. *Euphytica*, v. 112, p. 239-244, 2000.

VÄINÖLÄ, A.; REPO, T. Polyploidization of *Rhododendron* cultivars *in vitro* and how it affects cold hardiness. *Acta Horticulturae*, v. 560, p. 319-322. 2001.

VAJRABHAYA, T. Variations in clonal propagation. Ithaca, New York: Comstock Publishing Associates, p.176-201, 1983.

VAN LAERE, K.; VAN HUYLENBROECK, J.; VAN BOCKSTAELE, E. Breeding strategies to increase genetic variability within *Hibiscus syriacus*. *International Eucarpia Symposium, Section Ornamentals, Breeding for Beauty*, v. 714, p. 75-82, 2006.

VAN LAERE, K. Interspecific hybridization in woody ornamentals. PhD thesis, Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University. 115p, 2008.

VAN TUYL, J. M.; VAN HOLSTEIJN, H. C. M. Lily breeding research in the Netherlands. *Acta Horticulturae*, v. 414, p. 35-45, 1996.

VANDUREN, M.; MORPURGO, R.; DOLEZEL, J.; AFZA, R. Induction and verification of autotetraploids in diploid banana (*Musa acuminata*) by *in vitro* techniques. *Euphytica*, v. 88, p. 25-34, 1996.

WANG, C.; LEI, J. *In vitro* induction of tetraploids from immature embryos through colchicine treatments in *Clivia miniata* Regel. African Journal of Agricultural Research, v. 7, n. 25, p. 3712-3718, 2012.

WANG, L. J.; SHENG, M. Y.; WEN, P. C.; DU, J. Y. Morphological, physiological, cytological and phytochemical studies in diploid and colchicine-induced tetraploid plants of *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn Botanical Studies, v. 58, n. 1, p. 1-12, 2017.

WEAR, E. E.; CONCIA, L.; BROOKS, A. M.; MARKHAM, E. A.; LEE, T. J.; ALLEN, G. C.; HANLEY-BOWDOIN, L. Isolation of plant nuclei at defined cell cycle stages using EdU labeling and flow cytometry. Plant Cell Division: Methods and Protocols, v. 1370, p. 69-86, 2016.

WEILER, R. S.; KRYCKI, K. C.; GUERRA, D.; SIMIONI, C.; DALLAGNOL, M. Chromosome doubling in *Paspalum notatum* var. saure (cultivar Pensacola). Crop Breeding and Applied Biotechnology, v. 15, p. 106-111, 2015.

WU, J. H.; MOONEY, P. Autotetraploid tangor plant regeneration from *in vitro* citrus somatic embryogenic callus treated with colchicine. Plant Cell Tissue and Organ Culture, v. 70, p. 99-104, 2002.

WU, J. H.; FERGUSON, A. R.; MURRAY, B. G. Manipulation of ploidy for kiwifruit breeding: *in vitro* chromosome doubling in diploid *Actinidia chinensis* Planch. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 106, n. 3, p. 503-511, 2011.

WU, H.; MA, Z.; WANG, M. M.; QIN, A. L.; RAN, J. H.; WANG, X. Q. A high frequency of allopolyploid speciation in the gymnospermous genus *Ephedra* and its possible association with some biological and ecological features. Molecular ecology, v. 25, n. 5, p. 1192-1210, 2016.

XIONG, Y. C.; LI, F. M.; ZHANG, T. Performance of wheat crops with different chromosome ploidy: root-sourced signals, drought tolerance, and yield performance. Planta, v. 224, p. 710-718, 2006.

YANG, X. M.; CAO, Z. Y.; AN, L. Z.; WANG, Y. M.; FANG, X. W. *In vitro* tetraploid induction via colchicine treatment from diploid somatic embryos in grapevine (*Vitis vinifera* L.). Euphytica, v. 152, p. 217-224, 2006.

YANG, Z.; SHEN, Z.; TETREAU, H.; JOHNSON, L.; FRIEBE, B.; FRAZIER, T.; ZHAO, B. Production of autopolyploid lowland switchgrass lines through *in vitro* chromosome doubling. BioEnergy Research, v. 7, n. 1, p. 232-242, 2014.

YU, C. Y.; KIM, H. S.; RAYBURN, A.; WIDHOLM, J. M.; JUVIK, J. A. Chromosome doubling of the bioenergy crop, *Miscanthus giganteus*. Gcb Bioenergy, v. 1, n. 6, p. 404-412, 2009.

- ZAHUMENICKA, P.; SYSOVA, B., HOLIK, A.; FERNANDEZ, E. C. *In vitro* induced mitotic polyploidy in *Drosera capensis* L. *Agricultura tropica et subtropica*, v. 46, n. 4, p. 107-110, 2013.
- ZANELA, L. Caracterização cariotípica de quatro espécies brasileiras de *Alstroemeria* (Alstroemeriaceae) com as técnicas de FISH, CMA, DAPI e AgNOR. Discertação de mestrado. Instituto Agronômico de Pós-graduação. Campinas, SP. 96 p, 2009.
- ZHANG, J.; ZHANG, M.; DENG, X. Obtaining autotetraploids *in vitro* at a high frequency in *Citrus sinensis*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v. 89, p. 211-216, 2007.
- ZHANG, Z.; DAI, H. XIAO, M.; LIU, X. *In vitro* induction of tetraploids in *Phlox subulata* L. *Euphytica*, v. 159, p. 59-65, 2008.
- ZHANG, Q. Y.; LUO, F. X.; LIU, L.; GUO, F. C. *In vitro* induction of tetraploids in crape myrtle (*Lagerstroemia indica* L.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v. 101, p. 41-47, 2010.
- ZHANG, Q.; ZHANG, F.; LI, B.; ZHANG, L.; SHI, H. Production of tetraploid plants of *Trollius chinensis* Bunge induced by colchicine. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, v. 52, n. 1, p. 34-38, 2016.
- ZLESÁK, D.; THILL, C.; ANDERSON, N. Trifluralin-mediated polyploidization of *Rosa chinensis minima* (Sims) Voss. *Euphytica*, v. 141, p. 281-290, 2005.

## **CAPÍTULO I - CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE *Solanum melongena* Linn.**

### **1 INTRODUÇÃO**

O gênero *Solanum*, pertencente à família Solanaceae, é um dos mais diversos entre as angiospermas, com 75% de suas espécies ocorrendo na América do Sul (HUNZIKER, 2001). *Solanum* é composto por representantes de elevada importância econômica graças à presença de frutas ou folhas comestíveis. Destacam-se principalmente *S. tuberosum* L. (batata), *S. melongena* L. (berinjela), *S. muricatum* (melão-andino) e *S. lycopersicum*. O gênero conta ainda com representantes de interesse farmacológico como *S. viarum* e *S. elaeagnifolium*, que produzem compostos esteroidais e espécies ornamentais, como *S. pseudocapsicum* L. (NEE, 1991; EDMONDS e CHWEYA, 1997; HAWKES, 1999).

*Solanum melongena* (berinjela) é uma espécie não tuberosa cultivada em diversas partes do mundo que apresenta elevado potencial econômico graças a seu fruto palatável e altamente nutritivo. O fruto também é consumido pela população com fins terapêuticos no tratamento de diversas doenças como diabetes, bronquite e disúria e pode ser empregado ainda no combate a altos níveis de colesterol (JORGE et al., 1998; KASHYAP et al., 2003; ALIM et al., 2015). Inúmeras cultivares e variedades de berinjela são comercializadas em todo o mundo e diferem entre si em relação à produtividade, formato, coloração, brilho dos frutos e resistência a doenças. Dentre os genótipos plantados pelos agricultores encontram-se híbridos, cultivares originadas por polinização aberta e variedades locais (ARAMENDIZ-TATIZ et al., 2011). Segundo dados da Embrapa, pelo menos 19 diferentes cultivares de berinjela são comercializadas no Brasil, sendo que 13 delas são híbridos. A predominância dos híbridos deve-se principalmente à maior produtividade e vigor, à uniformidade das plantas e à presença de frutos que se adaptam a diferentes condições edafoclimáticas (REIS et al., 2007).



Em relação à caracterização citogenética, sabe-se que a família Solanaceae apresenta uniformidade cariotípica dentro de um mesmo gênero, principalmente em relação ao número e à forma dos cromossomos (FREGONEZI et al., 2006). Estudos citogenéticos básicos, como o registro de números cromossômicos são bem documentados para o gênero *Solanum*, sendo  $2n=24$  e  $2n=48$  os mais frequentes (OLATUNJI, 2005). Para *S. melongena*, a literatura traz informações acerca do número cromossômico apenas para algumas variedades, como Nápoli (RUSSO; VENORA; ERRICO, 1991), Esculentum (RAY, 2010), Preta comprida (CATTELAN, 2008) e BARI (FAWZIA E ALAM, 2011), e todos os trabalhos confirmam o número cromossômico de  $2n=24$  para a espécie, mesmo quando diferentes variedades foram consideradas.

Estudos citogenéticos mais refinados como bandeamento cromossômico (CMA<sub>3</sub>/DA/DAPI) e a hibridização in situ fluorescente (FISH), por outro lado são pouco documentados para berinjela. Ainda assim, a literatura mostra diferenças entre os resultados obtidos para variedades e cultivares distintas, principalmente em relação ao padrão de marcas obtidas com o bandeamento cromossômico (FAWZIA e ALAM, 2011). Até o momento, não há registros na literatura da caracterização citogenética da cultivar Embu, amplamente comercializada no Brasil. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi realizar, pela primeira vez, a caracterização citogenética da cultivar Embu de berinjela, por meio de técnicas de citogenética clássica e molecular.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi realizar a caracterização citogenética da cultivar Embu de *Solanum melongena* L., através de técnicas de citogenética clássica e molecular.

### 2.2 Objetivos específicos

- 1) Determinar o número cromossômico da cultivar Embu de *S. melongena* L.;
- 2) Avaliar a morfometria dos cromossomos da cultivar Embu de *S. melongena* L.;
- 3) Investigar o padrão de bandas de heterocromatina da cultivar Embu de *S. melongena* L. pela metodologia de bandeamento CMA<sub>3</sub>/DA/DAPI;
- 4) Investigar o número de sítios de DNA ribossomal 5S e 45S para a cultivar Embu de *S. melongena* L. pela técnica de Hibridização in Situ Fluorescente (FISH).

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Material Biológico

Para a condução dos experimentos realizados neste capítulo, foram utilizadas sementes de *Solanum melongena* L. (cultivar Embu) da marca FELTRIN<sup>®</sup>, lote 0070701310000050.

### 3.2 Preparo das lâminas

Para a obtenção de núcleos interfásicos e cromossomos metafásicos, sementes comerciais de berinjela foram submetidas a enraizamento em placas de Petri forradas com papel filtro e umedecidas com água destilada. Raízes com aproximadamente 1,0 cm de comprimento foram coletadas e tratadas com solução 2mM de 8-hidroxoquinoleína pelo período de 8h, a 9°C. Em seguida, as raízes foram fixadas em solução Carnoy (etanol: ácido acético glacial, 3:1) e armazenadas em refrigerador pelo período mínimo de 24h.

As raízes tratadas foram cuidadosamente lavadas em água destilada para a retirada total do fixador e digeridas em solução enzimática 2% (p/v) celulase Onozuka R-10 (Serva) e 20% (v/v) pectinase (Sigma). A digestão foi realizada em estufa a 37°C por 3h. Os meristemas radiculares foram separados com o auxílio de um bisturi e as lâminas de microscopia foram preparadas pela técnica de secagem ao ar (CARVALHO, 1995). As lâminas destinadas à contagem e morfometria cromossômica foram coradas em solução de Giemsa 5% (Merck), enquanto as lâminas destinadas às técnicas de citogenética molecular permaneceram sem coloração. O material foi observado em microscópio óptico (Olympus BX 51) com aumento de até 1000x.

### 3.3 Contagem e Morfometria Cromossômica

A avaliação do número de cromossomos para a cultivar Embu de berinjela foi feita pela observação de 50 metáfases. A morfometria foi realizada considerando-se dez metáfases sem sobreposição dos cromossomos.

O cariograma para a cultivar Embu de berinjela foi montado a partir da análise dos seguintes dados: comprimento do lote haploide (CLH); comprimento do braço curto (BC); comprimento do braço longo (BL); comprimento total do cromossomo ( $CT=BL+BC$ ); relação entre os braços ( $r=BL/BC$ ); índice centromérico ( $IC=BC100/CT$ ) e comprimento relativo do cromossomo ( $CR=100CT/CLH$ ).

Os cromossomos foram classificados de acordo com a razão entre os braços, conforme proposto por Levan et al. (1964) e a assimetria do cartiótipo foi calculada conforme proposto por Watanabe et al. (1999):  $A_i=(BL-BC)/(BL+BC)$ , sendo "A<sub>i</sub>" o grau de heterogeneidade e  $A=(1/n)\sum A_i$ , onde n é o número haploide de cromossomos e "A" é o grau de assimetria do cartiótipo. O grau de assimetria pode variar de zero (cartiótipo completamente simétrico) a 1 (cartiótipo totalmente assimétrico).

### 3.4 Bandeamento CMA<sub>3</sub>/DA/DAPI

A técnica de bandeamento cromossômico foi realizada em lâminas envelhecidas por pelo menos três dias, de acordo com protocolo proposto por Schweizer (1976), com pequenas alterações. Antes do início do procedimento, as lâminas, preparadas sem coloração, foram banhadas em ácido acético glacial 45% durante 15 minutos e secas ao ar. Foram aplicados 30 µL de CMA<sub>3</sub>, (0,1mg/mL) diluído em tampão McIlvaine acrescido de 0,5 mM de MgCl<sub>2</sub> pelo período de 1h. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com tampão McIlvaine e novamente secas ao ar. Foram adicionados 30 µL de solução de distamicina (0,1mg/mL) pelo período de 30 min, seguido de lavagem com água destilada. Por último, as lâminas

foram tratadas com 30 µL de solução de DAPI (0,1mg/mL) por 30min, lavadas com água destilada e secas ao ar. As lâminas foram montadas em meio antifade (30 µL) e mantidas em refrigerador para posterior análise, por pelo menos sete dias. Todo o procedimento acima descrito foi realizado na ausência de luz, à temperatura ambiente. A análise do material foi feita em microscópio de fluorescência (Olympus BX 51) com filtro específico para os fluorocromos DAPI (360 a 390 nm) e CMA<sub>3</sub> (430 a 480 nm).

### 3.5 Hibridização in situ Fluorescente (FISH)

A Hibridização in situ Fluorescente (FISH) em *S. melongena* (cultivar Embu) foi realizada com sondas para regiões de DNA ribossomal 5S e 45S, sendo a sonda 5S obtida a partir de DNA genômico de milho e a 45S a partir de DNA de trigo. As sondas foram cedidas ao Laboratório de Genética e Biotecnologia da UFJF pelo Dr. Jiming Jiang (University of Madison, Wisconsin, USA).

Plasmídeos vetores contendo as regiões de interesse foram inseridos em bactérias *Escherichia coli* pelo método de eletroporação (Electroporator 2510, Eppendorf). Foram utilizadas células competentes TOP 10, às quais foi adicionado 1µL de DNA plasmidial. O material foi mantido no gelo por 10 minutos e submetido a pulso elétrico em uma cuveta (1,7 kV, 200 W e 25 µF). Em seguida, o material foi incubado a 42°C (1 minuto e 30 segundos) e novamente colocado no gelo (1 minuto). As bactérias foram inoculadas em 400 µL de meio LB, incubadas a 37°C por 30 minutos e plaqueadas em LB sólido com ampicilina. Para o crescimento das bactérias contendo os plasmídeos de interesse, as placas foram incubadas a 37°C overnight. A eficiência da transformação foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{CFU}/\mu\text{g} = \frac{\text{CFU}}{\text{pg}} \times \frac{1.10^6}{\mu\text{g}} \text{pg} \times \frac{\text{volume transformado}}{\text{volume plaqueado}} \times \text{fator de diluição}$$

A multiplicação das bactérias transformadas foi feita através da incubação overnight a 37°C, com agitação (180 rpm) em meio LB com ampicilina (100mg/mL). A extração das regiões de DNAr foi feita com o kit PlasmidPrep MiniSpin (GE Healthare Illustra™) e a marcação das sondas foi realizada por *nick translation* (BioNick e DigNick, Roche), de acordo com as instruções do fabricante.

A hibridização em lâminas de berinjela foi realizada de acordo com protocolo proposto por Jiang et al. (1995), com modificações. Antes do início do processo, as lâminas foram lavadas em ácido acético 45% por 15 minutos e em álcool 100% por dois minutos. A desnaturação dos cromossomos e das sondas foi realizada separadamente. Os cromossomos foram desnaturados pela aplicação de 100µL de formamida (70%/2xSSC) diretamente sobre as lâminas. O material foi coberto com lamínula plástica e incubado em estufa (80-85°C) por 1 minuto e as lâminas foram imediatamente submetidas a uma série de banhos alcoólicos: etanol 70% gelado, etanol 90% (temperatura ambiente) e etanol 100% (temperatura ambiente), sendo cada banho com duração de 5 minutos. Após as lavagens, as lâminas foram secas ao ar e mantidas em placas de Petri ao abrigo da luz até o momento da aplicação da mistura de hibridização.

A mistura de hibridização foi composta por formamida deionizada 100% (10µL), dextran sulfato 50% (4µL), 20x SSC (2µL), sonda DNAr 5S ou 45S (1µL) e água ultrapura (2µL). A desnaturação do mix contendo cada uma das sondas foi feita em termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient, NSC 460; Kell 405) por 10 minutos, sendo adicionados 19µL do mix a cada lâmina previamente desnaturada. As lâminas foram cobertas com lamínulas de vidro (22x40mm), cuidadosamente seladas e incubadas a 37°C por no mínimo 48h para a hibridização das sondas nos cromossomos. Após o período de hibridização, as lamínulas foram removidas em banho de solução de 2xSSC e as lâminas passaram por outra série de banhos de 5 minutos: 2xSSC a temperatura ambiente, 2x SSC a 42°C, e 1x PBS a temperatura ambiente.

A detecção das sondas foi realizada por anticorpos marcados com fluorocromo (digoxigenina), sendo o mix de detecção formado por tampão TNB 5x (20 µL), ddH<sub>2</sub>O (80 µL), rodamina anti-DIG (1 µL) e TRITC acoplado a streptavidina

(1  $\mu\text{L}$ ). Em cada lâmina, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  do mix sobre os cromossomos. As lâminas foram então incubadas em câmara escura, a 37°C (1h) e lavadas em três banhos consecutivos de 1x TNT (5 min), seguido da lavagem em 1x PBS (5 min). Por último, as lâminas foram contracoradas com Vectashield/DAPI (20  $\mu\text{L}$ /lâmina) e observadas em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 51). Com a câmera Olympus U-TVO-63XC (SN1A48982; T7 TOKYO, JAPAN), foram capturadas pelo menos 10 figuras representativas de cada sonda (5S e 45S) e as análises foram realizadas no software ImagePro-Plus (Media Cybernetics).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Contagem e Morfometria Cromossômica

A contagem de cromossomos em metáfases de *S. melongena* L. cultivar Embu coradas com Giemsa evidenciou a presença de 24 cromossomos ( $2n=2x=24$ ). Também foi possível observar a presença de um par de constrições secundárias terminais, formando satélites no par cromossômico de número 4 (Figura 1a).

O comprimento médio dos cromossomos variou de 2,63 $\mu$ m (cromossomo 1) a 1,77 $\mu$ m (cromossomo 12) e o comprimento relativo dos mesmos ficou entre 9,79% (cromossomo 1) e 6,59% (cromossomo 12). O comprimento do lote haploide (CLH) foi de 26,84 $\mu$ m. A morfologia e o tamanho dos cromossomos mostraram-se bastante semelhantes, resultando na fórmula cariotípica representada por 12M (metacêntricos). O grau de assimetria para o cariótipo foi de 0,10 sendo, portanto, simétrico. Os dados morfométricos médios para os cromossomos podem ser observados mais detalhadamente na Tabela 1.

Tabela 1. Dados morfométricos médios dos cromossomos de *Solanum melongena*, cultivar Embu.

Cromossomo	BC ( $\mu$ m)	BL ( $\mu$ m)	CT ( $\mu$ m)	r	IC	CR (%)	Ai	CC
1	1,24	1,39	2,63	1,13	47,03	9,79	0,05	M
2	1,19	1,36	2,55	1,15	46,49	9,50	0,06	M
3	1,14	1,35	2,49	1,18	45,87	9,28	0,08	M
*4	1,10	1,27	2,37	1,16	46,27	8,84	0,07	M
5	1,05	1,22	2,27	1,16	46,40	8,46	0,07	M
6	1,00	1,33	2,34	1,33	42,96	8,71	0,14	M
7	0,98	1,21	2,19	1,23	44,77	8,18	0,10	M
8	0,95	1,21	2,15	1,27	44,01	8,02	0,12	M
9	0,92	1,16	2,08	1,25	44,43	7,75	0,11	M
10	0,88	1,18	2,06	1,34	42,70	7,66	0,14	M
11	0,84	1,10	1,94	1,31	43,34	7,24	0,13	M
12	0,76	1,01	1,77	1,32	43,08	6,59	0,14	M
CLH			26,84					

\*medidas sem considerar o satélite. (CLH) Comprimento do lote haploide; (BC) comprimento do braço curto; (BL) comprimento do braço longo; (CT=BL+BC) comprimento total do cromossomo; (r=BL/BC); relação entre braços; (IC=BC100/CT) índice centromérico; (CLH) comprimento do lote haploide; (CR=100CT/CLH); comprimento relativo do cromossomo; (Ai) = grau de heterogeneidade; (CC) classificação cromossômica; (M) metacêntrico.



Os resultados obtidos com os dados morfométricos dos cromossomos de berinjela permitiram a montagem do cariógrama para a cultivar Embu, que pode ser observado na Figura 1b.

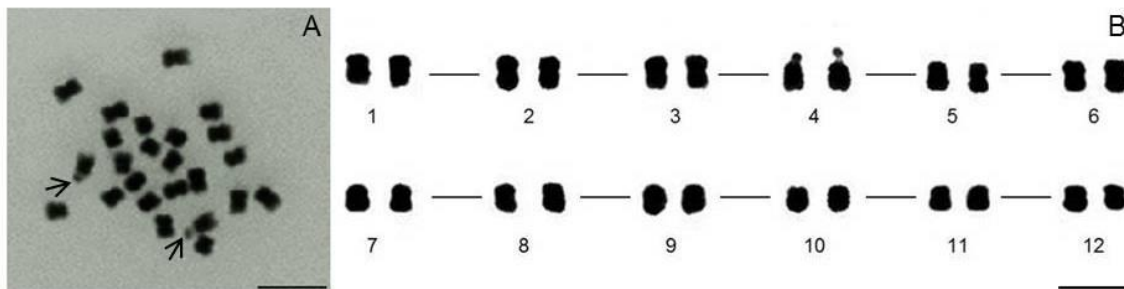


Figura 1. (A) Metáfase mitótica de *Solanum melongena* corada com Giemsa. As setas indicam as constrições secundárias. (B) Cariograma montado a partir da metáfase mitótica de *S. melongena*. As constrições secundárias podem ser observadas no par cromossômico número 4. Barra = 5μm

#### 4.2 Bandejamento CMA<sub>3</sub>/DA/DAPI

Através da coloração diferencial por CMA<sub>3</sub>/DA/DAPI nenhuma banda DAPI positiva foi observada nos cromossomos de berinjela, cultivar Embu (Figura 2a). Em contrapartida, foram observadas quatro bandas CMA<sub>3</sub> positivas, sendo um par de localização terminal e outro de localização intersticial (Figura 2b).

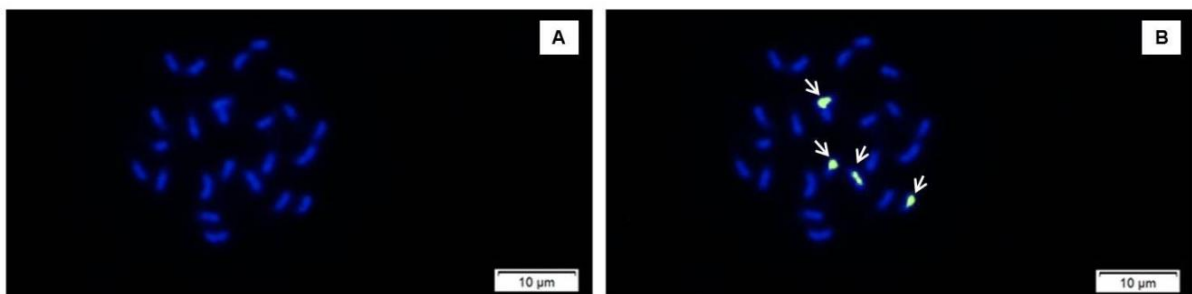


Figura 2. Técnica de bandeamento cromossômico aplicada aos cromossomos de berinjela, cultivar Embu. (A) Metáfase corada com DAPI evidenciando a ausência de marcações; (B) Sobreposição da coloração com CMA<sub>3</sub>/DA/DAPI; as setas indicam regiões CMA<sub>3</sub> positivas. Barra=10 μm.

### 4.3 Hibridização in situ Fluorescente (FISH)

A Hibridização in situ Fluorescente (FISH) com a sonda para DNAr 5S permitiu a identificação de dois sítios localizados em um par de homólogos (Figura 3a). A hibridização com a sonda para DNAr 45S, por sua vez, resultou na visualização de quatro sítios, em dois pares de homólogos (Figura 3b). Foi possível observar uma diferença na intensidade do sinal entre os pares de sítios de DNAr 45S e também diferenças na localização, sendo um par de localização terminal com sinal forte e o outro de localização intersticial com sinal mais fraco (Figura 3b).

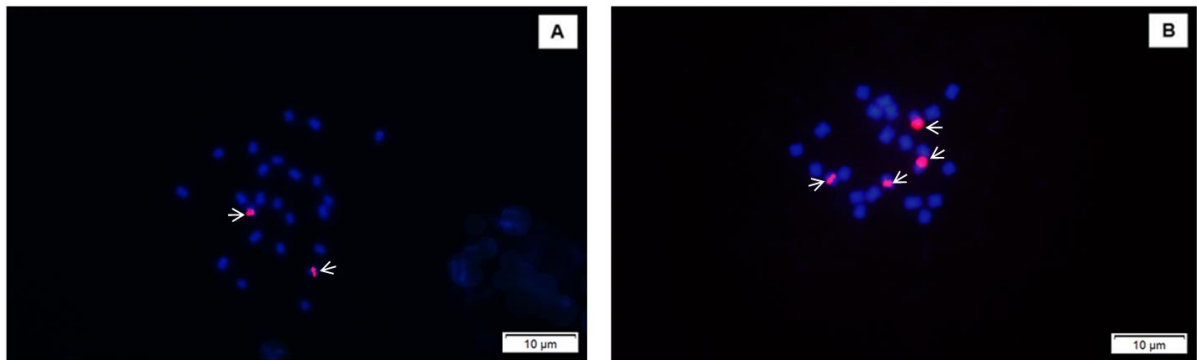


Figura 3. Técnica de Hibridização in situ Fluorescente (FISH) com sondas para DNAr 5s e 45S aplicada aos cromossomos de *Solanum melongena*, cultivar Embu. (A) Marcação com sonda para DNAr 5S. (B) Marcação com sonda para DNAr 45S. As setas indicam os pontos de fluorescência. Barra=10 µm.

## 5 DISCUSSÃO

A contagem cromossômica já foi descrita para algumas variedades distintas de berinjela, mas ainda não há relatos para a cultivar Embu. A avaliação de metáfases mitóticas da berinjela Embu permitiu a visualização de 24 cromossomos, corroborando os estudos prévios com as demais variedades. A morfometria dos cromossomos, no entanto, mostrou-se um pouco diferente do que o encontrado em outras variedades. Como pode ser observado na Tabela 1, o tamanho dos cromossomos da cultivar Embu variou entre 1,77 e 2,63  $\mu\text{m}$ . Estudos anteriores mostram variações entre 1,87 e 4,02  $\mu\text{m}$  (Preta comprida), 2,70 e 4,12  $\mu\text{m}$  (Inerme), 1,99 e 4,23  $\mu\text{m}$  (Bomo), 0,93 e 1,50  $\mu\text{m}$  (Islampuri), 1,02 e 1,88  $\mu\text{m}$  (BARI Begun-3), 0,97 e 1,77  $\mu\text{m}$  (BARI Begun-1) e entre 1,11 e 2,13  $\mu\text{m}$  (BARI Begun-5) (CATTELAN, 2008; OLATUNJI, 2005; FAWZIA e ALAM, 2011).

Em relação à presença de constrições secundárias, também foram observadas discrepâncias. No presente trabalho, foram encontradas duas constrições secundárias para a variedade Embu, localizadas no par cromossômico de número 4. Trabalhos anteriores registraram a presença de até seis constrições secundárias como, por exemplo, para a variedade Esculentum (RAY, 2010). Alguns autores registraram a presença de duas ou quatro constrições em *S. melongena* sp., mas não informaram a variedade utilizada no estudo (ACOSTA et al., 2005; OBUTE; NDUKWU; OKOLI, 2006). Para as variedades Preta Comprida, Islampuri e BARI-Begun-1 nenhuma constrição foi observada (CATTELAN, 2008), ao passo que em BARI Begun-3 e BARI Begun-5 (FAWZIA e ALAM, 2011) foram observadas duas constrições, assim como em Embu. É sabido que variações quanto ao número, posição e tamanho de constrições secundárias e de satélites são frequentemente observadas em vegetais, sendo úteis como marcadores. Segundo Murray (1975) e Stebbins (1971) esses marcadores podem ser incorporados ou suprimidos ao longo do processo evolutivo (MURRAY, 1975; STEBBINS, 1971).

O cariótipo da cultivar Embu mostrou-se simétrico, com todos os cromossomos metacêntricos. Em todos os relatos para berinjela há uma

predominância de cromossomos metacêntricos, indicando também a simetria do cariótipo, mas geralmente também são observados alguns cromossomos submetacêntricos ou até acrocêntricos, como é o caso dos estudos com Islampuri, BARI Begun 1, 3, e 5, Preta Comprida e Esculentum, já citados anteriormente. Como os cromossomos de berinjela são muito pequenos e altamente condensados, alguns autores relatam a indefinição da região centromérica, impedindo assim a classificação (CATTELAN, 2008; MELO, 2009).

Relatos de montagem de cariograma para a espécie também são escassos, provavelmente porque o tamanho reduzido dos cromossomos e a grande semelhança entre eles dificultam o pareamento correto. Apenas um registro pode ser encontrado, mas a resolução dos cromossomos não está bem definida e, por isso, não foi realizada classificação de acordo com a posição centromérica (CATTELAN, 2008). A utilização de metáfases bem bloqueadas e espalhadas permitiram tanto a classificação dos cromossomos quanto a montagem do cariograma para a cultivar Embu (Tabela 1; Figura 2).

O bandeamento CMA<sub>3</sub>/DA/DAPI representa uma boa maneira de enriquecer os dados citogenéticos, facilitando também a determinação de possíveis diferenças entre diploides e poliploides, variedades distintas de uma mesma espécie ou ainda entre espécies correlatas (SUMNER, 1990). A técnica permite a identificação da distribuição e da quantidade de heterocromatina e a diferenciação de tipos de heterocromatina (AT e CG) usando fluorocromos DAPI e CMA. Estes parâmetros são importantes para a identificação de cromossomos homólogos e homeólogos e para a caracterização de polimorfismos ou de relações de parentesco entre espécies próximas, distinguindo possíveis rearranjos cromossômicos (SOARES-SCOTT et al., 2005). Nenhuma banda DAPI positiva foi encontrada para a cultivar Embu, ao passo que quatro bandas CMA<sub>3</sub> positivas foram observadas, sendo um par com localização terminal e o outro com localização intersticial (Figura 3).

Dados acerca do bandeamento cromossômico em berinjela ainda são incipientes. No trabalho de Fawzia e Alam (2011), foram observadas quatro bandas DAPI+ para BARI Begun-5, mas nenhuma banda foi registrada para as outras três variedades estudadas. Em relação ao padrão de bandas CMA, foram registradas

duas bandas positivas para a variedade Islampuri (regiões terminais), quatro bandas positivas para BARI Begun-4 e 5 (regiões variadas) e nenhuma banda CMA para a variedade BARI Begun-1 (FAWZIA e ALAM, 2011).

Neste trabalho, a hibridização com a sonda para DNAr 5S permitiu a visualização de um par de sinais, enquanto a hibridização com a sonda para DNAr 45S evidenciou a presença de dois pares de sinais, sendo um dos sinais de localização terminal e de forte intensidade e o outro de localização intersticial e com menor intensidade de fluorescência (Figura 4). Este resultado não reproduz o que foi observado por Melo et al. (2011), em um estudo com nove espécies do gênero *Solanum*. Melo et al. (2011) registraram a presença de apenas dois sinais após a hibridização com a sonda para DNAr 45S, mas não informaram a variedade empregada, o que impossibilita a comparação com os resultados aqui obtidos.

## 6 CONCLUSÕES

A avaliação de metáfases mitóticas da cultivar Embu evidenciou a presença de 24 cromossomos e de um par de constrições secundárias terminais, localizadas no par cromossômico de número 4.

O tamanho dos cromossomos variou entre 1,77 $\mu$ m e 2,63 $\mu$ m e o cariótipo mostrou-se simétrico, com fórmula cariotípica representada por 12M.

Nenhuma banda DAPI positiva foi detectada, ao passo que foram observadas quatro bandas CMA<sub>3</sub> positivas, sendo um par de localização terminal e outro de localização intersticial.

A Hibridização in situ Fluorescente (FISH) permitiu a localização de dois sítios de DNAr 5S e quatro sítios de DNAr 45S.

## 7 REFERÊNCIAS

- ACOSTA, M. C.; BERNARDELLO, G.; GUERRA, M.; MOSCONE, E. A. Karyotype analysis in several South American species of *Solanum* and *Lycianthes rantonnei* (Solanaceae). *Taxon*, v. 54, n. 3, p. 713-723, 2005.
- ALIM, M. A.; BISWAS, B. K.; HASANUZZAMAN, M.; BALA, P.; ROY, S. Shoot regeneration and root induction in brinjal by growth regulators. *Research in agriculture, livestock and fisheries*, v. 2, n. 1, p. 43-51, 2015.
- ARAMENDIZ-TATIS, H.; SUDRÉ, C. P.; GONÇALVES, L. S. S.; RODRIGUES, R. Potencial agrônômico e divergência genética entre genótipos de berinjela nas condições do Caribe Colombiano. *Horticultura Brasileira*, n. 29, p. 174-180, 2011.
- CARVALHO, C. R. Desenvolvimento de tecnologia citogenética em milho (*Zea mays* L.). 127f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- CATTELAN, L. V. Aspectos anatômicos, citogenéticos e palinológicos de espécies de *Solanum*. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 30f, 2008.
- EDMONDS, J. M.; CHWEYA, J. A. Black Nightshades: *Solanum nigrum* L. and related species. Rome: IPGRI, 1997.
- FAWZIA, R.; ALAM, S. S. Fluorescent karyotype analysis in four varieties of *Solanum melongena* L. *Cytologia*, v. 76, n. 3, p. 345-351, 2011.
- FREGONEZI, J. N.; FERNANDES, T.; TOREZAN, J. M. D.; VIEIRA, A. O. S.; VANZELA, A. L. F. Karyotype differentiation of four *Cestrum* species (Solanaceae) based on the physical mapping of repetitive DNA. *Genetics and Molecular Biology*, v. 29, n. 1, p. 97-104, 2006.
- HAWKES, J. G. HAWKES, J. G. The economic importance of the family *Solanaceae*. *Solanaceae* IV. Advances in botany and utilization. Kew: Royal Botanic Gardens, Kew, p. 01-8, 1999.
- HUNZIKER, A. T. *Genera Solanacearum: the genera of Solanaceae illustrated, arranged according to a new system*. ARG Gantner Verlag KG: Ruggell, Liechtenstein, 2001.
- JIANG, J.; GILL, B. S.; WANG, G. L.; RONALD, P. C.; WARD, D. C. Metaphase and interphase fluorescence in situ hybridization mapping of the rice with bacterial artificial chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, n. 92, p. 4487-4491, 1995.

- JORGE, P. A. R.; NEYRA, L. C.; OSAKI, R. M.; ALMEIDA, E.; BRAGAGNOLO, N. Efeito da berinjela sobre os lípidos plasmáticos, a peroxidação lipídica e a reversão da disfunção endotelial na hipercolesteromia experimental. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, n. 70, p. 87-91, 1998.
- KASHYAP, V.; KUMAR, S. V.; COLLONIER, C.; FUSARI, F.; HAICOUR, R.; ROTINO, G. L.; SIHACHAKR, D.; RAJAM, M. V. Biotechnology of eggplant. *Scientia Horticulturae*, n. 97, p. 1-25, 2003.
- LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, n. 52, p. 201-210, 1964.
- MELO, C. A. F. Estudo citogenético e molecular em nove espécies do gênero *Solanum* L. (*Solanaceae* A. Juss.). 88f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, 2009.
- MELO, C. A. F.; MARTINS, M. I. G.; OLIVEIRA, M. B. M.; BENKO-ISEPPON, A. M.; CARVALHO, R. Karyotype analysis for diploid and polyploid species of the *Solanum* L. *Plant Systematics and Evolution*, 293: 227-235. 2011.
- MURRAY, B. G. The cytology of the genus *Brisa*, L. *Graminae*. I. Chromosome numbers, karyotypes and nuclear DNA variation. *Chromosoma*, Berlin, v. 49, p. 299-308, 1975.
- NEE, M. Synopsis of *Solanum* section *Acanthophora*: a group of interest for glycoalkaloids. *Taxonomy, Chemistry, Evolution*. Royal Botanic Gardens, Kew. p. 257-266, 1991.
- OBUTE, G. C.; NDUKWU, B. C.; OKOLI, B. E. Cytogenetic studies on some Nigerian species of *Solanum* L. (*Solanaceae*). *African Journal of Biotechnology*, v. 5, n. 9, p. 689-692, 2006.
- OLATUNJI, O. A. Karyotypic analysis and meiotic chromosomes in eight taxa of *Solanum* species (*Solanaceae*). *Acta SATECH*, v. 2, n. 1, p. 24-29, 2005.
- OMIDIJI, M. O. Cytomorphological studies of *Solanum aethiopicum* x *S. macrocarpon* F1 hybrid. *Cytologia*, v. 48, p. 35-40, 1983.
- RAY, D. P. Karyotype and genome size variation in five new cultivars of Indian Brinjal (*Solanum melongena* var. *Esculentum* L. *Cytologia*, v.75, n. 1, p. 41-47, 2010.
- REIS, A.; LOPES, C. A.; MORETTI, C. L.; RIBEIRO, C. S. C.; CARVALHO, C. M. M.; FRANÇA, F. H.; BÔAS, G. L. B. V.; HENZ, G. P.; SILVA, H. R.; BIANCHETTI, L. B.; VILELA, N. J.; MAKISHIMA, N.; FREITAS, R. A.; SOUZA, R. B.; CARVALHO, S. I. C.; BRUNE, S.; MAROUELLI, W. A.; NASCIMENTOS W. M.; PEREIRA, W.; MELO, W. F. Berinjela (*Solanum melongena* L.). *Cultivares*. Embrapa Hortaliças, Sistemas de Produção, v. 3 ISSN 1678-880x, Versão Eletrônica, 2007.
- RUSSO, C.; VENORA, G.; ERRICO, A. Karyotype analysis in *Solanum melongena* L. *Instituto Di Agronomia e Coltivazioni Erbacee, Della Torre – Portici*, p. 13-21, 1991.



SCHWEIZER, D. Reverse fluorescent chromosome banding with cromomicin and DAPI. *Chromosoma*, n. 58, p. 307-354, 1976.

SOARES-SCOTT, M. D.; MELETTI, L. M. M.; BERNACCI, L. C.; PASSOS, I. R. S.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. Citogenética clássica e molecular em passifloras. Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. 30p, 2005.

STEBBINS, G.L. Chromosome evolution in higher plants. Edward Arnold, London, 1971.

SUMNER, A. T. Chromosome banding. London: Unwin Human, 434p, 1990.

WATANABE, K.; YAHARA, T.; DENDA, T.; KONSUGE, K. Chromosomal evolution in the genus *Brachyscome* (Asteraceae, Astereae): statistical tests regarding correlation between changes in karyotype and habit using phylogenetic information. *Journal of Plankton Research*, n. 112, p. 145-161, 1999.

## **CAPÍTULO II - INDUÇÃO DE POLIPLÓIDIA *IN VITRO* E EFEITOS DA COLCHICINA SOBRE O CICLO CELULAR DE *Solanum melongena* Linn.**

### **1 INTRODUÇÃO**

A duplicação cromossômica induzida é uma estratégia muito empregada em estudos que visam o melhoramento de espécies vegetais (BONA; KARSBURG; GALLO, 2016). Inúmeras aplicações são descritas, como a quebra de barreiras sexuais, a restauração da fertilidade de híbridos, o desenvolvimento de variações fenotípicas, a indução de apomixia, o aumento da biomassa e o desenvolvimento de novas variedades (RAMSEY e SCHEMSKE, 1998). A técnica também pode ser empregada em estudos evolutivos, auxiliando no entendimento de alterações genômicas que ocorreram após a produção de híbridos e poliploides (DO AMARAL et al., 2015).

Poliploides artificiais podem ser obtidos pela utilização de antimitóticos, agentes químicos que interferem na formação do fuso durante a divisão celular (HÄNTZSCHEL e WEBER, 2010). Embora seja uma metodologia bem consolidada, a indução de poliploides *in vitro* consiste em um método complexo e laborioso, que na maioria dos casos apresenta baixas taxas de sucesso e percentuais elevados de plantas aneuploides e mixoploides. Muitas variáveis estão envolvidas no processo, como a escolha da substância poliploidizante, do tipo de explante, do período de exposição e até mesmo do método de detecção de ploidia (DHOOGHE et al., 2011). A maioria dos trabalhos disponíveis na literatura tem como principal objetivo apenas a produção de indivíduos poliploides, o que justifica a carência de estudos que avaliem aspectos básicos dos efeitos dos antimitóticos sobre as células e de características do ciclo celular das plantas.

O presente trabalho teve como objetivo utilizar a berinjela como modelo de estudo do processo de indução de poliploidia *in vitro*, empregando a colchicina como agente poliploidizante e a hidroxíureia como agente sincronizador do ciclo celular. A

berinjela (*S. melongena*) é uma espécie diploide ( $2n=24$ ) da família Solanaceae que apresenta grande importância econômica em todo o mundo, graças a seu fruto comestível e a algumas aplicações farmacológicas (GEORGE, 2004). A berinjela apresenta ainda tecidos com elevada capacidade de regeneração *in vitro*, característica que faz da espécie uma excelente opção para estudos com abordagens biotecnológicas. Já foram descritos trabalhos com berinjela para a produção de variedades melhoradas, para o resgate de embriões, a seleção *in vitro*, a hibridização somática e a transformação genética (MAGIOLI e MANSUR, 2005).

A colchicina, um dos principais antimitóticos empregados em estudos de indução de poliploidia, é um alcaloide extraído das sementes e bulbos de *Colchicum autumnale* e se destaca por não perder a capacidade poliploidizante com a autoclavagem. No entanto, seu uso pode ser tóxico para as plantas, afetando a sobrevivência e a capacidade de regeneração ou ainda levando a alterações cromossômicas (GANTAIT et al., 2011; ZHANG et al., 2007). Geralmente, doses muito baixas são insuficientes para gerar a poliploidização, ao passo que doses muito altas apresentam efeitos indesejados e podem até ser letais (ALLUM et al., 2007). O uso de sincronizadores permite a obtenção de maiores índices de células em divisão e, por isso, constitui uma estratégia interessante para estudos citogenéticos (TORRES; DAVIDE; BEARZOTI, 2003). Por outro lado, não há registros na literatura acerca do uso destas substâncias em protocolos de duplicação *in vitro*.

Considerando que os efeitos danosos dos antimitóticos são os principais obstáculos enfrentados durante o desenvolvimento de protocolos de indução, também foram investigadas as alterações causadas pela colchicina sobre o ciclo celular de berinjela. Para isso, foram empregadas técnicas de microscopia óptica e citometria de fluxo.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o processo de poliploidização e os efeitos do agente poliploidizante, empregando a berinjela como espécie modelo e a hidroxureia como agente sincronizador.

### 2.2 Objetivos específicos

- 1) Determinar um protocolo eficiente para indução de poliploidia *in vitro* em *Solanum melongena*, empregando duas concentrações de colchicina (0,2 e 0,02%) com e sem a sincronização do ciclo celular com hidroxureia;
- 2) Avaliar os efeitos de antimitóticos/sincronizadores (colchicina e hidroxureia) sobre o ciclo celular de células meristemáticas de *Solanum melongena* utilizando técnicas de microscopia óptica e citometria de fluxo;

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Desenho experimental

Os experimentos foram divididos em duas vertentes: a) entender o efeito de antimitóticos/sincronizadores sobre o ciclo celular de *S. melongena* L. e b) testar a eficiência destas substâncias em induzir poliploidia *in vitro* em *S. melongena* L. Um fluxograma representativo das estratégias adotadas é mostrado na Figura 1.

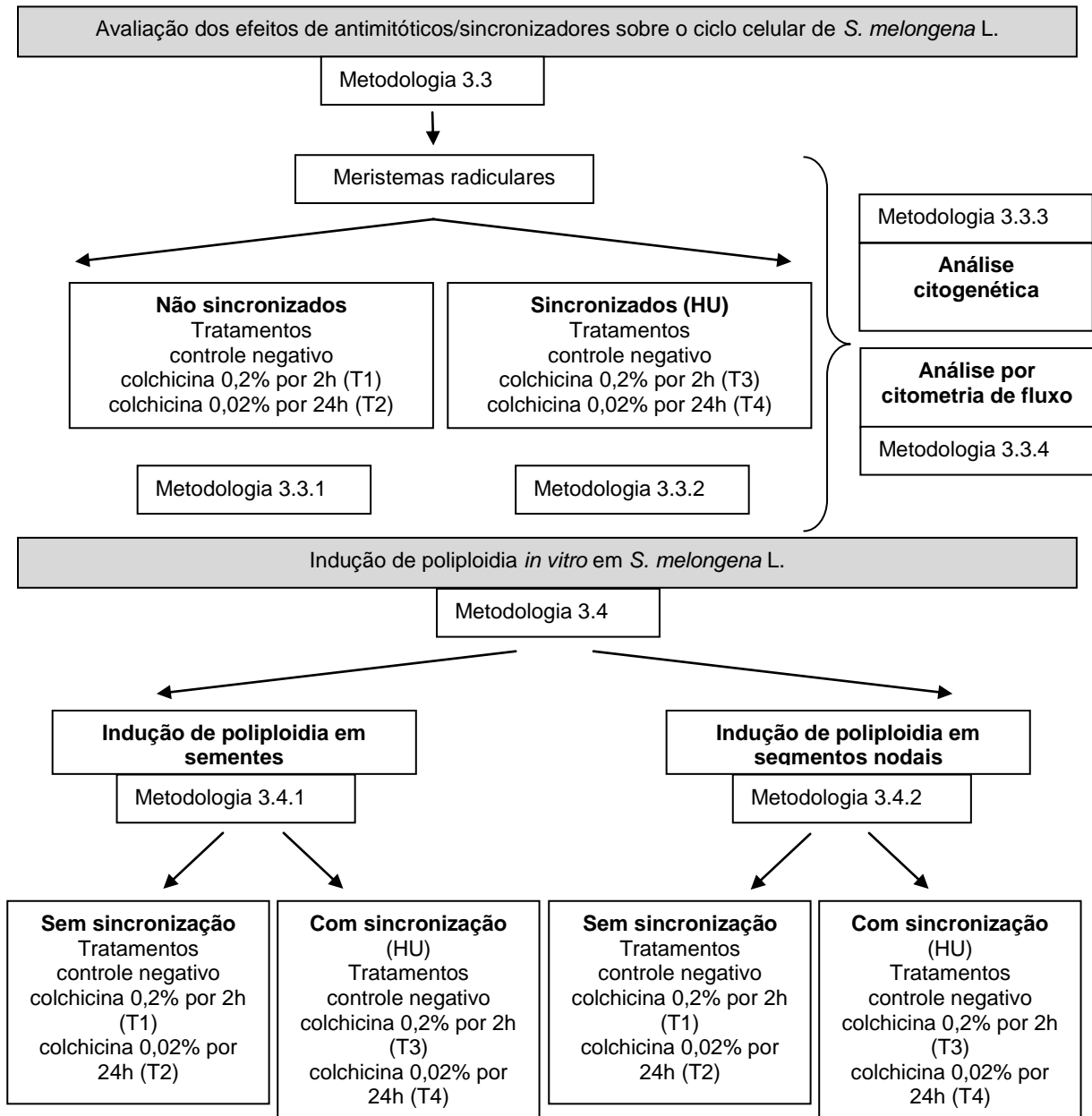


Figura 1. Fluxuograma representativo das estratégias adotadas.

## **3.2 Material Biológico**

Para a condução dos experimentos descritos neste capítulo foram utilizadas sementes de *Solanum melongena* L. (cultivar Embu) da marca Feltrin®, lote 0070701310000050.

## **3.3 Avaliação dos efeitos de antimitóticos/sincronizadores sobre o ciclo celular de *Solanum melongena* L.**

### **3.3.1 Meristemas radiculares não sincronizados**

Sementes de berinjela foram submetidas ao enraizamento em placas de Petri contendo papel filtro umedecido com água destilada. Raízes com aproximadamente 1,0 cm de comprimento foram tratadas com duas diferentes concentrações de colchicina: 0,2% por 2h (T1) e 0,02% por 24h (T2). Foram adicionados 800µL de solução de colchicina por placa e o controle negativo dos experimentos foi composto por água destilada.

Após os períodos de exposição, as raízes foram lavadas e transferidas para placas de Petri contendo água destilada para recuperação. Foram empregados períodos de recuperação de 0, 2, 4, 8, 16, 24 e 48h. Passados os períodos de exposição e recuperação, as raízes foram lavadas em água destilada e destinadas para análise citogenética ou por citometria de fluxo.

### **3.3.2 Meristemas radiculares sincronizados com HU**

Raízes com aproximadamente 1,0 cm de comprimento foram tratadas com hidroxiureia 2mM pelo período de 18,5h para promover a sincronização das células em interfase, conforme proposto por Doležel et al. (1999). Em seguida, as raízes

foram transferidas para placas de Petri contendo água destilada pelo período de 48h para que a divisão celular tivesse início. Passado este período, as raízes foram então transferidas para placas de Petri contendo as duas concentrações de colchicina 0,2% por 2h (T3) e 0,02% por 24h (T4). Foram empregados períodos de recuperação de 0, 2, 4, 8, 16, 24 e 48h e o controle negativo foi composto por água destilada. As raízes foram lavadas em água destilada e destinadas para análise citogenética ou por citometria de fluxo.

### 3.3.3 Análise citogenética

Parte dos meristemas (sincronizados e não sincronizados) tratados com colchicina foi destinada à análise citogenética. As raízes, após os tempos de exposição e recuperação foram fixadas em Carnoy 3:1 (etanol:ácido acético v/v). A solução fixadora foi renovada após 24h e o material armazenado a -4°C.

As lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento de acordo com proposto por Guerra e Souza (2002), com adaptações. Para tal, as raízes fixadas foram lavadas por cinco minutos e submetidas ao processo de digestão enzimática em estufa a 37° C pelo período de 3h (pectinase/celulase). Em seguida, foram lavadas em água destilada, hidrolisadas em HCl 5N por 20 minutos a temperatura ambiente e lavadas novamente. Para o preparo das lâminas, a região meristemática foi separada com o auxílio de uma lâmina de bisturi, sobreposta por uma lamínula de vidro e esmagada cuidadosamente em uma gota de ácido acético 45%. As lamínulas foram retiradas em nitrogênio líquido e as lâminas coradas com Giemsa 5% por três minutos, na ausência de luz.

Considerando a ausência de estudos na literatura que abordem os efeitos de substâncias sobre o ciclo celular de *S. melongena* e o reduzido tamanho dos cromossomos da espécie (ver Capítulo I), as análises foram realizadas utilizando-se um aumento de 1000x e, para cada lâmina, foi avaliado o número total de células da lâmina. Esta metodologia difere-se do que geralmente é descrito para análises de ciclo celular por microscopia (GUERRA e SOUZA, 2002), onde os autores definem

um número de campos a ser avaliado. Acredita-se que essa abordagem seja mais adequada para espécies com cromossomos pequenos como a berinjela, tornando a avaliação mais precisa. Para cada um dos tratamentos foram analisadas três lâminas, sendo cada uma delas considerada uma repetição. Os seguintes parâmetros foram avaliados:

i) Índice mitótico: (percentual de células em divisão): o índice mitótico (IM) foi calculado utilizando-se a equação:  $IM = NCD/NTC \times 100$ , em que NCD corresponde ao número de células em divisão e NTC ao número total de células analisadas (ALVIM et al., 2011).

ii) Percentual total de alterações cromossômicas (Ac): formação de brotos e micronúcleos, quebras e perdas cromossômicas, formação de pontes, multipolaridade, aderência cromossômica, migração tardia e alinhamento tardio (ALVIM et al., 2011).

iii) Percentual de alterações relacionadas à ação da colchicina sobre os microtúbulos: c-metáfases e metáfases duplicadas ( $2n=48$ );

iv) Percentual de morte celular: foi calculado dividindo-se o total de células com morte celular pelo total de células avaliadas (células em intérfase + células em divisão).

### **3.3.4 Análise por citometria de fluxo**

Os meristemas radiculares (não sincronizados e sincronizados) tratados com colchicina também foram analisados por citometria de fluxo. Passados os períodos de exposição e recuperação, as raízes foram lavadas e as amostras para leitura em citômetro de fluxo foram preparadas com as raízes ainda frescas, segundo o protocolo proposto por Dolezel et al. (1989).

As amostras de citometria foram preparadas utilizando-se apenas a região meristemática, por ser a região da raiz que apresenta o maior percentual de células



em divisão. Os meristemas foram macerados com o auxílio de uma lâmina de aço inoxidável em 500µL de tampão LB01 gelado, para a liberação dos núcleos em suspensão (DOLEŽEL et al., 1989). As soluções contendo os núcleos foram aspiradas através de duas camadas de gaze, filtradas em malha de 40µm e coletadas em tubos de poliestireno. A coloração dos núcleos se deu pela adição de 50 µL de iodeto de propídeo (1mg/mL).

A leitura das amostras foi realizada em citômetro FacsCanto II e as análises feitas no software FacsDiva. Os parâmetros do ciclo celular analisados por citometria foram: percentuais de células em sub-G1, G1, S e G2, além da possível presença de picos adicionais como 2xG2 e 4xG2, que possam indicar a ocorrência de eventos de poliploidização. Foram processadas três amostras para cada tratamento, sendo cada amostra preparada a partir de dez meristemas. As diferenças entre os tratamentos foram avaliadas por análise de variância (ANOVA), com nível de significância de 5%.

### **3.4 Indução de poliploidia em *S. melongena* L.**

Os experimentos de indução de poliploidia *in vitro* foram realizados em sementes e segmentos nodais, com e sem a sincronização prévia do ciclo celular por hidroxiureia (HU). Os explantes foram submetidos aos seguintes tratamentos com colchicina: 0,2% por 2h e 0,02% por 24h. Os tratamentos sem sincronização do ciclo celular foram denominados T1 (colchicina 0,2% por 2h) e T2 (0,02% por 24h). Já os tratamentos realizados após a sincronização do ciclo celular por hidroxiureia foram denominados T3 (HU, seguida de colchicina 0,2% por 2h) e T4 (HU, seguida de colchicina 0,02% por 24h).

A escolha das concentrações foi baseada em dados da literatura que sugerem maior eficiência do processo de duplicação quando concentrações maiores de colchicina são empregadas por períodos de exposição mais curtos e concentrações menores por períodos de exposição mais longos (DHOOGHE et al., 2011).

### 3.4.1 Indução de poliploidia em sementes

Todas as sementes foram previamente desinfestadas de acordo com protocolo estabelecido por Zayova et al. (2012) para a espécie, com pequenas modificações. Inicialmente, as sementes foram imersas em água destilada autoclavada com adição de cinco gotas de Tween 20 por 30 minutos para remoção de impurezas, descartando-se aquelas que emergiram para a superfície (JAMIL et al., 2013). As sementes restantes foram mergulhadas em etanol 70% por dois minutos e transferidas para uma solução de hipoclorito de sódio comercial 20% acrescida de 100µL de Tween 20 por 15 minutos. Decorrido este tempo, as sementes foram lavadas em água destilada autoclavada (5x) para total retirada dos resíduos de hipoclorito. Todo o procedimento de desinfestação foi realizado em fluxo laminar, utilizando-se materiais previamente autoclavados a 120°C com pressão de 1 atm por 15 minutos, com o intuito de remover os contaminantes e garantir a assepsia.

A ação de substâncias sobre o ciclo celular depende de sua ativação, que ocorre durante o desenvolvimento do embrião. Por isso, antes da indução de poliploidia, as sementes foram embebidas em água para a protusão da radícula. A determinação do período de embebição necessário foi feita por testes de germinação, utilizando-se sementes controle. O período de embebição necessário para a protusão da radícula em berinjela foi de seis dias.

Para os tratamentos sem sincronização, as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio pequenos contendo 1mL de meio MS acrescido de colchicina nas concentrações T1 (0,2% por 2h) e T2 (0,02% por 24h). Para os tratamentos com sincronização, as sementes foram previamente dispostas em placas de Petri pequenas contendo 800µL de HU 2mM pelo período de 18,5h (DOLEŽEL et al., 1999). Passado o período de exposição, as sementes foram lavadas e transferidas para placas de Petri contendo água destilada por 48h para a retomada da divisão celular. Posteriormente, as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio pequenos com meio MS acrescido das concentrações de colchicina 0,2% por 2h (T3) e 0,02% por 24h (T4).

Foram tratadas 60 sementes por concentração e paralelamente foi realizado um controle negativo do experimento, no qual as sementes foram inoculadas diretamente em MS básico. Após os períodos de exposição, as sementes foram lavadas em água destilada autoclavada (5x) e inoculadas em MS básico para desenvolvimento das plântulas. A avaliação dos níveis de ploidia foi realizada por citometria de fluxo, após o período de 40 dias.

As amostras para citometria foram preparadas de acordo com protocolo proposto por Doležel et al. (1989). Aproximadamente 25mg de tecido foliar foi macerado em tampão LB01 gelado para liberar os núcleos em suspensão, com o auxílio de uma lâmina de bisturi. As soluções contendo os núcleos foram aspiradas através de duas camadas de gaze, filtradas em malha de 40µm e coletadas em tubos de poliestireno. A coloração dos núcleos se deu pela adição de 50 µL de iodeto de propídeo (1mg/mL) e a leitura das amostras foi realizada em citômetro de fluxo FacsCanto II. As análises foram realizadas no software FacsDiva.

### **3.4.2 Indução de poliploidia em segmentos nodais**

Os segmentos nodais necessários para os experimentos de indução foram obtidos a partir de plantas estabelecidas *in vitro*. Para isso, sementes de berinjela foram inoculadas em frascos de vidro contendo 40 mL de meio de cultura MS básico (MURASHIGE e SKOOG, 1962) acrescido de 3% (p/v) de sacarose e 0,8% (p/v) de ágar (Sigma Chemical Company, USA) com pH ajustado em  $5,8 \pm 0,2$ , conforme estabelecido para a espécie por Bhat et al. (2013). Após a germinação e o desenvolvimento (aproximadamente 15 dias), as plântulas foram divididas em segmentos nodais (subcultivo). Os segmentos foram então transferidos para tubos de ensaio (15 x 2,5cm) contendo 15 mL de meio MS sem adição de hormônios.

O número total de explantes necessários para os experimentos de indução de poliploidia foi obtido através da repicagem a cada 30 dias. Cada tubo foi subcultivado por, no máximo, três vezes e apenas os segmentos nodais apicais foram utilizados nos experimentos. Os vidros e tubos de ensaio permaneceram em

sala de cultivo, com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16h e intensidade luminosa de  $40 \mu\text{moles.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas.

Assim como para as sementes, duas abordagens foram empregadas para os experimentos de indução de poliploidia em segmentos nodais: a) segmentos nodais não sincronizados e expostos à colchicina e b) segmentos nodais sincronizados e posteriormente expostos à colchicina.

Para o experimento sem sincronização, os segmentos nodais foram inoculados em tubos de ensaio pequenos contendo 1mL de meio MS acrescido de colchicina 0,2% por 2h (T1) e 0,02% por 24h (T2). Já para o experimento com sincronização, os segmentos nodais foram previamente tratados com hidroxiureia.

Como não há registros na literatura acerca da eficiência da HU após a autoclavagem, o tratamento com o sincronizador foi realizado pela diluição em água e não no meio de cultura. Com o intuito de evitar contaminações, todos os procedimentos foram conduzidos em fluxo laminar. A sincronização foi realizada através da imersão dos segmentos nodais em solução de HU 2mM pelo período de 18,5h. Em seguida, os explantes foram lavados em água destilada (5x) e transferidos para tubos de ensaio contendo MS básico por 48h para a retomada da divisão celular. Após esta etapa os explantes foram tratados com colchicina 0,2% por 2h (T3) e 0,02% por 24h (T4).

Foram tratados 60 segmentos nodais por concentração e dois controles negativos foram empregados, um com segmentos não sincronizados (CN) e outro com segmentos sincronizados.

Após os períodos de exposição, os segmentos nodais foram retirados do meio de cultura e lavados em água destilada (5x). Em seguida, os explantes foram novamente inoculados em meio MS básico por 40 dias para a regeneração e desenvolvimento das plantas *in vitro*. Os tubos de ensaio permaneceram em sala de cultivo com condições controladas e a avaliação dos níveis de ploidia foi realizada por citometria de fluxo (DOLEŽEL et al., 1989). A metodologia para o preparo das amostras de citometria de fluxo foi a mesma anteriormente descrita para avaliação de ploidia das plantas obtidas a partir de sementes.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Avaliação dos efeitos de antimitóticos/sincronizadores sobre o ciclo celular de *S. melongena* L.

#### 4.1.1 Análise citogenética

De um modo geral, não foram observados efeitos significativos sobre o IM quando se compara os tratamentos com os seus respectivos controles. Apenas a concentração de 0,2% de colchicina por 2h de exposição induziu aumentos significativos nos percentuais de células em divisão (IM) (Tabela 1). Este resultado foi observado após 24h de recuperação do tratamento T1 (colchicina 0,2% por 2h, sem sincronização prévia com hidroxiureia), onde o valor de IM foi cerca de 1,46X maior do que no controle. O mesmo foi observado após 2h e 4h de recuperação do tratamento T3 (exposição à HU, seguida de tratamento com colchicina 0,2% por 2h) (Tabela 1). De forma geral, também não foram observadas diferenças significativas quando se compara os mesmos tratamentos com colchicina (T1 com T3 ou T2 com T4) (Tabela 1).

Embora as variações no IM possam não ser significativas para a maioria das comparações, diferenças entre as proporções das fases da divisão celular poderiam estar presentes. Por isso, o percentual de metáfases após a exposição aos diferentes tratamentos com colchicina foi avaliado e os resultados são mostrados na Tabela 2. Aumentos significativos dos índices metafásicos foram observados tanto após exposição à concentração de 0,2% de colchicina por 2h (tratamento T1) quanto após exposição à concentração de 0,02% de colchicina por 24h (tratamento T2) (Tabela 2).

Tabela 1 – Índice mitótico de meristemas radiculares de *Solanum melongena* expostos aos tratamentos com colchicina, após períodos de recuperação.

Tratamentos	0h	2h	4h	8h	16h	24h	48h
Controle T1	10,70	15,44	13,91	14,54	15,67	13,20	13,56
Colch 0,2% 2h (T1)	13,25	14,00	14,19	13,39	11,53	19,29 <sup>a</sup>	14,65
Controle T2	12,02	11,47	14,70	15,92	15,94	15,83	13,01
Colch 0,02% 24h (T2)	10,72	13,59	13,28	14,14	12,06	12,16	17,56
Controle T3	12,85	12,60	13,59	12,58	12,07	12,72	13,07
HU* + Colch 0,2% 2h (T3)	12,71	14,00 <sup>a</sup>	11,32 <sup>a</sup>	10,75	13,45	14,33 <sup>A</sup>	13,46
Controle T4	12,53	15,28	12,67	13,91	14,36	13,71	13,19
HU* + Colch 0,02% 24h (T4)	13,49	12,94	14,97	16,50	13,95	12,29 <sup>A</sup>	15,38

Colch – Colchicina; \* - Tratamento com hidroxiureia 2mM por 18,5h seguido por 48h de recuperação em água destilada. <sup>a</sup> Média estatisticamente diferente do seu respectivo controle; ANOVA ( $p \leq 0,05$ ); <sup>A</sup>Média estatisticamente diferente quando comparada ao mesmo tratamento com colchicina no mesmo tempo de exposição (T1 comparado com T3; T2 comparado com T4).

Tabela 2. Índice metafásico de meristemas radiculares de *Solanum melongena* expostos aos tratamentos com colchicina, após períodos de recuperação.

Tratamentos	0h	2h	4h	8h	16h	24h	48h
Controle T1	28,12	21,12	21,31	27,20	27,25	27,64	25,36
Colch 0,2% 2h (T1)	24,61	43,65 <sup>a</sup>	49,67	30,92	18,96	48,44 <sup>a</sup>	33,23 <sup>a</sup>
Controle T2	28,12	23,00	19,90	24,64	22,82	24,87	24,32
Colch 0,02% 24h (T2)	51,76	36,02 <sup>a</sup>	23,93	25,51	15,83	30,10	19,67
Controle T3	29,85	28,50	30,76	34,00	26,96	23,69	25,71
HU* + Colch 0,2% 2h (T3)	30,03	30,08 <sup>A</sup>	30,81	33,17	26,99	27,14 <sup>A</sup>	30,82
Controle T4	30,40	30,04	31,57	36,58	28,59	29,85	30,39
HU* + Colch 0,02% 24h (T4)	30,40	28,08 <sup>A</sup>	31,60	35,53	29,07	30,35	30,88

Colch – Colchicina; \* - Tratamento com hidroxiureia 2mM por 18,5h seguido por 48h de recuperação em água destilada. <sup>a</sup> Média estatisticamente diferente do seu respectivo controle; ANOVA ( $p \leq 0,05$ ); <sup>A</sup>Média estatisticamente diferente quando comparada ao mesmo tratamento com colchicina no mesmo tempo de exposição (T1 comparado com T3; T2 comparado com T4).

Após 2h de recuperação, o percentual de metáfases em resposta à exposição à colchicina por 2h (T1) foi aproximadamente 2,07X superior ao seu controle. Maiores percentuais de metáfases também foram observados para este tratamento após 24h e 48h de recuperação. Já o tratamento com colchicina 0,02% por 24h (T2) aumentou significativamente o índice metafásico após 2h de recuperação, sendo este valor 1,57X superior ao controle (Tabela 2).

Os tratamentos com HU não contribuíram para um aumento significativo nos percentuais de metáfases quando se compara os mesmos tratamentos com colchicina (T1 com T3 ou T2 com T4). Contrariamente, após alguns tempos de recuperação dos tratamentos com HU + colchicina (T3 e T4) os percentuais de metáfases foram menores do que nos tratamentos sem sincronização (T1 e T2). Este efeito foi evidente após T3 seguido de 2h e 24h de recuperação de T4 seguido de 2h de recuperação de T4. No tratamento T3, os índices metafásicos foram 1,55X e 1,78X menores após 2h e 24h de recuperação, respectivamente. Após T4, foi observada uma diminuição de 1,28X após 2h de recuperação (T1 e T2) (Tabela 2).

Os percentuais de alterações após exposição aos tratamentos com colchicina são mostrados na Tabela 3. Todos os tratamentos induziram aumentos significativos nos percentuais de alterações cromossômicas, exceto o tratamento com colchicina 0,2% por 2h de exposição (T1) após 16h de recuperação. Em média o tratamento com colchicina 0,2% por 2h (T1) aumentou em 7,42X o percentual de alterações cromossômicas em relação ao controle. Este valor foi de 13,09X, 52,49X e 43,83X respectivamente para os tratamentos T2, T3 e T4 (Tabela 3).

Na Tabela 4 é possível observar o percentual total de c-metáfases após os tratamentos com colchicina. Todos os tratamentos induziram aumentos significativos nestes percentuais, exceto o tratamento com colchicina 0,2% por 2h de exposição (T1) após 2h e 4h de recuperação. Assim como foi observado para o percentual total de alterações, os tratamentos com sincronização (T3 e T4) apresentaram um efeito maior do que os tratamentos T1 e T2 (sem sincronização) (Tabela 4). O tratamento T3 induziu em média um aumento de 69,74X nos percentuais de c-metáfase. Em comparação com o tratamento T1, que apresenta a mesma concentração de colchicina (0,2%), este aumento foi de apenas 12,42X. Já o tratamento T4

apresentou um aumento médio de 28,29X em contraposição ao tratamento T2 com a mesma concentração de colchicina (0,02%), cujo aumento médio foi de 7,91X (Tabela 4).

Imagens representativas de algumas das alterações observadas são demonstradas na Figura 2.

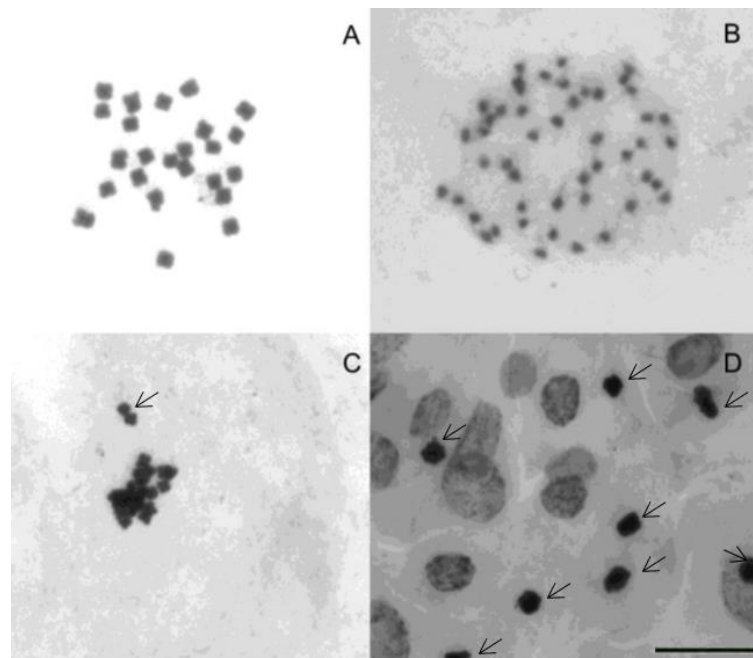


Figura 2. Alterações cromossômicas observadas após a exposição de meristemas radiculares de *S. melonena* à colchicina. (A) c-metáfase; (B) metáfase duplicada ( $2n=48$ ); (C) metáfase com perda cromossômica; (D) Presença de morte celular. As setas indicam as alterações. Barra =  $5\mu\text{m}$ .

Os percentuais de metáfases duplicadas após os tratamentos com colchicina são mostrados na Tabela 5. Os tratamentos sem sincronização não induziram o aparecimento de metáfases duplicadas nos tempos de recuperação avaliados, exceto o tratamento com colchicina 0,02% por 24h (T2) após 2h de recuperação. Já para os tratamentos com sincronização (T3 e T4) efeitos significativos foram observados após todos os tempos de recuperação (Tabela 5). O maior percentual de metáfases duplicadas (11,07%) foi observado após o tratamento T3 (HU + colchicina 0,2% por 2h) (Tabela 5).



Tabela 3. Percentual total de alterações em meristemas radiculares de *Solanum melongena* expostos aos tratamentos com colchicina, após períodos de recuperação.

Tratamentos	0h	2h	4h	8h	16h	24h	48h
Controle T1	4,12	3,29	4,46	4,95	8,57	5,21	2,27
Colch 0,2% 2h (T1)	17,61 <sup>a</sup>	39,30 <sup>a</sup>	45,52 <sup>a</sup>	20,96 <sup>a</sup>	13,19	13,51 <sup>a</sup>	25,73 <sup>a</sup>
Controle T2	1,70	1,19	3,36	2,03	1,62	2,02	3,86
Colch 0,02% 24h (T2)	46,50 <sup>a</sup>	14,14 <sup>a</sup>	29,10 <sup>a</sup>	20,79 <sup>a</sup>	19,03 <sup>a</sup>	36,89 <sup>a</sup>	13,98 <sup>a</sup>
Controle T3	0,41	0,32	0,11	0,44	0,41	0,29	0,31
HU* + Colch 0,2% 2h (T3)	17,62 <sup>aA</sup>	12,31 <sup>aA</sup>	13,20 <sup>a</sup>	16,59 <sup>a</sup>	14,59 <sup>a</sup>	12,05 <sup>a</sup>	15,87 <sup>a</sup>
Controle T4	0,23	0,19	0,43	0,46	0,42	0,48	0,51
HU* + Colch 0,02% 24h (T4)	14,01 <sup>a</sup>	14,00 <sup>a</sup>	13,42 <sup>a</sup>	15,39 <sup>a</sup>	19,37 <sup>a</sup>	17,49 <sup>a</sup>	12,77 <sup>a</sup>

Colch – Colchicina; \* - Tratamento com hidroxiureia 2mM por 18,5h seguido por 48h de recuperação em água destilada. <sup>a</sup> Média estatisticamente diferente do seu respectivo controle; ANOVA ( $p \leq 0,05$ ); <sup>A</sup>Média estatisticamente diferente quando comparada ao mesmo tratamento com colchicina no mesmo tempo de exposição (T1 comparado com T3; T2 comparado com T4).

Tabela 4. Percentual de c-metáfases em meristemas radiculares de *Solanum melongena* expostos aos tratamentos com colchicina, após períodos de recuperação.

Tratamentos	0h	2h	4h	8h	16h	24h	48h
Controle T1	1,21	3,63	6,99	3,04	4,39	2,49	1,80
Colch 0,2% 2h (T1)	14,33 <sup>a</sup>	3,40	3,65	23,8 <sup>a</sup>	36,27 <sup>a</sup>	64,54 <sup>a</sup>	14,95 <sup>a</sup>
Controle T2	5,38	7,01	2,65	2,27	0,85	1,96	1,84
Colch 0,02% 24h (T2)	19,34 <sup>a</sup>	53,43 <sup>a</sup>	17,7 <sup>a</sup>	15,76 <sup>a</sup>	6,77 <sup>a</sup>	21,08 <sup>a</sup>	20,34 <sup>a</sup>
Controle T3	0,17	0,36	0,66	0,37	0,57	0,68	0,97
HU* + Colch 0,2% 2h (T3)	25,88 <sup>a</sup>	36,37 <sup>aA</sup>	18,49 <sup>aA</sup>	45,53 <sup>a</sup>	18,32 <sup>a</sup>	18,59 <sup>aA</sup>	23,71 <sup>a</sup>
Controle T4	0,71	0,55	0,62	0,72	0,83	1,00	0,75
HU* + Colch 0,02% 24h (T4)	17,28 <sup>a</sup>	24,82 <sup>a</sup>	18,56 <sup>a</sup>	13,85 <sup>a</sup>	22,88 <sup>aA</sup>	21,94 <sup>a</sup>	22,47 <sup>a</sup>

Colch – Colchicina; \* - Tratamento com hidroxiureia 2mM por 18,5h seguido por 48h de recuperação em água destilada. <sup>a</sup> Média estatisticamente diferente do seu respectivo controle; ANOVA ( $p \leq 0,05$ ); <sup>A</sup>Média estatisticamente diferente quando comparada ao mesmo tratamento com colchicina no mesmo tempo de exposição (T1 comparado com T3; T2 comparado com T4).

Tabela 5. Percentual de metáfases duplicadas (2n=48) em meristemas radiculares de *Solanum melongena* expostos aos tratamentos com colchicina, após períodos de recuperação.

Tratamentos	0h	2h	4h	8h	16h	24h	48h
Controle T1	0,00	0,00	0,67	0,00	0,00	0,00	0,00
Colch 0,2% 2h (T1)	0,10	0,11	0,13	0,20	1,03	1,55	0,78
Controle T2	0,00	0,00	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00
Colch 0,02% 24h (T2)	0,87	1,86 <sup>a</sup>	0,22	2,51	0,00	0,30	2,81
Controle T3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
HU* + Colch 0,2% 2h (T3)	11,07 <sup>aA</sup>	9,54 <sup>aA</sup>	6,05 <sup>aA</sup>	3,68 <sup>aA</sup>	4,30 <sup>aA</sup>	8,06 <sup>aA</sup>	6,60 <sup>aA</sup>
Controle T4	0,06	0,00	0,07	0,04	0,06	0,06	0,11
HU* + Colch 0,02% 24h (T4)	2,36 <sup>a</sup>	1,35 <sup>a</sup>	2,71 <sup>aA</sup>	3,00 <sup>a</sup>	2,76 <sup>aA</sup>	2,35 <sup>aA</sup>	1,17 <sup>aA</sup>

Colch – Colchicina; \* - Tratamento com hidroxureia 2mM por 18,5h seguido por 48h de recuperação em água destilada. <sup>a</sup> Média estatisticamente diferente do seu respectivo controle; ANOVA ( $p \leq 0,05$ ); <sup>A</sup>Média estatisticamente diferente quando comparada ao mesmo tratamento com colchicina no mesmo tempo de exposição (T1 comparado com T3; T2 comparado com T4).

#### 4.1.2 Análise por citometria de fluxo

Um histograma típico dos controles apresentou  $5,66 \pm 0,56\%$  de partículas sub-G1,  $71,72 \pm 1,42\%$  de núcleos em G1,  $9,97 \pm 2,45\%$  de núcleos em S e  $12,44 \pm 1,83\%$  de núcleos em G2 (Figura 3). Nestes tratamentos não foram detectados eventos de poliploidização (2XG2).

Os resultados da análise por citometria de fluxo dos meristemas radiculares não sincronizados submetidos aos tratamentos com colchicina são mostrados na Tabela 6.

Tanto o tratamento T1 quanto o tratamento T2 induziram aumentos significativos nos percentuais de núcleos em S + G2 (Tabela 6) em comparação com os seus respectivos controles. De um modo geral, este efeito foi mais intenso no tratamento com colchicina 0,2% por 2h (T1). Eventos de poliploidização (observação de núcleos 2XG2) também foram observados após os dois tratamentos, sendo o maior percentual deste evento detectado após 24h de recuperação do tratamento T1 (colchicina 0,2% por 2h). Neste tempo de recuperação o percentual de núcleos poliploidizados foi de 7,23%. Um incremento estatisticamente significativo nos percentuais de partículas sub-G1 também foi observado para ambos os tratamentos (T1 e T2), em todos os períodos de exposição e recuperação (Tabela 6).

Os resultados da análise por citometria de fluxo de meristemas radiculares sincronizados com HU submetidos aos tratamentos com colchicina são mostrados na Tabela 7. Um histograma típico dos controles apresentou  $5,92 \pm 0,58\%$  de partículas sub-G1,  $72,73 \pm 1,10\%$  de núcleos em G1,  $10,10 \pm 1,01\%$  de núcleos em S e  $11,17 \pm 1,55\%$  de núcleos em G2. Nestes tratamentos não foram detectados eventos de poliploidização (2XG2). Alterações deste padrão foram detectadas após todos os tratamentos com colchicina investigados. Assim como já relatado para os meristemas não sincronizados, os dois tratamentos induziram aumentos significativos nos percentuais de núcleos em S + G2 e de partículas sub-G1. Núcleos poliploidizados também foram observados após exposição aos dois tratamentos com

colchicina, sendo o maior valor detectado após 48h de recuperação do tratamento com HU + colchicina 0,2% por 2h (T3) (9,10% de células poliploidizadas).

Histogramas representativos dos efeitos observados no ciclo celular de *S. melongena* após a exposição à colchicina são mostrados na Figura 3.

Tabela 6. Percentual de núcleos detectados em diferentes fases do ciclo celular (sub-G1, G1, S, G2 e 2xG2) após a exposição de meristemas radiculares de *Solanum melongena* não sincronizados à colchicina.

Tratamento	Tempo de recuperação	Sub-G1	G1	S	G2	2xG2
Controle T1	0h	5,43	72,34	11,91	10,32	ND
	2h	5,78	70,34	11,32	12,56	ND
	4h	5,78	71,28	10,59	12,36	ND
	8h	5,23	70,45	8,00	16,32	ND
	16h	6,72	72,37	8,25	12,67	ND
	24h	4,78	75,43	4,12	15,67	ND
	48h	4,89	73,45	8,41	13,25	ND
Colchicina 0,2% por 2h (T1)	0h	12,67 <sup>a</sup>	62,56 <sup>a</sup>	10,21	14,56	ND
	2h	15,67 <sup>a</sup>	58,53 <sup>a</sup>	11,23	14,57	ND
	4h	18,72 <sup>a</sup>	52,14 <sup>a</sup>	11,25	17,89 <sup>a</sup>	ND
	8h	17,32 <sup>a</sup>	51,00 <sup>a</sup>	11,34	17,89	2,45 <sup>a</sup>
	16h	17,89 <sup>a</sup>	47,28 <sup>a</sup>	10,34	19,82 <sup>a</sup>	4,67 <sup>a</sup>
	24h	17,88 <sup>a</sup>	44,65 <sup>a</sup>	10,56 <sup>a</sup>	19,68 <sup>a</sup>	7,23 <sup>a</sup>
	48h	17,54 <sup>a</sup>	45,54 <sup>a</sup>	10,11 <sup>a</sup>	19,80 <sup>a</sup>	7,01 <sup>a</sup>
Controle T2	0h	5,64	72,34	11,81	10,21	ND
	2h	5,78	71,24	11,53	11,45	ND
	4h	6,34	70,45	9,73	13,48	ND
	8h	5,89	70,78	10,77	12,56	ND
	16h	4,89	71,27	11,26	12,58	ND
	24h	6,11	72,34	10,32	11,23	ND
	48h	6,00	72,00	11,55	10,45	ND
Colchicina 0,02% por 24h (T2)	0h	21,23 <sup>a</sup>	52,19 <sup>a</sup>	11,24	15,34 <sup>a</sup>	ND
	2h	22,45 <sup>a</sup>	50,43 <sup>a</sup>	11,67	15,45 <sup>a</sup>	ND
	4h	22,67 <sup>a</sup>	50,56 <sup>a</sup>	12,45	14,32	ND
	8h	25,45 <sup>a</sup>	42,76 <sup>a</sup>	12,67	15,67 <sup>a</sup>	3,45 <sup>a</sup>
	16h	21,23 <sup>a</sup>	43,06 <sup>a</sup>	13,46	16,78 <sup>a</sup>	5,47 <sup>a</sup>
	24h	21,89 <sup>a</sup>	40,31 <sup>a</sup>	12,12	18,90 <sup>a</sup>	6,78 <sup>a</sup>
	48h	20,87 <sup>a</sup>	42,89 <sup>a</sup>	12,01	17,89 <sup>a</sup>	6,34 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Média estatisticamente diferente do seu respectivo controle; ANOVA ( $p \leq 0,05$ ). ND = não detectado.

Tabela 7. Percentual de núcleos detectados em diferentes fases do ciclo celular (sub-G1, G1, S, G2 e 2xG2) após a exposição de meristemas radiculares de *Solanum melongena* sincronizados à colchicina.

Tratamento	Tempo de recuperação	Sub-G1	G1	S	G2	2xG2
Controle T3	0h	4,99	72,45	9,12	13,44	ND
	2h	5,87	73,45	9,32	11,36	ND
	4h	5,11	73,56	8,76	12,57	ND
	8h	6,12	74,56	9,10	10,22	ND
	16h	6,43	72,78	9,00	11,79	ND
	24h	5,67	73,56	9,56	11,21	ND
	48h	7,11	74,56	9,85	8,48	ND
HU* + Colchicina 0,2% por 2h (T3)	0h	16,78 <sup>a</sup>	55,22 <sup>a</sup>	12,34 <sup>a</sup>	15,66 <sup>a</sup>	ND
	2h	19,98 <sup>a</sup>	51,50 <sup>a</sup>	12,63 <sup>a</sup>	14,78 <sup>a</sup>	1,11 <sup>a</sup>
	4h	19,83 <sup>a</sup>	49,14 <sup>a</sup>	11,45 <sup>a</sup>	18,13 <sup>a</sup>	1,45 <sup>a</sup>
	8h	20,11 <sup>a</sup>	47,75 <sup>a</sup>	12,45 <sup>a</sup>	17,31 <sup>a</sup>	2,38 <sup>a</sup>
	16h	22,34 <sup>a</sup>	41,98 <sup>a</sup>	13,56 <sup>a</sup>	18,34 <sup>a</sup>	3,78 <sup>a</sup>
	24h	24,56 <sup>a</sup>	34,85 <sup>a</sup>	13,34 <sup>a</sup>	18,32 <sup>a</sup>	8,93 <sup>a</sup>
	48h	21,34 <sup>a</sup>	39,35 <sup>a</sup>	12,32 <sup>a</sup>	17,89 <sup>a</sup>	9,10 <sup>a</sup>
Controle T4	0h	5,34	71,64	10,34	12,68	ND
	2h	5,90	72,23	11,34	10,53	ND
	4h	6,11	71,56	10,11	12,22	ND
	8h	6,57	72,67	11,76	9,00	ND
	16h	6,33	73,45	11,36	8,86	ND
	24h	5,45	71,56	11,34	11,65	ND
	48h	5,99	71,11	10,45	12,45	ND
HU* + Colchicina 0,02% por 24h (T2)	0h	23,56 <sup>a</sup>	49,54 <sup>a</sup>	11,23	15,67 <sup>a</sup>	ND
	2h	25,78 <sup>a</sup>	46,23 <sup>a</sup>	12,56	15,43 <sup>a</sup>	ND
	4h	27,89 <sup>a</sup>	42,88 <sup>a</sup>	12,45 <sup>a</sup>	16,78 <sup>a</sup>	ND
	8h	28,78 <sup>a</sup>	42,34 <sup>a</sup>	12,67 <sup>a</sup>	13,67 <sup>a</sup>	2,34 <sup>a</sup>
	16h	28,65 <sup>a</sup>	40,55 <sup>a</sup>	13,46 <sup>a</sup>	14,67 <sup>a</sup>	2,67 <sup>a</sup>
	24h	29,90 <sup>a</sup>	35,42 <sup>a</sup>	12,12	17,89 <sup>a</sup>	4,67 <sup>a</sup>
	48h	28,45 <sup>a</sup>	37,65 <sup>a</sup>	12,01 <sup>a</sup>	16,78 <sup>a</sup>	5,11 <sup>a</sup>

\* Tratamento com hidroxiiureia 2mM por 18,5h seguido por 48h de recuperação em água destilada.

<sup>a</sup> Média estatisticamente diferente do seu respectivo controle; ANOVA ( $p \leq 0,05$ ).

ND = não detectado.

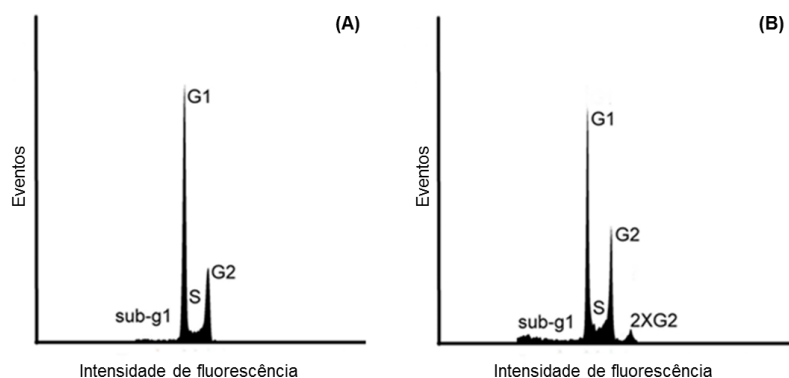


Figura 3. Histogramas representativos das avaliações por citometria de fluxo após exposição à colchicina. (A) Histograma representativo de um controle negativo. (B) Histograma representativo do efeito dos tratamentos. É possível observar o aumento do percentual de núcleos em S e G2 e de partículas sub-G1, além do aparecimento de núcleos poliploidizados (2xG2).

## 4.2 Indução de poliploidia *in vitro*

A tabela 8 mostra os resultados obtidos após a indução de poliploidia *in vitro* em sementes e segmentos nodais de berinjela com e sem a sincronização do ciclo celular. Após a manutenção das plantas *in vitro* por 40 dias, observou-se que todas as plantas controle se regeneraram com sucesso. Em relação aos explantes tratados com colchicina, foram observados elevados percentuais de sobrevivência tanto para sementes quanto para segmentos nodais, após todos os tratamentos. Estes percentuais variaram entre 60 e 85%, sendo o menor percentual observado após o tratamento T3 (colchicina 0,2% por 2h) em sementes sincronizadas e o maior após o tratamento T2 (colchicina 0,02% por 24h) em segmentos nodais não sincronizados.

A avaliação das plantas controle por citometria de fluxo confirmou que todas permaneceram diploides. Já para os explantes tratados com colchicina, foram observados indivíduos distribuídos em cinco categorias, de acordo com os níveis de ploidia. Foram encontrados principalmente diploides (2x), tetraploides (4x) e mixoploides com predominância de células 2x (2x + 4x). Foram observados ainda alguns indivíduos mixoploides (4x + 8x), mas com predominância de células tetraploides. Estes foram chamados de mixoploides 4x. Adicionalmente foi observado um indivíduo mixoploide (2x + 4x + 8x), com predominância de células octaploides, sendo este indivíduo chamado de mixoploide 8x (Tabela 8).

Plantas tetraploides foram obtidas após todos os tratamentos com colchicina, com percentuais variando entre 2,12 e 23,80%, sendo o maior percentual encontrado após o tratamento T4 (colchicina 0,02% por 24h) em segmentos nodais sincronizados por hidroxiureia (Tabela 8). Quando se analisa os explantes não sincronizados com HU, o tratamento com colchicina 0,2% por 2h (T1) induziu a poliploidização de 3 plantas obtidas do experimento com sementes (7,5% das plantas sobreviventes) e 1 planta obtida do experimento com segmentos nodais (2,12% das sobreviventes). A média destes dois valores é 4,81% das plantas sobreviventes. Este mesmo valor para o tratamento T2 (colchicina 0,02% por 24h) foi de 8,58% das plantas sobreviventes, ou seja, um incremento de 78,37% no

percentual de plantas poliplóides obtidas. Esta mesma observação é válida para os explantes previamente tratados com HU. Neste caso, o tratamento com colchicina 0,2% por 2h (T3) induziu, em média, 18,60% de plantas poliploides, contra 20,99% do tratamento com colchicina 0,02% por 24h (T4), representando um incremento de 12,84%.

A presença de mixoploidia ( $2x + 4x$ ) também foi recorrente em todos os tratamentos com colchicina, sendo observada com maior frequência após o tratamento T1 (colchicina 0,2% por 2h) em segmentos nodais não sincronizados (63,82%) e com menor frequência após o mesmo tratamento T1 em sementes não sincronizadas (7,5%). Plantas mixoploides  $4x + 8x$  foram encontradas apenas em sementes sincronizadas após o tratamento T3 (8,33%) e em segmentos nodais também sincronizados, tanto após T3 (4,44%) quanto após T4 (2,38%). O único indivíduo com predominância de núcleos octaploides (mixoploide  $8x$ ) foi observado após T3, em sementes sincronizadas (Tabela 8).

De todos os explantes tratados, foram regeneradas 342 plantas com sucesso, sendo 157 provenientes de sementes e 185 de segmentos nodais. Os percentuais de plantas regeneradas em cada nível de ploidia podem ser observados na Figura 4. No total, foram obtidas 45 plantas tetraploides (13,15%), 83 mixoploides  $2x + 4x$  (24,26%), 6 mixoploides  $4x + 8x$  (1,75%), e 1 mixoploide  $2x + 4x + 8x$  (0,29%).

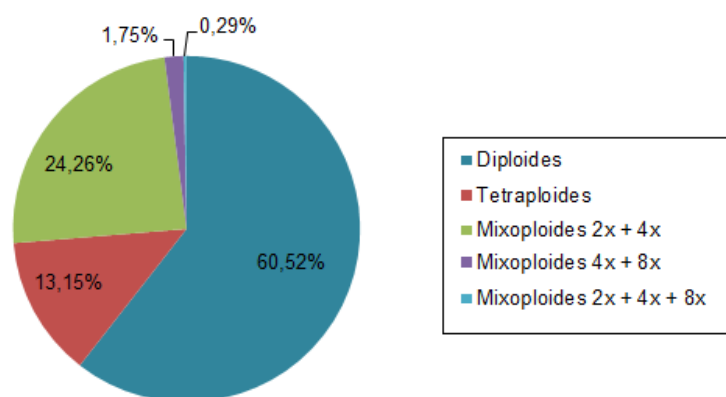


Figura 4. Distribuição dos explantes regenerados entre os diferentes níveis de ploidia após a indução de poliploidia *in vitro* em sementes e segmentos nodais de *Solanum melongena*.

As plantas regeneradas após os experimentos estão sendo mantidas em sala de cultivo com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16h e intensidade luminosa de  $40 \mu\text{moles.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas. Histogramas representativos de todos os níveis de ploidia obtidos após os tratamentos com colchicina podem ser observados na Figura 5.

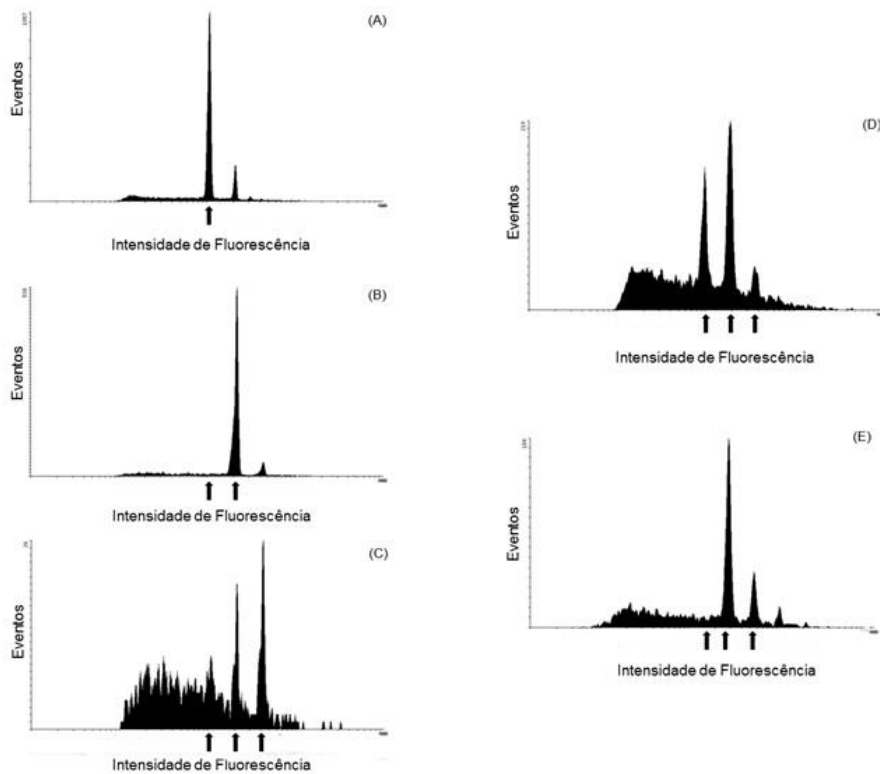


Figura 5. Histogramas representativos dos níveis de ploidia observados após os experimentos de indução de poliploidia com colchicina. (A) Indivíduo diploide ( $2x$ ), (B) tetraploide ( $4x$ ); (C) mixoplóide com células octaploides ( $2x + 4x + 8x$ ). (D) mixoploide  $2x (2x + 4x)$  e (E) mixoploide  $4x (4x + 8x)$ .



Tabela 8. Percentual de sobrevivência e avaliação dos níveis de ploidia, por citometria de fluxo, em *Solanum melongena* após tratamentos com colchicina em explantes sincronizados e não sincronizados.

Explantes	Tratamento	Explantes tratados	Sobrevivência	Diploides (2x)	Tetraploides (4x)	Mixoploides 2x (2x + 4x)	Mixoploides 4x (4x + 8x)	Mixoploide 8x (2x + 4x+ 8x)
Sementes não sincronizadas	T1	60	40 (66,66%)	34 (85,00%)	3 (7,5%)	3 (7,5%)	-	-
	T2	60	37 (61,66%)	30 (81,08%)	2 (5,40%)	5 (13,51%)	-	-
Sementes sincronizadas com HU*	T3	60	36 (60,00%)	21 (58,33%)	7 (19,44%)	4 (11,11%)	3 (8,33%)	1 (2,77%)
	T4	60	44 (73,33%)	26 (59,09%)	8 (18,18%)	10 (22,72%)	-	-
Segmentos nodais não sincronizados	T1	60	47 (78,33%)	16 (34,04%)	1 (2,12%)	30 (63,82%)	-	-
	T2	60	51 (85,00%)	35 (68,62%)	6 (11,76%)	10 (19,60%)	-	-
Segmentos nodais sincronizados com HU*	T3	60	45 (75,00%)	25 (55,55%)	8 (17,77%)	10 (22,22%)	2 (4,44%)	-
	T4	60	42 (70,00%)	20 (47,61%)	10 (23,80%)	11 (26,19%)	1 (2,38%)	-

\* Tratamento com hidroxiuréia (HU) 2mM por 18,5h seguido por 48h de recuperação em água destilada; T1 – Colchicina 0,2% por 2h; T2 – Colchicina 0,02% por 24h; T3 – Colchicina 0,2% por 2h; T4 – Colchicina 0,02% por 24h. Cada tratamento foi acompanhado por um controle negativo, no qual os explantes foram inoculados em meio MS básico.

## 5 DISCUSSÃO

A colchicina é um dos agentes despolimerizantes de microtúbulos mais empregados para bloquear células em metáfase e para induzir poliploidia em espécies vegetais. Apesar de fornecer resultados positivos no que se refere à duplicação cromossômica, é altamente tóxica para o ser humano, além de ser fitotóxica e induzir altas taxas de mixoploidia nas plantas regeneradas em estudos de duplicação (VAN DUREN et al., 1996; GANGA; CHEZHIYAN, 2002; YEMETS; BLUME, 2008). Dentre os efeitos já relatados para seu uso, pode-se citar também a esterilidade, o crescimento anormal, perdas cromossômicas e mutações gênicas (LUCKETT, 1989; DHOOGHE et al., 2011).

Os mecanismos responsáveis pela ação da colchicina sobre as células ainda não foram totalmente elucidados, o que se deve principalmente à carência de trabalhos que investiguem os aspectos básicos do efeito de antimitóticos. Observa-se na literatura uma ampla variação nas concentrações e tempos de exposição à colchicina empregados (DHOOGHE et al., 2011), mas poucos trabalhos tiveram o objetivo de entender como essa variação pode influenciar a eficiência do processo de indução de poliploidia. Caperta et al. (2006) apresentaram um interessante trabalho neste sentido, no qual os autores chamaram atenção para a relação tempo/concentração/eficiência que existe para os tratamentos com colchicina em experimentos de poliploidização.

Segundo trabalhos já citados por Caperta et al. (2006), curtos tempos de exposição à altas concentrações de colchicina resultam na formação de novos rearranjos de tubulina, apesar do processo de despolimerização dos microtúbulos (UTRILLA et al., 1989; APOSTOLAKOS et al., 1990; KARAGIANNIDOU et al., 1995). Os autores sugerem então que a não formação do fuso mitótico apenas não é suficiente para a indução de células poliploides e que é necessária a formação de estruturas alternativas de microtúbulos para o sucesso na indução de duplicação cromossômica (CAPERTA et al., 2006).

Utilizando como modelo *Secale cereale*, Caperta et al. (2006) avaliaram duas concentrações de colchicina, uma considerada baixa (0,5mM) e outra considerada alta (5mM). Os resultados mostraram que a baixa concentração induziu a despolimerização dos microtúbulos em todas as fases da divisão celular, enquanto a alta concentração foi capaz de induzir a polimerização de novas estruturas contendo tubulina em c-metáfases. Adicionalmente, os resultados demonstraram que somente a maior concentração foi capaz de induzir a formação de células poliploides. Os autores afirmam ainda que a baixa concentração induz o aparecimento de muitas alterações cromossômicas/celulares, o que apresenta um efeito nocivo à viabilidade celular após certo tempo de recuperação (CAPERTA et al., 2006).

O presente trabalho teve como objetivo auxiliar no entendimento do processo de duplicação cromossômica em si e também dos efeitos da colchicina sobre o ciclo celular, empregando *Solanum melongena* L (berinjela) como modelo de estudo. Considerando as contribuições do trabalho de Caperta et al. (2006) em relação a este assunto, seu trabalho serviu como um modelo para as estratégias aqui estudadas. Foram utilizadas as concentrações de 0,02% e 0,2% de colchicina, que representam as mesmas concentrações utilizadas por Caperta et al. (2006). Em adição à análise da resposta celular aos tratamentos com colchicina, o presente trabalho teve como objetivo testar o real efeito das diferentes concentrações de colchicina na indução de plantas poliploides *in vitro*. De forma pioneira, também foi utilizada a sincronização do ciclo celular com hidrox ureia, na tentativa de aumentar a eficiência do processo de poliploidia. A análise dos resultados mostrou que alguns aspectos aqui observados corroboram as conclusões de Caperta et al. (2006) e outros não.

As diferenças no índice mitótico (IM), nos índices de fases e nos percentuais de alterações cromossômicas são frequentemente empregadas para avaliar a citogenotoxicidade de substâncias (GOMES et al., 2015; RAJESHWARI et al., 2015; CVJETKO et al., 2017). Essa estratégia demonstra-se útil na investigação da ação de sincronizadores/antimitóticos sobre células modelo. Neste trabalho, o modelo de

células meristemáticas de *S. melongena* L. foi utilizado para a avaliação dos efeitos da exposição aos diferentes tratamentos com hidroxureia (HU)/colchicina.

Os resultados aqui obtidos não evidenciaram, em geral, diferenças em relação ao IM após os tratamentos com colchicina, embora a maior concentração (0,2%) tenha sido capaz de aumentar o IM por duas vezes nos tratamentos investigados. Nestes casos, o aumento do percentual de células em divisão poderia ser explicado por uma interrupção do ciclo celular em uma das fases da divisão celular (SINGH, 2003). A capacidade da colchicina de alterar o ciclo normal da mitose foi primeiramente descrita em 1905 (DIXON, 1905; LEVAN, 1938) e anos mais tarde estudos levantaram a hipótese de que a substância era capaz de aumentar o número de células em divisão (DUSTIN, 1934; LITS, 1934). No entanto, em 1936, Ludford concluiu que, na maioria dos casos, a colchicina aumenta o número de células em metáfase, graças a um bloqueio nesta fase, inicialmente chamado de atraso. Em seu trabalho, utilizando células animais, o pesquisador atribuiu a ação da colchicina a problemas na formação e no funcionamento do fuso mitótico (LUDFORD, 1936).

O primeiro estudo acerca da ação da colchicina em células vegetais foi realizado em 1938 em *Tradescantia* e, neste caso, os autores também sugeriram a ação sobre os microtúbulos (NEBEL e RUTTLE, 1938). Desde então, o acúmulo de células em metáfase pela colchicina vem sendo descrito para outras espécies, como feijão (EVANS; NEARY; TONKINSON, 1959), trigo (BURGESS e NORTHCOTE, 1969) e cebola (LEVAN, 1938). Dessa forma, é possível supor, como um efeito provável da colchicina, a interrupção do ciclo celular em metáfase, através da despolimerização dos microtúbulos.

A análise do índice metafásico em meristemas de berinjela mostrou que a maior concentração de colchicina aqui investigada (0,2%) foi a mais eficiente no bloqueio em metáfases. Entretanto, a menor concentração (0,02%) também apresentou este efeito. Estes resultados corroboram o que foi observado por Caperta et al. (2006), no sentido de que tanto concentrações baixas quanto altas de

colchicina são capazes de bloquear o ciclo celular na fase de metáfase. Esta observação é confirmada ainda pelos resultados da análise de c-metáfases.

A presença de c-metáfases foi relatada após exposição às duas concentrações de colchicina aqui analisadas. No entanto, conforme já descrito anteriormente para o índice metafásico, a maior concentração (0,2%) também apresentou um efeito mais evidente, uma vez que os percentuais de c-metáfases foram maiores após o tratamento com colchicina 0,2%. Pouco se conhece sobre como este bloqueio em metáfase é capaz de induzir a formação de células poliploides. A hipótese mais aceita é a de que a inibição da formação do fuso mitótico induz a formação de células poliploides devido à ausência de segregação normal das cromátides. Com a não segregação das cromátides para os polos, elas eventualmente tornam-se incorporadas em uma nova membrana nuclear e a célula progride para a interfase com o dobro do número de cromossomos (HAGUE e JONES, 1987). Embora esta hipótese seja atrativa, os mecanismos por trás do processo de poliploidização ainda não foram completamente elucidados. Conforme já relatado, Caperta et al., (2006) levantaram a hipótese de que o bloqueio em metáfase por si só pode não ser suficiente para a formação de células poliploides.

Nos resultados aqui obtidos, a análise dos tempos de recuperação após os tratamentos com colchicina em meristemas não sincronizados não revelaram o efeito esperado de aparecimento de células poliploides com grande frequência. Apenas a menor concentração de colchicina (0,02%) foi capaz de induzir um efeito significativo no aparecimento de células poliploides após 2h de recuperação do tratamento. Estes resultados não confirmaram o que foi observado pelo trabalho de Caperta et al. (2006) que também analisou células não sincronizadas e que relatou o aparecimento de células poliploidizadas somente após o tratamento com a maior concentração. No entanto, os percentuais de metáfases duplicadas após o tratamento com as concentrações de colchicina em meristemas previamente tratados com hidroxiureia (HU) demonstrou um elevado percentual de células poliploidizadas. Este efeito foi bem mais evidente após o tratamento com a maior concentração de colchicina (0,2%), chegando a 11,07% de células com o

complemento cromossômico duplicado após o tratamento (0h de recuperação). Mais uma vez, os resultados demonstram uma provável relação entre a utilização de altas concentrações e baixos tempos de exposição e a maior eficiência no processo de indução de células duplicadas, como relatado por Caperta et al. (2006). Entretanto, diferentemente do que estes autores relataram, o emprego de baixas concentrações com tempos de exposição altos também pode induzir o aparecimento de células poliploides, porém com uma menor eficiência.

Em relação às alterações cromossômicas, os tratamentos com colchicina induziram principalmente alterações em metáfase, como a formação de aderência cromossômica e a perda de cromossomos. Anáfases com perda, morte celular e micronúcleos também foram encontrados. Embora c-metáfases e metáfases duplicadas possam ser tratadas como alterações cromossômicas relacionadas ao mau funcionamento do fuso mitótico, estas não foram incluídas nos resultados de alterações cromossômicas totais, sendo mostradas como variáveis separadas. Tal estratégia partiu do princípio de que estas configurações cromossômicas, embora possam constituir erros na segregação normal dos cromossomos, são necessárias para o sucesso do processo de poliploidização (CAPERTA et al., 2006).

Dessa forma, as demais alterações foram consideradas como anormalidades não essenciais ao processo de duplicação e que podem ainda atrapalhar o processo de indução de poliploidia. Todos os tratamentos investigados no presente trabalho foram capazes de induzir um aumento significativo dos percentuais de alterações cromossômicas, sendo que a avaliação de meristemas não sincronizados com HU tratados com a menor concentração de colchinha investigada (0,02%) apresentou um efeito maior na indução de alterações cromossômicas do que a maior concentração (0,2%).

A análise do ciclo celular e dos percentuais de células nas diferentes fases da divisão representa uma estratégia útil na elucidação dos processos envolvidos na indução de duplicação cromossômica. O ciclo celular é composto por quatro fases: G1, S, G2 e M. A citometria de fluxo representa uma ferramenta útil, permitindo a análise dos percentuais de células em cada uma dessas fases (DOLEZEL e

BARTOS, 2005). Os resultados da análise por citometria de fluxo evidenciaram aumentos nos percentuais de núcleos em S/G2 em praticamente quase todos os tratamentos, tanto em meristemas radiculares não sincronizados como naqueles sincronizados com HU. No que se refere ao processo de indução de poliploidia, todos os tratamentos investigados foram eficientes na indução de núcleos poliploidizados. Esta observação é válida tanto para meristemas não sincronizados quanto para meristemas sincronizados com HU.

Os maiores percentuais de núcleos poliploides (7,01% em meristemas não sincronizados e 9,10% em meristemas sincronizados) foram obtidos após o tratamento com a maior concentração de colchicina (0,2%). Novamente, este resultado demonstra uma provável maior eficiência da maior concentração de colchicina na indução de poliploidia, assim como relatado no trabalho de Caperta et al. (2006). No entanto, vale a pena ressaltar que, diferentemente do que estes autores afirmaram, a menor concentração também foi eficiente na indução de poliploidia.

Outro aspecto a ser explorado nos resultados de citometria refere-se à formação de partículas sub-G1. No processo de morte celular, a degradação celular e nuclear gera subprodutos celulares que também são corados no procedimento para análise por citometria de fluxo e são eventualmente identificados e quantificados pelo citômetro. Todos estes subprodutos podem ser entendidos num sentido restrito das palavras como um *lixo* ou *debritos* do processo de morte celular (*debris*) e são chamamos de partículas sub-G1 (pois geralmente apresentam intensidade de fluorescência abaixo de G1) ou de resíduo na análise. O aumento do percentual dessas partículas pode representar indiretamente um aumento nos percentuais de indução de morte celular (LIU et al., 2016).

Após todos os tratamentos com colchicina investigados por citometria de fluxo, tanto em meristemas sincronizados como não sincronizados, os percentuais de partículas sub-G1 foram maiores do que nos controles. Além disso, os percentuais mais elevados de partículas sub-G1 foram observados após exposição à menor concentração de colchicina (0,02%). Este resultado está em concordância

com o observado após a análise microscópica das lâminas de regiões meristemáticas de *S. melongena*, onde foi observada morte celular após as duas concentrações de colchicina avaliadas.

Os resultados de percentuais de partículas sub-G1, somados aos resultados de frequência de alterações cromossômicas, representam um aspecto importante a ser discutido com relação à eficiência do processo de poliploidização. Como discutido anteriormente, Caperta et al. (2006) associam a exposição por longos períodos a baixas concentrações de colchicina com a indução de anormalidades celulares/cromossômicas. Segundo estes autores, estes tratamentos induziriam a formação de um grande número de anormalidades que estariam associadas a comprometimentos da viabilidade celular.

Os resultados discutidos no presente trabalho demonstraram que a formação de alterações celulares/cromossômicas não está associada apenas à menor concentração de colchicina (0,02%), mas também à maior concentração (0,2%). As duas concentrações foram capazes de induzir a formação de alterações analisadas por citogenética e também o aumento de partículas sub-G1, associadas a eventos de morte celular (analisadas por citometria de fluxo). Entretanto, é possível perceber que para as duas variáveis analisadas (alterações citogenéticas e percentual de partículas sub-G1), a menor concentração de colchicina (0,02%) apresentou um efeito mais evidente, corroborando mais uma vez a hipótese levantada por Caperta et al. (2006).

É possível observar, portanto, nos resultados até aqui discutidos uma provável maior eficiência da alta concentração de colchicina na indução de poliploidia. Diversas são as observações que suportam essa hipótese, tais como: por dois tempos de recuperação a maior concentração de colchicina foi capaz de induzir um aumento no percentual de células em divisão; foi também mais eficiente na indução de um aumento do índice metafásico e do percentual de c-metáfases; e através da análise por citometria de fluxo, os tratamentos com a maior concentração de colchicina também induziram efeitos mais significativos com relação ao aparecimento de células poliploidizadas. Entretanto, diferente do que foi apontado



por Caperta et al. (2006) a baixa concentração de colchicina também apresentou resultados positivos na indução de poliploidia pelas variáveis analisadas até aqui.

Somando esforços no sentido de contribuir para o entendimento do processo de poliploidização, foram conduzidos também experimentos de indução de poliploidia *in vitro* em sementes e segmentos nodais de *S. melongena* L. Resultados satisfatórios em estudos de duplicação já foram relatados para muitas espécies vegetais, como é o caso de *Siphonochilus aethiopicus* (HANNWEG; STEYN; BERTLING, 2016), *Lilium leichtlinii* (HEO et al., 2016), *Eucommia ulmoides* (TOKUMOTO et al., 2016), *Phalaenopsis amabilis* (AZMI et al., 2016), *Trollius chinensis* (ZHANG et al., 2016), *Bacopa monnieri* (KHARDE et al., 2017), *Lolium multiflorum* (PEREIRA et al., 2017), *Kaempferia rotunda* (SOONTHORNKALUMP et al., 2017), *Petunia hybrida* (REGALADO et al., 2017) e *Avena sativa* (MORIKAWA, 2017).

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que a colchicina foi eficiente na indução de poliploides de berinjela e que o protocolo de indução empregado foi bem sucedido tanto em sementes quanto em segmentos nodais.

A sobrevivência e a regeneração dos explantes é uma etapa extremamente importante para o sucesso de um protocolo de indução. De forma geral, a literatura mostra percentuais de regeneração menores do que os aqui encontrados para muitas espécies, quando se compara resultados obtidos com as mesmas concentrações. Em um estudo de duplicação em *Citrus reticulata*, por exemplo, foram observados percentuais de sobrevivência de 54,42%, 52,25% e 37% após o tratamento de sementes com 0,2% de colchicina pelos períodos de 12h, 24h e 48h, respectivamente (ELYAZID e EL-SHEREIF, 2014). Essa mesma concentração de colchicina levou a percentuais de regeneração de 60% (24h), 56,70% (48h) e 43,30% (72h) após o tratamento de sementes de *Salvia leriifolia* (ESTAJI et al., 2017). A indução de poliploidia em *Dendrobium chrysotoxum*, por sua vez, permitiu a regeneração de apenas 35% dos explantes após o tratamento com 0,02% de colchicina por quatro dias (ATICHART, 2013). Em *Solanum lycopersicum* (tomate) a concentração de colchicina 0,02% foi letal para todos os explantes tratados,

enquanto a concentração 0,06% permitiu 41,66% de sobrevivência (COLA et al., 2014).

As baixas taxas de sobrevivência após a exposição à colchicina ou a outros agentes poliploidizantes devem-se à toxicidade destas substâncias sobre as células vegetais. Geralmente, concentrações mais elevadas são letais, impedindo ou diminuindo as taxas de regeneração *in vitro* (LUCKETT, 1989; DHOOGHE et al., 2011; ATICHART, 2013). Os resultados obtidos com berinjela após a exposição às duas concentrações aqui testadas resultaram em elevados percentuais de regeneração, sendo a média de sobrevivência dos explantes igual a 71,25%. Além disso, foi observado percentual de sobrevivência de até 85% após o tratamento com a menor concentração (segmentos nodais não sincronizados, tratados com 0,02% por 24h). Estes resultados mostram que a espécie *S. melongena* apresenta boa capacidade de regeneração após os tratamentos com colchicina, mesmo quando submetida à maior concentração.

Em relação à eficiência do protocolo de indução de poliploidia, nota-se que em explantes não sincronizados (sementes e segmentos nodais) todos os tratamentos investigados foram capazes de induzir a recuperação de plantas poliploides. Não foram observadas grandes diferenças de eficiência entre as concentrações em sementes. Já em segmentos nodais, foi observado maior percentual de plantas poliploides após o tratamento com a menor concentração de colchicina (0,02%). Neste tratamento, 11,76% das plantas recuperadas eram poliploides. A maior eficiência de indução com a menor concentração de colchicina representou uma contradição em relação a provável maior eficiência esperada após o tratamento com a maior concentração (CAPERTA et al., 2006). Entretanto, a presença de plantas mixoploides foi um aspecto marcante nos resultados e também precisa ser considerada na discussão acerca da eficiência da duplicação cromossômica.

Conforme já citado, a literatura mostra que doses mais elevadas de colchicina geralmente apresentam maiores taxas de poliploidização, ao passo que doses menores são menos eficientes e ainda podem causar alterações (DHOOGHE et al.,

2011). Em um estudo com sementes de *Citrus reticulata*, por exemplo, foram testadas quatro diferentes concentrações de colchicina (0,01%, 0,05%, 0,1% e 0,2%). A análise por citometria de fluxo mostrou maiores percentuais de poliploidização após os tratamentos com 0,1% e 0,2% pelo período de 12h, sendo observados 33,78% após o tratamento com 0,1% e 30,90% após o tratamento com 0,2%. Neste mesmo trabalho, apenas 4,16% das plantas tratadas com a concentração 0,01% por 12h se regeneraram em poliploides (ELYAZID e EL-SHEREIF, 2014). Em *Mitracarpus hirtus*, foram testadas as concentrações 0,01% e 0,1% e, neste caso, apenas a maior concentração foi capaz de induzir poliploidia, com eficiência de 4,08% (PANSUKSAN et al., 2014).

A indução de tetraploides em *Trollius chinensis* com 0,05%, 0,1% e 0,2% de colchicina também resultou em maior eficiência após a maior concentração de colchicina pelo período de 12 horas, sendo observados 10,33% de plantas poliploides (ZHANG et al., 2016). Trabalhos de duplicação cromossômica que avaliaram a eficiência de concentrações baixas e concentrações altas de colchicina também já foram descritos para *Mitracarpus hirtus*, (PANSUKSAN et al., 2014), *Thymus persicus* (TAVAN; MIRJALILI; KARIMZADEH, 2015), *Phalaenopsis amabilis* (AZMI et al., 2016) e *Siphonochilus aethiopicus* (HANNWEG; STEYN; BERTLING, 2016), entre outros.

No presente trabalho, o cálculo da eficiência de poliploidização que levou à conclusão de maior eficiência da menor concentração de colchicina em segmentos nodais (11,76%) considerou apenas as plantas verdadeiramente poliploides, ou seja, aquelas que apresentaram exclusivamente células 4x. Se a presença de mixoploides for considerada também como um critério demonstrativo da eficiência do processo de indução de poliploidia, uma vez que elas também apresentam células poliploides, pode-se perceber uma grande eficiência da maior concentração de colchicina (0,2%) em segmentos nodais. Neste tratamento, 30 plantas foram consideradas mixoploides (portadoras também de células 4x), representando um total de 63,82% das plantas sobreviventes.

Plantas mixoploides são aquelas que apresentam células com mais de uma ploidia (SCHIFINO e FERNANDES, 1987; CHIANGMA et al., 2014). O alto percentual de plantas mixoploides aqui relatado indica que, mesmo quando os tratamentos com colchicina não foram suficientes para induzir a poliploidia, houve um efeito marcante da exposição ao antimitótico sobre as células de berinjela. A indução de mixoploides após tratamentos com altas concentrações de colchicina já foi relatada para diversas espécies, como em raízes de *Kaempferia rotunda* tratadas com 0,2% (SOONTHORNKALUMP et al., 2017), segmentos nodais de *Thymus persicus* tratados com 0,3% (TAVAN; MIRJALILI; KARIMZADEH, 2015) e brotos de *Cannabis sativa* tratados com 0,2% (BAGHERI e MANSOURI, 2015).

Diversas foram as observações indicando que a sincronização do ciclo celular pode representar uma ferramenta útil nos experimentos de indução de poliploidia *in vitro*. Através da análise dos efeitos de sincronizadores/antimitóticos sobre células meristemáticas de *S. melongena* aqui discutidas, foram observados aumentos nos percentuais de c-metáfases e células duplicadas após os tratamentos com HU. Em concordância com estes resultados, a citometria de fluxo também demonstrou percentuais maiores de núcleos poliploidizados após a sincronização do ciclo celular. Nos experimentos de indução de poliploidia *in vitro* os maiores percentuais de poliploides também foram observados quando os explantes foram previamente tratados com HU.

A análise dos dados como um todo mostrou que, em berinjela, as duas concentrações de colchicina foram capazes de induzir poliploidia *in vitro*, com uma tendência para maior eficiência da maior concentração (0,2%), principalmente se a indução de mixoploides for considerada como uma variável importante.

Em conjunto, os resultados obtidos pelos experimentos de citogenética, citometria e indução de poliploidia *in vitro* mostraram que a sincronização do ciclo celular com HU foi uma estratégia interessante para aumentar as taxas de poliploidização. Ainda que os resultados aqui encontrados sejam específicos para berinjela, espera-se que os dados acerca da eficiência das concentrações testadas e da possibilidade de utilizar a sincronização do ciclo celular para aumentar a

eficiência possam contribuir para o desenvolvimento de protocolos de duplicação para outras espécies vegetais. Além disso, as taxas de poliploidização alcançadas mostraram que o protocolo foi eficiente em berinjela, podendo ser empregado em estudos futuros com a espécie.

## 6 CONCLUSÕES

As duas concentrações de colchicina testadas não apresentaram efeitos significativos sobre o índice mitótico de *S. melongena*.

A menor concentração de colchicina (0,02%) induziu maiores percentuais de alterações cromossômicas em *S. melongena*.

Altas taxas de c-metáfases e metáfases duplicadas foram observadas, corroborando a ação da colchicina. Estes efeitos foram mais evidentes para a maior concentração de colchicina avaliada.

Todos os tratamentos foram capazes de induzir a poliploidia *in vitro*, mostrando eficiência das duas concentrações de colchicina. No entanto, os resultados mostram uma tendência para maior eficiência após o tratamento com a maior concentração.

A concentração 0,02% por 24h induziu maior número de tetraploides *in vitro*, mas os elevados percentuais de plantas mixoploides indicam a ação da colchicina sobre os explantes, mesmo quando o tratamento não foi suficiente para induzir a poliploidia.

A sincronização do ciclo celular com hidroxureia foi capaz de aumentar a poliploidização tanto em meristemas radiculares avaliados por microscopia e citometria de fluxo quanto em sementes e segmentos nodais.

Os protocolos de indução de poliploidia *in vitro* testados foram eficientes para a duplicação de *Solanum melongena*.

A espécie *Solanum melongena* mostrou-se um bom modelo para o estudo do mecanismo de duplicação cromossômica em plantas.

## 7 REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. E.; WALTER, P. *Biologia Molecular da Célula*. Porto Alegre: Artmed, p. 1313-1362, 2004.
- ALLUM, J. F.; BRINGLOE, D. H.; ROBERTS, A. V. Chromosome doubling in a *Rosa rugosa* Thunb. hybrid by exposure of *in vitro* nodes to oryzalin: the effects of node length, oryzalin concentration and exposure time. *Plant Cell Reports*, v. 26, p. 1977-1984, 2007.
- ALVIM, L. B.; KUMMROW, F.; BEIJO, L. A.; LIMA, C. A. A.; BARBOSA, S. Evaluation of the cytogenotoxicity of textile effluents using *Allium cepa* L. *Revista ambiente e água*, v. 6, n. 2, p. 255-265, 2011.
- APOSTOLAKOS, P.; GALATIS, B.; GATSAROS, C.; SCHNEPF, E. Tubulin conformation in microtubule-free cells of *Vigna sinensis*: an immunofluorescent and electron microscopy study. *Protoplasma*, v. 154, 132-143, 1990.
- ATICHART, P. Polyploid induction by colchicine treatments and plant regeneration of *Dendrobium chrysotoxum*. *Thai Journal of Agricultural Science*, v. 46, n. 1, p. 59-63, 2013.
- AZMI, T. K. K.; SUKMA, D.; AZIZ, S. A.; SYUKUR, M. Polyploidy Induction of Moth Orchid (*Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume) by colchicine treatment on pollinated flowers. *Journal of Agricultural Sciences*, v. 11, n. 2, p. 62-73, 2016.
- BHAT, S. V.; JADHAV, A. S.; PAWAR, B. D.; KALE, A. A.; CHIMOTE, V. P.; PAWAR, S. V. *In vitro* shoot organogenesis and plantlet regeneration in brinjal (*Solanum melongena* L.). *The Bioscan*, v. 8, n. 3, p. 821-824, 2013.
- BAGHERI, M.; MANSOURI, H. Effect of induced polyploidy on some biochemical parameters in *Cannabis sativa* L. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 175, n. 5, p. 2366-2375, 2015.
- BONA, D. A. O.; KARSBURG, I. V.; GALLO, R. indução e identificação de poliploidia em *Hymenaea courbaril* L. var. *stilbocarpa* (Hayne) Lee et Lang. *Ciência Florestal*, v. 26, n. 4, p. 1331-1337, 2016.
- BURGESS, J.; NORTHCOTE, D. H. Action of colchicine and heavy water on the polymerization of microtubules in wheat root meristem. *Journal of cell science*, v. 5, n. 2, p. 433-451, 1969.
- CAPERTA, A. D.; DELGADO, M.; RESSUREIÇÃO, F.; MEISTER, A.; JONES, R. N.; VIEGAS, W.; HOUBEN, A. Colchicine-induced polyploidization depends on tubulin polymerization in c-metaphase cells. *Protoplasma*, v. 227, p. 147-153, 2006.

- CHIANGMAI, P. N.; POOTAENG-ON, Y.; MEETUM, P.; JANKOMON, N.; MUANGNOI, D.; KITTHIP, D. Mutation Induction in Physic Nut (*Jatropha curcas* L.) by colchicine treatments. *Silpakorn University Science and Technology Journal*, v. 8, n. 2, 28-39, 2014.
- COLA, G. P. A.; MARQUES, A. M.; DAMASCENO, S.; CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R. *In vitro* polyploidization in *Solanum lycopersicum* Mill. 'Santa Cruz Kada Gigante'. *Cytologia*, v. 79, n. 3, p. 351-358, 2014.
- CVJETKO, P.; MILOŠIĆ, A.; DOMIJAN, A. M.; VRČEK, I. V.; TOLIĆ, S.; ŠTEFANIĆ, P. P.; BALEN, B. Toxicity of silver ions and differently coated silver nanoparticles in *Allium cepa* roots. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 137, p. 18-28, 2017.
- DHOOGHE, E.; VAN LAERE, K.; EECKHAUT, T.; LEUS, L.; VAN, H. Mitotic chromosome doubling of plant tissues *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 104, p. 359-373, 2011.
- DIXON, W. E. A manual of pharmacology. London, 1905.
- DO AMARAL, C. M.; DOS SANTOS-SEREJO, J. A.; SILVA, S. O.; LEDO, C. A. S.; AMORIM, E.P. Agronomic characterization of autotetraploid banana plants derived from Pisang Lilin (AA) obtained through chromosome doubling. *Euphytica*, v. 202, p. 435-443, 2015.
- DOLEŽEL, J.; BARTOŠ, J. A. N. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany*, v. 95, n. 1, p. 99-110, 2005.
- DOLEŽEL, J. Flowstar: a microcomputer program for flow cytometric data manipulation and analysis. *Biologia*, v. 44, p. 287-291, 1989.
- DOLEŽEL, J.; MACAS, J.; LUCRETTI, S. Flow analysis and sorting of plant chromosomes. *Current Protocols in Cytometry*, v. 33, p. 3-5, 1999.
- DUSTIN, A. P. Action de la colchicine sup le sarcome greffé, type Crocker, de la Souris. *The Royal Belgium Academy of Science*, v. 14, p. 487-501, 1934.
- ELYAZID, D. M. A.; EL-SHEREIF, A. R. *In vitro* induction of polyploidy in *Citrus reticulata* Blanco. *American Journal of Plant Sciences*, v. 5, n. 11, p. 1679-1684, 2014.
- ESTAJI, A.; HOSSEINI, B.; RAVANDI, E. G.; DEHGHAN, E.; SEFIDKON, F. The effects of colchicine-induced autotetraploidy on selected characteristics of nuruozaq (*Salvia leriifolia*). *Cytology and Genetics*, v. 51, n. 1, p. 74-81, 2017.



- EVANS, H. J.; NEARY, G. J.; TONKINSON, S. M. The effect of oxygen on the induction by gamma radiation of mitotic delay in root tips of *Vicia faba*. *Experimental Cell Research*, v. 17, n. 1, p. 144-159, 1959.
- GANGA, M.; CHEZHIYAN, N. Influence of the antimitotic agentes colchicine and oryzalin on *in vitro* regeneration and chromosome doubling of diploid bananas (*Musa* spp.). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, v. 77, p. 572-575, 2002.
- GANTAIT, S.; MANDAL, N.; BHATTACHARYYA, S.; DAS, P. K. Induction and identification of tetraploids using *in vitro* colchicine treatment of *Gerbera jamesonii* Bolus cv. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 106, p. 485-493, 2001.
- GEORGE, R. Vegetable seed production. 2nd ed. CABI, Wallingford, United Kingdom, 328p, 2004.
- GOMES, J. V.; TEIXEIRA, J. T. D. S.; LIMA, V. M. D.; BORBA, H. R. Induction of cytotoxic and genotoxic effects of Guandu River waters in the *Allium cepa* system. *Revista Ambiente e Água*, v. 10, n. 1, p. 48-58, 2015.
- HAGUE, L. M.; JONES, R. N. Cytogenetics of *Lolium perenne*. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 74, n. 2, p. 233-241, 1987.
- HANNWEG, K.; STEYN, W.; BERTLING, I. *In vitro* induced tetraploids of *Plectranthus esculentus* are nematode-tolerant and have enhanced nutritional value. *Euphytica*, v. 207, n. 2, p. 343-351, 2016.
- HÄNTZSCHEL, K.R.; WEBER, G. Blockage of mitosis in maize root tips using colchicine-alternatives. *Protoplasma*, v. 241, p. 99-104, 2010.
- HEO, J. Y.; JEONG, S. H.; CHOI, H. R.; PARK, S. M. Polyploid production in *Lilium leichtlinii* var. *maximowiczii* using colchicine. *Journal of Animal and Plant Sciences*, v. 26, n. 4, 2016.
- JAMIL, M. D.; PARVAIZ, M.; TUFAIL, M.; ARSHAD, J.; HUSSAIN, S.; IMTIAZ, S. Callogenesis, regeneration of shoot and root of brinjal (*Solanum melongena* L.). *World Applied Sciences Journal* v. 26, n. 8, p. 1039-1045, 2013.
- KARAGIANNIDOU, T.; ELEFThERIOU, E. P.; TSEKOS, I.; GALATIS, B.; APOSTOLAKOS, P. Colchicine-induced paracrystals in root cells of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Annals of Botany*, v. 76, p. 23-30, 1995.
- KHARDE, A. V.; CHAVAN, N. S.; CHANDRE, M. A.; AUTADE, R. H.; KHETMALAS, M. B. *In vitro* enhancement of bacoside in brahmi (*Bacopa monnieri*) using colchicine. *Plant Biochemistry and Physiology Journal*, v. 5, n. 172, p. 1-12, 2017.

LEVAN, A. The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*. *Hereditas*, v. 24, n. 4, p. 471-486, 1938.

LITS, F. J. Contribution à l'étude des réactions cellulaires provoquées par la colchicine. *The Comptes Rendus Biologie*, v. 115, p. 1421-1426, 1934.

LIU, S.; ZHAO, Y.; CUI, H. F.; CAO, C. Y.; ZHANG, Y. B. 4-Terpineol exhibits potent *in vitro* and *in vivo* anticancer effects in Hep-G2 hepatocellular carcinoma cells by suppressing cell migration and inducing apoptosis and sub-G1 cell cycle arrest. *Journal of the Balkan Union of Oncology*, v. 21, n. 5, p. 1195-1202, 2016.

LUCKETT, D. J. Colchicine mutagenesis is associated with substantial heritable variation in cotton. *Euphytica*, v. 42, n. 1, p. 177-182, 1989.

LUDFORD, R. J. The action of toxic substances upon the division of normal and malignant cells *in vitro* and *in vivo*. *Arch Exp Zellforsch*, v. 18, n. 411, 1936.

MAGIOLI, C.; MANSUR, E. Eggplant (*Solanum melongena* L.): tissue culture, genetic transformation and use as an alternative model plant. *Acta Botanica Brasilica*, v. 19, p. 139-148, 2005.

MORIKAWA, T. Protocol for producing synthetic polyploid oats. *Oat: Methods and Protocols*, p. 43-52, 2017.

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

NEBEL, B. R.; RUTTLE, M. L.. The cytological and genetical significance of colchicine. *Journal of Heredity*, v. 29, n. 9, 1938.

PANSUKSAN, K.; SANGTHONG, R.; NAKAMURA, I.; MII, M.; SUPAIBULWATANA, K. Tetraploid induction of *Mitracarpus hirtus* L. by colchicine and its characterization including antibacterial activity. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 117, p. 381-391, 2014.

PEREIRA, R. C., SANTOS, N. D. S., BUSTAMANTE, F. D. O., MITTELMANN, A., TECHIO, V. H. Stability in chromosome number and DNA content in synthetic tetraploids of *Lolium multiflorum* after two generations of selection. *Ciência Rural*, v. 47, n. 2, 2017.

RAJESHWARI, A.; KAVITHA, S.; ALEX, S. A.; KUMAR, D.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N.; MUKHERJEE, A. Cytotoxicity of aluminum oxide nanoparticles on *Allium cepa* root tip - effects of oxidative stress generation and biouptake. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 22, n. 14, 11057-11066, 2015.

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

REGALADO, J. J.; CARMONA-MARTÍN, E.; QUEROL, V.; VELÉZ, C. G.; ENCINA, C. L.; PITTA-ALVAREZ, S. I. Production of compact petunias through polyploidization. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, p. 1-11, 2017.

SCHIFINO, M.T; FERNANDES, M.I.M. Induction of polyploidy and cytological characterization of autotetraploids of *Trifolium riograndense* Burkart (Leguminosae). *Euphytica*, v. 36, n. 863-872, 1987.

SINGH, A. C.; KUMAR, M.; JHA, A. M. Genotoxicity of lomefloxacin - an antibacterial drug in somatic and germ cells of Swiss albino mice in vivo. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 535, n. 1, p.35-42, 2003.

SOONTHORNKALUMP, S.; CHUENBOONNGARM, N.; JENJITTIKUL, T.; THAMMASIRI, K.; SOONTORNCHAINAKSAENG, P. Morphological and stomatal guard cell characteristics of *in vitro* *Kaempferia rotunda* L.(Zingiberaceae) through Colchicine Induced Polyploidy. *Agricultural Technology and Biological Sciences*, v. 14, n. 3, p. 235-242, 2017.

GUERRA, M.; SOUZA, M. Como observar os cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto: FUNPEC. 191p., 2002.

TAVAN, M.; MIRJALILI, M. H.; KARIMZADEH, G. *In vitro* polyploidy induction: changes in morphological, anatomical and phytochemical characteristics of *Thymus persicus* (Lamiaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 122, n. 3, p. 573-583, 2015.

TOKUMOTO, Y.; KAJIURA, H.; TAKENO, S.; HARADA, Y.; SUZUKI, N.; HOSAKA, T.; NAKAZAWA, Y. Induction of tetraploid hardy rubber tree, *Eucommia ulmoides*, and phenotypic differences from diploid. *Plant Biotechnology*, v. 33, n. 1, p. 51-57, 2016.

TORRES, G. A.; DAVIDE, L. C.; BEARZOTI, E. Synchronization of cell cycle in root meristem of baru (*Dipteryx alata* Vog.). *Ciência e Agrotecnologia*, v. 27, n. 2, p. 398-405, 2003.

UTRILLA, L.; SANS, J.; DE LA TORRE, C. Colchicine-resistant assembly of tubulin in plant mitosis. *Protoplasma*, v. 152, p. 101-108, 1989.

VANDUREN, M.; MORPURGO, R.; DOLEZEL, J.; AFZA, R. Induction and verification of autotetraploids in diploid banana (*Musa acuminata*) by *in vitro* techniques. *Euphytica*, v. 88, p. 25-34, 1996.

YEMETS, A. I.; BLUME, Y. B. Progress in plant polyploidization based on antimicrotubular drugs. *Open Horticulture Journal*, v. 1, p. 15-20, 2008.

ZAYOVA, E.; VASSILEVSKA-IVANOVA, R.; KRAPTCHEV, B.; STOEVA, D. Indirect shoot organogenesis of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Journal of Central European Agriculture*, v. 13, n. 3, p. 446-457, 2012.

ZHANG, Q.; ZHANG, F.; LI, B.; ZHANG, L.; SHI, H. Production of tetraploid plants of *Trollius chinensis* Bunge induced by colchicine. *Czech J. Genet. Plant Breed*, v. 52, n. 1, p. 34-38, 2016.