

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
CURSO DE MESTRADO**

**CULTIVO IN VITRO NA OBTENÇÃO DE PLANTAS DE CITROS
COM DIFERENTES NÍVEIS DE PLOIDIA**

Michelle dos Santos Oliveira

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
2024**

CULTIVO IN VITRO NA OBTENÇÃO DE PLANTAS DE CITROS COM DIFERENTES NÍVEIS DE PLOIDIA

Michelle dos Santos Oliveira

Engenheira Agrônoma
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2022.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Dr. Walter dos Santos Soares Filho

Coorientadora: Dra. Karen Cristina Fialho dos Santos

Coorientadora: Dra. Mariane de Jesus da Silva de Carvalho

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
2024**

FICHA CATALOGRÁFICA

O48c

Oliveira, Michelle dos Santos.

Cultivo *in vitro* na obtenção de plantas de citros com diferentes níveis de ploidia / Michelle dos Santos Oliveira. _ Cruz das Almas, Bahia, 2024.

98f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Walter dos Santos Soares Filho.

Coorientadora: Dra. Karen Cristina Fialho dos Santos.

Coorientadora: Dra. Mariane de Jesus da Silva de Carvalho.

1.Citros – Cultivo in vitro. 2.Citometria de fluxo – Análise.
I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 634.3

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
CURSO DE MESTRADO**

**CULTIVO IN VITRO NA OBTENÇÃO DE PLANTAS DE CITROS
COM DIFERENTES NÍVEIS DE PLOIDIA**

Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação de
Michelle dos Santos Oliveira

Aprovada em: 28 de outubro de 2024

Documento assinado digitalmente
 **WALTER DOS SANTOS SOARES FILHO**
Data: 30/10/2024 11:47:10-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Walter dos Santos Soares Filho -UFRB
(Orientador)

Documento assinado digitalmente
 **TAMYRES AMORIM REBOUCAS**
Data: 31/10/2024 08:35:37-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Tamyres Amorim Rebouças - Bolsista de Desenvolvimento Tecnológico
Industrial do CNPq - Nível A - Embrapa.
(Examinador Externo)

Documento assinado digitalmente
 **SILVOKLEIO DA COSTA SILVA**
Data: 29/10/2024 08:24:46-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Silvokleio da Costa Silva - Universidade Federal do Piauí (Examinador
Externo)

AGRADECIMENTOS

A Deus Pai, Filho e Espírito Santo, que sempre foi meu tudo quando não possuía nada.

Ao meu orientador, Dr. Walter dos Santos Soares Filho, expresso minha profunda gratidão pela oportunidade concedida, pelos ensinamentos valiosos, pela confiança depositada, pela presteza constante, pela orientação incansável e pelo apoio inestimável.

Ao pesquisador Orlando Sampaio Passos, pela significativa colaboração para o desenvolvimento da citricultura no Brasil.

Ao pesquisador Dr. Antônio da Silva Souza, sou grata por toda a orientação dedicada, pela paciência demonstrada e pelos conhecimentos preciosos transmitidos ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Às minhas co-orientadoras Dra. Karen Cristina Fialho dos Santos e Dra. Mariane de Jesus da Silva de Carvalho, agradeço pelas valiosas contribuições que enriqueceram este projeto.

À prof^a. Dra. Simone Alves Silva, pela assistência constante. A sua ajuda constante foi e tem sido extremamente valiosa.

À toda equipe do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura, expresso minha sincera gratidão pelas atitudes colaborativas essenciais, pelo constante aprendizado compartilhado e pela amizade construída ao longo desta jornada.

À minha família, que esteve ao meu lado durante toda a minha trajetória acadêmica, oferecendo-me aprovação incondicional, amor e incentivo. Em especial minha mãe Maria Lúcia e minha irmã Milena, que me estimulavam com palavras de cunho harmonioso e foram essenciais nos momentos de dúvidas onde pude alcançar novas direções.

Ao meu companheiro de todas as horas, João Roberto Pereira Oliveira, obrigada por compartilhar a vida comigo, por ser meu maior incentivo nos momentos de dúvida, meu incentivo nos momentos de incertezas, meu riso nos momentos de lágrimas e meu colo nos momentos de fragilidade. Obrigada por ter acreditado em mim quando nem eu mesma acreditava.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, pela possibilidade de execução deste trabalho.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

CULTIVO IN VITRO NA OBTENÇÃO DE PLANTAS DE CITROS COM DIFERENTES NÍVEIS DE PLOIDIA

Resumo:

A poliploidia artificial tem sido amplamente utilizada para melhorar o desempenho de diversas culturas, especialmente em plantas economicamente importantes. Nesta pesquisa, a produção de genótipos superiores por meio do método de indução de poliploidia de três espécies cítricas envolveu a cultura de tecidos de miniestacas de 'Fremont' (*Citrus clementina* x tangerineira 'Ponkan' *Citrus reticulata* Blanco), 'Dancy' (*Citrus tangerina*) e 'Clementina Honey' (*Citrus clementina*). As variáveis analisadas incluíram diferentes concentrações de colchicina (0 mg/L⁻¹; 500 mg/L⁻¹; 1000 mg/L⁻¹; 1500 mg/L⁻¹; 2000 mg/L⁻¹; 2500 mg/L⁻¹), avaliadas de forma independente para cada nível de tratamento e concentrações de orizalina (0 mg/L⁻¹, 5,1954 mg/L⁻¹, 10,3908 mg/L⁻¹, 15,5862 mg/L⁻¹, 20,7816 mg/L⁻¹, 25,977 mg/L⁻¹), que foram adicionadas ao meio WPM, e diferentes durações de exposição (24 e 48 horas). Para os tratamentos em miniestacas de Clementina 'Honey' e 'Dancy', a melhor indução de tetraploidia foi com 500 mg/L de colchicina em 24 e 48 horas. Para 'Fremont', a concentração mais eficaz foi 2500 mg/L em 24 horas. Com orizalina, as melhores concentrações foram 10,3908 mg/L para Clementina Honey, 25,977 mg/L para 'Dancy' e 20,7816 mg/L⁻¹ para 'Fremont', com 24 horas de exposição. A citometria de fluxo revelou quatro níveis de ploidia: diploide, mixoploide, tetraploide e haploide nos tratamentos em sementes. 'Fremont' teve a maior taxa de tetraploides (36%) com 1500 mg/L de colchicina após 24 horas. 'Dancy' e Clementina 'Honey' mostraram mais mixoploides (30,8% e 50%, respectivamente) com 1000 a 1500 mg/L de colchicina por 24 horas. A presença de haploides sugere apomixia ou partenogênese.

Palavras-chave: *Citrus*; poliploidia artificial; citometria de fluxo.

IN VITRO CULTIVATION FOR OBTAINING CITRUS PLANTS WITH DIFFERENT PLOIDY LEVELS

Abstract:

Artificial polyploidy has been widely employed to enhance the performance of various crops, especially economically significant plants. In this study, the production of superior genotypes through polyploidy induction was conducted in three citrus species using tissue culture of mini cuttings from 'Fremont' (*Citrus clementina* x 'Ponkan' tangerine *Citrus reticulata* Blanco), 'Dancy' (*Citrus tangerina*), and 'Clementina Honey' (*Citrus clementina*). The variables analyzed included different colchicine concentrations (0 mg/L⁻¹; 500 mg/L⁻¹; 1000 mg/L⁻¹; 1500 mg/L⁻¹; 2000 mg/L⁻¹; 2500 mg/L⁻¹), evaluated independently at each treatment level, and oryzalin concentrations (0 mg/L⁻¹, 5,1954 mg/L⁻¹, 10,3908 mg/L⁻¹, 15,5862 mg/L⁻¹, 20,7816 mg/L⁻¹, 25,977mg/L⁻¹), added to the WPM medium, with varying exposure durations (24 and 48 hours). For the mini cutting treatments of Clementina 'Honey' and 'Dancy,' the optimal induction of tetraploidy occurred at 500 mg/L⁻¹ of colchicine after 24 and 48 hours. For 'Fremont,' the most effective concentration was 2500 mg/L⁻¹ after 24 hours. With oryzalin, the best concentrations were 10.3908 mg/L⁻¹ for Clementina 'Honey,' 25.977 mg/L⁻¹ for 'Dancy,' and 20.7816 mg/L⁻¹ for 'Fremont,' all with 24 hours of exposure. Flow cytometry revealed four ploidy levels: diploid, mixoploid, tetraploid, and haploid in the seed treatments. 'Fremont' achieved the highest tetraploid rate (36%) with 1500 mg/L⁻¹ of colchicine after 24 hours. 'Dancy' and Clementina 'Honey' exhibited higher proportions of mixoploids (30.8% and 50%, respectively) at 1000–1500 mg/L⁻¹ of colchicine for 24 hours. The presence of haploids suggests occurrences of apomixis or parthenogenesis.

Keywords: Citrus; artificial polyploidy; flow cytometry.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
2.1 Melhoramento Genético de Citros.....	11
2.2 Cultivo In Vitro.....	12
2.3 Poliploidia	14
2.4 Indução Artificial de Poliploidia.....	15
2.4.1 Colchicina.....	16
2.4.2 Orizalina.....	17
2.5 Plantas Tetraploides de Citros.....	18
2.6 Plantas Triploides de Citros.....	20
2.7 Plantas Haploides de Citros.....	22
REFERÊNCIAS.....	24

CAPÍTULO 1

INDUÇÃO IN VITRO DE TETRAPLOIDIA NAS TANGERINEIRAS 'FREMONT' (<i>Citrus clementina</i> Hort. ex Tan. x <i>Citrus reticulata</i> Blanco), 'DANCY' (<i>Citrus tangerina</i> Hort. ex Tan.) E 'CLEMENTINA HONEY' (<i>Citrus clementina</i> Hort. ex Tan.)	37
---	-----------

INTRODUÇÃO.....	40
MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
Material vegetal.....	42
Avaliação de sobrevivência, crescimento de miniestacas e detecção do nível de ploidia.....	42
Delineamento experimental e análise estatística.....	43
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
Efeito da colchicina na sobrevivência e crescimento de miniestacas.....	44
Citometria de fluxo e Indução de poliploidia.....	49
Efeito da orizalina na sobrevivência e crescimento de miniestacas.....	52
Citometria de fluxo e eficiência de indução.....	59
CONCLUSÃO.....	62
REFERÊNCIAS.....	64

CAPÍTULO 2

INDUÇÃO DE TETRAPLOIDIA ATRAVÉS DE TRATAMENTOS IN VITRO COM COLCHICINA EM SEMENTES DE CITROS	70
INTRODUÇÃO.....	73
MATERIAIS E MÉTODOS.....	74
Material vegetal.....	74
Indução de poliploidia.....	74
Avaliação de sobrevivência e crescimento da planta.....	75

Detecção de poliploidia.....	75
Desenho experimental e análise estatística.....	76
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	77
Efeito da colchicina na sobrevivência e crescimento de miniestacas	77
Citometria de fluxo e Indução de poliploidia.....	84
Haploides.....	87
CONCLUSÃO.....	88
REFERÊNCIAS.....	90

1. INTRODUÇÃO

A produção de frutas cítricas engloba países com diferentes condições geográficas, sobressaindo-se China, Brasil, Índia, México e Espanha, que, juntos, formam o ranking de maiores produtores citros. Entre essas frutas, a laranja lidera a produção mundial, acompanhada da tangerina, limão e lima, respondendo a 76,4, 44,2 e 21,5 milhões de toneladas, respectivamente (FAO, 2022).

Na safra 2021/22, de acordo com informações publicadas pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2023), o Brasil liderou a produção mundial de laranja e de suco de laranja, sendo responsável por 33,9% da produção mundial da fruta e 67,8% do volume global de suco concentrado de laranja.

A citricultura brasileira é altamente centralizada na produção de laranja, sendo a produção de o total de 16.929.631 toneladas, em 568.132 hectares de área colhida. Desse total, 13.025.994 toneladas foram colhidas apenas no estado de São Paulo, que junto ao estado de Minas Gerais, formam o maior pólo citrícola do País, somando 83% da produção nacional da fruta (IBGE, 2022).

Apesar da liderança do Brasil na produção global de citros e na exportação de suco concentrado de laranja, sua participação no mercado mundial de frutas frescas ainda é limitada. Isso se deve ao fato de que o mercado de frutas frescas valoriza atributos visuais, como tamanho, cor, espessura da casca, menor quantidade ou ausência de sementes, além de uma proporção adequada entre açúcar e acidez total (CASTLE et al., 2010; CAPUTO et al., 2012). Essas características são cruciais para atender às exigências do mercado consumidor (CRUZ et al., 2023).

Diante disso, a utilização de variedades cítricas triploides pode aumentar significativamente a participação do Brasil no mercado global de frutas frescas, devido à sua ausência de sementes (LOURKISTI et al., 2021), atendendo à alta demanda dos consumidores por esse tipo de produto, com alto valor agregado (DALEL et al., 2020).

Ao criar estrategicamente híbridos triploides por meio de cruzamentos controlados, o Brasil pode otimizar a qualidade dos frutos, aumentar a competitividade do mercado e capitalizar as vantagens oferecidas por essas variedades (SANTIAGO et al., 2019; MAHMOUDI et al., 2020).

Os híbridos triploides de citros, decorrentes de cruzamentos entre parentais diploides e tetraploides, oferecem características desejáveis, como a escassez ou reduzido número de sementes (geralmente abortivas). Porém, a obtenção desses híbridos não é uma tarefa simples, devido à baixa frequência natural de triploidia (ESEN; SOOST, 1971; ESEN; SOOST, 1973; SANTIAGO, 2017).

Para superar essa adversidade, a indução da poliploidia via emprego de antimitóticos é uma estratégia crucial em programas de melhoramento genético de plantas, facilitando o rápido desenvolvimento de variedades triploides e ampliando a base genética para o melhoramento. Essa abordagem não apenas aprimora as características desejáveis, como também acelera a criação de novas linhagens (SHINDE et al., 2024).

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi de estabelecer um protocolo de duplicação cromossômica para diferentes genótipos de citros, a partir de diferentes explantes.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Melhoramento genético de citros

O programa de melhoramento de citros teve início no estado da Flórida em 1893, liderado por Swingle e Webber. Desde então, diversas iniciativas foram desenvolvidas globalmente nessa área (DAVIES; ALBRIGO, 1994), abrangendo duas categorias distintas: variedades copa e variedades porta-enxerto, cada uma com objetivos específicos (OLIVEIRA et al., 2014), como o aprimoramento de características como vigor, qualidade dos frutos e adaptabilidade a várias condições de solo e clima (GÓRA et al., 2021).

A citricultura no Brasil, enfrenta diversos desafios devido ao seu número limitado de variedades, tornando-a vulnerável a fatores fitossanitários (ANDRADE; ROCHA 2022), como Huanglongbing (HLB), Citrus tristeza virus (CTV), Cancro Cítrico e Clorose Variegada dos Citros (CVC), (LIMAYEM et al., 2024; SANTANA

et al., 2024).). Para resolver esta questão, os programas de melhoramento têm-se empenhado na diversificação de variedades de citros, tanto para a indústria como para o mercado de fruta fresca (KUPPER et al., 2022).

Nas últimas décadas, os esforços do melhoramento genético em citros se expandiram por meio da integração de ferramentas biotecnológicas com métodos clássicos de melhoramento, levando a avanços significativos no desenvolvimento de variedades cítricas com maior tolerância a estresses bióticos e abióticos, melhor qualidade dos frutos e maior resistência à doenças, cruciais para a adaptação às mudanças ambientais e aos desafios crescentes no cultivo de citros (CONTI et al., 2021; GAYLE et al., 2023).

As ferramentas de melhoramento genético de citros são categorizadas em métodos tradicionais e não tradicionais. As abordagens tradicionais incluem introdução, seleção e hibridização, enquanto os métodos não tradicionais abrangem a duplicação do conjunto cromossômico, produção de haploides e duplo-haploides (embriogênese somática), variação somaclonal, mutação e hibridização somática, transformação genética e edição de genes via CRISPR (GERMANÀ et al., 2020; RAMASAMY et al., 2023).

Ao integrar abordagens tradicionais e modernas de melhoramento genético, os melhoristas de citros podem enfrentar de forma mais eficaz as complexidades inerentes à biologia da espécie, como a longa fase de juvenilidade, alta heterozigosidade, incompatibilidade cruzada gametofítica, esterilidade masculina, apomixia, ausência de sementes e a necessidade de estabilidade das características sob diferentes condições ambientais. (OLLITRAULT et al., 2012; XU et al., 2013).

Os programas que visam desenvolver variedades sem sementes concentram-se principalmente em estratégias como induzir baixa viabilidade de pólen ou criar plantas triploides (GOTO et al., 2023; MONTALT et al., 2023). Embora os avanços biotecnológicos tenham facilitado a transformação genética e a hibridização somática no melhoramento de citros (ÇIMEN et al., 2022), os métodos tradicionais, como a hibridização natural, continuam cruciais para a recombinação genética e a introgressão em programas de melhoramento (LORA et al., 2022).

Neste contexto, técnicas de cultura de tecidos oferecem soluções alternativas para desafios inerentes aos programas de melhoramento

convencional (MUSTAFA et al., 2021), podendo ser utilizadas para múltiplos propósitos, como organogênese, micropropagação e conservação de germoplasma e transformação genética (CHAMANDOOSTI, 2017; 2020).

2.2 Cultivo in vitro

O cultivo de plantas in vitro envolve a manutenção da esterilidade e a regulação de fatores físicos e químicos para facilitar a regeneração e a multiplicação de plantas a partir de várias de suas partes, como brotos, meristemas apicais, embriões, secções de caule, pontas de raízes, anteras e protoplastos (MANMOHAN et al., 2022) em condições assépticas. Essas condições são essenciais para evitar contaminação e garantir o crescimento saudável do material vegetal in vitro (SHINDE et al., 2020).

O meio de cultura utilizado para o cultivo in vitro fornece os nutrientes e hormônios necessários para o desenvolvimento dos explantes. Além disso, o ambiente controlado nas instalações de cultura de tecidos otimiza as condições de crescimento, permitindo o máximo desenvolvimento vegetal (HASNAIN et al., 2022).

A técnica de cultura de tecidos vegetais tem sido fundamental no desenvolvimento de novas variedades de copa e porta-enxertos em plantas de citros, pois permite a produção de cópias exatas de plantas com características desejáveis, auxiliando na criação de espécies economicamente importantes e culturas com resistência a doenças, tolerância a estresses abióticos e melhor adaptação aos diferentes solos (SHINDE et al., 2020; SAMANTA; ROY, 2022).

Além disso, a cultura de tecidos vegetais desempenha um papel crucial na engenharia genética de plantas, pois impede a regeneração completa das plantas após a manipulação ou edição (JAISWAL et al., 2022). A obtenção de indivíduos poliploides também podem ser alcançados por meio da cultura de tecidos, conforme exposto nos estudos desenvolvidos por Silva; Carvalho; Clarindo (2019); Çimen (2020); Bhuvaneswar; Thirugnanasampandan; Gogulramnath, (2020); Jokari; Shekafandeh; Jowkar (2022) e Narukulla et al. 2023, que evidenciaram protocolos eficazes para a indução da duplicação do conjunto cromossômico de plantas lenhosas.

O êxito na indução de poliploidia em ambiente in vitro está intrinsecamente ligado ao aprimoramento de procedimentos eficazes de cultivo de tecidos vegetais. Frequentemente, os sistemas de cultivo de tecidos vegetais se mostram desafiadores, especialmente para plantas lenhosas, e apenas um número restrito de espécies tem sido cultivado com êxito. O desenvolvimento de protocolos muitas vezes demanda esforços específicos para cada espécie e, em muitos casos, para cada clone, visando otimizar os métodos de regeneração que possam ser aplicados na indução de poliploidia em ambiente in vitro (TOUCHELL; PALMER; RANNEY, 2020).

2.3 Poliploidia

A poliploidia, é caracterizada pela presença de mais de dois conjuntos de cromossomos no mesmo núcleo (VAN DE PEER; MIZRACHI; MARCHAL, 2017; SIMONIN; RODDY 2018; LEEBENS-MACK et al., 2019).

Os poliploides são identificados de acordo com a sua origem em autopoliploidia ou aloploidia. A autopoliploidia é categorizada como a condição na qual um organismo ou espécie contém múltiplas cópias do seu conjunto de cromossomos, todas descendentes de uma única espécie (LE COMBER et al., 2010).

Em 2020, Doyle; Coate classificaram como uma macromutação epigenética, um evento com consequências fenotípicas. Esse processo pode acontecer durante a meiose, onde se houver uma falha na segregação dos cromossomos durante a meiose, gametas não reduzidos (2x) podem ser formados.

A falha na divisão celular mitótica pode resultar em células somáticas que duplicam seu número de cópias do genoma sem que ocorra a segregação dos conjuntos cromossômicos para os polos opostos da célula (ZHOU et al., 2022; YI et al., 2023). Esse processo destaca como os erros na divisão celular mitótica podem ter implicações significativas na estabilidade da ploidia e na geração de organismos poliploides em espécies vegetais (KOZGUNOVA; NISHINA; GOSHIMA, 2018).

A aloploidia é o resultado da união de gametas não reduzidos seguida pela multiplicação do material genético em híbridos F1 ou pela fusão entre

espécies ou gêneros distintos (PELÉ; ROUSSEAU-GUEUTIN; CHÈVRE, 2018). Portanto, os aloploidos possuem dois ou mais conjuntos completos de cromossomos, cada um proveniente de um genoma progenitor distinto, o que leva à formação de subgenomas homólogos. Os mesmos são identificados com base em variações na estrutura cromossômica nas sequências de DNA e na organização genética (PRIETO; NARANJO, 2020).

Naturalmente os organismos poliploides também podem surgir das mutações em células somáticas, as quais referem-se à duplicação dos cromossomos mediante endomitose ou endoreduplicação, podendo ocorrer tanto em tecidos meristemáticos quanto em célula zigoto do organismo, sem a ocorrência do processo de citocinese durante a mitose (SATTLER; CARVALHO; CLARINDO, 2016; PACEY; MAHERALI; HUSBAND, 2019).

No contexto do gênero *Citrus* e gêneros relacionados, em sua maioria são diploides (KRUG, 1943), porém Longley (1925) identificou um tetraploide selvagem kumquat de 'Hong Kong' (*Fortunella hindsii* Swing.). Outros exemplos dos poucos poliploides naturais encontrados no germoplasma de Aurantioideae são delinhagens tetraploides de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. (IWASAKI 1943), limas triploides (JACKSON; SHERMAN, 1975) exemplo da limeira ácida Tahiti [*Citrus latifolia* (Yu. Tanaka) Tanaka] (LUCHETTI et al., 2003), o alotetraploide *Clausena excavata* Burm.f., o tetraploide *Clausena harmandiana* (Pierre) Guillaumin e o hexaploide *Glycosmis pentaphylla* (Retz.) DC.

Benefícios evolutivos estão diretamente associados à condição de ploidia, como o aumento da heterose, redundância genética, resistência a mutações e deleções, assim como uma maior plasticidade fenotípica (SATTLER; CARVALHO; CLARINDO, 2016). Os poliploides exibem uma gama de características vantajosas, tais como folhas mais espessas e de cores mais intensas, flores maiores e mais duráveis, maior vigor, melhor adaptação a estresses ambientais, resistência a pragas e doenças, aumento da produção de metabólitos e a capacidade de restaurar a fertilidade em híbridos estéreis (MASON; PIRES, 2015; RAUF et al., 2021).

Estas características tornam a poliploidia uma ferramenta valiosa nas estratégias de melhoramento das culturas, levando a um melhor desempenho e produtividade das plantas. Estudos têm demonstrado que a poliploidia induzida pode resultar em melhorias significativas nas características morfológicas,

fisiológicas e bioquímicas, contribuindo para o desenvolvimento de variedades vegetais superiores com maior rendimento, frutos de melhor qualidade e melhor resiliência a condições adversas de crescimento (MIRI, 2020; TOSSI et al., 2022). A aplicação da poliploidia em programas de melhoramento é promissora para enfrentar os desafios da agricultura moderna e fomentar práticas sustentáveis de produção agrícola (SABOONI; GHARAGHANI, 2022).

2.4 Indução artificial de poliploidia

A poliploidização é um método de melhoramento capaz de produzir modificações nas expressões genotípicas e fenotípicas importantes. Para induzir poliploidia, os aloploidos podem ser induzidos artificialmente por meio da hibridação somática via fusão de protoplastos (SPIEGEL-ROY; GOLDSCHMIDT, 2008), enquanto organismos autopoliploides podem ser desenvolvidos a partir de tratamentos na cultura de tecidos utilizando agentes antimitóticos ou hibridização somática (ENG; HO, 2019; NIAZIAN; NALOUSHI, 2020).

Uma estratégia para induzir a duplicação do conjunto cromossômico em plantas é interromper seu ciclo mitótico, podendo ser realizado por vários compostos químicos que interferem entre o final da fase S e o início da citocinese (DHOOGHE et al., 2011). Alguns dos agentes antimitóticos mais eficazes atuam durante a metáfase, como a colchicina, dinitroanilinas (orizalina, trifluralina, dinitramina), acenafteno e vinblastina, inibindo a polimerização dos microtúbulos e impedindo a migração dos cromossomos durante a anáfase (PETERSEN; HAGBERG; KRISTIANSEN, 2003; CAPERTA et al., 2006). Além disso, outros compostos como lactacistina, MG132 e epoxomicina, que bloqueiam o complexo promotor da anáfase também podem ser utilizados, porém apresentam menor eficácia e um custo mais elevado (DHOOGHE et al., 2011).

2.4.1 Colchicina

A colchicina, o agente antimitótico mais comum, tem sido usada desde a década de 30 (BLAKESLEE; AVERY, 1937), sendo amplamente empregada na indução de poliploidia devido à sua alta eficácia e estabilidade após autoclavagem. Porém, sua toxicidade ser uma preocupação, podendo causar

anormalidades no crescimento, mutações ou infertilidade (LUCKETT, 1989; DHOOGHE et al., 2011). Este alcaloide afeta a estrutura das fibras do fuso mitótico, ligando-se à tubulina dos microtúbulos (DEWITTE et al. 2003). Como resultado, ocorre a desmontagem dos microtúbulos nas células tratadas com colchicina, alterando radicalmente a localização do retículo endoplasmático e do aparelho de Golgi. Portanto, não estando ligado a nenhum outro organelo, o aparelho de Golgi fragmenta-se para formar pequenas vesículas dispersas por todo o citoplasma, enquanto o retículo endoplasmático, que está conectado ao envelope nuclear, colapsa em direção ao centro da célula. Quando a colchicina é parcialmente removida do meio por lavagem, a síntese de tubulina recomeça devido à diminuição de tubulina livre no meio, levando ao reaparecimento de microtúbulos nas células (OLMOS et al., 2010). Consequentemente, os organelos recuperam suas posições originais devido à ação de proteínas motoras ao longo de microtúbulos recém-formados (ALBERTS et al., 2006).

Podwyszyńska et al. (2017) corroboraram a maior eficácia da indução de tetraploidia utilizando o alcaloide em *Malus domestica* (Suckow) Borkh. a partir de explantes foliares ou de brotos em condições de cultura in vitro. Esse estudo evidenciou a capacidade de alterar o nível de ploidia em maçãs, potencialmente influenciando características agrônômicas importantes.

Além disso, Kundu et al. (2018) exploraram a tetraploidização in vitro como uma estratégia para aumentar a produção de wedelolactona em *Sphagneticola calendulacea* (L.) Pruski. Esse estudo enfatizou os efeitos da poliploidia na composição fitoquímica da planta, destacando sua aplicação na produção de compostos bioativos.

Outro exemplo notável é o trabalho de Podwyszyńska e Pluta (2019), que obtiveram sucesso na indução de tetraploidia em groselha-preta (*Ribes nigrum* L.) por meio de culturas in vitro, observando alterações fenotípicas preliminares que destacam o potencial dessa técnica para a criação de variantes úteis.

Ren et al. (2021) investigaram a indução de tetraploidia em *álamo 84 K* (*Populus alba* × *P. glandulosa*), observando variações significativas nos traços fenotípicos das plantas tetraploides resultantes. Já Abdolinejad et al. (2021), demonstraram como a indução de tetraploidia em *Ficus carica* L. levou a melhorias marcantes nas características morfológicas, fisiológicas e fitoquímicas da planta.

Em um estudo recente, Bora et al. (2022) investigaram a indução de poliploidia em lima ácida *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle utilizando colchicina em explantes de pontas de brotos derivados in vitro. Os resultados destacaram a viabilidade dessa técnica para a modificação do número cromossômico em citros.

Shashi et al. (2023) demonstraram sucesso na indução de poliploidia em porta-enxertos de citros por meio do tratamento in vitro de explantes derivados de sementes com colchicina. Essa abordagem mostrou-se promissora para a criação de novas variedades de citros com propriedades desejáveis.

Esses exemplos ilustram como a indução artificial de poliploidia pode ser uma ferramenta poderosa para o melhoramento genético e a criação de novas variedades de plantas com características aprimoradas, influenciando desde o rendimento até a qualidade dos produtos vegetais.

2.4.2 Orizalina

A orizalina (N4-dipropylsulfanilamide) tem sido mencionada como uma opção substitutiva à colchicina, em experimentos de cultivo in vitro (Vainola, 2000; Morgan et al., 2003). É uma substância química da classe dos dinitroanilinos, que se ligam à α -tubulina para formar um complexo tubulina-dinitroanilina, impedindo assim a polimerização dos microtúbulos (EECKHAUT et al., 2004; KHOSRAVI et al., 2008; TOUCHELL; PALMER; RANNEY, 2020). É um reagente frequentemente preferido à colchicina para uso na indução de poliploidia em plantas devido à sua menor toxicidade, eficácia em concentrações mais baixas e produção de plantas sem tecido deformado ou crescimento anormal (VAN TUYL et al., 1992). Estudos conduzidos por Väinölä (2000), Morgan et al. (2003), Allum et al. (2007), Khosravi et al. (2008), Greplová et al. (2009), Zeng et al. (2019) e Toucheell et al. (2020) destacam substancialmente a orizalina como uma alternativa à colchicina para indução de poliploidia em experimentos in vitro.

Além disso, Wulansari et al. (2017) exploraram a indução de poliploidia em taro (*Colocasia esculenta* L.) utilizando orizalina em condições de cultura in vitro. Este estudo demonstrou a utilidade da orizalina como agente indutor de poliploidia em uma cultura alimentar significativa.

Outros estudos relevantes como o conduzido por Švécarová et al. (2019), que realizou a indução artificial de tetraploidia em lúpulo (*Humulus lupulus* L.), o

de Ridwan;Witjaksono (2020), que induziram autotetraploidia em plantas de Moringa (*Moringa oleifera* Lam) e o de Bae et al. (2020), que promoveram a tetraploidia em melancias mostram a importância da orizalina para indução de diferentes níveis de ploidia nas culturas agrônomicas de interesse alimentício e comercial.

A eficácia desses protocolos de duplicação cromossômica in vitro depende da capacidade dos agentes antimitóticos em interromper temporariamente a divisão celular, um processo crítico para a duplicação cromossômica. Fatores como a duração da exposição, concentrações dos agentes, tipo de tecido, método de aplicação, condições de cultivo e variações entre espécies também influenciam a eficiência do processo (FOMICHEVA et al., 2024).

2.5 Plantas tetraploides de citros

Na literatura sobre citros, os tetraploides resultantes da duplicação cromossômica, sendo elas: espontâneas no tecido nucelar ou induzida por agentes antimitóticos, são geralmente chamados de autotetraploides. Em contrapartida, os tetraploides híbridos somáticos obtidos por fusão de protoplastos são considerados alotetraploides (OTTO; WHITTON, 2000).

A indução da tetraploidização em citros é frequentemente estudada. Doaa et al. (2014) realizaram estudos bem-sucedidos na indução de poliploidia em *Citrus reticulata* Blanco utilizando técnicas in vitro. Já Ollitrault et al. (2019) enfatizaram a importância da manipulação de ploidia na criação de novas variedades de citros, explorando os benefícios dos poliploides para o melhoramento genético.

Çimen (2020) revelou em seus resultados que plantas tetraploides estáveis e não quiméricas podem ser produzidas com sucesso por meio do uso de várias doses de colchicina e tempo de exposição em explantes derivados de sementes de citrange 'C35'.

Yasuda et al. (2022) também produziram plantas tetraploides de forma eficaz em sementes de cinco genótipos poliembriônicos em *Citrus*, *Fortunella* e *Poncirus* com colchicina na indução tetraploide. Já Jokari; Shekafandeh; Jowkar (2022) induziram plantas tetraploides in vitro em limão mexicano (*Citrus aurantifolia* L.) e laranja azeda (*Citrus aurantium* L.), que foram induzidas

utilizando segmentos nodais, por meio da adição de colchicina como produto químico antimitótico.

Um estudo recente realizado por Shashi et al. (2023) demonstrou a eficácia da indução de poliploidia em porta-enxertos de citros por meio de tratamento *in vitro* com colchicina. Os pesquisadores utilizaram explantes derivados de sementes e conseguiram induzir a formação de tetraploides em diferentes espécies de porta-enxertos. Esse método mostrou-se promissor para o desenvolvimento de plantas mais resistentes e produtivas.

A tetraploidia é uma técnica frequentemente utilizada para manipular a ploidia e é vista como uma ferramenta atrativa para melhoristas de plantas, pois resulta na criação de novas plantas que podem ser empregadas em programas de melhoramento, contribuindo assim com o alcance de novos recursos genéticos (UDALL; WENDEL, 2006; HUSSAIN et al., 2012; SATTLER et al., 2016).

Plantas tetraploides podem dar origem a fenótipos superiores, conhecidos como efeito de “gigantismo”, com caules vigorosos, folhagem mais robusta e aumento do tamanho de flores, frutos, maior tamanho dos órgãos e diferentes características anatômicas (DHOOGHE et al., 2011; PODWYSZYŃSKA et al., 2017; DOYLE; COATE, 2019; TAN et al., 2019).

Não sendo regra, pois o trabalho de Allario et al. (2011), sugere que o crescimento das plantas diploides (2x) foi mais vigoroso do que nas tetraploides (4x), apesar das folhas, caules e raízes das plantas tetraploides apresentarem maior espessura e células maiores. Essas diferenças anatômicas podem influenciar significativamente o transporte de água entre as células. Além disso, o conteúdo hídrico das folhas foi superior nas plantas tetraploides (4x) em comparação com as diploides (2x), sugerindo que a duplicação cromossômica pode afetar a capacidade de retenção de água nas plantas, o que pode ter implicações na fisiologia da planta, incluindo a eficiência na regulação da água e na adaptação a estresses ambientais

Foi demonstrado que plantas tetraploides de citros promovem a adaptação a diferentes estresses abióticos (RUIZ et al., 2020; GÓRA et al., 2021). Elas foram descritas como tendo melhor tolerância ao frio, salinidade e seca do que suas contrapartes diploides (ALLARIO et al., 2013 ; RUIZ et al., 2016; OUSTRIC et al., 2017). Ruiz et al. (2016) e Oustric et al. (2019) indicaram que tetraploides de

citros são menos afetados pelo estresse nutricional e menos sensíveis ao excesso de boro do que os diploides correspondentes.

A importância das plantas tetraploides está principalmente relacionada ao seu uso como progenitores em programas de melhoramento, visando a obtenção de plantas triploides com frutos sem sementes e baixa viabilidade gamética (BRUGNARA et al., 2008; SPIEGEL-ROY; GOLDSCHMIDT, 2008).

2.6 Plantas triploides de citros

A triploidia, é uma característica relevante encontrada naturalmente em citros. Triploides são indivíduos que possuem um número triplo de conjuntos cromossômicos em suas células, resultando em uma condição genética única que influencia suas características agrônomicas e fisiológicas. A ocorrência de triploidia em citros pode ser espontânea, surgindo de forma natural durante o desenvolvimento das plantas. Esses indivíduos triploides podem apresentar características distintas em relação aos diploides, como esterilidade, tamanho de frutos e resistência a certas condições ambientais (DOAA et al., 2014; MAHMOUDI et al., 2020).

Os triploides espontâneos podem ser originados pela fusão de gametas femininos não reduzidos com gametas masculinos reduzidos. Assim, presume-se que o progenitor feminino desempenha um papel central na taxa de formação de triploides naturais. Acredita-se que o mecanismo subjacente à geração de megásporos não reduzidos seja a falta de ocorrência da segunda divisão meiótica, resultando na manutenção do genótipo original do gameta feminino (HANDAJI et al., 2008).

Um exemplo notável de uma variedade triploide espontânea com significativo valor comercial é a limeira ácida Tahiti, conhecida por sua alta produtividade e pela produção de frutos sem sementes. Na triploidia, os cromossomos podem se organizar formando trivalentes, bivalentes e univalentes, que resultarão em gametas desbalanceados (inférteis) (DEL BOSCO et al., 2007; DUTT et al., 2010; Huw; Barry, 1994).

Lee (1988) delineou várias metodologias viáveis para a produção de plantas cítricas triploides ($3x = 27$). Essas incluem a geração de híbridos sexuais triploides por meio do cruzamento de cultivares diploides ($2x$) com tetraploides

(4x) (ESEN; SOOST, 1972; ESEN et al., 1978) ou entre dois cultivares diploides (2x) (ESEN; SOOST, 1971). Os híbridos triploides também podem ser obtidos por meio da fusão somática entre protoplastos haploides e diploides (ALEZA et al., 2009).

A frequência de obtenção de triploides entre as variedades de citros pode variar de 50% a 100%, dependendo do genótipo, tipo de semente, ambiente e porcentagem de sementes germinadas (TIMBÓ, 2007). Além de compatibilidade dos pais, viabilidade do pólen e a frequência de gametas não-reduzidos, especialmente do progenitor feminino (WANG et al., 2016). O primeiro híbrido triploide artificial em *Citros* foi desenvolvido por Swingle, ao polinizar a *Fortunella hindsii*, um kumquat tetraploide nativo das montanhas do sudeste da China, com um limequat diploide (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing, x *Fortunella margarita* (Lour.) Swingle) (LONGLEY, 1925).

As tangerineiras triploides representam uma via promissora no melhoramento de citros devido à sua ausência de sementes (LOURKISTI et al., 2021). As plantas triploides são heterozigotas e frequentemente expressam muitas características desejáveis, com frutos de maior rendimento, mais suculentos e doces (WANG et al., 2016; DALEL et al., 2020).

Além disso, Jones et al. (2007); Lourkisti et al. (2021) relataram que a triploidia induz um aumento no tamanho das células somáticas e células guardas, bem como no número de cloroplastos, fortalecendo capacidade de recuperação após estresse por déficit hídrico, melhor eficiência de carboxilação, ajuste osmótico e sistemas antioxidante, maior tolerância às temperaturas naturais de resfriamento, com propriedades fotossintéticas melhoradas.

Adicionalmente, a produção de híbridos triploides por meio de cruzamentos controlados em condições ambientais específicas tem sido bem-sucedida, destacando a importância dos fatores ambientais na formação triploide (MAHMOUDI et al., 2020). As tangerineiras triploides representam uma valiosa estratégia de melhoramento genético para o desenvolvimento de novas variedades cítricas com características desejáveis.

2.7 Plantas haploides e duplo-haploides de citros

Plantas haploides são aquelas que possuem células com apenas um conjunto básico de cromossomos (GERMANÀ, 2006). A obtenção dessas plantas é geralmente pouco frequente na natureza, sendo possível por meio de métodos artificiais como o cultivo *in vitro* de anteras, cultura de micrósporos isolados, partenogênese *in situ*, ou partenogênese *in vitro* (GERMANÀ, 2011; GERMANÀ et al., 2013).

A capacidade de obter plantas haploides ou duplo-haploides é crucial para o desenvolvimento de linhagens homozigóticas a partir de parentais heterozigotos de forma rápida, em oposição aos métodos tradicionais de autofecundação que demandam mais tempo (GERMANÀ, 2011). Essas técnicas são amplamente utilizadas em programas de melhoramento de espécies agronomicamente importantes como aspargo, berinjela, arroz, entre outras (MUROVEC; BOHANEK, 2012).

Além de seu valor no melhoramento de plantas, as plantas haploides e duplo-haploides são essenciais para estudos genéticos, investigação de herança de caracteres, indução de alelos mutantes e genômica (ALEZA et al., 2009). Elas também desempenham um papel fundamental na produção de híbridos F1, onde a heterose é restaurada (GERMANÀ, 2009).

Em espécies lenhosas como os citros, a obtenção de plantas homozigóticas é crucial devido ao longo período juvenil, alta heterozigosidade e auto incompatibilidade dessas espécies (GERMANÀ, 2006; 2009).

Os haploides de citros são especialmente valiosos em estudos genéticos devido à sua homozigosidade, facilitando a detecção de alelos recessivos e mutações naturais (SZAREJKO; FORSTER, 2007). Essas linhagens têm sido cruciais para projetos de sequenciamento de genoma completo (WGS – *Whole Genome Sequencing*) de *Citrus* spp. e espécies relacionadas.

Um exemplo notável é o estabelecimento de um genoma de referência de alta qualidade para citros a partir de uma linha haploide derivada de gênese *in situ* de clementina ‘Nules’ (ALEZA et al., 2009; WU et al., 2014).

O sequenciamento de linhagens haploides e duplo-haploides tem fornecido dados haplotípicos valiosos para estudos filogenômicos e genômicos funcionais em citros e espécies afins (XU et al., 2013; WANG et al., 2016). Além disso, plantas homozigotas são fundamentais como linhas parentais para a produção de híbridos F1, nos quais se observa a restauração da heterose, ou vigor híbrido

(GERMANÁ, 2009). No caso das plantas lenhosas, como os citros, o desenvolvimento de plantas homozigotas é de grande importância, visto que essas espécies apresentam longo período juvenil, elevado nível de heterozigosidade e autoincompatibilidade (GERMANÁ, 2006, 2009). Essas características tornam as linhas homozigotas essenciais para o melhoramento genético e o desenvolvimento de variedades híbridas mais estáveis e produtivas.

REFERÊNCIAS

- ABDOLINEJAD, R.; SHEKAFANDEH, A.; JOWKAR, A. In vitro tetraploidy induction creates enhancements in morphological, physiological and phytochemical characteristics in the fig tree (*Ficus carica* L.). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 166, p. 191–202, 2021.
- ACQUAAH, G. **Polyploidy in plant breeding**. In: *Principles of Plant Genetics and Breeding*. Hoboken: John Wiley & Sons, 2012. p. 452–469.
- AHMED, D.; EVRARD, J.C.; OLLITRAULT, P.; FROELICHER, Y. The effect of cross direction and ploidy level on phenotypic variation of reciprocal diploid and triploid mandarin hybrids. **Tree Genetics & Genomes**, v. 16, n. 25, 2020.
- ALEZA, P.; JUAREZ, J.; HERNANDEZ, M.; et al. Recovery and characterization of a *Citrus clementina* Hort. ex Tan. 'Clemenules' haploid plant selected to establish the reference whole citrus genome sequence. **BMC Plant Biology**, v. 9, p. 110, 2009.
- ALEZA, P.; JUAREZ, J.; OLLITRAULT, P.; et al. Production of tetraploid plants of non-apomictic citrus genotypes. **Plant Cell Reports**, v. 28, n. 12, p. 18371846, 2009.
- ALFEREZ, F. Struggling citriculture in Florida is a source for innovation in horticultural science. **Journal of Horticulture**, 2017.
- ALLARIO, T.; BRUMOS, J.; COLMENERO-FLORES, J. M.; TADEO, F.; FROELICHER, Y.; TALON, M.; NAVARRO, L.; OLLITRAULT, P.; MORILLON, R. Large changes in anatomy and physiology between diploid Rangpur lime (*Citrus limonia*) and its autotetraploid are not associated with large changes in leaf gene expression. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 8, p. 2507–2519, 2011.
- ALLARIO, T.; BRUMOS, J.; COLMENERO-FLORES, J.M.; IGLESIAS, D.J.; PINA, J.A.; NAVARRO, L.; TALON, M.; OLLITRAULT, P.; MORILLON, R. Tetraploid Rangpur lime rootstock increases drought tolerance via enhanced constitutive root

abscisic acid production. **Plant, Cell & Environment**, v. 36, n. 4, p. 856–868, 2013.

BHUVANESWARI, G.; THIRUGNANASAMPANDAN, R.; GOGULRAMNATH, M. Effect of colchicine induced tetraploidy on morphology, cytology, essential oil composition, gene expression, and antioxidant activity of *Citrus limon* (L.) Osbeck. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 26, n. 2, p. 271–279, 2020.

BLAKESLEE, A.F.; AVERY, A.G. Methods of inducing doubling of chromosomes in plants: By treatment with colchicine. **Journal of Heredity**, v. 28, n. 12, p. 393-411, 1937.

BORA, L.; VIJAYAKUMAR, R.; GANGA, M.; MEENAKSHI, N.; GANESAN, M.; SARKAR, M.; KUND, M. Induction of polyploids in acid lime (*Citrus aurantifolia*) through colchicine treatment of in vitro derived shoot tip explants. **Plant Breeding**, v. 142, n. 1, p. 118-127, 28 nov. 2022.

BRUGNARA, E.C.; SCHIFINO WITTMANN, M.T.; WEILER, R.L.; SCHWARZ, S.F. Ploidia e fertilidade de pólen em progênies de citros. **Bragantia**, v. 67, n. 3, p. 599-602, 2008.

CAPUTO, M. M. et al. Seleção de cultivares de laranja doce de maturação precoce por índices de desempenho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** [online], v. 47, n. 11, p. 1669-1672, 2012.

CAPERTA, A.; DELGADO, M.; RESSURREIÇÃO, F.; et al. Colchicine-induced polyploidization depends on tubulin polymerization in c-metaphase cells. **Protoplasma**, v. 227, p. 147-153, 2006.

CASTLE, W. S.; BALDWIN, J. C.; MURARO, R. P.; LITTELL, R. Performance of 'Valencia' Sweet Orange Trees on 12 Rootstocks at Two Locations and an Economic Interpretation as a Basis for Rootstock Selection. **HortScience horts**, v. 45, n. 4, p. 523-533, 2010.

ÇİMEN, B. Induction of polyploidy in C35 Citrange through in vitro colchicine treatments of seed-derived explants. **International Journal of Fruit Science**, 2020. <https://doi.org/10.1080/15538362.2020.1837051>.

ÇIMEN, B.; YESILOGLU, T.t; YILMAZ, B.; INCESU, M. **Genetic Improvement in Citrus**. In: HUSSAIN, S.; KHALID, M.F.; ALI, M.A.; AHMED, N.; HASANUZZAMAN, M.; AHMAD, S. (Eds.). **Citrus Production: Technological Advancements and Adaptation to Changing Climate**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 2022.

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

CONTI, G., et al. Citrus genetic transformation: An overview of the current strategies and insights on the new emerging technologies. **Frontiers in Plant Science**, 2021.

CRUZ, M. A. et al. Long-term field evaluation of Pera sweet orange selections under the Brazilian humid subtropical climate. **European Journal of Agronomy**, v. 150, p. 126952, 2023.

DANIEL, J. de; ANDRADE, C. M.; da, ROCHA. Resistance management for mites vectoring citrus leprosis in Brazil. **Zoosymposia**, 2022.

DEL BOSCO, S.F.; et al. Production and characterization of new triploid seedless progenies for mandarin improvement. **Scientia Horticulturae**, v. 114, n. 4, p. 258-262, 2007.

DHOOGHE, E.; VAN LAERE, K.; EECKHAUT, T.; LEUS, L. VAN HUYLENBROECK, J. Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, v. 104, n. 3, p. 359-373, 2011.

DOAA, M.; ABOU, E.; ELYAZID, A.; EL-SHEREIF, R. In vitro induction of polyploidy in *Citrus reticulata* Blanco. **American Journal of Plant Sciences**, 2014.

DOYLE, J.J.; COATE, J.E. Autopolyploidy: an epigenetic macromutation. **American Journal of Botany**, v. 107, n. 8, p. 10971100, 2020.

DUTT, M.; VASCONCELLOS, M.; SONG, K.J.; GMITTER Jr., 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.

ENG, W.H.; HO, W.S. Polyploidization using colchicine in horticultural plants: a review. **Horticultural Science**, v. 246, p. 604-617, 2019.

ESEN, A.; SOOST, R.K. Distribution of enzymatic browning of young shoot homogenates the Aurantioideae. **American Journal of Botany**, v. 62, p. 1078-1083, 1975.

ESEN, A.; SOOST, R.K. Separation of nucellar and zygotic browning. **Proceedings International Society of Citriculture**, v. 2, p. 616-618, 1977.

ESEN, A.; SOOST, R.K. Tetraploid progenies from 2x x 4x crosses of citrus and their origin. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 97, p. 410-414, 1972.

ESEN, A.; SOOST, R.K. Unexpected triploids in Citrus: their origin, identification, and possible use. **Journal of Heredity**, v. 62, p. 329-333, 1971.

ESEN, A.; SOOST, R.K.; GERACI, G. Seed set, size, and development after 4x X 2x and 4x X 4x crosses in Citrus. **Euphytica**, v. 27, p. 283-294, 1978.

FIROOZEH, Chamandoosti. Citrus tissue culture with two different approaches. **International Journal of Biosciences**, 2020.

FIROOZEH, Chamandoosti. The utilities of Citrus tissue culture. **International Journal of Environmental & Agriculture Research**, 2017.

GERMANÀ, M. A. Anther culture for haploid and doubled haploid production. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 104, p. 283-300, 2011.

GERMANÀ, M. A. Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding. **Plant Cell Reports**, v. 30, n. 5, p. 839-857, 2011.

GERMANÀ, M. A.; ALEZA, P.; CARRERA, E.; et al. Cytological and molecular characterization of three gametoclones of *Citrus clementina*. **BMC Plant Biology**, v. 13, p. 129, 2013.

GERMANÀ, Maria Antonietta. Doubled haploid production in fruit crops. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 86, p. 131–146, 2006. DOI: 10.1007/s11240-006-9088-0.

GHULAM, M.; JOYIA, F. A.; KHAN, M. S.; et al. Citrus biotechnology: Current innovations and future prospects. **IntechOpen**, 2021.

GORA, J.; RAM, C.; POONIA, P.; CHOUDHARY, M.; HALDHAR, S. Polyploid rootstocks in citrus for mitigation of biotic and abiotic stresses: A review. **Journal of Agriculture and Ecology**, v. 13, n. 13, p. 1–19, 2022.

GOTO, S. et al. Allelic haplotype combinations at the MS-P1 region, including P-class pentatricopeptide repeat family genes, influence wide phenotypic variation in pollen grain number through a cytoplasmic male sterility model in citrus. **Frontiers in Plant Science**, 2023.

HANDAJI, N.; ARSALANE, N.; BENYAHIA, H.; IBRIZ, M. Identification de l'origine de gamètes parentaux diploïdes et mode de restitution nucléaire des hybrides spontanément triploïdes de mandariniers. **Alawamia**, p. 123-124, 2008.

HARLAN, J. R.; DEWET, J. M. J. On Ö. Winge and a Prayer: The origins of polyploidy. **Botanical Review**, v. 41, p. 361–390, 1975. DOI: 10.1007/BF02860830.

HASNAIN, A.; NAQVI, S. A. H.; AYESHA, S. I.; et al. Plants in vitro propagation with its applications in food, pharmaceuticals and cosmetic industries; current scenario and future approaches. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 1009395, 2022. DOI: 10.3389/fpls.2022.1009395.

HUSSAIN, S.; CURK, F.; DHUIQUE-MAYER, C.; et al. Autotetraploid trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata*) rootstocks do not impact clementine quality but reduce fruit yields and highly modify rootstock/scion physiology. **Scientia Horticulturae**, v. 134, p. 100–107, 2012.

IWASAKI, T. On the big and small leaf strain of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* Raf.). **Journal of Horticultural Association Japan**, v. 14, p. 302–305, 1943.

JACKSON, L. K.; SHERMAN, W. B. Chromosome counts in 'Tahiti' lime. **Florida State Horticultural Society**, p. 458–459, 1975.

JAISWAL, P.; SINGH, A. V.; YADAV, V. K.; KUMARI, N. Plant tissue culture in tree species. In: *Advances in Plant Tissue Culture*. **Elsevier**, 2022. p. 345-356.

JOKARI, S.; SHEKAFANDEH, A.; JOWKAR, A. In vitro tetraploidy induction in Mexican lime and sour orange and evaluation of their morphological and physiological characteristics. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 150, p. 651–668, 2022.

JONES, K. D.; REED, S. M.; RINEHART, T. A. Analysis of ploidy level and its effects on guard cell length, pollen diameter, and fertility in *Hydrangea macrophylla*. **HortScience**, v. 42, p. 483–488, 2007.

KOZGUNOVA, E.; NISHINA, M.; GOSHIMA, G. Chromosome missegregation causes somatic polyploidization in plants. **bioRxiv**, 2018.

KRUG, C. Chromosome number in the subfamily Aurantioideae with special reference to the genus *Citrus*. **Botanical Gazette**, v. 104, p. 602-611, 1943.

KUNDU, S.; SALMA, U.; ALI, M. N.; MANDAL, N. In vitro tetraploidization for the augmentation of wedelolactone in *Sphagneticola calendulacea* (L.) Pruski. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 40, 2018.

KUPPER, K. C.; MOURA, V. S.; FRANCISCO, F. B. Leveduras como agentes de controle biológico de patógenos de pós-colheita em citros. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, p. 35-55, 2022. DOI: 10.31976/0104-038321v290002.

LE COMBER, S. C.; AINOUCHE, M. L.; KOVARIK, A.; LEITCH, A. R. Making a functional diploid: from polysomic to disomic inheritance. **The New Phytologist**, v. 186, n. 1, p. 113-122, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03117.x>.

LEE, L. S. Citrus polyploidy: origins and potential for cultivar improvement. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 39, p. 735747, 1988.

LEEBENS-MACK, J. H.; BARKER, M. S.; CARPENTER, E. J. et al. One thousand plant transcriptomes and the phylogenomics of green plants. **Nature**, v. 574, n. 7780, p. 679685, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1693-2>.

LIMAYEM, A.; MARTIN, E. M.; SHANKAR, S. Study on the citrus greening disease: current challenges and novel therapies. **Microbial Pathogenesis**, v. 192, p. 106688, 2024.

LONGLEY, A. E. Polycarpy, polyspory and polyploidy in *Citrus* and *Citrus* relatives. **Journal of the Washington Academy of Sciences**, v. 15, p. 347-357, 1925.

LORA, J.; GARCIA-LOR, A.; ALEZA, P. Pollen development and viability in diploid and doubled diploid citrus species. **Frontiers in Plant Science**, 2022.

LOURKISTI, R.; FROELICHER, Y.; HERBETTE, S.; MORILLON, R.; GIANNETTINI, J.; BERTI, L.; SANTINI, J. Triploidy in Citrus Genotypes Improves Leaf Gas Exchange and Antioxidant Recovery From Water Deficit. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 615335, 2021.

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

MAHMOUDI, K.; HANDAJI, N.; IBRIZ, M.; BENYAHYA, H. Research of citrus triploid hybrids by embryo rescue and flow cytometry from two oranges varieties Pineapple and Parson Brown. **Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology**, v. 21, n. 1-2, p. 19-27, 2020.

MANIKANDAN, R.; MATEOS, D.; IRIGOYEN, S.; PADILLA, C. S.; MANDADI, K. K. Rhizobium rhizogenes-mediated hairy root induction and plant regeneration for bioengineering citrus. **Plant Biotechnology Journal**, 2023.

MANMOHAN, S.; LAL, M.; JAMWAL, M.; SOOD, Y.; BAKSHI, P.; SHARMA, N.; SHARMA, S.; KUMAR, S. Micropropagation of fruit crops: a review. **Plant Science Today**, 2022.

MASON, A. S.; PIRES, J. C. Unreduced gametes: meiotic mishap or evolutionary mechanism? *Trends in Genetics*, v. 31, n. 1, p. 5–10, 2015.

MIRI, S. M. Artificial polyploidy in the improvement of horticultural crops. **Journal of Plant Physiology and Breeding**, v. 10, n. 1, p. 1-28, 2020. DOI: <https://doi.org/10.22034/jppb.2020.12490>.

MONTALT, Rafael et al. Genotyping by sequencing for SNP-based linkage analysis and the development of KASPar markers for male sterility and polyembryony in citrus. **Plants**, 2023.

MUROVEC, J.; BOHANEK, B. Haploids and double haploids in plant breeding. In: ABDURAKHMONOV, I. (Ed.). **Plant Breeding**. InTech, 2012.

NARUKULLA, V.; LAHANE, Y.; FISKE, K.; PANDEY, S.; ZIOGAS, V. Induction of Polyploidy in Citrus Rootstocks through In Vitro Colchicine Treatment of Seed-Derived Explants. **Agronomy**, v. 13, p. 1442, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy13061442>.

NIAZIAN, M.; NALOUSHI, A. M. Induction of artificial polyploidy for the improvement of ornamental and medicinal plants. **Plant Cell Tissue Culture Organization Cultivation**, v. 3, p. 447469, 2020.

OLIVEIRA, R. P.; SOARES FILHO, W. S.; MACHADO, M. A.; FERREIRA, E. A.; SCIVITTARO, W. B.; GESTEIRA, A. S. Melhoramento genético de plantas cítricas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 35, n. 281, p. 2229, 2014.

OLLITRAULT, P.; DAMBIER, D.; LURO, F.; FROELICHER, Y. Ploidy manipulation for breeding seedless triploid citrus. **Plant Breeding Reviews**, v. 30, p. 323-352, 2008.

OLLITRAULT, P.; GERMANA, M.; FROELICHER, Y.; CUENCA, J.; ALEZA, P.; MORILLON, R.; GROSSER, J. W.; GUO, W. Ploidy Manipulation for Citrus Breeding, Genetics, and Genomics. **Plant Breeding Reviews**, 2019.

OTTO, S. P.; WHITTON, J. Polyploid incidence and evolution. **Annual Review of Genetics**, v. 34, p. 401437, 2000.

OUSTRIC, J. et al. Nutrient deficiency tolerance in citrus is dependent on genotype or ploidy level. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 127, 2019.

OUSTRIC, J. et al. Tetraploid Carrizo citrange rootstock (*Citrus sinensis* Osb. × *Poncirus trifoliata* L. Raf.) enhances natural chilling stress tolerance of common clementine (*Citrus clementina* Hort. ex Tan). **Journal of Plant Physiology**, v. 214, p. 108115, 2017.

PACEY, E. K.; MAHERALI, H.; HUSBAND, B. C. The influence of experimentally induced polyploidy on the relationships between endopolyploidy and plant function in *Arabidopsis thaliana*. **Ecology and Evolution**, v. 10, n. 1, p. 198216, 2019.

PELÉ, A.; ROUSSEAU-GUEUTIN, M.; CHÈVRE, A. M. Speciation success of polyploid plants closely relates to the regulation of meiotic recombination. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 907, 2018.

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

PODWYSZYŃSKA, M.; PLUTA, S. In vitro tetraploid induction of the blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) and preliminary phenotypic observations. **Zemdirbyste-Agriculture**, v. 106, p. 151-158, 2019.

PODWYSZYŃSKA, Małgorzata et al. In vitro tetraploid induction of *Malus × domestica* Borkh. using leaf or shoot explants. **Scientia Horticulturae**, v. 226, p. 379-388, 2017.

PRIETO, P.; NARANJO, T. Analytical methodology of meiosis in autopolyploid and allopolyploid plants. In: *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.). v. 2061, p. 141–168, 2020.

RAMASAMY, M. et al. Rhizobium rhizogenes-mediated hairy root induction and plant regeneration for bioengineering citrus. **Plant Biotechnology Journal**, v. 21, n. 9, p. 1728–1730, 2023.

RANNEY, T. G. Polyploidy: from evolution to new plant development. **Combined Proceedings International Plant Propagators' Society**, v. 56, p. 137–142, 2006.

RAUF, S. et al. Induced polyploidy: a tool for forage species improvement. **Agriculture**, v. 11, p. 210, 2021.

REN, Yongyu et al. In vitro induction of tetraploid and resulting trait variation in *Populus alba* × *Populus glandulosa* clone 84 K. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 146, p. 343-356, 2021.

RUIZ, M. et al. Tetraploidy enhances boron-excess tolerance in Carrizo citrange (*Citrus sinensis* L. Osb. × *Poncirus trifoliata* L. Raf.). **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 701, 2016.

SABOONI, N.; GHARAGHANI, A. Induced polyploidy deeply influences reproductive life cycles, related phytochemical features, and phytohormonal activities in blackberry species. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 938284, 2022.

SAMANTA, D.; ROY, D. **Plant Tissue Culture - A Lab Manual**. 2022.

SANGIORGIO, P. et al. Citrus as a multifunctional crop to promote new bio-products and valorize the supply chain. **Environmental Engineering and Management Journal**, 2019.

SANTANA, L. G. L.; SOARES FILHO, W. DOS S.; LEDO, C. A. DA S.; BARBOSA, C. DE J.; SANTOS, M. G. Reação de progênies de citros ao vírus-da-tristeza-dos-citros (*Citrus tristeza virus* – CTV). **Revista Contemporânea**, v. 4, n. 4, p. e3662, 2024.

SATTLER, M. C.; CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R. The polyploid and its key role in plant breeding. **Plant**, v. 243, n. 2, p. 281-296, 2016.

SHASHI, B.; PANDEY, V.; ZIOGAS, V. Induction of polyploidy in citrus rootstocks through in vitro colchicine treatment of seed-derived explants. **Agronomy**, v. 13, n. 6, p. 1442, 2023.

SHINDE, A. V.; JADHAV, R. A.; DESHMUKH, A. S.; THAKUR, N. R. Polyploidy: An Evolutionary Plant Breeding Approach. **Elements of Plant Breeding**, Série IIP, v. 3, p. 88-105, maio 2024.

SHINDE, A. A.; JAWALE, S.; ZARGAD, V.; TARDE, S.; MUSMADE, D. Plant Tissue Culture. **International Journal of Emerging Technologies and Innovative Research**, v. 7, n. 11, p. 229-239, nov. 2020.

SIMONIN, K. A.; RODDY, A. B. Genome downsizing, physiological novelty, and the global dominance of flowering plants. **PLoS Biology**, v. 16, n. 1, e2003706, 2018.

SPIEGEL-ROY, P.; GOLDSCHMIDT, E. E. Biology of *Citrus*. 2. ed. **Cambridge**: Cambridge University Press, 2008. 230 p.

SZAREJKO, I.; FORSTER, B. P. Doubled haploidy and induced mutation. **Euphytica**, v. 158, n. 3, p. 359-370, 2007.

TAN, F.-Q. et al. Comparative metabolic and transcriptional analysis of a doubled diploid and its diploid citrus rootstock (*C. junos* cv. Ziyang xiangcheng) suggests its potential value for stress resistance improvement. **BMC Plant Biology**, v. 15, p. 89, 2015.

TAN, F.-Q. et al. Metabolic adaptation following genome doubling in citrus doubled diploids revealed by non-targeted metabolomics. **Metabolomics**, v. 13, p. 143, 2017.

TAN, F.-Q. et al. Polyploidy remodels fruit metabolism by modifying carbon source utilization and metabolic flux in Ponkan mandarin (*Citrus reticulata* Blanco). **Plant Science**, v. 289, p. 110276, 2019.

THOMAS, H. M.; THOMAS, B. J. Meiosis in triploid *Lolium*. I. Formation of the synaptonemal complex and chromosome configurations at metaphase I in *L. multiflorum* autotriploid aneuploid. **Genome**, v. 37, n. 2, p. 181-189, 1994.

TIMBÓ, A. L. de O. **Obtenção de protoplastos de híbridos triplóides entre o capim-elefante e o milho**. 2007. 44 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

TOSSI, V. E. et al. Impact of polyploidy on plant tolerance to abiotic and biotic stresses. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 869423, 2022.

TOUCHELL, D. H.; PALMER, I. E.; RANNEY, T. G. In vitro ploidy manipulation for crop improvement. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 722, 2020.

UDALL, J. A.; WENDEL, J. F. Polyploidy and crop improvement. **Crop Science**, v. 46, p. 3–14, 2006.

VAN DE PEER, Y.; MIZRACHI, E.; MARCHAL, K. The evolutionary significance of polyploidy. **Nature Reviews Genetics**, v. 18, p. 411–424, 2017.

VOLK, G. M.; GMITTER, F. G.; KRUEGER, R. Conserving citrus diversity: From Vavilov's early explorations to genebanks around the world. **Plants**, 2023.

WANG, X. et al. Breeding triploid plants: a review. **Czech Journal of Genetics and Plant Breeding**, v. 52, p. 41–54, 2016.

WU, G. A. et al. Sequencing of diverse mandarin, pummelo and orange genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 7, p. 656–662, 2014.

XU, Q. et al. The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). **Nature Genetics**, v. 45, n. 1, p. 59–66, 2013.

YASUDA, K. et al. Effects of in vitro colchicine treatment on tetraploid induction in seeds of polyembryonic cultivars of the genera *Citrus*, *Fortunella*, and *Poncirus*. **Journal of the Society for Tropical Agriculture**, v. 66, n. 2, p. 51-58, 2022.

YI, J. et al. Meiocyte size is a determining factor for unreduced gamete formation in *Arabidopsis thaliana*. **The New Phytologist**, v. 237, n. 4, p. 1179–1187, 2023.

ZHOU, Q. et al. Heat shock-induced failure of meiosis I to meiosis II transition leads to 2x pollen formation in a woody plant. **Plant Physiology**, v. 189, n. 4, p. 2110–2127, 2022.

CAPÍTULO 1

INDUÇÃO IN VITRO DE TETRAPLOIDIA NAS TANGERINEIRAS 'FREMONT' (*Citrus clementina* Hort. ex Tan. × *Citrus reticulata* Blanco), 'DANCY' (*Citrus tangerina* Hort. ex Tan.) E 'CLEMENTINA HONEY' (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.)¹

INDUÇÃO IN VITRO DE TETRAPLOIDIA NAS TANGERINEIRAS 'FREMONT' (*Citrus clementina* Hort. ex Tan. × *Citrus reticulata* Blanco), 'DANCY' (*Citrus tangerina* Hort. ex Tan.) E 'CLEMENTINA HONEY' (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.)

RESUMO:

A poliploidia, caracterizada pela ocorrência de indivíduos com múltiplos cromossômicos do padrão da espécie, é um fenômeno relevante na evolução e no melhoramento genético de plantas. Neste trabalho, foi investigada a indução de poliploides por agentes antimitóticos, utilizando miniestacas de tangerineiras 'Fremont' (*Citrus clementina* Hort. ex Tan. x *C. reticulata* Blanco), 'Dancy' (*C. tangerina*) e 'Clementina Honey' (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.). Foram testadas diferentes concentrações de colchicina (0 a 2500 mg/L⁻¹) e orizalina (0 a 25,977 mg/L⁻¹) adicionadas ao meio WPM líquido, com tempos de exposição de 24 e 48 horas. A análise por citometria de fluxo identificou plantas com diferentes níveis de ploidia. Para 'Clementina Honey' e 'Dancy', a maior indução de tetraploides foi obtida com 500 mg/L⁻¹ de colchicina, enquanto 'Fremont' apresentou melhores resultados com 2500 mg/L⁻¹. Mixoploides foram mais frequentes em 'Clementina Honey' com 40% (500 mg/L⁻¹, 24 h) e em 'Dancy' com 50% (2000 mg/L⁻¹, 24 h). Em 'Fremont', concentrações de 500 mg/L⁻¹ e 1500 mg/L⁻¹ induziram 60% e 50% de mixoploides, respectivamente. Com orizalina, as concentrações de 10,3908 mg/L⁻¹ ('Clementina Honey'), 25,977 mg/L⁻¹ ('Dancy') e 20,7816 mg/L⁻¹ ('Fremont') foram as mais eficientes para induzir tetraploidia. Mixoploides foram identificados principalmente em 'Clementina Honey' (76,9%, 20,7816 mg/L⁻¹, 24 h), enquanto 'Dancy' e 'Fremont' apresentaram 25% e 66,7%, respectivamente, com doses específicas. Os resultados demonstram que a eficiência da indução de poliploides varia conforme o genótipo, o antimitótico, a concentração e o tempo de exposição, sendo possível ajustar os protocolos para obter tetraploides com maior eficácia e reduzir a ocorrência de mixoploides.

Palavras-chave: Citros; Poliploidia; Agentes antimitóticos;

IN VITRO TETRAPLOIDY INDUCTION IN 'FREMONT' TANGERINE (*Citrus clementina* Hort. ex Tan. × *Citrus reticulata* Blanco), 'DANCY' (*Citrus tangerina* Hort. ex Tan.), AND 'CLEMENTINA HONEY' (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.)

ABSTRACT:

Polyploidy, characterized by the occurrence of individuals with chromosomal numbers that are multiples of the species' standard, is a significant phenomenon in plant evolution and genetic improvement. This study investigated the induction of polyploids using antimitotic agents on microcuttings of tangerine trees 'Fremont' (*Citrus clementina* Hort. ex Tan. × *C. reticulata* Blanco), 'Dancy' (*C. tangerina*), and 'Clementina Honey' (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.). Different concentrations of colchicine (0 to 2500 mg/L⁻¹) and oryzalin (0 to 25.977 mg/L⁻¹) were tested in liquid WPM medium, with exposure durations of 24 and 48 hours. Flow cytometry analysis identified plants with varying ploidy levels. For 'Clementina Honey' and 'Dancy,' the highest tetraploid induction was achieved with 500 mg/L⁻¹ of colchicine, while 'Fremont' showed the best results with 2500 mg/L⁻¹. Mixoploids were most frequent in 'Clementina Honey' at 40% (500 mg/L⁻¹, 24 h) and in 'Dancy' at 50% (2000 mg/L⁻¹, 24 h). In 'Fremont,' concentrations of 500 mg/L⁻¹ and 1500 mg/L⁻¹ induced 60% and 50% mixoploids, respectively. With oryzalin, concentrations of 10.3908 mg/L⁻¹ ('Clementina Honey'), 25.977 mg/L⁻¹ ('Dancy'), and 20.7816 mg/L⁻¹ ('Fremont') were most efficient for tetraploid induction. Mixoploids were primarily identified in 'Clementina Honey' (76.9%, 20.7816 mg/L⁻¹, 24 h), while 'Dancy' and 'Fremont' showed 25% and 66.7%, respectively, with specific doses. The results demonstrate that the efficiency of polyploid induction varies depending on genotype, antimitotic agent, concentration, and exposure time, allowing protocols to be optimized for higher tetraploid yields and reduced mixoploid occurrence.

Keywords: Citrus; Polyploidy; Antimitotic agents;

INTRODUÇÃO

O melhoramento genético de citros tem uma longa história de desenvolvimento, sendo iniciado na Flórida em 1893 por Swingle e Webber, conforme registrado por Davies; Albrigo (1994). Desde então, os esforços de melhoramento genético foram difundidos globalmente, com o intuito de melhorar variedades copa e porta-enxertos, especialmente em relação à resistência a doenças, produtividade e qualidade dos frutos, como destacado por Oliveira et al. (2014). O processo tradicional de obtenção de novas variedades enfrenta desafios significativos, incluindo fatores como características biológicas reprodutivas, incluindo apomixia, esterilidade parcial masculina e feminina, incompatibilidade cruzada e autopolinização, alto nível de heterozigosidade, longo período juvenil, entre outros (RAVEH et al., 2020).

Nesse contexto desafiador, as técnicas biotecnológicas têm desempenhado um papel crucial no avanço do melhoramento genético de citros. Segundo Germanà et al. (2020), a aplicação da biotecnologia tem contribuído significativamente para melhorar a qualidade da fruta para o mercado fresco e de processamento, além de resolver problemas relacionados a doenças, tais como X, Y e Z, que tem afetado a indústria citrícola nacional, causando prejuízo na ordem de X dólares.

Uma das técnicas biotecnológicas utilizadas é a indução *in vitro* de tetraploidia em citros por meio de agentes antimitóticos, tais como colchicina e orizalina. A tetraploidia, que implica na duplicação do número do conjunto cromossômico nas células, oferece oportunidades significativas para melhorar características agrônômicas e a adaptação das plantas ao estresse ambiental (NARUKULLA et al., 2023; ZOU et al., 2024).

A colchicina, derivada do açafrão-do-prado (*Colchicum autumnale* L.), induz poliploidia ao se ligar à tubulina, bloqueando a separação dos cromossomos na anáfase. Isso resulta na duplicação do material genético sem divisão celular. O tratamento desorganiza os microtúbulos e organelos, como o Golgi e o retículo endoplasmático, que são reorganizados após a remoção da colchicina. (NARUKULLA et al., 2023; SHARMA; SINGH, 2023).

De forma similar, a orizalina, herbicida da classe dos dinitroanilinas, promove a duplicação cromossômica ao ligar-se à α -tubulina. Nesse caso, ocorre a formação de um complexo que impede a formação do fuso mitótico, estrutura essencial para a correta migração dos cromossomos. Com o bloqueio dessa função, os cromossomos permanecem na célula, resultando na duplicação do material genético sem a separação celular (TOUCHELL, PALMER; RANNEY, 2020). Esse mecanismo tem sido bem-sucedido na indução de poliploidia em várias culturas, incluindo citros (TAN et al., 2017).

Plantas cítricas tetraploides apresentam maior tolerância à seca por meio da regulação sinérgica da fotossíntese, fosforilação e mudanças hormonais (JINGLONG et al., 2022). Estudos conduzidos por Gunasekaran et al. (2020) demonstraram que a tetraploidia induz alterações na morfologia, citologia, composição de óleo essencial, expressão gênica e atividade antioxidante. Os tetraploides resultantes de pólen não reduzido em hibridações fornecem informações sobre padrões de herança e aplicações potenciais de citros tetraploides em programas de melhoramento (HOUSSEM et al., 2017). De acordo com Dushimimana et al. (2023), uma das principais vantagens reprodutivas associadas às plantas tetraploides é a capacidade de gerar descendentes triploides, que tipicamente produzem frutos sem sementes, característica desejável na produção comercial de frutas.

Dessa forma, o objetivo do presente estudo, foi de realizar a indução in vitro de tetraploidia em três tangerineiras: 'Clementina Honey' (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.), 'Dancy' (*C. tangerina* Hort. ex Tan.) e 'Fremont' (*C. clementina* Hort. ex Tan. x *C. reticulata* Blanco), visando utilizá-los como novos recursos nos programas de melhoramento genético.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos, localizado no Núcleo de Biologia Avançada da Embrapa Mandioca e Fruticultura, no município de Cruz das Almas, Bahia. Os frutos das seguintes tangerineiras foram utilizados: 'Clementina Honey' (*C. clementina* Hort. ex Tan.), 'Dancy' (*C.*

tangerina Hort. ex Tan.) e 'Fremont' (*Citrus clementina* Hort. ex Tan. x *C. reticulata* Blanco), provenientes do Banco Ativo de Germoplasma de Citros (BAG Citros) da referida instituição.

Dezessete (17) explantes com 1,5 cm de comprimento, obtidos de plântulas de sementes previamente cultivadas, com idade de aproximadamente 160 dias, foram inseridos em Erlenmeyer contendo meio de cultura WPM líquido, composto por sais do meio WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980), acrescido de diferentes concentrações de colchicina (0 mg/L⁻¹; 500 mg/L⁻¹; 1000 mg/L⁻¹; 1500 mg/L⁻¹; 2000 mg/L⁻¹; 2500 mg/L⁻¹) e de orizalina (0 mg/L⁻¹, 5,1954 mg/L⁻¹, 10,3908 mg/L⁻¹, 15,5862 mg/L⁻¹, 20,7816 mg/L⁻¹, 25,977mg/L⁻¹).

Os Erlenmeyer foram mantidos em condições de escuro, sob agitação constante a 105 rpm, por períodos de 24 e 48 horas. Após esse procedimento, os explantes foram lavados três vezes com água de osmose reversa autoclavada, e foi feito um corte transversal nas extremidades de cada miniestaca para remoção de áreas necrosadas. Em seguida, os explantes foram transferidos para meio de cultura WPM, acrescido de sacarose a 30 g L⁻¹ e solidificado com 2,4 g L⁻¹ de Phytigel®, com pH ajustado para 5,8, sem a presença dos agentes antimicrobianos, com o objetivo de induzir a regeneração de plantas. Durante o desenvolvimento vegetal, os segmentos foram mantidos em uma sala de crescimento com temperatura de 27 ± 1 °C, intensidade luminosa de 30 μmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas.

Avaliação de sobrevivência, crescimento de miniestacas e detecção do nível de ploidia

A porcentagem de sobrevivência e as variáveis de desenvolvimento altura de parte aérea (APA, em cm), número de folhas verdes (NFV), número de folhas senescentes (NFS), número de miniestacas (NM) e o número de raízes (NR) foram avaliadas após 120 dias. Além dessas variáveis também foi realizada a análise de citometria de fluxo visando-se determinar a quantidade de DNA nuclear (valor C) das amostras, seguindo a metodologia descrita por Doležel et al. (2007), a fim de obter o nível de ploidia.

Para essa análise, foram coletadas uma folha de cada planta, separadamente, em câmara de fluxo laminar para manutenção das condições

assépticas. Em uma placa de Petri, cada amostra de folha foi triturada juntamente com o padrão de referência de DNA para citros, *Crotalaria breviflora* DC. (COSTA et al., 2019), contendo 1 mL de solução tampão de isolamento de núcleos de lise (LB01), e misturado com uma pipeta, para promover a liberação dos núcleos.

A suspensão de núcleos foi aspirada com pipeta e filtrada em tela de náilon 50 µm, em microtubo com capacidade de 2 mL. Em seguida, as amostras foram coradas com 0,20 µL de solução de iodeto de propídio. Posteriormente, as amostras foram analisadas por meio do Acoustic Focusing Cytometer Attune® (Life Technologies), obtendo-se o conteúdo de DNA nuclear (2C) (pg) das amostras, contabilizando no mínimo 10.000 eventos. A folha de citros possui 2C = 0,70 pg de DNA, enquanto a *Crotalaria breviflora* possui 2C = 2,02 pg de DNA. Assim, para determinar o teor de DNA em amostras de citros, o cálculo foi realizado utilizando a fórmula abaixo, descrita por Doležel et al. (2007):

Valor da amostra 2C (pg de DNA) =

$$\frac{\text{posição média do pico da amostra} \times \text{valor da referência 2C}}{\text{referência 2C da posição média do pico}}$$

A eficiência de indução de tetraploidia foi calculada usando o método de Bouvier et al. (1994) como segue:

$$\text{Eficiência de Indução (EIT)} = \text{Sobrevivência da Planta (\%)} \times \text{Indução de Tetraploide (\%)}$$

Delineamento experimental e análise estatística

Para cada um dos experimentos foi escolhido apenas um tipo de agente antimitótico (colchicina ou orizalina) e um genótipo ('Clementina', 'Dancy' ou 'Fremont'). Dessa forma, os experimentos foram dispostos em esquema fatorial (2x6), sendo 2 intervalos de tempo (24 e 48 horas) e 6 doses, sendo de colchicina (0 mg/L⁻¹; 500 mg/L⁻¹; 1000 mg/L⁻¹; 1500 mg/L⁻¹; 2000 mg/L⁻¹; 2500 mg/L⁻¹) ou 6 doses de orizalina (0 mg/L⁻¹, 5,1954 mg/L⁻¹, 10,3908 mg/L⁻¹, 15,5862 mg/L⁻¹, 20,7816 mg/L⁻¹ e 25,977mg/L⁻¹).

Todos os dados foram submetidos a testes para verificação dos pressupostos da análise de variância. Quando necessário foram feitas transformações para $\sqrt{x + 0.5}$ para atendimento dos pressupostos. Foi realizada a análise de variância a 5% de significância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. As análises foram realizadas com o pacote ExpDes.pt no programa R versão 4.3.2. (R CORE TEAM, 2023).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito da colchicina na sobrevivência e crescimento de miniestacas

A taxa de sobrevivência das plantas foi registrada após 120 dias da transferência dos explantes para o meio de cultura. As maiores taxas de sobrevivência ao agente colchicina foram observadas nos meios sem a adição do reagente (controle), para todas as espécies, nos dois tempos de exposição (Figura 1). De modo geral, a taxa de sobrevivência dos explantes diminuiu significativamente em resposta a um aumento na concentração.

Para o tempo de exposição de 24 horas, para a tangerineiras 'Clementina Honey' e 'Fremont', as menores taxas de sobrevivência (ambas de 5,6%) foram observadas nas doses de 2500 mg/L⁻¹ e 1500/mg L⁻¹ de colchicina, respectivamente (Figura 1). Já para a tangerineira 'Dancy', nas doses de 1000 mg/L, 1500 mg/L⁻¹ e 2500 mg/L⁻¹, houve a morte de todas as plantas cultivadas. Para o tempo de 48 horas, a menor taxa de sobrevivência (5,6%) ocorreu na dose de 2000 mg/L⁻¹ para Clementina 'Honey' e na dose de 1500 mg/L⁻¹ para 'Fremont'. Para a tangerineira 'Dancy', nas doses de 1000 mg/L, 2000 mg/L⁻¹ e 2500 mg/L⁻¹, não houve o desenvolvimento de plantas.

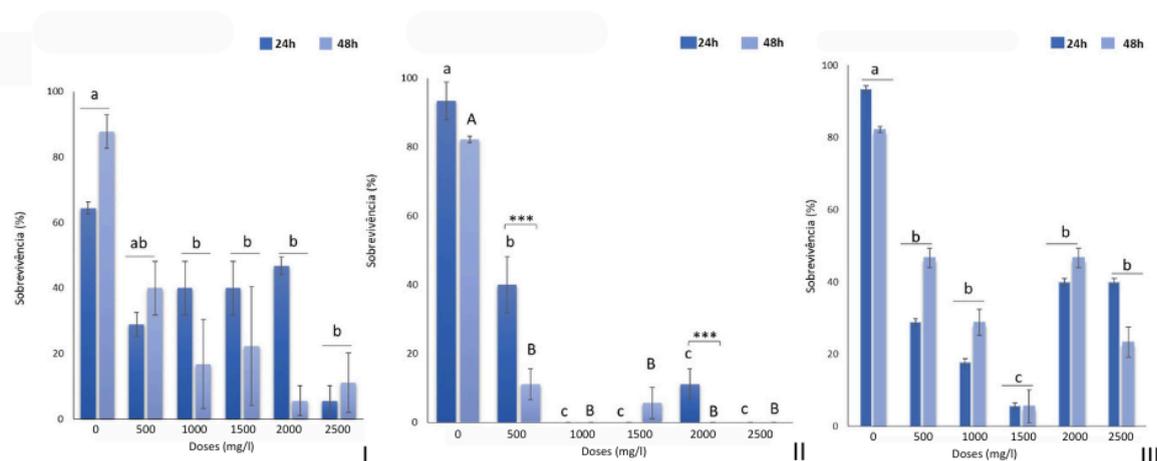


Figura 1. Percentual de sobrevivência tangerineiras: I) 'Clementina Honey' (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.), II) 'Dancy' (*C. tangerina* Hort. ex Tan.) e III) 'Fremont' (*C. clementina* Hort. ex Tan. x *C. reticulata* Blanco), após tratamento com diferentes concentrações de colchicina, nos dois tempos de exposição. As barras de cor azul escuro indicam o tempo de 24 horas enquanto as barra de cor azul claro indicam o tempo de 48 horas. Letras diferentes em cima das barras indicam diferenças significativas entre os tratamentos dentro dos experimentos. as letras minúsculas indicam o fator tempo e maiúsculas indicam fator dose

Os resultados obtidos na tangerineira 'Dancy' indicam que o fator genótipo tem uma influência significativa na taxa de sobrevivência dos explantes, sendo esse genótipo particularmente sensível às doses e tempos de exposição à colchicina, em relação aos demais.

Outras espécies de plantas tiveram desempenho semelhante como resultado de tais tratamentos. Exemplos incluem *Spathoglottis eburnea* Gagnep (Orchidaceae) (PORNCHUTI et al., 2015), o citrange 'C35', o limão mexicano e a laranja azeda (CIMEN, 2020; JOKARI; SHEKAFANDEH; JOWKAR, 2022). A taxa de mortalidade de explantes tratados com colchicina pode ser atribuída aos danos causados pela penetração da colchicina nas camadas celulares do meristema apical. A colchicina é um agente antimitótico, o que significa que há a interferência na formação de microtúbulos, estruturas essenciais para a divisão celular. Quando os microtúbulos são afetados, o processo de divisão celular é interrompido, o que pode impedir o crescimento adequado e levar à morte celular. Isso é especialmente crítico nas células do meristema apical, que são responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento da planta (ASCOUGH et al., 2008; AHIRWAR; VERMA, 2015).

A altura das plantas (APA) variou significativamente em resposta ao tratamento com colchicina (Tabela 1). A 'Clementina Honey' apresentou sensibilidade, exibindo uma diminuição na altura, conforme o aumento das doses. O mesmo ocorreu com a 'Dancy', que obteve médias bastante discrepantes nas duas doses avaliadas. No comportamento de 'Fremont', embora tenha havido uma redução na altura, houve uma constância nos valores, sem grandes variações com o aumento da dosagem.

Tabela 1. Médias de altura da parte aérea (APA, em cm), número de folhas verdes (NFV), número de folhas senescentes (NFS), número de miniestacas (NM) e número de raízes (NR), nas tangerineiras 'Clementina Honey' (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.), 'Dancy' (*C. tangerina* Hort. ex Tan.) e 'Fremont' (*C. clementina* Hort. ex Tan. x *C. reticulata* Blanco), tratados com diferentes concentrações de colchicina, em dois tempos de exposição.

'Clementina Honey' (<i>Citrus clementina</i> hort. ex Tanaka.)											
Doses mg/L ⁻¹	APA		NFV		NFS		NM		NR		
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	
0	3,20 ± 0,25 a	3,32 ± 0,18 a	3,20 ± 0,25 a	3,32 ± 0,18 a	3,20 ± 0,25 a	3,32 ± 0,18 a	3,20 ± 0,25 a	3,32 ± 0,18 a	3,20 ± 0,25 a	3,32 ± 0,18 a	
500	2,14 ± 0,26 b	2,03 ± 0,20 b	2,14 ± 0,26 b	2,03 ± 0,20 b	2,14 ± 0,26 a	2,03 ± 0,20 a	2,14 ± 0,26 b	2,03 ± 0,20 b	2,14 ± 0,26 b	2,03 ± 0,20 b	
1000	1,57 ± 0,15 b	1,30 ± 0,08 b	1,57 ± 0,15 b	1,30 ± 0,08 b	1,57 ± 0,15 a	1,30 ± 0,08 a	1,57 ± 0,15 b	1,30 ± 0,08 b	1,57 ± 0,15 b	1,30 ± 0,08 b	
1500	1,83 ± 0,15 b	1,46 ± 0,16 b	ab	1,46 ± 0,16 ab	1,83 ± 0,15 a	1,46 ± 0,16 a	1,83 ± 0,15 b	1,46 ± 0,16 b	1,83 ± 0,15 b	1,46 ± 0,16 b	
2500	1,53 ± 0,11 b	1,30 ± 0,07 b	1,53 ± 0,11 ab	1,30 ± 0,07 ab	1,53 ± 0,11 a	1,30 ± 0,07 a	1,53 ± 0,11 b	1,30 ± 0,07 b	1,53 ± 0,11 b	1,30 ± 0,07 b	
Média	2,16 ± 0,15	2,46 ± 0,19	5,32 ± 0,64	6,68 ± 0,74	2,42 ± 0,41 a**	1,45 ± 0,41 b	5,32 ± 0,14	6,68 ± 0,19	5,32 ± 0,14	0,87 ± 0,20	
CV (%)	10,73 %		27,89 %		46,89 %		12,54 %		23,73 %		
'Dancy' (<i>C. tangerina</i> hort. ex Tanaka.)											
Doses mg/L ⁻¹	APA		NFV		NFS		NM		NR		
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	
0	3,06 ± 0,12 aB	3,83 ± 0,20 aA	11,87 ± 0,75 a	15,21 ± 1,49 a	2,44 ± 0,73	1,64 ± 0,49	2,89 ± 0,24	3,64 ± 0,16	3,25 ± 0,46 a	3,29 ± 0,50 a	
500	1,45 ± 0,19 b	1,00 ± 0,00 b	3,00 ± 1,05 b	4,00 ± 0,00 b	0,67 ± 0,61	0,50 ± 0,35	1,17 ± 0,26 b	0,50 ± 0,35 b	0,67 ± 0,44 b	0,50 ± 0,35 b	
Média	2,63 ± 0,19	3,48 ± 0,29	9,46 ± 1,05	13,8 ± 1,60	1,95 ± 0,61	1,50 ± 0,44	2,41 ± 0,26	3,2 ± 0,30	2,5 ± 0,44	2,94 ± 0,50	
CV (%)	9,18 %		18,53 %		52,36 %		14,24 %		32,91 %		
'Fremont' (<i>C. clementina</i> hort. ex Tanaka x <i>C. reticulata</i> Blanco)											
Doses mg/L ⁻¹	APA		NFV		NFS		NM		NR		
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	
0	2,40 ± 0,12	2,87 ± 0,30	7,81 ± 0,79 a	6,00 ± 0,09 a	2,25 ± 0,42 a	3,46 ± 0,62 a	1,56 ± 0,12	2,00 ± 0,00	1,50 ± 0,18 a	1,61 ± 0,17 a	
500	1,50 ± 0,0 b	1,50 ± 0,0 b	2,60 ± 1,00 b	3,13 ± 0,62 b	0,80 ± 0,18 b	0,38 ± 0,25 b	1,00 ± 0,00 b	1,00 ± 0,00 b	0,00 ± 0,00 b	0,00 ± 0,00 b	
1000	1,50 ± 0,0 b	1,50 ± 0,0 b	2,00 ± 0,00 b	1,60 ± 0,35 b	0,33 ± 0,27 b	0,00 ± 0,00 b	1,00 ± 0,00 b	1,00 ± 0,00 b	0,00 ± 0,00 b	0,00 ± 0,00 b	
2000	1,50 ± 0,0 b	1,50 ± 0,0 b	1,17 ± 0,15 b	2,00 ± 0,43 b	0,00 ± 0,00 b	0,13 ± 0,12 b	1,00 ± 0,00 b	1,00 ± 0,00 b	0,00 ± 0,00 b	0,00 ± 0,00 b	
2500	1,64 ± 0,13 b	1,50 ± 0,0 b	2,71 ± 0,56 b	2,50 ± 0,56 b	0,29 ± 0,26 b	0,00 ± 0,00 b	1,14 ± 0,13	1,00 ± 0,00 b	0,14 ± 0,13 b	0,00 ± 0,00 b	

Média	1,91 ± 0,09	1,97 ± 0,00	4,59 ± 0,60	3,61 ± 0,39	1,16 ± 0,25	1,29 ± 0,32	1,27 ± 0,07	1,34 ± 0,07	0,68 ± 0,14	0,55 ± 0,13
CV (%)	5,64 %		23,39 %		33,22 %		7,26 %		17,59 %	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula em cada coluna e maiúscula em cada linha não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelos testes de Tukey, (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

O número de folhas verdes (NFV) foi igualmente prejudicado por concentrações elevadas. Houve uma relação clara entre a dose aplicada e a redução do número de folhas em todos os genótipos. Em 'Clementina Honey', os resultados variaram entre $3,20 \pm 0,25\%$ a $1,53 \pm 0,11\%$ em 24 horas resultado semelhante em 48 horas. Na 'Dancy' houve variação crescente à medida que aumentava as doses de colchicina $11,87 \pm 0,75\%$ a $3,00 \pm 1,05\%$ em 24 horas. Já para 'Fremont', os resultados foram semelhantes aos demais genótipos, à medida que aumentava as doses o número de folhas verdes diminuía $7,81 \pm 0,79\%$ a $2,71 \pm 0,56\%$, não houve diferença estatística.

A colchicina também provocou efeitos variáveis no número de folhas senescentes (NFS) entre os genótipos. Para 'Clementina Honey', o tratamento não resultou na diferença estatística entre as doses estudadas. No entanto, em 'Dancy' e 'Fremont' a medida que aumentava as concentrações de colchicina diminuía o número de folhas senescentes. Em 'Fremont', a quantidade de folhas senescentes chegou a zero 1000 mg/L^{-1} e 2500 mg/L^{-1} em 48 horas de exposição e na dose 2000 mg/L^{-1} para 24 horas de exposição ao antimetabólito. Essas variações refletem a diversidade genética na resposta ao tratamento.

Na análise de variância, o genótipo 'Clementina Honey' apresentou maior número de miniestacas (NM) na dose controle. Para 'Dancy', houve interação significativa entre doses e tempo para o número de miniestacas, com a dose de 500 mg/L inibindo o crescimento independentemente do tempo de exposição. No controle, por não estar sendo influenciado por concentrações de colchicina, a planta desenvolveu, e influenciou no número de miniestacas que aumentou com o tempo devido ao desenvolvimento vegetativo. Na tangerineira 'Fremont', o tratamento controle resultou no maior número de miniestacas formadas, destacando-se em relação aos demais tratamentos avaliados, enquanto doses de 500 mg/L^{-1} a 2500 mg/L^{-1} tiveram efeito tóxico, resultando em médias semelhantes. O tempo de exposição não afetou significativamente a formação de miniestacas, exceto na dose de 2500 mg/L^{-1} , onde houve uma leve variação.

Na análise do número de raízes (NR), 'Clementina Honey' revelou um comportamento dependente da dose, com estabilização do efeito inibitório já a partir da dose de 500 mg/L^{-1} , independentemente do tempo de exposição a colchicina. A tangerineira 'Dancy' apresentou uma queda na dose de 500 mg/L^{-1} em comparação a dose controle. Já o híbrido 'Fremont' demonstra uma

sensibilidade extrema, com supressão completa do crescimento radicular a partir da dose mínima de 500 mg/L⁻¹.

O aumento da concentração de colchicina revela um padrão consistente de impacto negativo no crescimento das variedades analisadas, refletido em diversos parâmetros. Os efeitos adversos das doses mais elevadas são atribuídos ao estresse fisiológico e à toxicidade induzidos pela colchicina. Esses achados corroboram com os estudos de Azevedo (2022), Mastuti, Munawarti e Afiyanti (2022), Sajjad et al. (2012) e Majd et al. (2013), que também observaram um retardo nos parâmetros de crescimento em Ananas, *Physalis angulata* L., calêndula e *Narcissus tazetta* L. após o tratamento com colchicina. Pesquisas de Al-Jubouri e Alqaisi (2023), Allafe e Adam (2022) e Singh et al. (2020) com petúnias, sementes de trigo e mutantes de laranja doce, também mostraram que concentrações e tempos de exposição variáveis à colchicina podem inibir a altura da planta, a formação e o crescimento de brotos, afetando o número de folhas, altura dos brotos e desenvolvimento radicular.

Citometria de fluxo e eficiência de indução

Foram identificados três níveis de ploidia por meio da análise de citometria de fluxo: diploide, mixoploide e tetraploide (Fig. 3). Estudos anteriores em lima mexicana, laranja azeda, buganvílias, bananeiras e *Neolamarckia cadamba* também utilizaram essa técnica com sucesso (JAKARI et al., 2022; LI et al., 2024; HERLINA et al., 2024; HO et al., 2024).

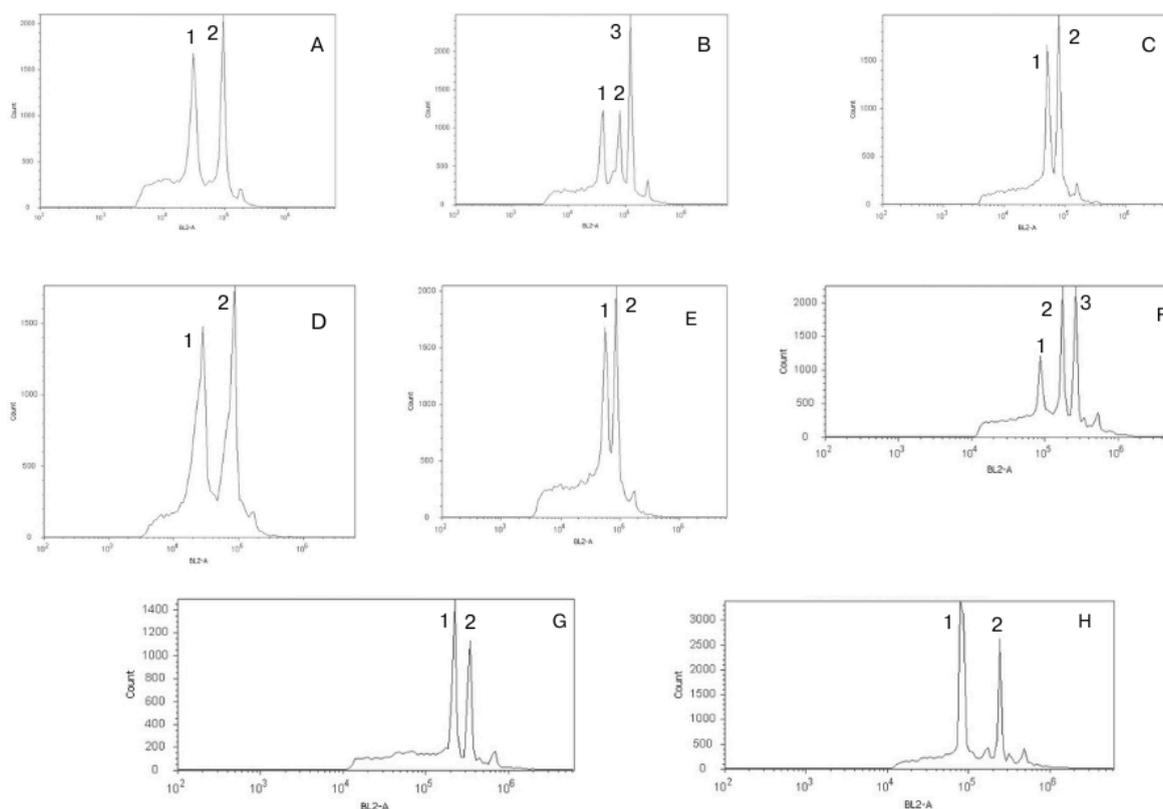


Figura 3. Histogramas obtidos por análise de citometria de fluxo. A) Folhas de 'Clementina Honey' com picos diploides (1) e controle (*Crotalaria breviflora* DC) (2). B) 'Clementina Honey' mostrando picos diploides (1), tetraploides (2) e controle (3). C) Folhas de 'Clementina Honey' com picos tetraploides (1) e controle (2). D) Folhas de 'Dancy' com picos diploides (1) e controle (2). E) 'Dancy' apresentando picos tetraploides (1) e controle (2). F) Folhas de 'Fremont' com picos diploides (1), tetraploides (2) e controle (3) G) 'Fremont' mostrando picos tetraploides (1) e controle (2). H) 'Fremont' com picos diploides (1) e controle (2).

As diferentes concentrações de colchicina e tempos de exposição nos genótipos 'Clementina Honey', 'Dancy', e 'Fremont' demonstraram que a eficácia da indução de tetraploidia (EIT) varia significativamente conforme a dose aplicada e a duração do tratamento.

Na Tabela 2, os resultados para explantes de 'Clementina Honey' mostram que, em 24 horas, a dose de 2000 mg/L^{-1} foi a mais eficaz, com eficiência de indução de tetraploides (EIT) de 12,5%, sugerindo que essa concentração induz tetraploidia de forma relativamente eficiente em um curto período. Já em 48

horas, a dose de 500 mg/L⁻¹ apresentou a maior eficiência, atingindo EIT de 40,0%, indicando que o aumento do tempo de exposição otimiza a indução com menores doses do agente antimitótico. A dose de 2000 mg/L⁻¹, no tempo de 48 horas, no entanto, reduziu sua eficácia para 5,6%, mostrando que a exposição prolongada interferiu negativamente na indução de tetraploides. Adicionalmente, as taxas máximas de mixoploides foram de 40% e 12,5%, observadas com 500 mg/L⁻¹ e 2000 mg/L⁻¹ de colchicina em 24 horas, respectivamente.

Tabela 2. Ploidia e níveis de ploidia de explantes de citros e eficiência de indução de tetraploides (EIT), em %, sob exposição à colchicina.

'Clementina Honey' (<i>Citrus clementina</i> hort. ex Tanaka.)								
Doses mg/L ⁻¹	Diploide (2x)		Mixoploide		Tetraploide (4x)		(EIT) (%)	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
0	100	100	0,0	0,0	0,0	0,0	00	0,0
500	40,0	0,0	40,0	0,0	20,0	100	5,8	40,0
1000	14,0	33,3	0,0	0,0	86,0	66,7	0,0	11,1
1500	0,0	25,0	0,0	0,0	100	75,0	0,0	16,7
2000	100	0,0	12,5	0,0	87,5	100	12,5	5,6
2500	0,0	100	0,0	0,0	100	100	0,0	11,1

'Dancy' (<i>C. tangerina</i> hort. ex Tanaka.)								
Doses mg/L ⁻¹	Diploide (2x)		Mixoploide		Tetraploide (4x)		(EIT) (%)	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
0	100	100	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
500	0,0	0,0	0,0	0,0	100	100	40,0	11,1
1000	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1500	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2000	50,0	0,0	50,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2500	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

'Fremont' (<i>Citrus clementina</i> hort. ex Tanaka x <i>C. reticulata</i> Blanco)								
Doses mg/L ⁻¹	Diploide (2x)		Mixoploide		Tetraploide (4x)		(EIT) (%)	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
0	100	100	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
500	40,0	37,5	60,0	25,0	0,0	25,0	0,0	11,7
1000	66,7	100	33,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1500	0,0	0,0	0,0	50,0	100	50,0	5,6	2,8
2000	33,3	37,5	16,7	25,0	50,0	37,5	20,0	17,5
2500	28,6	66,7	0,0	33,3	71,4	0,0	28,6	0,0

Para o genótipo 'Dancy', a dose de 500 mg/L⁻¹ de colchicina demonstrou eficácia na indução de tetraploidia, apresentando uma dependência significativa do tempo de exposição. Após 24 horas, a EIT alcançou 40,0%, indicando que essa concentração é particularmente eficaz em um curto período de tratamento. Contudo, após 48 horas, a EIT foi reduzida para 11,1%, sugerindo uma diminuição na eficácia com o prolongamento da exposição. As demais concentrações não exibiram eficácia na indução de tetraploides, mas promoveram a indução de mixoploidia, especialmente com a dose de 2000 mg/L⁻¹ após 24 horas de exposição.

Os explantes de 'Fremont' tratados com diferentes concentrações de colchicina demonstraram que, após 24 horas, as doses mais elevadas apresentaram maior eficácia na indução de tetraploidia. A dose de 2500 mg/L⁻¹ resultou na maior EIT, com 28,6%, seguida pela dose de 2000 mg/L⁻¹, que alcançou uma EIT de 20,0%. A dose de 1500 mg/L⁻¹ exibiu a menor EIT, de 5,6%. Ao estender o tempo de exposição para 48 horas, a dose de 2000 mg/L⁻¹ revelou-se a mais eficiente, atingindo uma EIT de 17,5%. Além disso, foram obtidas taxas máximas de mixoploidia de 60,0% e 50,0% com as doses de 500 mg/L⁻¹ e 1500 mg/L⁻¹ de colchicina, respectivamente, após exposições de 24 e 48 horas.

A eficiência na indução de ploidia e tetraploidia em explantes cítricos tem sido amplamente investigada por meio de tratamentos com colchicina. Diversas concentrações e tempos de exposição foram testados para promover a tetraploidia em espécies como limão áspero, limão cravo, Alemow e citrange 'C35', resultando em taxas de poliploidização bem-sucedidas que variaram de 18,3% a mais de 50%. (GROSSER; KAINTH; DUTT, 2014; WULANDARI et al., 2015; CIMEN, 2020; NARUKULLA et al., 2023).

Efeito da orizalina na sobrevivência e crescimento de miniestacas

A taxa de sobrevivência das plantas foi monitorada 120 dias após a transferência dos explantes para o meio WPM. Os dados obtidos, ilustrados nas taxas de sobrevivência dos genótipos (Figura 2), revelaram variações significativas em relação às concentrações de tratamento e aos tempos de exposição avaliados.

Após 24 horas, constatou-se uma taxa de 100% no genótipo 'Clementina Honey' nas concentrações de 20.7816 mg/L⁻¹ e 25.977 mg/L⁻¹, enquanto no genótipo 'Dancy', a sobrevivência total foi observada nas doses de 5.1954 mg/L⁻¹, 10.3908 mg/L⁻¹ e 20.7816 mg/L⁻¹. Em 48 horas, o percentual total foi registrado em Clementina 'Honey' nas concentrações de 10.3908 mg/L⁻¹, 15.5862 mg/L⁻¹ e 25.977 mg/L⁻¹, além de 'Fremont' nas concentrações de 0 mg/L⁻¹ (controle) e 25.977 mg/L⁻¹.

As menores taxas em 24 horas foram identificadas em 'Clementina Honey', com 71,13% e 76,67% nas concentrações de 0 mg/L⁻¹ (controle) e 10.3908 mg/L⁻¹, respectivamente. Para 'Fremont', foi de 76,67% nas doses de 10.3908 mg/L⁻¹, 15.5862 mg/L⁻¹ e 20.7816 mg/L⁻¹. Em 48 horas, as taxas mais baixas foram em 'Clementina Honey' foram de 82,2% para as doses de 5.1954 mg/L⁻¹ e 20.7816 mg/L⁻¹, em 'Dancy' com 71,13% e 64,47% nas concentrações de 10.3908 mg/L⁻¹ e 15.5862 mg/L⁻¹, enquanto em 'Fremont', a taxa foi de 70% na dose de 5.1954 mg/L⁻¹. Esses resultados indicam que a sensibilidade à orizalina apresenta variações significativas entre os genótipos, dependendo tanto da concentração, quanto do tempo de exposição.

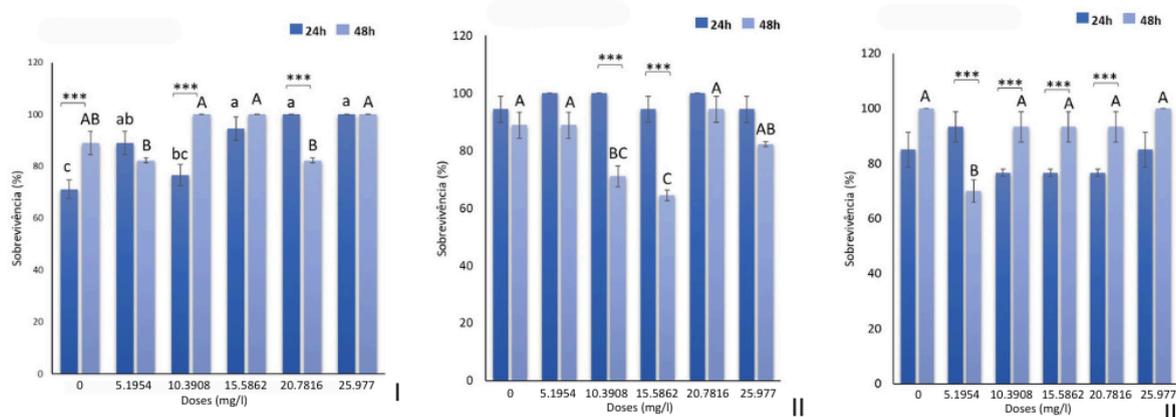


Figura 2. Percentual de sobrevivência tangerineiras: I) 'Clementina Honey' (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.), II) 'Dancy' (*C. tangerina* Hort. ex Tan.) e III) 'Fremont' (*C. clementina* Hort. ex Tan. x *C. reticulata* Blanco), após tratamento com diferentes concentrações de orizalina, nos dois tempos de exposição. As barras de cor azul escuro indicam o tempo de 24 horas enquanto as barra de cor azul claro indicam o tempo de 48 horas. Letras diferentes em cima das barras indicam diferenças significativas entre os tratamentos dentro dos experimentos, as letras minúsculas indicam o fator tempo e maiúsculas indicam fator dose, barras sem letras indica que não houve diferenças significativas.

Os resultados deste estudo contrastam com investigações realizadas em outras espécies vegetais. Nos trabalhos com *Lilium hybrida* var. Polyanna, mandioca, *Populus alba* L. × *P. glandulosa* P. Mill. × *P. tomentosa* Carr., *Melissa officinalis* L. e *Mentha spicata* L., Chandanie et al. (2010), Carvalho et al. (2016), Zeng et al. (2019) e Bharati et al. (2023) relataram que a taxa de sobrevivência dos explantes tratados diminuiu exponencialmente com o aumento da concentração e da duração da exposição à orizalina. Em contrapartida, nos cultivares de berinjela Karnaz F1 e Faselis F1, os tratamentos com orizalina apresentaram resultados variados em relação à sobrevivência dos explantes, conforme observado por Kuhlalioglu (2017). Assim, é evidente que a toxicidade da orizalina é influenciada pela espécie, pelo tempo de exposição e pela dose aplicada.

As plantas demonstraram variação nas variáveis analisadas (Tabela 3), incluindo a altura, possivelmente em decorrência do uso do agente antimetabólico orizalina. No genótipo 'Clementina Honey', a interação entre doses e tempos de exposição não foi significativa ($p > 0,05$), indicando que os fatores não interagiram. Contudo, o tempo de tratamento apresentou efeitos significativos.

A análise do genótipo 'Dancy' revelou que a dose exerce um impacto significativo na APA, enquanto o tempo de exposição não apresentou efeito direto.

Nos resultados para 'Fremont', indica-se que o tempo de exposição exerce maior influência no número de folhas verdes do que as doses aplicadas, sendo que 48 horas proporcionaram os melhores resultados, com exceção da dose de 25.977 mg/L⁻¹.

Tabela 3. Caracterização morfológica dos explantes tratados com concentrações de orizalina, altura da parte aérea (APA) e número de folhas verdes (NFV).

Clementina Honey' (Citrus clementina hort. ex Tanaka.)		
Doses mg/L ⁻¹	APA	
	24h	48h
0	2,67 ± 0,20 a	2,53 ± 0,11 a
5,1954	2,77 ± 0,18 a	2,59 ± 0,15 a
10,3908	2,58 ± 0,24 ab	2,49 ± 0,10 ab
15,5862	2,37 ± 0,15 ab	1,94 ± 0,12 ab

20,7816	2,88 ± 0,16 a	2,64 ± 0,15 a
25,977	2,68 ± 0,15 ab	2,24 ± 0,14 ab
Média	2,66 ± 0,07 a***	2,39 ± 0,06 b
CV (%)	10,54 %	
Dancy' (C. tangerina hort. ex Tanaka.)		
APA		
Doses mg/L ⁻¹	24h	48h
0	2,68 ± 0,09 a	2,93 ± 0,09 a
5,1954	2,74 ± 0,19 aA	2,09 ± 0,15 bB
10,3908	1,90 ± 0,21 b	2,20 ± 0,12 ab
15,5862	2,47 ± 0,16 ab	2,85 ± 0,22 ab
20,7816	2,84 ± 0,23 a	2,52 ± 0,20 ab
25,977	2,18 ± 0,15 ab	2,26 ± 0,13 ab
Média	2,49 ± 0,08	2,47 ± 0,07
CV (%)	11,51 %	
Fremont' (Citrus clementina hort. ex Tanaka C. reticulata Blanco)		
NFV		
Doses mg/L ⁻¹	24h	48h
0	3,55 ± 0,80	5,62 ± 0,55
5,1954	3,08 ± 0,53	3,33 ± 0,44
10,3908	3,10 ± 0,36	3,25 ± 0,54
15,5862	3,20 ± 0,53	3,58 ± 0,47
20,7816	2,22 ± 0,34	3,83 ± 1,05
25,977	4,00 ± 0,53	3,50 ± 0,33
Média	3,23 ± 0,23 b	3,89 ± 0,22 a**
CV (%)	23,02 %	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula em cada coluna e maiúscula em cada linha não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelos testes de Tukey, (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

Os resultados das médias dos descritores morfológicos, apresentados na Tabela 4, ressaltam a relevância desses parâmetros na avaliação da variabilidade genética em plantas, facilitando a identificação de genótipos superiores para o setor produtivo. Investigações recentes, como as realizadas com batata na Colômbia Danita (2024), trigo na Índia, Chauhan et al. (2023), *Catharanthus*

roseus (L.) G.Don, Soares et al. (2024) e diversos genótipos em Jabalpur, Índia Jawarkar et al. (2024), corroboram a importância dessa abordagem.

Para a variável número de folhas verdes (NFV) em 'Clementina Honey', observou-se que nas concentrações de 20,7816 mg/L⁻¹ e 25,977 mg/L⁻¹ as médias diferem significativamente entre os tempos, sendo mais altas no tempo de 48 horas, sugerindo que o efeito da dose, nesta variável, para essa espécie, varia conforme a duração, especialmente nos níveis mais elevados. Por sua vez, o genótipo 'Dancy' mostrou efeitos significativos tanto das doses quanto do tempo, com a concentração de 5,1954 mg/L⁻¹ apresentando a menor média para ambos os períodos.

Tabela 4. Caracterização morfológica dos explantes tratados com concentrações de orizalina, altura da parte aérea (APA), número de folhas verdes (NFV), número de folhas senescentes (NFS), número de miniestacas (NM), número de raiz (NR).

Clementina Honey' (Citrus clementina hort. ex Tanaka.)									
Doses mg/L ⁻¹	NFV		NFS		NM		NR		
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	
0	9,58 ± 1,60 a	6,60 ± 1,31 a	1,75 ± 0,68 abB	3,80 ± 0,60 aA	2,83 ± 0,26 a	2,47 ± 0,16 a	1,50 ± 0,30 a	1,00 ± 0,25 a	
5,1954	9,47 ± 1,08 a	6,86 ± 1,02 a	0,40 ± 0,18 bB	2,64 ± 0,61 aA	2,60 ± 0,21 a	2,57 ± 0,19 a	1,27 ± 0,33 a	1,21 ± 0,31 a	
10,3908	6,69 ± 1,02 a	7,29 ± 0,82 a	1,69 ± 0,35 abA	0,35 ± 0,12 bB	2,38 ± 0,23 a	2,35 ± 0,17 a	0,69 ± 0,25 a	1,05 ± 0,26 a	
15,5862	6,69 ± 0,84 a	7,24 ± 0,74 a	0,69 ± 0,28 b	0,24 ± 0,13 b	2,50 ± 0,20 a	2,47 ± 0,30 a	0,75 ± 0,19 a	1,12 ± 0,20 a	
20,7816	7,35 ± 0,82 B	10,07 ± 0,68 A	1,82 ± 0,61 abA	0,29 ± 0,16 bB	2,53 ± 0,17 a	3,29 ± 0,24 a	1,65 ± 0,28 a	0,93 ± 0,12 a	
25,977	5,81 ± 0,52 B	8,88 ± 1,11 A	2,38 ± 0,51 aA	0,76 ± 0,28 bB	2,44 ± 0,16 a	3,18 ± 0,27 a	1,31 ± 0,19 a	1,06 ± 0,28 a	
Média	7,52 ± 0,42	7,81 ± 0,42	1,45 ± 0,20	1,29 ± 0,20	2,53 ± 0,08	2,71 ± 0,10	1,20 ± 0,1	1,07 ± 0,10	
CV (%)	24,79 %		42,71 %		14,22 %		33,19 %		

Dancy' (C. tangerina hort. ex Tanaka.)									
Doses mg/L ⁻¹	NFV		NFS		NM		NR		
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	
0	8,94 ± 0,80 a	10,67 ± 0,70 a	1,00 ± 0,32 b	0,53 ± 0,34	2,88 ± 0,20 ab	2,73 ± 0,11 ab	1,06 ± 0,24	1,07 ± 0,22 ab	
5,1954	1,12 ± 0,31 cB	6,73 ± 0,70 bA	3,00 ± 0,20 aA	0,67 ± 0,32 B	3,00 ± 0,20 aA	1,93 ± 0,18 bB	1,59 ± 0,23 A	0,47 ± 0,16 bB	
10,3908	6,31 ± 0,75 ab	7,58 ± 1,06 ab	0,23 ± 0,12 bB	1,75 ± 0,72 A	2,08 ± 0,32 b	2,33 ± 0,27 ab	1,46 ± 0,55 B	2,67 ± 0,69 aA	
15,5862	5,41 ± 3,86 bB	8,82 ± 0,78 abA	0,18 ± 0,12 b	0,82 ± 0,38	2,53 ± 0,29 ab	3,00 ± 0,22 a	1,41 ± 0,33	2,18 ± 0,31 a	
20,7816	7,38 ± 0,98 ab	7,69 ± 0,67 ab	0,13 ± 0,08 bB	0,88 ± 0,17 A	3,19 ± 0,28 aA	2,50 ± 0,25 abB	1,69 ± 0,32	1,82 ± 0,38 ab	
25,977	6,88 ± 0,79 ab	7,57 ± 0,60 ab	0,88 ± 0,32 b	0,36 ± 0,19	2,00 ± 0,15 b	2,57 ± 0,17 ab	1,25 ± 0,34	2,00 ± 0,46 a	
Média	5,94 ± 0,41	8,17 ± 0,34	0,94 ± 0,14	0,81 ± 0,16	2,63 ± 0,11	2,49 ± 0,09	1,41 ± 0,14	1,67 ± 0,18	

CV (%)	23,01 %		38,22 %		14,97 %		36,82 %	
Fremont' (Citrus clementina hort. ex Tanaka. C. reticulata Blanco)								
	APA		NFS		NM		NR	
Doses mg/L ⁻¹	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
0	3,35 ± 1,11 a	2,08 ± 0,05 a	2,18 ± 0,56 a	1,08 ± 0,35 a	1,00 ± 0,00 abB	1,77 ± 0,12 aA	0,91 ± 0,24 a	0,31 ± 0,13 a
5,1954	1,46 ± 0,04 b	1,50 ± 0,00 b	1,33 ± 0,57 a	1,00 ± 0,38 a	1,17 ± 0,11 aB	1,44 ± 0,17 abA	0,25 ± 0,17 b	0,11 ± 0,10 b
10,3908	1,50 ± 0,00 b	1,50 ± 0,00 b	1,00 ± 0,32 a	0,17 ± 0,16 a	1,00 ± 0,00 ab	1,00 ± 0,00 c	0,00 ± 0,00 b	0,00 ± 0,00 b
15,5862	1,50 ± 0,00 b	1,50 ± 0,00 b	1,30 ± 0,40 a	1,25 ± 0,56 a	1,20 ± 0,13 a	1,08 ± 0,08 bc	0,00 ± 0,00 b	0,08 ± 0,09 b
20,7816	1,56 ± 0,05 b	1,58 ± 0,05 b	0,67 ± 0,22 a	1,25 ± 0,36 a	1,00 ± 0,00 ab	1,00 ± 0,00 c	0,22 ± 0,14 ab	0,25 ± 0,17 ab
25,977	1,54 ± 0,04 b	1,50 ± 0,00 b	0,92 ± 0,23 a	0,43 ± 0,19 a	0,83 ± 0,11 b	1,00 ± 0,00 c	0,33 ± 0,18 ab	0,07 ± 0,07 ab
Média	1,83 ± 0,21	1,62 ± 0,03	1,25 ± 0,18	0,85 ± 0,15	1,03 ± 0,04	1,21 ± 0,05	0,14 ± 0,08	0,14 ± 0,05
CV (%)	13,68 %		43,22 %		8,83 %		27,12 %	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula em cada coluna e maiúscula em cada linha não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelos testes de Tukey, (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

No estudo sobre o número de folhas senescentes (NFS), o genótipo 'Clementina Honey' apresentou uma forte correlação com a dose de orizalina e a duração da exposição. A aplicação da dose de 5,1954 mg/L⁻¹ resultou na máxima indução de senescência em 48 horas, com uma média de 2,64, evidenciando um efeito significativo. Em contraste, concentrações superiores, como 15,5862 mg/L⁻¹ e 20,7816 mg/L⁻¹, provocaram uma redução acentuada nas folhas senescentes, apresentando médias de 0,24 e 0,29 em 48 horas, respectivamente.

No genótipo 'Dancy', a dose de 5,1954 mg/L⁻¹ induziu um aumento no NFS em 24 horas, alcançando a média de 3,00, superando os valores do controle. Por outro lado, a concentração de 20,7816 mg/L⁻¹ resultou na menor quantidade de folhas senescentes em 24 horas, com uma média de 0,13, embora tenha aumentado para 0,88 em 48 horas, indicando que a eficácia da orizalina varia com o tempo de tratamento.

Para o genótipo 'Fremont' apesar das variações numéricas observadas, os resultados estatísticos indicam que tanto as doses de tratamento quanto o tempo de exposição (24h e 48h) não causaram mudanças significativas no número de folhas senescentes. Semelhante resultado a variável número de miniestacas em Clementina Honey.

No genótipo 'Dancy', a dose de 20,7816 mg/L⁻¹ demonstrou a maior média para número de miniestacas (NM) após 24 horas de tratamento, alcançando 3,19 de média. Essa concentração apresentou desempenho superior em relação a outras doses, sugerindo o não comprometimento da formação de miniestacas nesse intervalo. Em contraste, a dose de 5,1954 mg/L⁻¹ em 48 horas resultou na menor média, com 1,93, indicando uma resposta inferior em comparação com concentrações mais elevadas e o controle. Para o genótipo 'Fremont', a dose de 15,5862 mg/L⁻¹ resultou em um número médio de miniestacas de 1,20 após 24 horas, superando os resultados do controle. Entretanto, em 48 horas, nenhuma das doses testadas apresentou desempenho superior ao controle.

Clementina Honey os resultados estatísticos indicam que tanto as doses de tratamento quanto o tempo de exposição (24h e 48h) não causaram mudanças significativas no número de raízes (NR). A análise dos dados referente ao número de raízes no genótipo 'Dancy' indicou variações significativas em função das doses e dos tempos de exposição. A concentração de 10,3908 mg/L⁻¹ resultou na maior média de NR (2,67 cm), destacando-se como a menos inibitória. Em

contraste, a dose de 5,1954 mg/L⁻¹ apresentou a menor média (0,47). No genótipo 'Fremont', observou-se que as doses de 10,3908 mg/L⁻¹ e 15,5862 mg/L⁻¹ impactaram negativamente o desenvolvimento radicular em ambos os períodos de exposição.

A orizalina afeta o crescimento das plantas de maneira distinta, interferindo na estrutura dos microtúbulos, componentes essenciais do citoesqueleto que participam de diversos processos vegetais. Estudos demonstram que a orizalina inibe o crescimento radicular e a resposta gravitropismo em *Arabidopsis* ao estimular a produção de etileno, alterar a organização dos microtúbulos e interferir no crescimento da parede celular (GO; PARK; KIM, 2021).

Os resultados das médias das variáveis NM e NR em 'Clementina Honey', bem como o APA, NFV e NFS em 'Fremont', sugerem que os tratamentos com orizalina não apresentaram efeitos significativos em relação às doses ou ao tempo de exposição.

As plantas apresentaram variações nas respostas ao tratamento com orizalina, evidenciando que o agente mutagênico impacta o crescimento e desenvolvimento de diferentes genótipos de maneira distinta, sugerindo uma sensibilidade variável entre eles. Estudos com *Jasminum sambac* (L.) Aiton (VISHNUPANDI et al., 2024) demonstraram que a orizalina provocou efeitos tanto positivos quanto negativos em parâmetros como altura da planta, número de folhas e características de floração. Em *Tectona grandis* L.f., a aplicação de orizalina induziu poliploidia, resultando em alterações no crescimento, morfologia das folhas e teor de clorofila, além de aprimorar a capacidade de aclimatação das plântulas (FAUZAN et al., 2024).

Citometria de fluxo e eficiência de indução

Os resultados evidenciaram a presença de três níveis de ploidia (diploide, mixoploide e tetraploide), conforme demonstrado pela citometria de fluxo (Figura 4). Essa diversidade reflete a complexidade dos processos celulares associados à tetraploidização. Os distintos níveis de ploidia sugerem que a resposta celular à orizalina é altamente variável, dependendo da concentração aplicada e do tempo de exposição.

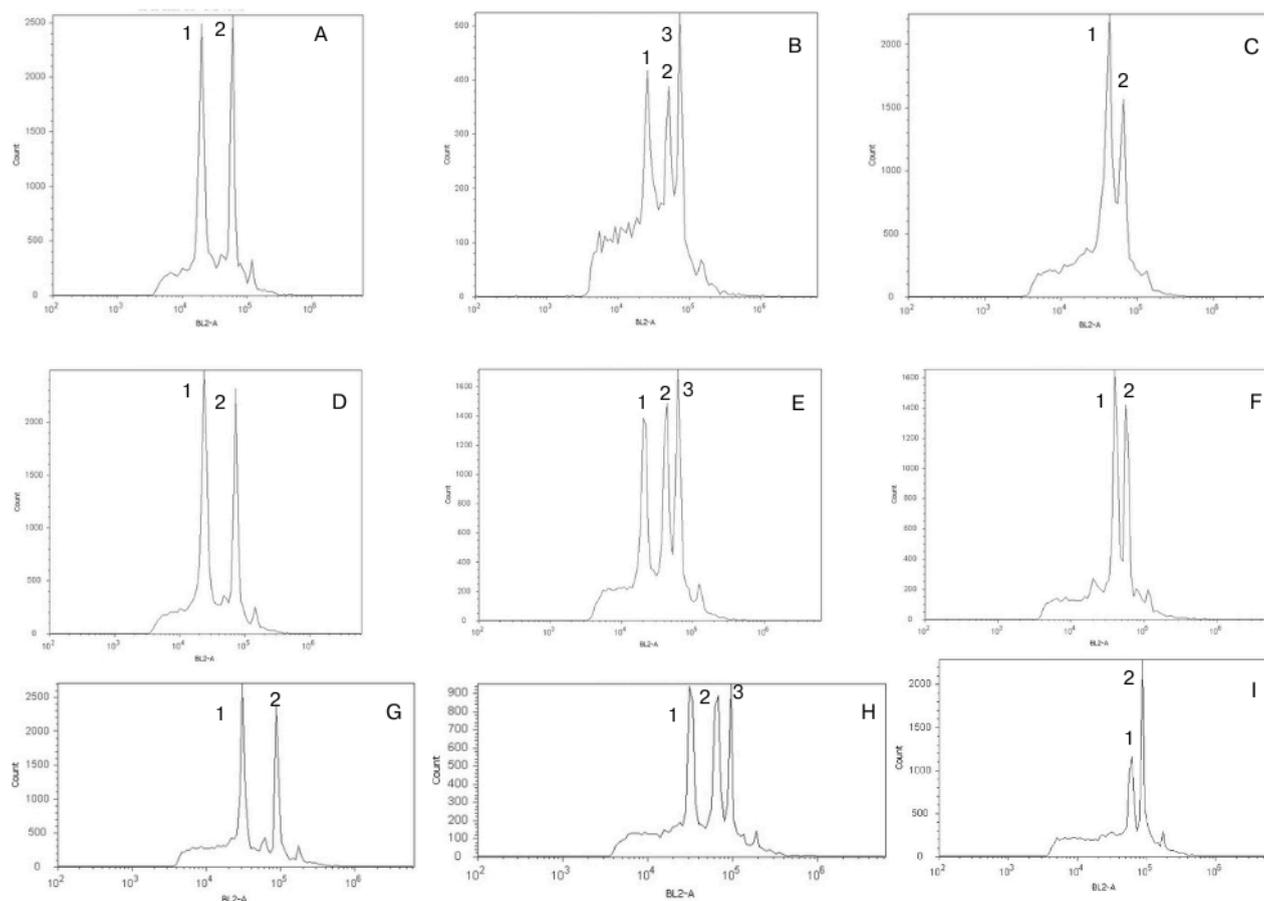


Figura 4. Histogramas obtidos por análise de citometria de fluxo. A) 'Clementina Honey' com picos diploides (1) e controle (diploide *Crotalaria breviflora* DC.), (2). B) 'Clementina Honey' com picos diploides (1), tetraploides (2) e controle (3). C) 'Clementina Honey' com picos tetraploides (1) e controle (2). D) 'Dancy' com picos diploide (1) e controle (2). E) 'Dancy' com picos diploide (1), tetraploide (2) e controle (3). F) 'Dancy' com picos tetraploide (1) e controle (2). G) 'Fremont' com picos diploide (1) e controle (2). H) 'Fremont' com picos haploides (1), diploides (2) e controle (3). I) 'Fremont' com picos tetraploides (1) e controle (2).

A análise da eficiência de indução de tetraploides (EIT) em explantes de 'Clementina Honey', 'Dancy' e 'Fremont', conforme apresentado na Tabela 5, revela aspectos críticos sobre a interação entre dose e tempo de exposição, com implicações significativas para a otimização da tetraploidização em plantas cítricas.

Para o genótipo 'Clementina Honey', os dados indicam que a concentração de 10,3908 mg/L⁻¹ de orizalina foi consistentemente eficaz, alcançando uma EIT

de 25,6% tanto em 24 quanto em 48 horas. Essa estabilidade sugere que essa concentração proporciona um equilíbrio ideal entre eficácia e toxicidade. Em contraste, doses mais elevadas ($15,5862 \text{ mg/L}^{-1}$ e $20,7816 \text{ mg/L}^{-1}$) resultaram em uma diminuição significativa da EIT. A manutenção da EIT em 48 horas com a dose de $10,3908 \text{ mg/L}^{-1}$ demonstra sua eficácia e viabilidade celular ao longo do tempo. No entanto, em relação à indução de mixoploides, a concentração de $20,7816 \text{ mg/L}^{-1}$ revelou-se a mais eficaz, com uma taxa de 76,9%.

Nos explantes do genótipo 'Dancy', durante o período de 24 horas, a concentração mais elevada de orizalina ($25,977 \text{ mg/L}^{-1}$) demonstrou maior eficácia na indução de tetraploides, com a dose de $25,977 \text{ mg/L}^{-1}$ alcançando uma EIT de 25,2%. Contudo, o tempo de exposição para 48 horas resultou em uma redução drástica na eficiência de todas as doses, exceto para $20,7816 \text{ mg/L}^{-1}$, que manteve uma EIT de 6,3%. Isso indica que, para o genótipo 'Dancy', um tempo de exposição prolongado pode intensificar os efeitos tóxicos da orizalina, comprometendo a viabilidade celular e, conseqüentemente, a eficácia da tetraploidização. A indução de mixoploides foi mais significativa em 24 horas, com concentrações de $10,3908 \text{ mg/L}^{-1}$ e $15,5862 \text{ mg/L}^{-1}$, apresentando uma taxa de 25,0%, mas não houve aumento substancial com a exposição prolongada.

Os resultados obtidos com explantes do genótipo 'Fremont' evidenciam uma clara dependência do tempo de exposição à orizalina. A dose de $20,7816 \text{ mg/L}^{-1}$ demonstrou ser a mais eficaz em 24 horas, resultando em uma EIT de 21,9%. No entanto, ao aumentar o tempo de exposição para 48 horas, observou-se uma redução acentuada na eficácia das doses, com a maioria delas não induzindo tetraploides. A concentração de $10,3908 \text{ mg/L}^{-1}$ foi a única que ainda apresentou alguma eficácia (EIT de 10,4%) após 48 horas, sugerindo que, para 'Fremont', a orizalina deve ser utilizada em períodos curtos, sendo as exposições prolongadas potencialmente prejudiciais. Além disso, a concentração de $15,5862 \text{ mg/L}^{-1}$ destacou-se na indução de mixoploides em 48 horas, alcançando 66,7%.

Tabela 5. Ploidia e níveis de ploidia de explantes de citros e eficiência de indução de tetraploides (EIT), em %, sob exposição à orizalina.

Clementina Honey' (Citrus clementina hort. ex Tanaka.)								
	Diploide (2x) (%)		Mixoploide (%)		Tetraploide (4x) (%)		(EIT) (%)	
Doses mg/L ⁻¹	24 (h)	48 (h)	24 (h)	48 (h)	24 (h)	48 (h)	24 (h)	48 (h)
0	100	100	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
5,1954	61,5	50,0	38,5	50	0,0	0,0	0,0	0,0
10,3908	41,7	64,7	25,0	11,8	33,3	23,5	25,6	25,6
15,5862	46,2	64,7	46,2	23,5	7,7	5,9	7,3	7,3
20,7816	15,4	85,7	76,9	0,0	7,7	14,3	7,7	6,3
25,977	50,0	82,4	50,0	17,6	0,0	0,0	0,0	0,0
Dancy'(C. tangerina hort. ex Tanaka.)								
	Diploide (2x) (%)		Mixoploide (%)		Tetraploide (4x) (%)		(EIT) (%)	
Doses mg/L ⁻¹	24 (h)	48 (h)	24 (h)	48 (h)	24 (h)	48 (h)	24 (h)	48 (h)
0	100	100	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
5,1954	78,6	83,3	21,4	16,7	0,0	0,0	0,0	0,0
10,3908	75,0,	88,9	25,0	11,1	0,0,	0,0	0,0	0,0
15,5862	50,0	88,9	25,0	11,1	25,,0	0,0	23,6	0,0
20,7816	75,0	73,3	8,3	20,0	16,7	6,7	16,7	6,3
25,977	60,0	84,6	13,3	15,4	26,7	0,0	25,2	0,0
Fremont' (Citrus clementina hort. ex Tanaka C. reticulata Blanco)								
	Diploide (2x) (%)		Mixoploide (%)		Tetraploide (4x) (%)		(EIT) (%)	
Doses mg/L ⁻¹	24 (h)	48 (h)	24 (h)	48 (h)	24 (h)	48 (h)	24 (h)	48 (h)
0	100	100	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
5,1954	50,0	66,7	50,0	33,3	0,0	0,0	0,0	0,0
10,3908	57,1	88,9	42,9	0,0	0,0	11,1	0,0	10,4
15,5862	70,0	33,3	10,0	66,7	20,0	0,0	15,3	0,0
20,7816	40,0	75,0	20,0	25,0	28,6	0,0	21,9	0,0
25,977	54,5	77,8	45,5	22,2	0,0	0,0	0,0	0,0

CONCLUSÕES

Considerando-se o conjunto de genótipos utilizados, tem-se:

A colchicina e a orizalina possibilitaram a indução de tetraploides nas tangerineiras estudadas.

A colchicina foi mais eficaz na indução de tetraploide, porém seus efeitos foram mais tóxicos em relação à orizalina.

A tangerineira 'Dancy' foi mais sensível aos efeitos tóxicos da colchicina.

Há indicativos de que a tetraploidização pode ser potencializada mediante reduções dos níveis de concentração de colchicina e aumentos dos de orizalina.

REFERÊNCIAS

AHIRWAR, R.; VERMA, R. C. Colchicine induced asynaptic chromosomal behavior at meiosis in *Allium cepa* L. **Nucleus**, v. 58, p. 47–51, 2015.

AL-JUBOURI, A. A. K.; ALQAISI, M. R. M. Effect of Colchicine Concentration and Exposure Duration on the Growth and Flowering of *Petunia hybrid* L. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 1213, p. 012038, 2023.

ALLAFE, M. A.; ADAM, A. R. Influence of Colchicine Concentrations on Wheat Seeds Germination and Seedling Quality. **Diyala Agricultural Sciences Journal**, v. 14, n. 1, p. 66–72, 2022.

ASCOUGH, G. D.; VAN STADEN, J.; ERWIN, J. E. Effectiveness of Colchicine and Oryzalin at Inducing Polyploidy in *Watsonia lepidota* N.E. Brown. **HortScience**, v. 43, n. 7, p. 2248-2251, 2008.

AZEVEDO, L. L. Indução à ploidia em *Ananas comosus* var. *erectifolius* (LB Smith) Coppens & Leal, na Amazônia Ocidental. 2022.

BHARATI, R.; FERNÁNDEZ-CUSIMAMANI, E.; GUPTA, A.; NOVY, P.; MOSES, O.; SEVEROVÁ, L.; SVOBODA, R.; ŠRÉDL, K. Oryzalin induces polyploids with superior morphology and increased levels of essential oil production in *Mentha spicata* L. **Industrial Crops and Products**, v. 198, p. 116683, 2023.

BHARATI, R.; GUPTA, A.; NOVY, P.; SEVEROVÁ, L.; ŠRÉDL, K.; ŽIAROVSKÁ, J.; FERNÁNDEZ-CUSIMAMANI, E. Synthetic polyploid induction influences morphological, physiological, and photosynthetic characteristics in *Melissa officinalis* L. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, p. 1332428, 2023.

BOUVIER, L.; FILLON, F.R.; LESPINASSE, Y. Oryzalin as an Efficient Agent for Chromosome Doubling of Haploid Apple Shoots in vitro. **Plant Breeding**, v. 113, p. 343-346, 1994.

CARVALHO, M. de J. da S.; GOMES, V. B.; SOUZA, A. da S.; AUD, F. F.; SANTOS-SEREJO, J. A.; OLIVEIRA, E. J. Inducing autotetraploids in cassava using oryzalin and colchicine and their in vitro morphophysiological effects.

Genetics and Molecular Research: GMR, v. 15, n. 2, article 10.4238/gmr.15028281, 2016.

CHANDANIE, M. A.; SINGH, Dr. Shiv Kumar; SINDHU, S. S.; SINGH, Anita; TOMAR, Shivmangal Singh; PRASAD, K. V. Efficacy of oryzalin as a potent chemical for in vitro induction of polyploids in Asiatic lily (*Lilium hybrida* L.) var. Polyanna. **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding**, v. 71, n. 3, p. 262-268, 2010.

CHAUHAN , P.; KUMAR , V.; SHRIVASTAVA , M. K.; PATEL , N.; BISWAL , M.; MATE , H. Agro-morphological Characterization of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Genotypes. **Journal of Experimental Agriculture International**, [S. I.], v. 45, n. 11, p. 122–129, 2023.

CIMEN, B. Induction of Polyploidy in C35 Citrange through in Vitro Colchicine Treatments of Seed-Derived Explants. **International Journal of Fruit Science**, v. 20, supl. 3, p. S1929–S1941, 2020.

COSTA, S. N.; CORTEZ, P. A.; ALMEIDA, L. A. H.; MARTINS, F.; SOARES FILHO, W. S.; COELHO FILHO, M. A.; GESTEIRA, A. D. S. Frequência triploide de hibridização sexual e desenvolvimento de pólen e ovário em tangerinas. **Brazilian Journal of Botany**, v. 42, n. 1, p. 73–82, 2019.

DANITA, A.-D. Morpho-Physiological Characterization of Potato (*Solanum Tuberosum*) Genotypes of the Andigenum and Phureja Group from the Working Collection of the Universidad De Nariño. **International Journal of Life Science and Agriculture Research**, v. 3, n. 5, p. 404–419, 2024.

DAVIES, F. S ; ALBERICO, L. G. **Citrus**. Wallingford: CABI, 254p, 1994..

DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. **Nature protocols**, 2(9), 2233-2244. 2007.

DUSHIMIMANA, C.; VAN LAERE, K.; MAGOMERE, T.; SMAGGHE, G.; WERBROUCK, S. P. O. Production of tetraploid plants from cotyledons of diploid *Melia volkensii* Gürke. **Horticulturae**, v. 9, p. 791, 2023.

FAUZAN, Y. S. A.; SUPRIYANTO; MULYONO, J.; TAJUDDIN, T. The effectiveness of colchicine and oryzalin on polyploidy induction in teak (*Tectona grandis* Linn. f.) in vitro. **Indonesian Journal of Forestry Research**, v. 11, n. 1, p. 1–15, 2024.

FETOUH, M. I.; DENG, Z.; WILSON, S. B.; REINHARDT ADAMS, C.; KNOX, G. W. W. Induction and characterization of tetraploids in Chinese Privet (*Ligustrum sinense* Lour.). **Scientia Horticulturae**, v. 271, p. 109482, 2020.

GERMANÀ, M. A.; ALEZA, P.; GROSSER, J. W. Citrus biotechnology. In: TALON, M.; CARSUO, M.; GMITTER, F. G. (eds.). The genus citrus. Amsterdam: **Elsevier**, 2020. p. 171–209.

GO, J. G.; PARK, S. I.; KIM, S. Y. The effect of oryzalin on growth and gravitropism in *Arabidopsis* roots. **Journal of Life Sciences**, 2021.

GROSSER, J. W.; KAINTH, D.; DUTT, M. Production of colchicine-induced autotetraploids in pummelo (*Citrus grandis* Osbeck) through indirect organogenesis. **HortScience**, v. 49, n. 7, p. 944-948, 2014.

GUNASEKARAN, B.; RAMARAJ, T.; MADHUSUDHANAN, G. Effect of colchicine induced tetraploidy on morphology, cytology, essential oil composition, gene expression and antioxidant activity of *Citrus limon* (L.) Osbeck. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, 2020.

HERLINA; POERBA, Y. S.; HANDAYANI, T.; AHMAD, F.; MARTANTI, D. Identifikasi tingkat ploidi tanaman pisang menggunakan flow cytometer di Jawa Tengah. MANILKARA: **Journal of Bioscience**, 2024.

HO, W. S.; ENG, W. H.; LING, K. H. Optimizing flow cytometry analysis for determining ploidy level and genome size of colchicine-induced polyploids of *Neolamarckia cadamba*. **Journal of Applied Biology and Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 93-97, 2024.

HOUSSEM, R.; CUENCA, J.; NAVARRO, L.; OLLITRAULT, P.; ALEZA, P. Tetraploid citrus progenies arising from FDR and SDR unreduced pollen in 4x X 2x hybridizations. **Tree Genetics & Genomes**, 2017.

JAWARKAR , S.; SHRIVASTAVA , M. K.; SATPUTE , G. K.; AMRATE , P. K.; BARELA , A.; NAGAR , S. K. Morphological characterization of recombinant inbred lines of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). **International Journal of Environment and Climate Change**, v. 13, n. 9, p. 521–527, 2023.

JIANG, J.; YANG, N.; LI, L.; QIN, G.; REN, K.; WANG, H.; DENG, J.; DING, D. Tetraploidy in *Citrus wilsonii* enhances drought tolerance via synergistic regulation of photosynthesis, phosphorylation, and hormonal changes. **Frontiers in Plant Science**, 2022.

JOKARI, S.; SHEKAFANDEH, A.; JOWKAR, A. In vitro tetraploidy induction in Mexican lime and sour orange and evaluation of their morphological and physiological characteristics. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 150, p. 651–668, 2022.

KULAHLIOGLU, I.; ÇÜRÜK, S. Effect of different oryzalin and colchicine applications in liquid medium on tetraploid plant production in eggplant. **Journal of Plant Biology and Biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 42-47, 2017.

LI, H.; LENG, Q.; SUN, L.; LU, J.; XU, S.; WANG, Y.; LIU, S.; YIN, J.; MA, C.; LÓPEZ, H. A.; JUNHAI, N. Comparative assessment of morphological, cytological, and reproductive characteristics of the spontaneous mixoploid 'MM 2×/4×' and its diploid counterpart 'Miss Manilla' in *Bougainvillea* (*Bougainvillea × buttiana* Honlittum & Standl.). **Scientia Horticulturae**, 2024.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Use of Microculture for the Production and Improvement of *Rhododendron* spp. **HortScience**, v. 15, n. 3, p. 416–417, 1980.

MAJD, M. A.; SARIKHANI, H.; CHAICH, M. I.; KASHI, A. S. Y. An investigation into micropropagation and the effect of colchicine on in vitro ploidy induction in narcissus (*Narcissus tazetta*). [s.l.], 2013.

MASTUTI, R.; MUNAWARTI, A.; AFIYANTI, M. The effect of colchicine on in vitro growth of ciplukan (*Physalis angulata*). **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, 2022.

NARUKULLA, V.; LAHANE, Y.; FISKE, K.; PANDEY, S.; ZIOGAS, V. Induction of polyploidy in citrus rootstocks through in vitro colchicine treatment of seed-derived explants. **Agronomy**, v. 13, n. 6, p. 1442, 2023.

PORNCHUTI, W.; THAMMASIRI, K.; CHUENBOONNGARM, N.; PANVISAVAS, N. Alteration of *Spathoglottis eburnea* Gagnep. ploidy level after colchicine treatments. **Walailak Journal of Science and Tech[nology] (WJST)**, v. 14, n. 3, p. 243–252, 2015.

RAVEH, E.; GOLDENBERG, L.; PORAT, R.; CARMİ, N.; GENTILE, A.; LA MALFA, S. Conventional breeding of cultivated citrus varieties. In: GENTILE, A.; LA MALFA, S.; DENG, Z. (eds.). **The citrus genome**. Cham: Springer, 2020. p. 45-64. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-030-15308-3_4. Acesso em: 11 set. 2024.

SAJJAD, Y.; JASKANI, M. J.; MEHMOOD, A.; AHMAD, I.; ABBAS, H. Effect of colchicine on in vitro polyploidy induction in African marigold (*Tagetes erecta*). [s.l.], 2012.

SHARMA, N.; SINGH, R. *Colchicum autumnale* (Naked Ladies). In: **Book Exploring Poisonous Plants**. p. 8, 2023.

SINGH, K.; AWASTHI, O. P.; SINGH, A.; SHARMA, V. K.; DUBEY, A.; SISODIA, L. S. Effect of colchicine on plant growth and leaf nutrient acquisition of sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) cv. Mosambi. **International Journal of Chemical Studies**, v. 8, n. 3, p. 211-215, 2020.

TAN, F.-Q.; TU, H.; WANG, R.; WU, X.-M.; XIE, K.-D.; CHEN, J.-J. Metabolic adaptation following genome doubling in citrus doubled diploids revealed by non-targeted metabolomics. **Metabolomics**, v. 13, p. 143, 2017.

TOUCHELL, D. H.; PALMER, I. E.; RANNEY, T. G. In vitro ploidy manipulation for crop improvement. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 722, 2020.

VISHNUPANDI, S.; GANGA, M.; RAJAMANI, K.; MANONMANI, S.; BOOPATHI, M. N. Evaluation of oryzalin-induced putative polyploids of *Jasminum sambac* cv. Ramanathapuram Gundumalli. **Journal of Horticultural Sciences**, v. 19, n. 1, 2024.

WULANDARI, D. R.; PURWITO, A.; SUSANTO, S.; HUSNI, A.; ERMAYANTI, T. M. In vitro induction of tetraploid pummelo 'Nambangan' (*Citrus maxima* (Burm.) Merr.) by colchicine treatment using germinated seed, shoot tip and cotyledonary node as explants. [s.l.], 2015.

ZENG, Q.; LIU, Z.; DU, K.; KANG, X. Oryzalin-induced chromosome doubling in triploid *Populus* and its effect on plant morphology and anatomy. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (PCTOC), v. 138, p. 571–581, 2019.

ZOU, P.; ZHENG, Y.; WANG, Y.; HU, X.; DAI, S.; WANG, W.; LEE, S. Y.; LIU, G. In vitro induction of tetraploids in the ornamental plant *Melastoma candidum* using colchicine treatment. [s.l.], **Preprint (Version 1)**. 14 Mar. 2024.

CAPÍTULO 2

INDUÇÃO DE TETRAPLOIDIA ATRAVÉS DE TRATAMENTOS IN VITRO COM COLCHICINA EM SEMENTES DE CITROS

INDUÇÃO DE TETRAPLOIDIA ATRAVÉS DE TRATAMENTOS IN VITRO COM COLCHICINA EM SEMENTES DE CITROS

RESUMO:

A poliploidia artificial tem sido amplamente utilizada para melhorar o desempenho de diversas culturas, especialmente em plantas economicamente importantes. O presente estudo teve como objetivo induzir tetraploidia em três espécies de tangerineiras ('Fremont', 'Dancy' e 'Clementina Honey') por meio de tratamentos in vitro com diferentes concentrações de colchicina. A análise de citometria de fluxo revelou quatro níveis de ploidia: diploide, mixoploide, tetraploide e haploide. O objetivo foi investigar a eficácia da indução de tetraploides utilizando colchicina em diferentes doses e tempos de exposição. A maior taxa de indução de tetraploides foi observada em "Fremont", com 36% de sucesso em 1500 mg/L de colchicina após 24 horas de exposição. As variedades 'Dancy' e 'Clementina Honey' apresentaram uma maior ocorrência de mixoploides, com taxas de 30,8% e 50%, respectivamente, em tratamentos de 1000 a 1500 mg/L de colchicina por 24 horas. O estudo também identificou haploides espontâneos, possivelmente relacionados à apomixia ou partenogênese. A eficácia da colchicina na indução de tetraploidia é altamente dependente da variedade, da dose e do tempo de exposição. O estudo destaca a importância de protocolos otimizados para cada espécie, visto que altas doses ou tempos prolongados podem reduzir a taxa de sucesso e aumentar a ocorrência de mixoploides.

PALAVRAS-CHAVE: *Citrus*; Poliploidia; Citometria de fluxo; Haploides

INDUCTION OF TETRAPLOIDY THROUGH IN VITRO TREATMENTS WITH COLCHICINE IN CITRUS SEEDS

ABSTRACT:

Artificial polyploidy has been widely used to improve the performance of several crops, especially in economically important plants. The present study aimed to induce tetraploidy in three mandarin species ('Fremont', 'Dancy' and 'Clementina Honey') through in vitro treatments with different concentrations of colchicine. Flow cytometry analysis revealed four ploidy levels: diploid, mixoploid, tetraploid and haploid. The aim was to investigate the efficacy of tetraploid induction using colchicine at different doses and exposure times. The highest tetraploid induction rate was observed in 'Fremont', with 36% success at 1500 mg/L of colchicine after 24 hours of exposure. The varieties 'Dancy' and 'Clementina Honey' showed a higher occurrence of mixoploids, with rates of 30.8% and 50%, respectively, in treatments of 1000 to 1500 mg/L of colchicine for 24 hours. The study also identified spontaneous haploids, possibly related to apomixis or parthenogenesis. The efficacy of colchicine in inducing tetraploidy is highly dependent on the variety, dose and exposure time. The study highlights the importance of optimized protocols for each species, since high doses or prolonged times can reduce the success rate and increase the occurrence of mixoploids.

KEYWORDS: Citrus; Polyploidy; Flow cytometry; Haploids

1. INTRODUÇÃO

Historicamente, a poliploidização é reconhecida como um dos principais mecanismos de diferenciação ecológica e especiação, ocorrendo ao menos uma vez na evolução de todos os organismos conhecidos (Blanc e Wolfe, 2004; Chen e Gao, 2007), a diploidia é a forma mais estável geneticamente. Dessa forma, a indução dessa poliploidia, tem sido estudada e realizada artificialmente em muitas culturas economicamente importantes nas últimas décadas (DHOOGHE et al., 2011), tendo em vista que facilita várias aplicações, como a quebra de barreiras sexuais (FOMICHEVA et al., 2024), restaura a fertilidade híbrida (GONZALO et al., 2023) e aumenta as variações fenotípicas (SHINDE et al., 2024), contribuindo, dessa forma, para o entendimento dos processos evolutivos (SIVASANKAR, 2023).

A indução de poliploides in vitro com agentes antimitóticos como a colchicina é complexa, sendo influenciada por diversos fatores como o produto químico, o explante e a duração do tratamento (WU et al., 2023). Embora eficaz, a técnica enfrenta baixas taxas de sucesso e altas ocorrências de aneuploidia e mixoploidia (MARANGELLI et al., 2022). Sendo essencial a citometria de fluxo para confirmação da duplicação cromossômica (ZOU et al., 2024).

A colchicina liga-se à tubulina, impedindo a sua polimerização em microtúbulos, o que é essencial para a segregação cromossômica adequada durante a mitose (MAKINO et al., 2022). Esta inibição resulta na interrupção da metáfase, onde os cromossomos não conseguem migrar para os pólos, levando à formação de células com complemento cromossômico duplicado (KHAH et al., 2022).

Plantas que foram mutadas pela colchicina são conhecidas como colchi-mutantes (ARI et al., 2015). Uma ampla gama de concentrações de colchicina tem sido usada para a indução de poliploidia variando de 0,00001% a 1,5% para diferentes espécies (CASTRO; CASTRO; LOUREIRO, 2018). Apesar desses avanços, os desafios permanecem, como altas taxas de mortalidade e a necessidade de protocolos otimizados adaptados a espécies de plantas específicas (NAWALKAR; VERMA, 2024; SHINDE et al., 2024).

Citrus são geralmente diploides ($2x=2x=18$), mas também ocorrem variedades triploides ($2x=3x=27$) e tetraploides ($2x=4x=36$) (GUERRA et al.,

1997; GMITTER et al., 1990; SPIEGEL-ROY; GOLDSCHMIDT, 1996). O presente trabalho teve como objetivo induzir a tetraploidia por meio de tratamentos in vitro com colchicina em sementes de citros das tangerineiras 'Clementina Honey' (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.), 'Dancy' (*C. tangerina* Hort. ex Tan.) e 'Fremont' (*Citrus clementina* Hort. ex Tan. x *C. reticulata* Blanco).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos, localizado no Núcleo de Biologia Avançada da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas, Bahia. Foram utilizados explantes das variedades de tangerineira: 'Clementina Honey' (*C. clementina* Hort. ex Tan.), 'Dancy' (*C. tangerina* Hort. ex Tan.) e 'Fremont' (*Citrus clementina* Hort. ex Tan. x *C. reticulata* Blanco), obtidos a partir do Banco Ativo de Germoplasma de Citros (BAG - Citros) da referida unidade de pesquisa.

Indução de poliploidia

As sementes das três variedades (Figura 1A) foram extraídas de frutos maduros (Figura 1A), lavadas (Figura 1B) e secas à temperatura ambiente (Figura 1C). Em seguida, o tegumento externo foi removido, e as sementes foram desinfetadas em câmara de fluxo laminar (Figura 1D), passando por imersão em etanol 70% por cinco minutos, em hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo) com uma gota de Tween® por 20 minutos, e seguida de três lavagens com água de osmose reversa autoclavada. Dezesete explantes foram transferidos para Erlenmeyers com meio líquido WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980), contendo diferentes concentrações de colchicina (0 mg/L⁻¹; 500 mg/L⁻¹; 1000 mg/L⁻¹; 1500 mg/L⁻¹; 2000 mg/L⁻¹; 2500 mg/L⁻¹), que foram mantidos sob agitação (105 rpm) por 24 horas e 48 horas, no escuro. Após os dois tempos de exposição, os explantes foram lavados três vezes com água de osmose reversa autoclavada e foram transferidos para meio sólido WPM, sendo composto pelos mesmos sais do meio líquido, acrescido de sacarose (30 g/L⁻¹) e solidificado com 2,4 g L⁻¹ de Phytigel®, tendo o pH ajustado para 5,8, sem a presença da colchicina, visando o

desenvolvimento vegetal, em sala de crescimento com temperatura de 27 ± 1 °C, luz de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas.

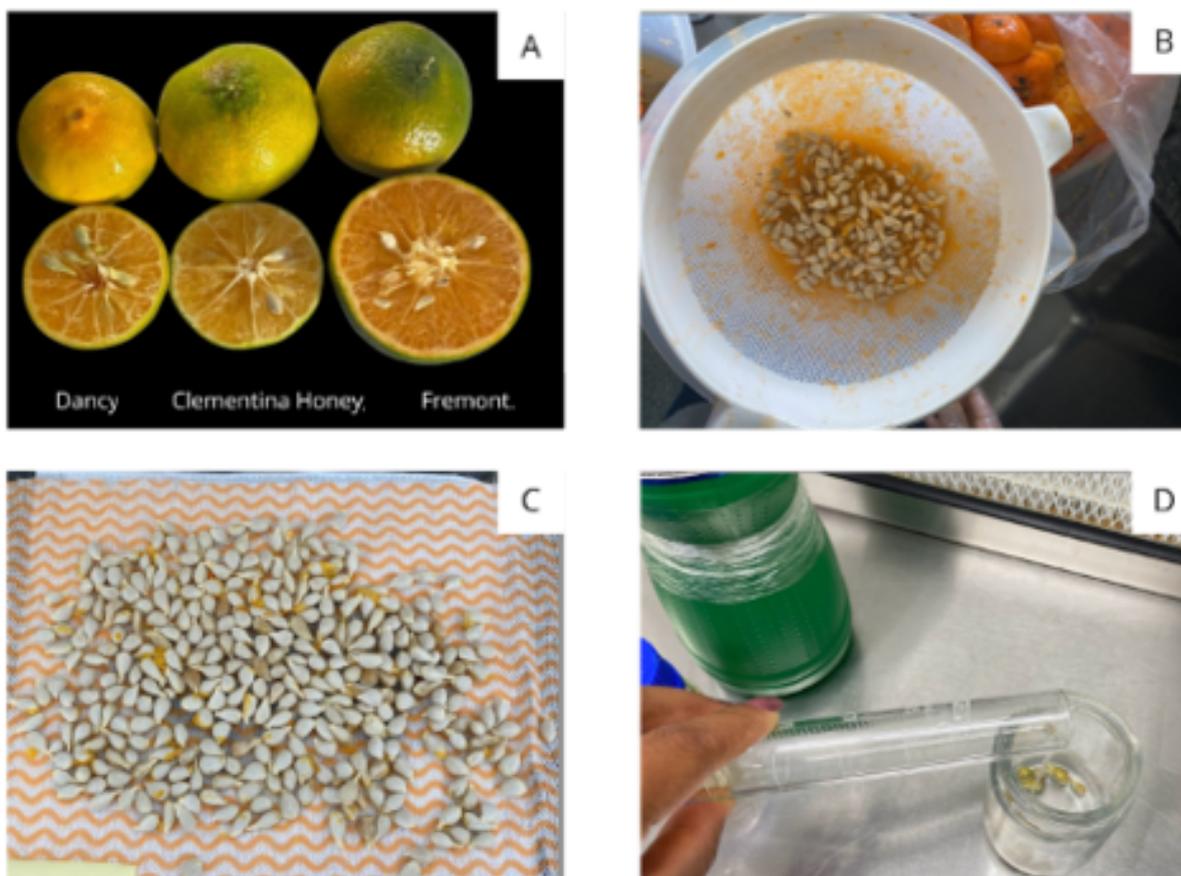


Figura 1. A) Frutos da variedade 'Dancy', 'Clementina Honey' e 'Fremont' cortados para retirada das sementes ; B) sementes extraídas dos frutos para o processo de lavagem; C) sementes em processo de secagem em temperatura ambiente; D) sementes em processo de desinfestação, em câmara de fluxo laminar.

Avaliação de sobrevivência e crescimento da planta

A porcentagem de sobrevivência foi avaliada após 120 dias, levando em conta o desenvolvimento dos explantes. Foram analisadas as variáveis altura da parte aérea (APA, em cm), número de folhas verdes (NFV), número de folhas senescentes (NFS), número de miniestacas (NM) e número de raízes (NR).

Detecção de poliploidia

A análise de ploidia das dezessete plântulas provenientes das sementes das três classes de desenvolvimento foi realizada 120 dias após a introdução in vitro. A quantidade de DNA nuclear (valor C) das amostras foi determinada via citometria de fluxo, conforme a metodologia de Doležel et al. (2007).

A análise ocorreu em câmara de fluxo laminar onde amostras de uma folha foram coletadas individualmente de cada planta. Para as sementes poliembriônicas, cada plântula foi identificada separadamente para coleta. As folhas foram trituradas em placa de Petri, juntamente com o padrão de referência de DNA para citros, *Crotalaria breviflora* DC. (Costa et al., 2019), em 1 mL de solução tampão de lise (LB01), utilizando pipeta para liberar os núcleos.

A suspensão de núcleos foi filtrada em tela de náilon para microtubos de 2 mL e corada com 0,20 µL de solução de iodeto de propídio. As amostras foram então analisadas no Acoustic Focusing Cytometer Attune® (Life Technologies), contabilizando-se no mínimo 10.000 eventos. O conteúdo de DNA nuclear (2C) foi determinado, com folhas de citros contendo 2C = 0,70 pg de DNA e *Crotalaria breviflora* contendo 2C = 2,02 pg de DNA. A quantificação do DNA foi calculada conforme a fórmula de Doležel et al. (2007).

Valor da amostra 2C (pg de DNA) =

$$\frac{\text{posição média do pico da amostra} \times \text{valor da referência 2C}}{\text{referência 2C da posição média do pico}}$$

A eficiência de indução de tetraploidia foi calculada usando o método de Bouvier et al. (1994) como segue: eficiência de indução =

$$\text{Eficiência de indução (TIE)} = \text{Sobrevivência da Planta (\%)} \times \text{Indução de Tetraploide (\%)}$$

Desenho experimental e análise estatística

Os dados referentes aos três genótipos ('Clementina Honey', 'Dancy' e 'Fremont') e às diferentes concentrações de colchicina foram organizados em experimentos independentes em esquema fatorial (2x6), sendo dois tempos de exposição (24 e 48 horas) e seis doses de colchicina (0 mg/L⁻¹, 500 mg/L⁻¹, 1000 mg/L⁻¹, 1500 mg/L⁻¹, 2000 mg/L⁻¹ e 2500 mg/L⁻¹).

Os dados foram submetidos ao teste de homogeneidade de resíduos e variâncias para verificar os pressupostos da análise de variância. Após essa etapa, quando necessário, os dados foram transformados utilizando a fórmula $\sqrt{x + 0.5}$, para atendimento aos pressupostos da ANOVA. Em seguida, foi realizada a análise de variância ao nível de 5% de significância, com as médias comparadas pelo teste de Tukey. As análises foram conduzidas utilizando o pacote ExpDes.pt no software R, versão 4.3.2 (R CORE TEAM, 2023).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito da colchicina na sobrevivência e crescimento das plantas

A avaliação dos percentuais de sobrevivência foi registrada após 120 dias da transferência das sementes para meio WPM (Figura 2). As maiores taxas de sobrevivência com as respectivas concentrações de colchicina no tempo de 24 horas foram: 'Clementina Honey' 24,6%/500 mg/L⁻¹, 'Dancy' 94,4%/1500 mg/L⁻¹ e 'Fremont' 100%/500 mg/L⁻¹. Para o período de 48 horas: 'Clementina Honey' 24,6%/500 mg/L⁻¹, 'Dancy' 84,9%/0 mg/L⁻¹ e 'Fremont' 100%/0 mg/L⁻¹.

As menores taxas de sobrevivência (0%, 50%, 75,4%) foram observadas nas doses 2500 mg/L⁻¹, 500 mg/L⁻¹, 2000 mg/L⁻¹ de colchicina, com tempo de exposição de 24 horas em 'Clementina Honey', 'Dancy' e 'Fremont' respectivamente (Figura 2). Para exposição em 48 horas as menores taxas de sobrevivência (4,8%, 0%, 84,9) ocorreram em 2500 mg/L⁻¹, 2000 mg/L⁻¹, 500 mg/L⁻¹, para as mesmas variedades.

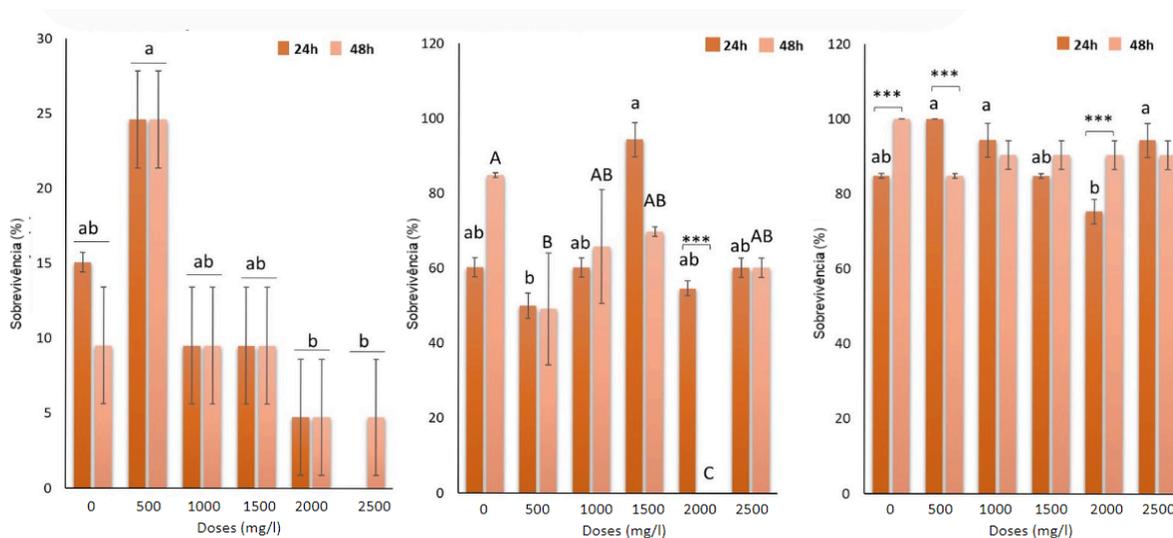


Figura 2. Percentual de sobrevivência tangerineiras: A) 'Clementina Honey' (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.), B) 'Dancy' (*C. tangerina* Hort. ex Tan.) e C) 'Fremont' (*C. clementina* Hort. ex Tan. x *C. reticulata* Blanco), após tratamento com diferentes concentrações de colchicina, nos dois tempos de exposição. As barras de cor laranja escuro indicam o tempo de 24 horas enquanto as barra de cor laranja claro indicam o tempo de 48 horas. Letras diferentes em cima das barras indicam diferenças significativas entre os tratamentos dentro dos experimentos, as letras minúsculas indicam o fator tempo e maiúsculas indicam fator dose, barras sem letras indica que não houve diferenças significativas.

Esses resultados corroboram parcialmente com estudos anteriores que demonstram que tratamentos com colchicina podem reduzir significativamente as taxas de sobrevivência de explantes derivados de sementes, de porta-enxertos cítricos em diferentes doses e tempos de exposição. Quanto maior a concentração de colchicina e maior o período de exposição, menor a taxa de sobrevivência (NARUKULLA et al., 2023). Estudos com *Echinacea purpurea* (L.) Moench. conduzidos por Abdoli et al. (2013), *Thymus persicus* (Ronniger ex Rech.f.) Jalas, por Tavan et al. (2015) e *Citrus limon* (L.) Osbeck por Bhuvaneshwari; Thirugnanasampandan; Gogulramnath (2020), também corroboram esses resultados.

Concentrações mais baixas e durações mais curtas de exposição à colchicina tendem a ter maior sobrevivência (ASCOUGH et al., 2008). Porém, a eficácia da duplicação cromossômica deste agente antimitótico in vitro depende muito da concentração aplicada, da duração do tratamento, do tipo de explante e da penetração do composto (ALLUM et al., 2007).

Mangena (2021), observou uma redução quase total na germinação de sementes de soja com o aumento da concentração de colchicina e da duração do tratamento. Além disso, Cimen (2020) ao estudar o citrange 'C35' destacou que a presença de tegumento e a aplicação de ácido giberélico (GA_3), podem influenciar significativamente na germinação, sugerindo que a complexidade das respostas à germinação em plantas é dependente de múltiplas variáveis.

Os dados obtidos no presente estudo indicam que, embora a colchicina possa ser utilizada para induzir variações morfológicas desejáveis em plantas, a sua aplicação deve ser cuidadosamente controlada para evitar efeitos adversos significativos, como a completa inibição da germinação e a alta mortalidade das mudas. Tais efeitos foram observados por Essel et al. (2015) em feijão-caupi,

demonstrando que a toxicidade da colchicina é um fator crítico que deve ser considerado na aplicação deste composto em programas de melhoramento genético. As variações nas respostas entre os genótipos sugerem que a tolerância à colchicina pode estar associada a características específicas de cada variedade, ressaltando a importância de estudos preliminares para determinar as condições ótimas de uso desse agente químico.

O número de miniestacas (MN) foi predominantemente influenciada pelo tempo de exposição à colchicina em 48 horas de tratamento em 'Clementina Honey' apresentou uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0.01$) (Tabela 1). Ao analisar a variável número de raízes (NR) em 'Clementina Honey', observou-se que a formação de raízes foi significativamente maior após 48 horas de exposição à colchicina, indicando que nesse genótipo a duração do tratamento foi mais importante do que a dose, uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0.001$). As concentrações de 2000 mg/L^{-1} e 2500 mg/L^{-1} de colchicina não foram avaliadas devido a falta de material vegetal. Para 'Fremont' o número de folhas senescentes (NFS) médio de 0.20, apresentou uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em 24 horas, e não significativa para 48 horas.

Tabela 1. Caracterização morfológica dos explantes tratados com concentrações de colchicina, número de miniestacas (NM), número de raízes (NR) e número de folhas senescentes (NFS).

Clementina Honey' (<i>Citrus clementina</i> hort. ex Tanaka.)				
Doses mg/L^{-1}	NM		NR	
	24h	48h	24h	48h
0	$1,67 \pm 0,27$	$2,00 \pm 0,00$	$1,00 \pm 0,00$	$2,00 \pm 0,00$
500	$1,00 \pm 0,00$	$1,60 \pm 0,32$	$1,00 \pm 0,00$	$1,40 \pm 0,31$
100	$1,00 \pm 0,00$	$1,50 \pm 0,35$	$1,00 \pm 0,00$	$2,00 \pm 0,70$
1500	$1,00 \pm 0,00$	$1,50 \pm 0,35$	$1,00 \pm 0,00$	$1,50 \pm 0,35$
Média	$1,17 \pm 0,10$ b	$1,64 \pm 0,16$ a**	$1,00 \pm 0,0$ b	$1,64 \pm 0,19$ a***
CV (%)	11,42 %		12,65 %	
Fremont' (<i>Citrus clementina</i> hort. ex Tanaka. C. <i>reticulata</i> Blanco)				
Doses mg/L^{-1}	NFS			
	24h	48h		
0	$0,07 \pm 0,05$	$0,18 \pm 0,10$		
500	$0,19 \pm 0,14$	$0,00 \pm 0,00$		
1000	$0,40 \pm 0,12$	$0,03 \pm 0,03$		

1500	0,21 ± 0,13	0,00 ± 0,00
2000	0,00 ± 0,00	0,06 ± 0,04
2500	0,21 ± 0,14	0,07 ± 0,08
Média	0,20 ± 0,05 a*	0,07 ± 0,03 b
CV (%)	28,94 %	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula em cada coluna e maiúscula em cada linha não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelos testes de Tukey, (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). médias sem nenhuma letra indica que não houve diferença significativa

Na Tabela 2 estão citados os dados das variáveis: APA, NFV, NFS, NM e NR, nas diversas concentrações e tempos de cultivo em meio contendo colchicina, bem como os respectivos controles cultivados, sem a presença do agente antimetabólico.

Ao analisar a altura da parte aérea (APA) das variedades 'Clementina Honey', 'Dancy' e 'Fremont', foram observadas respostas distintas à aplicação de colchicina. Na 'Clementina Honey', a ausência de colchicina resultou em um crescimento significativamente maior, com uma média de 3,10cm após 24 horas, enquanto a menor altura foi registrada com a dose de 1500 mg/L⁻¹ atingindo 1,25cm. Essa tendência persistiu para o tempo de 48 horas, sugerindo que essas doses de colchicina tendem a inibir o crescimento da parte aérea.

A tangerineira 'Dancy' não apresentou variações na APA em resposta às diferentes doses e tempos de exposição à colchicina. Em contraste, na variedade 'Fremont', as doses de 2000 mg/L⁻¹ e 2500 mg/L⁻¹ resultaram em maiores alturas da parte aérea, quando comparado ao demais tratamentos, incluindo o controle, para os dois tempos de exposição. Tan et al. (2015) relataram que a tetraploidia induzida em *Citrus junos* cv. 'Xiangxiang Cheng' resultou em plantas de menor altura em comparação às diploides. Similarmente, o estudo de Jokari et al. (2022) também identificou uma redução na altura de plantas cítricas decorrente da duplicação cromossômica.

O número de folhas verdes revelou variações significativas entre os genótipos estudados. Para 'Clementina Honey', o número de folhas verdes (NFV) 5,50 para a dose de 500 mg/L⁻¹ o qual apresentou uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em 24 horas, enquanto para o tempo de 48 horas, essa variação não foi estatisticamente significativa. Para o NFV, em 'Dancy'

observou-se que doses mais altas de colchicina (1500 mg/L^{-1} e 2000 mg/L^{-1}) resultaram em uma maior média após 24 horas, em comparação com doses mais baixas (0 mg/L^{-1} e 500 mg/L^{-1}). Contudo, após 48 horas, o NFV diminuiu com o aumento das doses, sugerindo um possível efeito tóxico da colchicina, que compromete o desenvolvimento das folhas. Tanto as doses de colchicina, quanto o tempo de exposição não demonstraram efeitos sobre o NFV em 'Fremont'. Resultados similares foram encontrados quando avaliada a variável número de folhas senescentes (NFS) para 'Clementina Honey' e 'Dancy'. Em Acha (Fonio) *Digitaria* sp., o tratamento com colchicina em concentrações mais altas (70,70% a 0,20 g/dL) aumentou a altura da planta e o número de folhas em comparação com os tratamentos controle (NYAM et al., 2024).

Tabela 2. Caracterização morfológica dos explantes tratados com concentrações de colchicina, altura da parte aérea (APA), número de folhas verdes (NFV), número de folhas senescentes (NFS), número de miniestacas (NM) e número de raiz (NZ).

'Clementina Honey' (<i>Citrus clementina</i> hort. ex Takana.)										
Doses mg/L ⁻¹	APA		NFV		NFS					
	24h	48h	24h	48h	24h	48h				
0	3,10 ± 0,50 a	3,50 ± 0,00 a	8,33 ± 1,91	11,50 ± 1,06	0,33 ± 0,27	0,00 ± 0,00				
500	1,98 ± 0,02 ab	2,02 ± 0,55 ab	5,20 ± 1,31	8,00 ± 1,74	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00				
100	2,00 ± 0,00 ab	2,55 ± 0,39 ab	4,00 ± 0,00	10,00 ± 2,12	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00				
1500	1,25 ± 0,18 b	1,75 ± 0,53 b	3,50 ± 1,47	7,00 ± 2,83	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00				
Média	2,14 ± 0,22	2,34 ± 0,28	5,50 ± 0,98 a*	8,82 ± 1,03 a	0,08 ± 0,08	0,00 ± 0,00				
CV (%)	13,35 %		30,13 %		14,96 %					
Dancy' (<i>C. tangerina</i> hort. ex Tanaka.)										
Doses mg/L ⁻¹	APA		NFV		NFS		NM		NR	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
0	3,29 ± 0,30	2,52 ± 0,17	6,00 ± 0,51 ab	7,15 ± 0,71	0,11 ± 0,11	0,04 ± 0,04	1,83 ± 0,18 c	1,81 ± 0,12	1,44 ± 0,18 b	1,42 ± 0,21 a
500	2,51 ± 0,24	2,91 ± 0,29	5,07 ± 0,56 b	7,11 ± 0,73	0,07 ± 0,06	0,00 ± 0,00	1,53 ± 0,16 c	1,89 ± 0,19	1,81 ± 0,14 b	1,78 ± 0,14 a
1000	2,59 ± 0,17	2,53 ± 0,13	6,31 ± 0,59 ab	7,41 ± 0,64	0,00 ± 0,00	0,07 ± 0,07	1,94 ± 0,21 bc	2,04 ± 0,11	1,81 ± 0,22 b	1,96 ± 0,15 a
1500	2,69 ± 0,13	2,54 ± 0,13	7,82 ± 0,45 aA	6,00 ± 0,70 B	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	2,55 ± 0,16 abA	1,67 ± 0,11 B	2,61 ± 0,15 aA	1,50 ± 0,14 aB
2500	2,64 ± 0,17	2,42 ± 0,29	7,57 ± 0,79 ab	5,79 ± 0,67	0,19 ± 0,19	0,00 ± 0,00	2,76 ± 0,23 aA	1,86 ± 0,20 B	1,76 ± 0,13 b	1,50 ± 0,17 a
Média	2,74 ± 0,08	2,55 ± 0,08	6,82 ± 0,26	6,80 ± 0,33	0,07 ± 0,38	0,03 ± 0,02	2,22 ± 0,09	1,86 ± 0,06	1,90 ± 0,09	1,64 ± 0,09
CV (%)	13,88 %		21,05 %		19,75 %		15,01 %		17,16 %	
Fremont' (<i>Citrus clementina</i> hort. ex Tanaka <i>C. reticulata</i> Blanco)										
Doses mg/L ⁻¹	APA		NFV		NM		NR			
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h		

0	3,06 ± 0,22 abA	2,42 ± 0,14 cB	6,04 ± 0,50	5,84 ± 0,47	2,25 ± 0,19 abA	1,71 ± 0,12 bcB	2,04 ± 0,16 ab	2,04 ± 0,20 ab
500	2,50 ± 0,17 b	2,70 ± 0,21 bc	5,19 ± 0,49	5,52 ± 0,68	1,89 ± 0,16 b	1,62 ± 0,13 c	2,06 ± 0,15 abA	1,33 ± 0,14 bB
1000	2,86 ± 0,13 ab	3,09 ± 0,14 ab	7,40 ± 0,81	6,09 ± 0,51	2,11 ± 0,20 b	2,04 ± 0,12 abc	2,78 ± 0,23 aA	1,69 ± 0,17 abB
1500	3,11 ± 0,15 a	3,02 ± 0,16 abc	5,43 ± 0,73	6,28 ± 0,51	1,82 ± 0,13 b	2,22 ± 0,14 abc	1,75 ± 0,22 bB	2,4 ± 0,18 aA
2000	3,36 ± 0,15 a	3,42 ± 0,13 a	5,42 ± 0,48	6,15 ± 0,51	2,24 ± 0,13 ab	2,39 ± 0,10 a	2,03 ± 0,17 ab	1,73 ± 0,13 ab
2500	3,18 ± 0,15 a	3,54 ± 0,15 a	7,63 ± 0,70	5,61 ± 0,87	2,82 ± 0,23 aA	2,24 ± 0,15 abB	1,97 ± 0,22 b	2,09 ± 0,26 a
Média	3,00 ± 0,07	3,01 ± 0,07	6,31 ± 0,30	5,94 ± 0,23	2,20 ± 0,9	2,07 ± 0,06	2,15 ± 0,10	1,93 ± 0,08
CV (%)	13,34 %		26,16 %		17,07 %		20,87 %	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula em cada coluna e maiuscula em cada linha não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelos testes de Tukey, (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

No caso da variedade 'Dancy', as doses mais elevadas de colchicina (1500 mg/L⁻¹ e 2500 mg/L⁻¹) promoveram maiores médias de miniestacas (MN) após 24 horas, sugerindo que essas doses não inibem o crescimento durante esse intervalo de tempo. Após 48 horas de exposição, às variações entre as doses foram atenuadas, resultando em médias estatisticamente semelhantes entre os tratamentos, indicando um efeito de saturação ou estabilização nas respostas avaliadas. Esses valores são comparáveis aos resultados da administração de 2500 mg/L⁻¹ de colchicina em 'Fremont' em período de 24 horas com maior média (2,82) de miniestacas. No entanto, quando o tempo aumentou para 48 horas a dose de 2000 mg/L⁻¹ mostrou-se eficiente (2,39) em não inibir a produção de miniestacas. A interação significativa entre a dose e o tempo de exposição indica que a combinação ideal de concentração de colchicina e duração do tratamento é essencial para maximizar a produção de miniestacas.

Em 'Dancy', a dose de 1500 mg/L⁻¹ foi mais eficaz no período de 24 horas, mas uma exposição prolongada (48 horas) reduziu o número de raízes (NR). Neste caso o tempo de exposição não teve efeitos significativos para a maioria das doses.

Em 'Fremont', a dose de colchicina também teve um efeito significativo para o NR, com melhores resultados nas doses de 1000 mg/L⁻¹ em 24 horas, e 1500 mg/L⁻¹ em 48 horas. A interação entre doses e tempo mostrou que o impacto do tempo sobre o NR depende da dose aplicada, com respostas variáveis dependendo da concentração de colchicina. O tempo de exposição não teve um efeito consistente em todas as doses.

Citometria de fluxo e Indução de poliploidia

Quatros níveis de ploidia foram observados, de acordo com a análise de citometria de fluxo, sendo eles: haploide, diploide, tetraploide e mixoploide (Figura 3). Nesse contexto, o histograma de pico diploide foi observado em todas as variedades estudadas, independentemente das concentrações e tempos estabelecidos (Figura 1 B, 1E e 1I). O histograma de pico correspondente às plantas tetraploides foi observado exclusivamente em 'Fremont' (Figura 3). Em contrapartida, as plantas mixoploides foram encontradas para para todas as variedades estudadas com variação nas dosagens e tempo (Figura 3C, 3F e 3J).

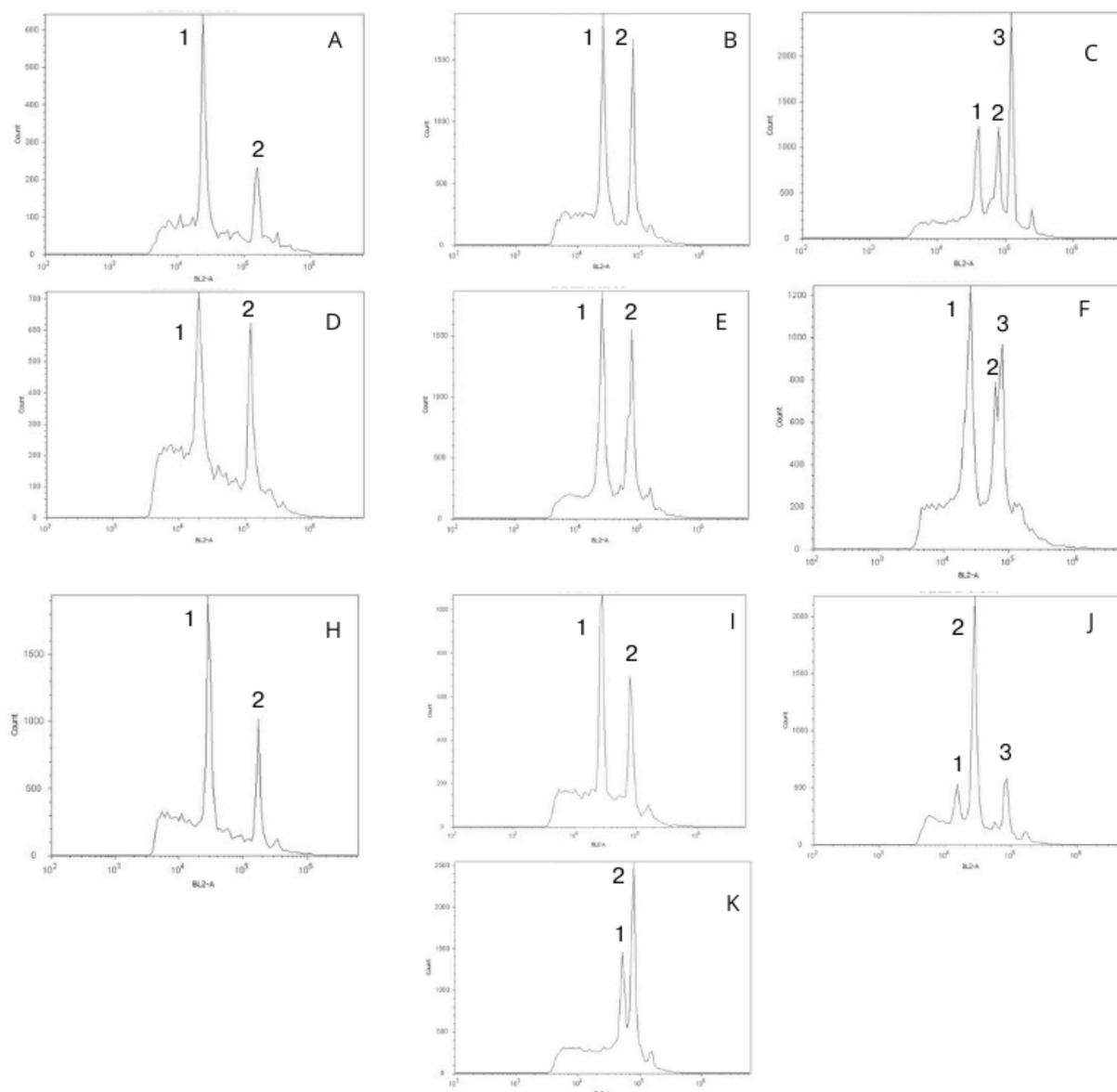


Figura 3. Histogramas obtidos por análise de citometria de fluxo. A) 'Clementina Honey' com picos haploides (1) e controle diploide *Crotalaria breviflora* DC (2). B) 'Clementina Honey' com picos diploides (1) e controle (2). C) 'Clementina Honey' com picos diploides (1), tetraploides (2) e controle (3). D) 'Dancy' com picos haploides (1) e controle (2). E) 'Dancy' com picos diploides (1) e controle (2). F) 'Dancy' com picos tetraploides (1) e controle (2). H) 'Fremont' com picos haploides (1) e controle (2). I) 'Fremont' com picos diploides (1) e controle (2). J) 'Fremont' com picos diploides (1), tetraploides (2) e controle (3). K) 'Fremont' com picos tetraploides (1) e controle (2).

A aplicação de colchicina resultou na indução de tetraploides em diferentes intensidades (Tabela 3). A taxa de indução de tetraploidia em 'Fremont' foi de 36,0 e 19,8% em resposta, respectivamente, a 1500 mg/L^{-1} e 2000 mg/L^{-1} de colchicina

perante a exposição de 24 horas. Quando os tempos de exposição foram prolongados para 48 horas, nessa mesma variedade, a taxa de indução tetraploide diminuiu acentuadamente (2,7 e 5,0%, respectivamente) corroborando com os relatos obtidos para *Echinacae purpurae*, *Thymus persicus* e *Citrus limon* (L.) Osbeck (ABDOLI et al., 2013; TAVAN et al. 2015; BHUVANESWARI; THIRUGNANASAMPANDAN; GOGULRAMNATH, 2020).

Além disso, taxas máximas de mixoploides de 50% e 30,8% foram obtidas em 'Clementina Honey' e 'Dancy', respectivamente, quando 1500 mg/L⁻¹ e 1000 mg/L⁻¹ de colchicina foram administradas por 24 horas. Enquanto isso, em 'Fremont' a maior taxa de mixoploides 42,4% foi obtido em duração de 48 horas na concentração de 1500 mg/L⁻¹ de colchicina. Esses resultados são similares aos encontrados em estudo com lima mexicana e laranja azeda, onde taxas máximas de mixoploides de 32,56% e 28,79% foram obtidos quando 250 mg/L⁻¹ de colchicina, que foram mantidas sob administração por tempo de 144 horas como relatado por Jakari et al. (2022).

Tabela 3. Ploidia e níveis de ploidia em plântulas provenientes de sementes de citros e eficiência de indução de tetraploides (EIT) em %, sob exposição à colchicina.

'Clementina Honey' (<i>Citrus clementina</i> hort. ex Tanaka.)								
Doses mg/L ⁻¹	Diploide (2x)		Mixoploide		Tetraploide (4x)		(EIT) (%)	
	24	48	24	48	24	48	24	48
0	100	100	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
500	80,0	100	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1000	100	100	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1500	50,0	100	50,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2000	100	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2500	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
'Dancy' (<i>C. tangerina</i> hort. ex Tanaka.)								
Doses mg/L ⁻¹	Diploide (2x)		Mixoploide		Tetraploide (4x)		(EIT) (%)	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
0	100	100	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
500	100	77,8	0,0	16,7	0,0	0,0	0,0	0,0
1000	69,2	82,6	30,8	17,4	0,0	0,0	0,0	0,0
1500	39,3	100	3,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2000	71,4	0,0	28,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2500	71,4	84,6	0,0	15,4	0,0	0,0	0,0	0,0
'Fremont' (<i>Citrus clementina</i> hort. ex Tanaka <i>C. reticulata</i> Blanco)								
Doses mg/L ⁻¹	Diploide (2x)		Mixoploide		Tetraploide (4x)		(EIT) (%)	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
0	100	100	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
500	100	77,8	0,0	16,7	0,0	0,0	0,0	0,0
1000	69,2	82,6	30,8	17,4	0,0	0,0	0,0	0,0
1500	39,3	100	3,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2000	71,4	0,0	28,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2500	71,4	84,6	0,0	15,4	0,0	0,0	0,0	0,0

Doses mg/L ⁻¹	24h		48h		24h		48h	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
0	100	100	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
500	100	94,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1000	100	0,0	0,0	12,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1500	96,0	60,6	4,0	42,4	0,0	3,0	36,0	2,7
2000	0,0	63,2	0,0	26,3	0,0	5,6	19,8	5,0
2500	100	92,9	0,0	3,6	0,0	3,6	3,4	3,2

Esses achados indicam que a resposta à colchicina na indução de mixoploides é altamente dependente tanto da variedade, quanto das condições específicas de dose e tempo de exposição, com cada genótipo respondendo de maneira única às variáveis testadas. A colchicina atua interrompendo a mitose, tornando-a eficaz apenas nas células em divisão, não atingindo todas as células do material tratado, o sucesso da colchicina na indução de tetraploides varia significativamente entre as espécies, sendo comum o aparecimento de mixoploides (PIO, 2008). Assim Koutolis et al. (2005) e Poutaraud; Girardin (2005) relatam o efeito diferencial de agentes antimitóticos em diferentes tecidos quando expostos a esses tratamentos.

Haploides

Neste estudo, foram identificadas plantas haploides conforme mostrado na (Figura 3A, 3D e 3H), representando cada uma das variedades estudadas (Tabela 4), apesar das sementes do presente trabalho serem tratadas com diferentes concentrações do agente antimitótico colchicina, visando a indução da duplicação cromossômica.

Apesar das sementes do presente trabalho serem tratadas com diferentes concentrações do agente antimitótico colchicina em períodos diferentes. Este resultados não está relacionada à ação desse agente, que age ligando-se de forma reversível aos dímeros de tubulina α e β , provocando uma mudança em sua estrutura que impede a polimerização do fuso mitótico, bloqueando a célula na fase de metáfase. Esse processo ocorre porque os sítios específicos de ligação da colchicina nos dímeros α e β não estão acessíveis quando a tubulina já está polimerizada na forma de microtúbulos. Dessa forma, a colchicina atua na tubulina solúvel, impedindo sua polimerização. Em relação aos microtúbulos que

já estão formados, a colchicina interrompe o crescimento dessas estruturas durante a divisão celular. Como resultado, a colchicina inibe a formação do fuso mitótico, o que impede a separação dos cromossomos homólogos. Quando a célula completa a divisão com a formação da membrana nuclear, o número de cromossomos é duplicado, originando uma célula com o dobro do número cromossômico (Salma et al., 2017; Silva, 2014).

A eficiência de indução de poliploidia não está somente atrelada ao agente antimitótico, mas também o tipo de explante, duração da exposição, concentrações de colchicina onde doses baixas não produzem com sucesso plantas poliploides, enquanto doses excessivamente altas são letais (Dhooghe et al., 2011). Além disso, o método de aplicação, condições de cultivo e variações entre espécies também influenciam a eficiência desse processo (Fomicheva et al., 2024). Para esse propósito, diferentes tipos de explantes foram utilizados, semente, ápice e no hipocótilo invertido Noh et al. (2012) e Sheikh et al. (2013), segmentos nodais (Shmeit et al. 2020), sementes (Carbajal et al. 2019), partes foliares (Zhang et al. 2020) e meristemas apicais de brotos (Zhang e Gao 2020).

No que diz respeito a citros pesquisas históricas mostram diferentes abordagens para a indução de poliploidia. Oiyama e Okudai (1986) relataram a obtenção de plantas poliploides de *Citrus clementina*, *Citrus hassaku* e *Citrus tamurana* por meio da imersão de gemas axilares em uma solução de colchicina a 0,1% por períodos de 2 a 6 horas. Aleza et al. (2009) obtiveram tetraploides de tangerinas 'Clemenules' utilizando ápices caulinares tratados com colchicina a 0,1%. Em estudos mais recentes, Jokari, Shekafandeh e Jowkar (2022) induziram tetraploides em nós de limão mexicano e laranja azeda, com colchicina a 250 mg/L, obtendo taxas de poliploidização de 27,50% e 25,52% após 72 e 96 horas de exposição, respectivamente.

Kainth e Grosser (2010) produziram tetraploides de pomelo (*Citrus grandis*) usando colchicina a 0,1% por 12 e 24 horas. Wulandari et al. (2015) obtiveram até 66,6% de tetraploides em ápices caulinares e 44,4% em sementes. Cimen (2020) conseguiu 15% de tetraploides em sementes de citrange C35 com 0,1% de colchicina por 48 horas. Bhuvaneshwari et al. (2020) alcançaram até 64,4% de tetraploides em sementes de *Citrus limon* após 24 horas de tratamento. Narukulla et al. (2023) e (2024) observaram que 0,1% de colchicina por 24 horas foi o mais eficaz, com uma taxa de 15,22% em sementes de Nagpur mandarin.

O sucesso da indução de poliploidia em citros também está fortemente relacionado ao método de aplicação. Estudos como os de Kainth e Grosser (2010), Wulandari et al. (2015), Cimen (2020), Bhuvanewari, Thirugnanasampandan e Gogulramnath (2020), e Narukulla et al. (2023; 2024) utilizaram sementes germinadas com 12 a 14 dias de idade, até que o hipocótilo emergisse dos cotilédones e alcançasse um tamanho de 5 a 8 mm. Neste estágio, as sementes estão no estado meristemático ativo e prontas para tratamento com colchicina. Este período representa uma transição crítica da quiescência para o crescimento ativo, o que torna as sementes ideais para manipulação (Mahd et al., 2018). Em contraste, ao método adotado neste experimento, que utilizou sementes não germinadas.

Tabela 4. Porcentagem de haploides espontâneos nas tangerineiras Clementina 'Honey' (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.), 'Dancy' (*C. tangerina* Hort. ex Tan.) e 'Fremont' (*C. clementina* Hort. ex Tan. x *C. reticulata* Blanco),

'Clementina Honey' (<i>Citrus clementina</i> Hort. ex Tan.)		
Doses mg/L ⁻¹	% haploide	
	24 h	48 h
2500		100
'Dancy' (<i>C. tangerina</i> Hort. ex Tan.)		
Doses mg/L ⁻¹	% haploide	
	24 h	48 h
1500	29,0	
2500	50,0	
'Fremont' (<i>Citrus clementina</i> Hort. ex Tan. <i>C. reticulata</i> Blanco)		
Doses mg/L ⁻¹	% haploide	
	24	48
2000	100	
2500		100

A obtenção de haploides neste trabalho, provavelmente, ocorreu de forma espontânea devido a dois mecanismos principais: apomixia e partenogênese. A apomixia é um processo de reprodução assexuada no qual ocorre a formação de sementes sem fertilização, permitindo que o embrião se desenvolva a partir de células maternas, resultando em indivíduos geneticamente idênticos à planta

mãe. Já a partenogênese envolve o desenvolvimento de um embrião a partir de um óvulo não fertilizado, levando à formação de plantas haploides, uma vez que não há contribuição genética masculina. Esses mecanismos podem ter sido favorecidos em condições controladas de laboratório, tendo em vista que o ambiente é propício e ajustado para estimular a regeneração de plantas a partir de tecidos ou células isoladas. Outros trabalhos também obtiveram haploides espontâneos in vitro de citros como o de Das et al. (2018) e o de Verde et al. (2023).

Os haploides espontâneos ocorrem em baixa frequência, mas podem ser induzidos por métodos como polinização modificada in vivo (hibridização ampla, eliminação de cromossomos, polinização com pólen irradiado) e cultura in vitro de gametófitos imaturos. A embriogênese gamética, uma das rotas de embriogênese vegetal, envolve a transformação irreversível dos gametófitos masculinos (micrósporos ou pólen imaturo) ou femininos (ginogênese) de uma via gametofítica para esporofítica. Ao contrário da embriogênese somática, que preserva o genótipo clonalmente, a embriogênese gamética gera plantas haploides, exceto quando ocorre duplicação cromossômica (GERMANÀ, 2011).

Haploides são ferramentas valiosas em estudos genéticos, facilitando a investigação de alelos recessivos, mutações e sequenciamento genômico (ALEZA et al., 2009). Em citros, por exemplo, sua homozigosidade permite a criação de genomas de referência, promovendo avanços em projetos de sequenciamento completo (WU et al., 2014). Dessa forma, o cultivo de haploides in vitro não só acelera o melhoramento de plantas, como também enriquece o campo da genômica e da filogenética, consolidando seu valor na pesquisa genética e no desenvolvimento de novas variedades agrícolas.

4. CONCLUSÕES

Considerando-se o conjunto de genótipos estudados e a utilização de sementes não pré-germinadas, tem-se:

A eficiência da colchicina na tetraploidização foi superior em tangerineira 'Fremont'.

Possivelmente, a eficácia da colchicina na tetraploidização pode ser potencializada mediante sua aplicação em sementes pré-germinadas, devido à facilitação da penetração desse agente antimitótico.

Além disso, plantas haploides espontâneas foram identificadas em todas as variedades. Acredita-se que os haploides surgiram por apomixia ou partenogênese, mecanismos que ocorrem espontaneamente em condições controladas.

REFERÊNCIAS

- ABDOLI, M.; MOIENI, A.; BADI, H. N. Morphological, physiological, cytological and phytochemical studies in diploid and colchicine-induced tetraploid plants of *Echinacea purpurea* (L.). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, n. 7, p. 2075-2083, 2013.
- ALEZA, P.; JUÁREZ, J.; HERNÁNDEZ, M.; PINA, J. A.; OLLITRAULT, P.; NAVARRO, L. Recovery and characterization of a *Citrus clementina* Hort. ex Tan. 'Clemenules' haploid plant selected to establish the reference whole *Citrus* genome sequence. **BMC Plant Biology**, v. 9, p. 110, 2009.
- ALLUM, J. F.; BRINGLOE, D. H.; ROBERTS, A. V. Chromosome doubling in *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.
- ARI, E.; DJAPO, H.; MUTLU, N.; GURBUZ, E.; KARAGUZEL, O. Creation of variation through gamma irradiation and polyploidization in *Vitex agnus-castus* L. **Scientia Horticulturae**, v. 195, p. 74-81, 2015.
- ASCOUGH, G. D.; VAN STADEN, J.; ERWIN, J. E. Effectiveness of Colchicine and Oryzalin at Inducing Polyploidy in *Watsonia lepida* N.E. Brown. **HortScience**, v. 43, n. 7, p. 2248-2251, 2008.
- BHUVANESWARI, G.; THIRUGNANASAMPANDAN, R.; GOGULRAMNATH, M. Effect of colchicine induced tetraploidy on morphology, cytology, essential oil composition, gene expression and antioxidant activity of *Citrus limon* (L.) Osbeck. **Physiology and Molecular Biology of Plants: An International Journal of Functional Plant Biology**, v. 26, n. 2, p. 271-279, 2020.
- CARBAJAL, E. M.; ZULETA, M. C.; SWAYZER, L.; SCHWARTZ, B. M.; CHAVARRO, M. C.; BALLENTABORDA, A. C.; MILLA-LEWIS, S. R. Development of colchicine-induced tetraploid St. Augustinegrass (*Stenotaphrum secundatum*) lines. **Plant Breeding**, v. 138, n. 6, p. 958-966, 2019.

CASTRO, M.; CASTRO, S.; LOUREIRO, J. Production of synthetic tetraploids as a tool for polyploid research. **Web Ecology**, v. 18, p. 129–141, 2018.

FOMICHEVA, M.; KULAKOV, Y.; ALYOKHINA, K.; DOMBLIDES, E. Spontaneous and chemically induced genome doubling and polyploidization in vegetable crops. **Horticulturae**, v. 10, p. 551, 2024.

CIMEN, B. Induction of Polyploidy in C35 Citrange through in Vitro Colchicine Treatments of Seed-Derived Explants. **International Journal of Fruit Science**, v. 20, supl. 3, p. S1929–S1941, 2020.

COSTA, S. N.; CORTEZ, P. A.; ALMEIDA, L. A. H.; MARTINS, F. M.; SOARES FILHO, W. S.; COELHO FILHO, M. A.; GESTEIRA, A. S. Triploid frequency of sexual hybridization and pollen and ovary development in mandarins. **Brazilian Journal of Botany**, v. 42, n. 1, p. 73–82, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40415-019-00513-6>.

DAS, A.; KUMAR, K.; TRIBHUVAN, K.; DAS, S. S.; MISHRA, M. Development of haploid and double haploid in fruit crops—a review. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 7, n. 5, p. 2119–2132, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.705.247>.

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

DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. **Nature protocols**, 2(9), 2233-2244. 2007.

ESSEL, E.; ASANTE, I. K.; LAING, E. Effect of colchicine treatment on seed germination, plant growth and yield traits of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). **Canadian Journal of Pure and Applied Sciences**, v. 9, p. 3573–3576, 2015.

FOMICHEVA, M.; KULAKOV, Y.; ALYOKHINA, K.; DOMBLIDES, E. Spontaneous and Chemically Induced Genome Doubling and Polyploidization in Vegetable Crops. **Horticulturae**, v. 10, p. 551, 2024.

GERMANÀ, M.A. Anther culture for haploid and doubled haploid production. **Plant Cell Tiss Organ Cult** 104, 283–300, 2011.

GMITTER, F. G., Jr.; LING, X. B.; DENG, X. X. Induction of triploid Citrus plants from endosperm calli in vitro. TAG. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 80, n. 6, p. 785–790, 1990.

GONZALO, A.; PARRA-NUNEZ, P.; BACHMANN, A. L.; SANCHEZ-MORAN, E.; BOMBLIES, K. Partial cytological diploidization of neoautotetraploid meiosis by induced cross-over rate reduction. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 120, 2023.

GUERRA, M.; PEDROSA, A.; BARROS E SILVA, A. E.; et al. Chromosome number and secondary constriction variation in 51 accessions of a citrus germplasm Bank. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 20, n. 3, p. 489–496, 1997.

JOKARI, S.; SHEKAFANDEH, A.; JOWKAR, A. In vitro tetraploidy induction in Mexican lime and sour orange and evaluation of their morphological and physiological characteristics. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 150, p. 651–668, 2022.

KAINTH, D.; GROSSER, J. W. Induction of autotetraploids in Pummelo (*Citrus grandis* L. Osbeck) through colchicine treatment of meristematically active seeds in vitro. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v. 123, p. 44–48, 2010.

KHAH, M. A. et al. Influence of colchicine in causing severe chromosomal damage in microsporocytes of hard wheat (*Triticum durum* Desf.): possible mechanisms and genotoxic relevance. **Cytologia**, 2022.

KOUTOLIS, A.; ROY, A. T.; PRICE, A.; SHERRIFF, L.; LEGGETT, G. DNA ploidy level of colchicines-treated hops (*Humulus lupulus* L.). **Scientia Horticulture**, Amsterdam, v. 105, n. 2, p. 263–268, jun. 2005.

MAHDI, H. S.; HUSSEIN, W. I.; HASSAN, H. N.; SELAH-ALDEN, M. T.; MAHMOOD, M. J.; HAMEED, N. A.; AHMED, G.; SAMI, M.; AMIN, A.; YOUSSEF,

S.; BARZANI, D. Seed germination ecology and seedling emergence of sixteen tree species autumn sown. **Journal of Duhok University**, v. 20, n. 1, p. 50-63, 27 abr. 2018.

MAKINO, M.; KODAMA, R.; KAWAGUCHI, K. Numerous mitotic figures with metaphase arrest in the mucosa suggest colchicine poisoning. **Pathology International**, v. 72, n. 12, p. 637-639, dez. 2022.

MANGENA, P. Germination, Morphological and Physiological Evaluation of Seedlings Pretreated with Colchicine in Soybean (*Glycine max* L). **Walailak Journal of Science and Technology (WJST)**, [S. I.], v. 18, n. 18, p. Article 9489 (12 pages), 2021.

MARANGELLI, F.; PAVESE, V.; VAIA, G.; LUPO, M.; BASHIR, M. A.; CRISTOFORI, V.; SILVESTRI, C. In vitro polyploid induction of highbush blueberry through de novo shoot organogenesis. *Plants*, v. 11, n. 2349, 2022.

NARUKULLA, V.; LAHANE, Y.; FISKE, K.; PANDEY, S.; ZIOGAS, V. Induction of polyploidy in citrus rootstocks through in vitro colchicine treatment of seed-derived explants. **Agronomy**, v. 13, n. 6, p. 1442, 2023.

NAWALKAR, P.; VERMA, Dr. S. K. Polyploidy induction in forage crops. In: **Futuristic Trends in Biotechnology**. Vol. 3, Book 20, IIP Series, v. 3, p. 217-222, maio 2024. e-ISBN 978-93-6252-440-9.

NOH, J. et al. Screening different methods of tetraploid induction in watermelon [*Citrullus lanatus* (thunb.) Manst. and Nakai] **Horticulture, Environment, and Biotechnology**. v.53, n.6, p.521-529, 2012.

NYAM, D. D.; GONZUK, N. S.; SILA, M. D.; TUMBA, Y. C.; ANGYU, E. A. et al. Agro-morphological growth response of Acha (FONIO) (*Digitaria exilis* and *Digitaria iburua* [Kippist Stapf.] exposed to colchicine: germination, plant height and leaf number. **Journal of Plant Science and Phytopathology**, v. 8, p. 055-059, 2024.

OIYAMA, I.; OKUDAI, N. Production of colchicine-induced autotetraploidy plants through micrografting in monoembryonic *Citrus* cultivars. **Japanese Journal of Breeding**, v. 36, p. 371-376, 1986.

PIO, L. A. S. **Indução e identificação de poliploidia em bananeira (*Musa acuminata* Colla)**. 2008. 72 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

POUTARAUD, A.; GIRARDIN, P. Influence of chemical characteristics of soil on mineral and alkaloid seed contents of *Colchicum autumnale*. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 54, n. 2, p. 101-108, Sept. 2005.

SALMA, U.; KUNDU, S.; MANDAL, N. Artificial polyploidy in medicinal plants: advancement in the last two decades and impending prospects. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 9-19, 2017.

SHEIKH, S.; NOH, J.; SEONG, M. H.; JUNG, G. T.; KIM, J. M.; JU, H.; HUH, Y. C. Phenotypic Markers for Tetraploid Watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. et Nakai] Following Parental Exposure to Colchicine in T₀ Generation. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**. v. 54, n.6, p. 524-530, 2013.

SHINDE, A. V.; JADHAV, R. A.; DESHMUKH, A. S.; THAKUR, N. R. Polyploidy: An Evolutionary Plant Breeding Approach. In: **Elements of Plant Breeding**, IIP Series, v. 3, p. 88-105, maio 2024. e-ISBN: 978-93-6252-234-4.

SILVA, P. A. K. X. M. **Indução de poliploidia em mandioca**. 2014. 28 p. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

SIVASANKAR, S. Crop Improvement Through Induced Genetic Diversity and Mutation Breeding: Challenges and Opportunities. In: PENNA, S.; JAIN, S. M. (eds). **Mutation Breeding for Sustainable Food Production and Climate Resilience**. Singapore: Springer, p. 197-211, 2023.

SPIEGEL-ROY, P.; GOLDSCHMIDT, E. E. **Biology of citrus**. 1. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. 230 p.

TAN, F.-Q.; TU, H.; WANG, R.; WU, X.-M.; XIE, K.-D.; CHEN, J.-J. Metabolic adaptation following genome doubling in citrus doubled diploids revealed by non-targeted metabolomics. **Metabolomics**, v. 13, p. 143, 2017.

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.

VILA VERDE, D. S.; MENDES, M. I. S.; SOUZA, A. S.; AUD, F. F.; SANTOS, K. C. F.; SOARES FILHO, W. S.; GESTEIRA, A. S. S.; COSTA, M. G. C. Obtaining spontaneous haploids and polyploids from seeds derived from tangerine-type fruits. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 153, p. 133–144, 2023.

WU, J.; ZHOU, Q.; SANG, Y.; ZHAO, Y.; KONG, B.; LI, L.; DU, J.; MA, L.; LU, M.; ZHANG, P. D. In vitro induction of tetraploidy and its effects on phenotypic variations in *Populus hopeiensis*. **BMC Plant Biology**, v. 23, p. 557, 2023.

WULANDARI, D.R.; PURWITO, A.; SUSANTO, S.; HUSNI, A.; ERMAYANTI, T.M. In Vitro Induction of Tetraploid Pummelo 'Nambangan' (*Citrus maxima* (Burm.) Merr.) By Colchicine Treatment Using Germinated Seed. Shoot Tip Cotyledonary Node Explants. **Journal of Tropical Agriculture**, v. 19, n. 1, p. 8, 2015.

ZHANG, X.; GAO, J. In vitro tetraploid induction from multigenotype protocorms and tetraploid regeneration in *Dendrobium officinale*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 141, n. 2, p. 289–298, 2020.

ZOU, P.; ZHENG, Y.; WANG, Y.; HU, X.; DAI, S.; WANG, W.; LEE, S. Y.; LIU, G. In vitro induction of tetraploids in the ornamental plant *Melastoma candidum* using colchicine treatment. [s.l.], **Preprint (Version 1)**, 4 Mar. 2024.