

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS

CLAUDINEI DA SILVA SOUZA

**Regeneração in vitro de poliploides e avaliação de sementes de plantas
triploides de *Passiflora cincinnata* Masters**

TANGARÁ DA SERRA
MATO GROSSO - BRASIL
FEVEREIRO - 2022

CLAUDINEI DA SILVA SOUZA

Regeneração in vitro de poliploides e avaliação de sementes de plantas triploides de *Passiflora cincinnata* Masters

Dissertação apresentada à UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maurecilne Lemes da Silva Carvalho

Coorientadores: Profa. Dr.^a Aryane Campos Reis

Prof. Dr. Diego Ismael Rocha

TANGARÁ DA SERRA
MATO GROSSO - BRASIL
FEVEREIRO - 2022

Walter Clayton De Oliveira CRB 1/2049

SOUZA, Claudinei da Silva.

S719r Regeneração In Vitro de Poliploides e Avaliação de Sementes de Plantas Triploides de Passiflora Cincinnata Masters / Claudinei da Silva Souza – Alta Floresta/Cáceres/Tangará da Serra, 2022.

102 f.; 30 cm. (ilustrações) Il. color. (sim)

Trabalho de Conclusão de Curso
(Dissertação/Mestrado) – Curso de Pós-graduação Stricto Sensu (Mestrado Acadêmico) Genética e Melhoramento de Plantas, Faculdade de Ciências Biológicas e Agrárias, Multicampi, Universidade do Estado de Mato Grosso, 2022.

Orientador: Maurecilne Lemes da Silva Carvalho

Coorientador: Aryane Campos Reis e Diego Ismael Rocha

1. Aneuploide. 2. Colchicina. 3. Embriogênese Somática. 4. Maracujazeiro. 5. Organogênese de Novo. I. Claudinei da Silva Souza. II. Regeneração In Vitro de Poliploides e Avaliação de Sementes de Plantas Triploides de Passiflora Cincinnata Masters:

CDU 581.4

CLAUDINEI DA SILVA SOUZA

Regeneração in vitro de poliploides e avaliação de sementes de plantas triploides de *Passiflora cincinnata* Masters

Dissertação apresentada à UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de Mestre.

Aprovado em, 28 de fevereiro de 2022.

Comissão Examinadora:

Profa. Dr^a. Maurecilne Lemes da Silva Carvalho
Orientadora - PGMP – UNEMAT

Prof^o. Dr. Wagner Campos Otoni
UFV – Viçosa – MG

Profa. Dr^a. Aryane Campos Reis
Coorientadora - UFJF – Juiz de Fora - MG

Prof^o. Dr. Diego Ismael Rocha
Coorientador - UFV – Viçosa - MG

*A*os meus amados pais Maria e Orozimbo, e minha querida irmã Claudinéia

Dedico...

A minha orientadora, Dr^a. Maurecilne Lemes da Silva Carvalho

Ofereço...

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por estar sempre presente na minha vida, guiando meus caminhos e me amparando nos momentos difíceis.

Especialmente à minha família que sempre me apoiam e incentivam em todas as decisões da minha vida; sem eles, não haveria condições para caminhar sozinho. Obrigado a todos vocês pelo carinho direcionado a mim.

Agradeço de todo o meu coração à minha orientadora, Dr^a. Maurecilne Lemes da Silva Carvalho. Professora, obrigada por todos os momentos de ensinamento e, acima de tudo, de compreensão. A senhora é um exemplo de profissional e acima de tudo de ser humano. Sem a sua profunda participação não seria possível a realização do nosso trabalho. Acima de tudo, obrigada por toda confiança dedicada a mim. Obrigado por sua valiosa amizade.

À minha coorientadora Dr^a. Aryane Campos Reis, pelo apoio incondicional em todos os momentos, dedicação, paciência e orientação na elaboração e execução do trabalho. Obrigado.

Ao coorientador professor Dr. Diego Ismael Rocha pela amizade, confiança, ensinamentos, encorajamento e orientação neste trabalho.

Ao professor e amigo professor Dr. Ilio Fealho de Carvalho, por todos os ensinamentos, conselhos e contribuições durante a graduação e mestrado. Sempre auxiliando com empenho e boa vontade em momentos difíceis. Obrigado pela nossa grande amizade.

Ao Dr. Elyabe Monteiro de Matos, pelas valiosas contribuições e análises de citometria de fluxo. Muito Obrigado.

Ao professor Dr. Diego Silva Batista pelo auxílio das análises estatísticas e contribuições na elaboração e execução do trabalho. Obrigado.

Ao professor Dr. Saulo Marçal de Sousa pelas contribuições durante o mestrado. Obrigado.

Ao professor Dr. Lyderson Vicinni pela disponibilização do Laboratório para as análises de citometria de fluxo e citogenética na Universidade Federal de Juiz de Fora - MG.

Agradeço aos meus amigos, que sempre estiveram presentes, Aline, Amanda, Afonsylina, Douglas, Nayara e Marcelo. Obrigado por todo incentivo e principalmente pelos momentos de descontração.

Aos meus colegas de laboratório que me apoiaram durante toda execução deste trabalho propiciando a concretização do mesmo: Alana, Mabily, Carla, Daniela e Franciele. E a todos que, de alguma forma, estiveram comigo durante esse período e que contribuíram para a realização desse trabalho.

À Universidade Estadual do Estado de Mato Grosso e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela estrutura e oportunidade de realizar o mestrado.

Agradeço à Capes pela concessão da bolsa para que essa qualificação fosse possível.

Muito Obrigado!

*"Todos querem o perfume das flores, mas poucos
sujam as suas mãos para cultivá-las."*

(Augusto Cury)

BIOGRAFIA

CLAUDINEI DA SILVA SOUZA, filho de Maria Aparecida da Silva e Genicio Lopes de Souza, nasceu no dia 23 de março de 1996, em Tangará da Serra, Mato Grosso.

Em agosto de 2015, ingressou no Curso de Ciências Biológicas, na Universidade do Estado de Mato Grosso, campus de Tangará da Serra MT graduando-se como Licenciado e Bacharel em Ciências Biológicas em fevereiro de 2020.

Em março de 2020, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, em nível de mestrado, na mesma instituição, concentrando seus estudos na área de Biotecnologia e Recursos Genéticos Vegetais. Em fevereiro de 2022, submeteu-se à defesa de sua dissertação intitulada, regeneração in vitro de poliploides e avaliação de sementes de plantas triploides de *Passiflora cincinnata* Masters.

SUMÁRIO

RESUMO	IX
ABSTRACT	XI
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1. Aspectos biológicos da poliploidia	14
2.2. Importância da poliploidia no melhoramento genético de plantas.....	16
2.2 Métodos de obtenção artificial de poliploides	18
2.4 Poliploidia em maracujazeiros e as perspectivas desses genótipos no melhoramento	21
2.5 Aneuploidia.....	23
2.6 <i>Passiflora cincinnata</i> Masters.....	24
2.7 Caracterização de plantas poliploides	25
Capítulo I - Reprodução e caracterização de sementes e plântulas de plantas triploides de <i>P. cincinnata</i> Masters	52
1. INTRODUÇÃO	52
2. MATERIAL E MÉTODOS	53
2.1. Material Vegetal.....	53
2.2. Volume e concentração de açúcares do néctar produzido por flores triploides de <i>P. cincinnata</i>	55
2.3. Avaliação morfológica de sementes obtidas a partir do cruzamento entre plantas triploides ..	56
2.4. Germinação in vitro	56
2.5. Índice de velocidade de germinação (IVG)	57
2.6. Aclimatização das plântulas.....	57
2.7. Determinação do conteúdo de DNA	58
2.8. Análise cromossômica	58
2.9. Análise estomática	59
2.10. Delineamento experimental	59
3. RESULTADOS	60
3.1. Quantificação e concentração de açúcares do néctar	60
3.3. Germinação in vitro de sementes do cruzamento de plantas triploides	63
3.4. Citometria de Fluxo e citogenética	67
3.5. Caracterização estomática.....	68
4. DISCUSSÃO	70

5.	REFERÊNCIAS BIBLIORAFICAS	73
Capítulo II - Endoduplicação sintética de plantas triplóides derivadas de endosperma como meio de gerar hexaplóide de <i>Passiflora cincinnata</i> Masters.....		
1.	INTRODUÇÃO	78
2.	MATERIAL E MÉTODOS	80
2.1.	Material vegetal	80
2.2.	Indução de poliploides in vitro	81
2.3.	Aclimatização de plantas regeneradas	82
2.4.	Estimativa do conteúdo de DNA	82
2.5.	Número cromossômico das plantas poliploides.....	83
2.6.	Análises estomática.....	84
2.7.	Delineamento experimental	84
3.	RESULTADOS	85
3.1.	Indução de poliploides em embriões somáticos de <i>P. cincinnata</i>	85
3.2.	Caracterização estomática.....	91
4.	DISCUSSÃO	93
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
6.	CONCLUSÃO GERAL.....	104

RESUMO

SOUZA, Claudinei Silva. M. Sc. Universidade do Estado de Mato Grosso. Fevereiro de 2022. **Regeneração in vitro de poliploides e avaliação de sementes de plantas triploides de *Passiflora cincinnata* Masters.** Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maurecilne Lemes da Silva Carvalho. Coorientadores: Prof^a. Dr^a. Aryane Campos Reis e Prof. Dr. Diego Ismael Rocha.

Passiflora cincinnata Masters ($2n = 2x = 18$) é uma espécie com potencial ornamental, alimentício e muito utilizada em programas de melhoramento genético do gênero. O estabelecimento de sistemas de regeneração via organogênese *de novo* e embriogênese somática foram estabelecidos a partir do cultivo in vitro de endosperma de *P. cincinnata* para produção de plantas triploides ($2n = 3x = 27$). O objetivo do trabalho foi realizar cruzamento entre plantas triploides de origem a partir do cultivo in vitro do endosperma e avaliar o comportamento morfofisiológico das sementes e plântulas germinadas in vitro de *P. cincinnata*. O cruzamento foi realizado entre plantas triploides de *P. cincinnata*, sendo polinizadas 50 flores por planta. A concentração de açúcares do néctar indica que os citótipos diploide e triploide apresentam valores próximos com 220,3 μL e 219,6 μL , respectivamente. Os açúcares do néctar foram de 40,9% em diploides e 41,73% em plantas triploides. As sementes produzidas apresentaram peso, largura, comprimento e espessura, significativamente menores quando comparadas aos diploides. O maior percentual de germinação in vitro ocorreu nas sementes do material controle $2x$ com 80% de germinação, comprimento médio de 61,61 mm e com número médio de folhas de 3,06 folhas. As plântulas produzidas do cruzamento apresentaram percentual de 53,3% de germinação, com comprimento médio de 61,61 mm e número médio de folhas de 1,56 folhas. Nos estômatos diferenças significativas entre os genótipos diploide, triploide e aneuploides foram observados na densidade estomática, comprimento, largura e área. Para as células ordinárias as diferenças significativas entre os citótipos foram na densidade, tamanho, largura e área. O segundo capítulo objetivou em induzir a duplicação do genoma de brotações adventícias e embriões somáticos regenerados a partir de endosperma *P. cincinnata* Masters. Para a regeneração via organogênese *de novo* e embriogênese somática, os endospermas foram cultivados em meio contendo os sais básicos de MS na presença de 2,0 mg L^{-1} de BA, sob fotoperíodo de 16 h e na ausência de irradiância com 3,0 mg L^{-1} 2,4-D + 1,0 mg L^{-1} de BA, respectivamente. Brotações adventícias e embriões somáticos foram cultivadas em meio suplementado com concentrações de 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2 e 0,5 % de colchicina em tempos de 72, 144 e 216 horas de exposição. Após os tempos de exposição, as plântulas poliploidizadas in vitro foram cultivadas em casa de vegetação e o nível de ploidia confirmado via citometria de fluxo, citogenética e caracterização estomática. Plantas hexaploides apresentaram $2C = 9,00$ pg de DNA nuclear e número cromossômico $2n = 3x = 54$. A maior frequência da média de plantas hexaploides ocorreu na concentração de 0,01% de colchicina correspondendo a 22,33% seguido de 0,5 com 17,77%. A maior frequência de plantas triploides foi de 96,07% na concentração de 0,02% de colchicina. A caracterização estomática dos poliploides evidenciou menor densidade estomática, maiores valores em largura, comprimento e área dos estômatos em plantas hexaploides em comparação

com as plantas diploides. As células ordinárias das plantas hexaploides apresentaram na epiderme diferenças quanto a densidade e tamanho em relação as triploides e o controle diploide.

Palavras chaves: Aneuploide, Colchicina, Embriogênese somática, Endosperma, Maracujazeiro, Organogênese *de novo*, Poliploidia.

ABSTRACT

SOUZA, Claudinei da Silva. M. Sc. State University of Mato Grosso. March of 2022. **In vitro regeneration of polyploids and evaluation of seeds from triploid plants of *Passiflora cincinnata* Masters.** Advisor: Prof^ª. Dr^ª. Maurecilne Lemes da Silva Carvalho, Co-advisors: Prof^ª. Dr^ª. Aryane Campos Reis and Prof. Dr. Diego Ismael Rocha.

Passiflora cincinnata Masters ($2n = 2x = 18$) is a species with ornamental and food potential and is widely used in genetic improvement programs of the genus. The establishment of regeneration systems via de novo organogenesis and somatic embryogenesis were established from the in vitro cultivation of *P. cincinnata* endosperm for the production of triploid plants ($2n = 3x = 27$). The objective of this work was to cross between triploid plants of origin from the in vitro culture of the endosperm and to evaluate the morphophysiological behavior of seeds and seedlings germinated in vitro of *P. cincinnata*. The cross was carried out between triploid plants of *P. cincinnata*, being pollinated 50 flowers per plant. The concentration of nectar sugars indicates that the diploid and triploid cytotypes present similar values with 220.3 μL and 219.6 μL , respectively. Nectar sugars were 40.9% in diploid and 41.73% in triploid plants. The seeds produced had significantly lower weight, width, length, and thickness when compared to diploid ones. The highest percentage of in vitro germination occurred in the seeds of the control material $2x$ with 80% germination, average length of 61.61 mm and average number of leaves of 3.06 leaves. The seedlings produced from the crossing showed a percentage of 53.3% of germination, with an average length of 61.61 mm and an average number of leaves of 1.56 leaves. In the stomata, significant differences between diploid, triploid and aneuploid genotypes were observed in stomatal density, length, width, and area. For ordinary cells, the significant differences between the cytotypes were in density, size, width, and area. The second chapter aimed to induce the genome duplication of adventitious shoots and somatic embryos regenerated from *P. cincinnata* Masters endosperm. For regeneration via de novo organogenesis and somatic embryogenesis, endosperms were cultured in medium containing MS basic salts in the presence of 2.0 mg L^{-1} of BA, under a photoperiod of 16 h and in the absence of irradiance with 3.0 mg L^{-1} 2,4-D + 1.0 mg L^{-1} of BA, respectively. Adventitious shoots and somatic embryos were grown in medium supplemented with concentrations of 0.01; 0.02; 0.05; 0.1; 0.2 and 0.5% colchicine at 72, 144 and 216 hours of exposure. After the exposure times, the in vitro polyploidized seedlings were grown in a greenhouse and the ploidy level confirmed via flow cytometry, cytogenetics and stomatal characterization. Hexaploid plants showed $2C = 9.00$ pg of nuclear DNA and chromosome number $2n = 3x = 54$. The highest frequency of the mean of hexaploid plants occurred at the concentration of 0.01% colchicine, corresponding to 22.33% followed by 0.5 with 17.77%. The highest frequency of triploid plants was 96.07% in the concentration of 0.02% colchicine. The stomatal characterization of polyploids showed lower stomatal density, higher values in stomatal width, length and area in hexaploid plants compared to diploid plants.

Ordinary cells of hexaploid plants showed differences in the epidermis in terms of density and size in relation to triploids and diploid control.

Keywords: Aneuploid, Colchicine, Somatic Embryogenesis, Endosperm, Passion Fruit, *De novo* organogenesis, Polyploidy

.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Conhecido popularmente como maracujá do mato ou maracujá do Cerrado, *Passiflora cincinnata* Masters é uma espécie silvestre de maracujazeiro, de ocorrência nos estados da Bahia, Goiás e Minas Gerais, Brasil (Oliveira Júnior et al., 2010). A espécie apresenta potencial comercial, a polpa do fruto é utilizada na fabricação geleias, sorvete, sucos e doces, por conter alto teor de ácido cítrico (Siebra et al., 2014; Fonseca et al., 2017; Araújo et al., 2018), além de ser cultivada durante anos como planta ornamental na Europa (Vanderplanck, 2000).

A parceria entre as instituições Embrapa Semiárido (Petrolina, PE) e Embrapa Cerrados (Planaltina, DF), possibilitou o lançamento de uma nova cultivar de *Passiflora cincinnata* Mast. cv. BRS Sertão Forte, cultivar que apresenta alta produtividade, tolerância ao estresse hídrico e níveis superiores de tolerância a *Fusarium* sp. comparado a outros cultivares de maracujazeiro azedo (Fonseca et al., 2017; Araújo et al., 2018). Em decorrência dessas características, *P. cincinnata* tem sido utilizada como porta enxerto para *Passiflora edulis* por apresentar resistência a doenças e déficit hídrico (Viana et al., 2010; Alexandre et al., 2013; Preisigke et al., 2017), favorecendo sua incorporação aos programas de melhoramento genético de maracujazeiros.

Tendo em vista o potencial econômico de espécimes do gênero *Passiflora*, estudos de indução de poliploidia vêm sendo realizados com intuito de obter-se plantas com maior vigor vegetativo e reprodutivo (Antoniazzi et al., 2018; Silva et al., 2020; Mikosviki et al., 2020; Mikosviki et al., 2021).

Plantas poliploides têm características fisiológicas e fenotípicas diferentes, em relação aos respectivos organismos diploides (Wang et al., 2016). Essas variações podem ser vantajosas o que agrega alto valor ornamental e econômico, pois, em geral, resulta em plantas cujas folhas são mais largas, flores e frutos maiores, presença ou ausência de sementes, potencialidade do sabor, tolerâncias a estresses ambientais, pragas e patógenos (Ranney, 2006; Banyai et al., 2009; Meletti et al., 2011; Serapiglia et al., 2015; Manzoor et al. 2019). Além do aumento da diversificação de

características ornamentais (Kazi et al., 2015), apresentando maior vigor vegetativo em relação aos respectivos diploides (Gorálski et al., 2005; Wang et al. 2016).

Em 1991, Knight Jr. utilizou plantas híbridas do cruzamento entre *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg. com *P. incarnata* L. e induziu poliploides com solução de colchicina, obtendo alotetraploides. Outros trabalhos relatam a produção de alotetraplóides pela via hibridação somática para espécies *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg. + *P. incarnata* (Otoni et al., 1995), *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg. + *P. amethystina* Mikan, *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg. + *P. alata* L., *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg. + *P. cincinnata* L. e *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg. + *P. giberti* L. (Barbosa e Vieira, 1997; Vieira, 1997).

Um dos métodos utilizados para a obtenção de poliploides no gênero *Passiflora* foi descrito por Mohamed et al., (1996), que ao utilizarem o endosperma de *P. foetida* como fonte de explante no cultivo in vitro em diferentes concentrações de BA (2.0, 5.0 e 10 μ M), através da organogênese de novo resultou na obtenção de plantas triploides. O sistema de regeneração do tecido endospermico também foi relatada para as espécies *P. edulis* ($2n = 3x = 27$) (Antoniazzi et al., 2018), *P. cincinnata* ($2n = 3x = 27$) (Silva et al., 2020) e *P. foetida* ($2n = 3x = 30$) (Mikovski et al., 2021), produzindo plantas triploides.

Mediante aos avanços no estabelecimento de protocolos para a regeneração in vitro de plantas triploides, o trabalho teve o intuito de realizar o cruzamento entre plantas triploides e avaliar o comportamento morfofisiológico das sementes e plântulas germinadas in vitro de *P. cincinnata*, além de avaliar o efeito da colchicina em brotações adventícias e embriões somáticos regenerados a partir de endosperma *P. cincinnata* Masters.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspectos biológicos da poliploidia

Os organismos poliploides são caracterizados pela existência de dois ou mais genomas em um mesmo núcleo, sendo considerado o principal fator evolutivo em plantas (Hovav et al. 2008; Wood et al. 2009; Hegarty et al., 2013; Storme e Mason,

2014; Wendel et al. 2016). A poliploidia é uma característica comum durante o curso evolutivo vegetal influenciando em características morfológicas e de adaptação (Bharadwaj et al., 2015; Wendel et al., 2016; Catalano et al., 2021).

Existem vários fatores, que fornecem aos poliploides vantagens adaptativas e evolutivas, pela alta frequência de diversificação e especiação, causada devido às mudanças gênicas ou isolamento reprodutivo, originando diferenças no número cromossômico e dissimilaridades de genomas híbridos (Adams; Wendel, 2005; Fawcett et al., 2009).

Os poliploides podem variar de acordo com sua origem, sendo classificados como autopoliploide ou alopoliploide (Yang et al., 2011). Os autopoliploides apresentam a origem pela duplicação espontânea ou da união de gametas não reduzidos de parentais diploides, podendo ou não apresentar fertilidade. Os alopoliploides são resultantes da reprodução sexual com gametas não reduzidos de espécies diferentes após um evento de hibridação, sendo normalmente férteis (Stebbins 1971; Chen 2010; Haslop-Harrison; Schwarzacher, 2011, Sattler et al., 2016).

Organismos poliploides são classificados de acordo com a quantidade de conjuntos cromossômicos presentes em seus núcleos, em organismos diploides (2x), triploides (3x), tetraploides (4x), pentaploides (5x) e hexaploides (6x), assim por diante (Darlington 1973; Dhooghe et al. 2011). O aumento de ploidia nas plantas em geral permite, em geral, o efeito “giga”, que se trata do incremento morfofisiológico sobre os órgãos vegetais, proporcionando folhas e flores maiores, coloração intensa, hastes grossas, tolerância aos estresses biótico e abiótico, tornando-os mais vigorosos em relação a seus diploides, causado pelo aumento no número de cópias de genes (Levin, 2002, Kermani et al. 2003; Shao et al., 2003; Otto; Whitton, 2007; Chen 2010; Lin et al. 2010; Sattler et al., 2016).

Organismos poliploides apresentam redundância gênica, que a nível molecular interagem em amoldamentos extensivos e complexos denominados arranjos genômicos (Adams e Wendel, 2005). Essa extensa reestruturação em todo conjunto genômico, favorece em novos padrões de expressão gênica, silenciamento gênico, alterações cromossômicas, ativação de elementos de transposição, mudanças das formas alélicas e epigenéticas, alterações no padrão de metilação, perdas de sequências

de DNA, amplificação ou redução de sequências repetitivas (Schifino-Wittmann, 2004; Wendel, 2005; Hegarty; Hiscock, 2008; Tayalé; Parisod, 2013; Song e Chen, 2015; Iannicelli et al., 2020).

Em alguns casos passam a produzir uma nova função ou maior quantidade de determinado produto gênico (neofuncionalização) ou sintetizar uma nova substância específica (subfuncionalização), devido à interação de genes duplicados (Mayo et al, 1970; Rieseberg 2001; Xu et al., 2014; Spoelhof et al., 2017; Li et al., 2019; Drapal et al., 2020).

A presença de múltiplos genomas em autoploidos proporciona a heterozigose e um maior número de genes e alelos disponíveis (Singh, 2017). O grau da heterozigose pode ser um fator chave no crescimento e desenvolvimento, aumentando os níveis de variação da expressão gênica resultando na capacidade de adaptarem-se a ambientes mais extremos. Os aloploidos apresentam maior grau de heterozigose, no que contribui no vigor híbrido (Sanford 1983; Rieseberg 2001; Lin et al. 2010). Estudos moleculares apontam que aloploidos manifestam a multiplicidade enzimática, resultando na capacidade de produzir enzimas de cada progenitor e novas enzimas híbridas, fornecendo uma maior flexibilidade bioquímica (Roose e Gottlieb, 1976; Soltis e Soltis 1993).

Plantas poliploides tendem a ocorrer a diploidização com o tempo retornando ao estado diploide, no entanto alterações morfológicas, fisiológicas e genômicas são perdidas ou adquiridas com o processo (Soltis et al., 2010; Moghe e Shiu, 2014; Ramirez-Parra, 2015).

2.2. Importância da poliploidia no melhoramento genético de plantas

No melhoramento genético de plantas a indução de poliploidia possibilita conseguir plantas maiores e melhores, restaurar a fertilidade ou transferir genes de interesse entre níveis de ploidia diferentes, intra ou interespecíficos (Schifino-Wittmann, 2004; Liqin et al., 2019). Esse aumento do número de cópias do genoma ou na adição de diferentes genomas em espécies agrícolas, florestais e ornamentais, agrega alto valor econômico, em geral, plantas poliploides apresentam mudanças

genéticas e epigenéticas significativas o que leva há possíveis alterações fenológicas, fenotípicas e fisiológicas (Yang et al. 2011; Van de Peer et al., 2017; Liqin et al., 2019).

Geralmente, a poliploidização é induzida para contornar a esterilidade cromossômica dos híbridos interespecíficos, mas também pode usada para induzir a esterilidade e eliminar as sementes em frutas, como é o caso em uva, mamão, maçã, melancia, banana e citros (Wang et al., 2016).

Cerca de 100% das angiospermas (Soltis et al., 2009; Jiao et al., 2011; Del pozo e Ramirez-Parra, 2015) e 40% das espécies cultivadas possuem genoma poliploides (Aversano et al., 2012). Dentre as espécies cultivadas poliploides, destacam-se *Bixa orellana* (Carvalho et al., 1995), *Actinidia chinensis* (Wu et al., 2011), *Trachyspermum ammi* (Noori et al., 2017), *Ophiopogon planiscapus* (Gillooly et al., 2015), *Impatiens walleriana* (Ghanbari et al., 2019), *Raphanus sativus* x *Brassica oleracea* (Niimi et al., 2015), *Cannabis sativa* (Parsons et al., 2019), *Cucumis sativus* (Ebrahimzadeh et al., 2018), *Passiflora edulis* (Rêgo et al., 2011), *Panicum virgatum* (Yang et al., 2014), *Populus hopeiensis* (Wu et al., 2020), *Populus tomentosa* (Xu et al., 2017), *Petunia axillaris* (Regalado et al., 2017), dentre outras (Schifino-Wittmann e Agnol 2003). Considerando as espécies florestais, destacam-se *Pinus silvestres*, *Pinus contorta*, *Picea abis*, *Larix sibirica*, *Betula pendula*, *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus grandis*, *Acacia mearnsii* (Johnsson, 1975; Särkilahti; Valanne, 1990; Blakesley et al. 2002; Ewald et al. 2009; Lin et al. 2010; Han et al. 2011).

Plantas poliploides, geralmente expressam características morfofisiológicas aprimoradas, como aumento de atributos vegetativos e reprodutivos, maior concentração do teor de metabólitos primários e secundários, alterações na densidade e no tamanho das estruturas estomáticas, tolerância ou resistência a tensões abióticas e bióticas (Rêgo et al., 2011; Sattler et al., 2015; Liqin et al., 2019; Ruiz et al., 2020).

Em *Cattleya intermedia*, Mello et al (2000) utilizaram mensurações da área dos estômatos e da densidade estomática para a distinção entre plantas diploides e tetraploides, afirmando que plantas tetraploides apresentam menor densidade estomática com estômatos maiores. Em poliploides obtidos do híbrido triploide de *Pennisetum purpureum* e *Pennisetum glaucum*, houve a redução da frequência

estomática e aumento do comprimento dos estômatos (Campos et al., 2009), o mesmo comportamento morfológico estomático foi evidenciado em plantas poliploides de amoreira por Ramesh et al (2011). Mikovski et al (2021), observaram diferenças significativas nas dimensões dos órgãos vegetativos e reprodutivos de indivíduos diploides e triploides de *P. foetida*. O comprimento médio das folhas de plantas triploides foi significativamente maior que seu respectivo diploide, também observado para as dimensões das peças florais. Alterações no tamanho e densidade dos estômatos são comuns entre poliploides (Rêgo et al., 2011; Talebi et al., 2017; Parsons et al., 2019).

Em poliploides de *M. sinensis* e *M. x giganteus*, variações fenotípicas no diâmetro do grão de pólen e comprimento das espiguetas foram observadas em relação ao homólogos diploides (Głowacka et al., 2010). Chae et al (2012), observaram variações na altura da planta, número de perfilhos e diâmetro do caule em poliploides de *M. x giganteus*. Plantas tetraploides de *Phalaenopsis amabilis* são mais compactas e exibem folhas arredondadas e grossas com coloração verde mais escura que as diploides (Mohammadi et al., 2021).

2.2 Métodos de obtenção artificial de poliploides

Entre os métodos de melhoramento utilizados para obtenção de novos genótipos poliploides, a hibridação interespecífica seguida por um evento poliploidização é um método utilizado para criar variabilidade ou transferir características de interesse econômico, normalmente após o evento poliploidização é restaurado a fertilidade nos híbridos, regularizando o pareamento meiótico (Schifino-Wittmann, 2004). Da mesma forma, características de espécie silvestre podem ser transferidas para espécies cultivadas, conferindo resistência a determinados estresses bióticos e abióticos (Gonçalves et al., 2011).

Os poliploides ocasionalmente se estabelecem dentro das populações naturais após um processo mutagênico que produz alterações bruscas no genótipo, essas alterações mutações numéricas (aneuploidia e euploidia), podem provocar modificações nas proteínas produzindo efeitos fenotípicos relativamente leves,

representando uma classe de mutação relativamente frequente em plantas (Predieri, 2001).

A poliploidia pode ser induzida de maneira artificial, por métodos biotecnológicos, físicos e químicos. O método biotecnológico emprega os sistemas in vitro de cultivo de massas celulares de calos de células variantes ou também por meio da fusão de protoplastos (Phillips et al., 1994; Slater et al., 2003). Os métodos físicos se baseia em processos de choques térmicos quentes e/ou frios e os de pressão (Randolph, 1932).

Entretanto, a utilização de agentes químicos antimitóticos na duplicação cromossômica vem sendo mais vantajosa, atualmente temos a colchicina, orizalina, ácido nitroso, APM (Amiprofos-methyl) e trifluralina como as principais substâncias para a indução de poliploides, capazes de atuar em diferentes pontos do ciclo mitótico alterando sua via padrão. Estes agentes atuam sobre as fibras do fuso mitótico impedindo sua polimerização e suprimindo a separação dos cromossomos na anáfase e citocinese (Doležel et al., 1994; Eeckhaut et al., 2002; Quesenberry et al., 2010, Esmaeili et al., 2020; Touchell et al., 2020).

Vários estudos relatam a utilização de agentes antimitóticos na poliploidização com o intuito de contornar a esterilidade cromossômica de híbridos interespecíficos, ou as vezes utilizados para induzir a esterilidade, a fim de eliminar as sementes de alguns frutos, como por exemplo, em melancia (Souza; Queiróz; Dias, 1999), uva (Wakana et al., 2008) e banana (Vanduren et al., 1996).

Dentre os agentes antimitóticos artificiais, o alcaloide colchicina destaca-se por apresentar maior facilidade e eficiência como indutor de poliploidia em tecidos vegetais, por ser solúvel em soluções aquosas e estável ao calor, podendo ser autoclavado e sendo um poderoso agente antimitótico no melhoramento vegetal. A colchicina ($C_{22}H_{25}O_6N$) é um alcaloide extraído de sementes e bulbos *Colchicum autumnale* L. (Liliaceae), sendo sua utilização descrita por volta de 1550 a.C. para o tratamento de reumatismo e da gota (Eigsti e Dustin, 1955). O primeiro relato de indução de duplicação cromossômica em plantas foi em 1937 por Blakeslee e Avery, o que representou um avanço no melhoramento vegetal (Blakeslee e Avery, 1937; Glowacka et al., 2009).

A colchicina atua no final da prófase mitótica, suprimindo a formação das fibras do fuso acromático ou levando a formação de um fuso abortivo pela precipitação das proteínas constituintes das fibras, geralmente induzindo células com diferentes variações cromossômicas (Dhooghe et al., 2010). Esse aumento do número cromossômico, geralmente, favorece o aumento de estruturas morfológicas e reprodutivas, alterando a conformação da morfologia da planta (Wu et al., 2010). Porém, a aplicação de colchicina pode apresentar baixa taxa na frequência de poliploidia e alta frequência na formação de mixoploides, a utilização de altas concentrações ou tratamento prolongado podem acarretar a morte vegetal, no entanto, varia para o tipo de explante utilizado e a permeabilidade do tecido cultivado *in vitro* (Allum et al., 2007).

Os mixoploides são caracterizados por apresentarem células com variações no número cromossômico, em um mesmo tecido ou entre órgãos da planta formada (Pereira et al., 2012), pois o agente antimicrotubulante age em células que estão em estado de divisão celular e nem sempre são atingidas todas as células tratadas (Zhang et al., 2010).

Em função a colchicina ser uma substância com alta toxicidade ao ser humano, e apresentam fitotoxicidade *in vitro* e, quando utilizada em altas concentrações pode ocasionar problemas como esterilidade, crescimento anormal, mutações, perdas ou rearranjos cromossômicos (Yemets e Blume, 2008). Outros compostos herbicidas pertencente a classe das dinitroanilinas como a orizalina, trifluralina e amiprofosmetil (APM), vem sendo empregado como alternativa à colchicina para poliploidização para indução de poliploides (Eeckhaut et al., 2004; khosravi et al., 2008). A orizalina apresenta baixa citotoxicidade as plantas e induz o maior número de plantas poliploides, reduzindo a incidência de mixoploides (Morejohn et al., 1987; Tosca et al., 1995; Vanduren et al., 1996). A eficiência do APM e trifluralina é variável, mas a maioria dos resultados tem sido promissores (Khosravi et al., 2008). Assim, a relação da concentração e o tempo de exposição aos agentes mitóticos devem ser determinados para cada espécie de planta e tipo de material a ser tratado (Eng e Ho 2019; Niazian e Nalouse, 2020).

Atualmente, a utilização do endosperma (3n) como fonte de explante na regeneração *in vitro* possibilitou a obtenção de plantas triploides (Bajaj et al., 1980; Góralski et al., 2005; Miyashita et al. 2009; Hoshino et al., 2011; Sun et al. 2011; Wang et al., 2016; Antoniazzi et al., 2018; Silva et al., 2020; Machado 2020 (dados não publicados); Mikovski et al., 2021). Devido à formação do endosperma, que ocorre pela fusão de um núcleo haploide espermático com dois núcleos polares haploides, o cultivo *in vitro* deste tecido possibilita a formação direta de plantas triploides (Hoshino et al., 2011, Wang et al., 2016).

A utilização do endosperma como fonte de explante já foi descrita em arroz (Bajaj et al., 1980), *Citrus* sp. (Gmitter et al., 1990), *Acacia nilotica* (Garg et al., 1996), *Azadirachta indica* (Chaturvedi et al. 2003), *Actinidia deliciosa* (Góralski et al., 2005), *Lonicera caerulea* (Miyashita et al. 2009), *Carica papaya* (Sun et al. 2011), *Actinidia kolomikta* (Asakura e Hoshino, 2017), *Passiflora edulis* (Antoniazzi et al., 2018), *Passiflora cincinnata* (Silva et al., 2020) e *Passiflora foetida* (Mikovski et al., 2021).

Outro método de obtenção de plantas triploides é através da hibridação sexual entre uma planta tetraploide e uma diploide, entretanto é um método convencional que requer tempo, devido ao longo ciclo de vida das plantas (Hoshino et al., 2011).

2.4 Poliploidia em maracujazeiros e as perspectivas desses genótipos no melhoramento

O gênero *Passiflora* pertence à família Passifloraceae, é composto por 20 gêneros com cerca de 530 espécies, sendo que aproximadamente 70 espécies produzem frutos comestíveis (Cervi, 1997; Faleiro et al., 2005; Bernacci et al., 2008; Bernacci et al., 2013). A família Passifloraceae ocorre principalmente em regiões neotropicais, no Brasil ocorrem 139 espécies distribuídas em quatro subgêneros: *Astrophea* Mast., *Decaloba* Rchb., *Deidamioides* Killip. e *Passiflora* L., no qual o subgênero *Passiflora* o táxon mais diversificado (Ulmer e MacDougal, 2004; Bernacci et al., 2008; Bernacci et al., 2013).

O uso comercial de espécimes do gênero *Passiflora* é de suma importância, pois possibilita a fabricação de bebidas, produção de defensivo agrícola, produção de remédios por conter compostos de passiflorina e alcalóides (Braga et al., 2006; Oliveira, 2009). Espécimes como *P. alata* Curtis e *P. foetida* L., são utilizadas como calmantes, antiespasmódicos, anti-helmínticos e como regulador do ciclo menstrual (Killip, 1938; Chitty, 2006), além de serem cultivadas para fins ornamentais (Bernacci; Meletti; Soares-Scott, 2005). No Brasil o uso de espécies silvestres de maracujazeiros com potencial ornamental e comercial vem sendo utilizados em cruzamentos interespecíficos para produção de híbridos (Junqueira et al., 2008; Santos et al., 2012; Amorim et al., 2013). Existem aproximadamente cerca de 400 híbridos artificiais já registrados (Peixoto 2005; Cervi 2006;), sendo que alguns desses foram criados para fins ornamentais, como BRS Estrela do Cerrado, BRS Roseflora, BRS Rubiflora, BRS Rosea Púrpura (Faleiro et al., 2009; Fonseca et al., 2017), *P. alva*, *P. priscilla*, *P. aninha* (Cerqueira-Silva et al., 2014), *P. Byron Beauty*, *P. byte* e *P. clear* (Fisher, 2004).

Mas atualmente, a produção de plantas poliploides de *Passiflora* é uma estratégia relevante em programas de melhoramento genético para a seleção e cultivo de plantas ornamentais e comerciais (Mikovski et al., 2019). No gênero *Passiflora*, a cultura do tecido endospermico é importante método para produção rápida e eficiente de plantas poliploides com características morfoagronômicas vantajosas (Mikovski et al., 2019; Silva et al., 2020; Mikovski et al., 2021; Machado, 2020).

O primeiro relato do cultivo de endosperma para o gênero *Passiflora* foi descrito por Mohamed et al., (1996), no qual utilizaram endosperma (3n) de sementes maduras de *P. foetida* como fonte de explante no cultivo in vitro. Guzzo et al. (2004) cultivando endospermas de *P. apetala*, *P. cincinnata*, *P. glandulosa*, *P. incarnata*, *P. mansii*, *P. nitida*, *P. sub-rotunda* observaram a formação de calos. A regeneração do tecido endospermico pela via organogênica também foi descrita para as espécies *P. edulis* (Antoniazzi et al., 2018), *P. cincinnata* (Silva et al., 2020) e *P. foetida* (Mikovski et al., 2021) no qual obtiveram plantas triploides. Mas recentemente, Machado (2020) estabeleceram protocolo na produção de plantas triploides de *P. cincinnata* a partir da via de embriogênese somática.

A produção de plantas triploides a partir do cultivo in vitro do endosperma do *Passiflora* spp. consiste em uma abordagem moderna na agricultura e no melhoramento genético do gênero *Passiflora*, levando em consideração à aquisição de características morfoagronômicas desejáveis (Hoshino et al., 2011; Wang et al., 2016; Silva et al., 2020; Mikovski et al., 2021).

2.5 Aneuploidia

Em alguns casos de poliploidização com agentes inibidores ou perturbadores das fibras do fuso ocorre a formação de aneuploides, que são indivíduos que apresentam conteúdo de DNA alterado devido à falta ou excesso de cromossomos, que implica no ganho ou perda de informação genética (Sheltzer et al., 2012; Escudero et al., 2014). Existem também outras condições que favorecem a incidência de aneuploides, como mutações em genes responsáveis no controle do pareamento meiótico e mitótica e segregação, deficiência na formação dos fios do fuso, presença de genes específicos e cruzamento entre espécies de diferentes níveis de ploidia (Singh, 2017).

A aneuploidia é originada pela não segregação de um ou mais cromossomos durante a meiose ou mitose. Na mitose a não segregação ocorre pelo não rompimento do centrômero no início da anáfase ou perda de cromossomos por não se ligarem no fuso mitótico. No entanto, a não segregação na meiose é devido a falhas na disjunção dos cromossomos na meiose I ou cromátides na meiose II para os polos opostos (Ramalho et al., 2008).

Comumente os aneuploides podem ser classificados conforme a perda ou ganho cromossômico em seu núcleo, indivíduos que apresentam falta de dois cromossomos não homólogos são chamados de nulissômicos ($2n - 1$), onde há falta de somente um cromossomo são os monossômicos ($2n - 1$). Os indivíduos que apresentam cromossomos em excesso são chamados de polissômicos, que se dividem em trissômico ($2n + 1$) apresentando um cromossomo adicional, tetrassômico ($2n + 2$) com ganho de dois cromossomos e duplotrissômicos ($2n + 2 + 2$) que apresentam dois cromossomos diferentes em excesso (Ramalho et al., 2008; Singh, 2017).

A utilização de aneuploides nos programas de melhoramento vegetal, permite identificar genes e regiões cromossômicas responsáveis por características agrônomicas de interesse econômico, além de possibilitar o mapeamento genético e dosagem de genes repetitivos no genoma (Wang et al., 2007; Birchler, 2013; Singh, 2017).

2.6 *Passiflora cincinnata* Masters

Passiflora cincinnata Masters conhecida popularmente como maracujá-mochila, maracujá-do-mato e maracujá-mi, é uma espécie silvestre de maracujazeiro diploide com 18 cromossomos ($2n = 2x = 18$). O epíteto específico “*cincinnata*” provém do Latim, que significa por natureza cabelo anelado ou encrespado, fazendo referência à corona de filamentos, cujos filamentos se enrolam quando a flor está completamente em antese (Guerra, 1986; Cervi, 1997).

Esta espécie ocorre com ampla distribuição na América do Sul, em diferentes fitofisionomias da caatinga e cerrado, apresentando registros em diferentes estados brasileiros: Alagoas, Bahia, Brasília, Ceará, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Rio de Janeiro, Santa Catarina e São Paulo (Killip, 1938; Lima; Cunha, 2004; Nunes; Queiroz, 2006; Oliveira Júnior et al., 2010).

Na Inglaterra *P. cincinnata* é cultivada como planta ornamental, pelo fato de apresentar flores de coloração azul rosadas ou violeta, com corona de filamentos com bandeamentos de coloração azul rosado escurecido, azul pálido e azul, além de agradável fragrância (Vanderplank, 2000). Possui filotaxia simples, com número de folhas de 3 a 5 tripartidas ou palmatipartidas, de coloração verde escura na face abaxial e verde pálida na face adaxial, de consistência coriácea, sépalas oblongo-lanceoladas e pecíolos com 2 a 3 glândulas sésseis. Os frutos são ovoides e oblongos, do tipo baga com sementes ovais, faveoladas e negras. Apresentando floração e frutificação, entre os meses de outubro a maio (Vanderplank, 2000; Nunes; Queiroz, 2001; Araújo, 2007; Jesus et al., 2014; Nobrega et al., 2017; Fonseca et al., 2017).

A espécie *P. cincinnata* também apresenta valor agrônômico, pela tolerância à seca, período de florescimento ampliado, longevidade e maior concentração de componentes químicos, contribuindo para os programas de melhoramento vegetal (Meletti et al. 2005; Rybka et al., 2016). Além disso, apresenta resistência a patógenos específicos como ao nematoide *Meloidogyne* sp., a bactéria *Xanthomonas campestris* f. sp. *Passiflorae* e ao fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* (Oliveira; Ruggiero, 2005; Viana et al., 2010; Alexandre et al., 2013; Preisigke et al., 2017).

Embora utilizado nos programas de melhoramento, *P. cincinnata* tem potencial econômico no uso alimentício, cosmético, medicinal e ornamental, oferecendo à sociedade produtos diversificados derivado da espécie. De forma peculiar, a industrialização em pequenas fábricas caseiras constitui em um produto diferenciado, pela vantagem de ser um fruto isento de agrotóxicos e de sabor exótico, o produto manufaturado em forma de geleia é exportado para a Alemanha e Itália, sendo consumido na merenda escolar das comunidades de Uauá, Curaçá e Canudos na Bahia (Araújo et al. 2006; Delmondes et al., 2014; Araújo et al., 2018; Siebra et al., 2018).

Além disto, essa espécie pode ser considerada um modelo para o gênero *Passiflora*, no qual, apresenta excelentes respostas morfogenéticas in vitro, demonstrando grande responsividade organogênica e pela embriogênese somática (Silva et al., 2009, 2020, 2021; Dias et al., 2009; Silva et al., 2011; Rocha et al., 2012; Otoni et al., 2013, Vieira et al., 2018; Silva et al., 2020; Mikovski et al., 2021).

2.7 Caracterização de plantas poliploides

A citometria de fluxo é uma técnica confiável e rápida, que permite a análise do conteúdo de DNA nuclear em partículas microscópicas suspensas em meio líquido em fluxo (Leus et al. 2009). A análise por citometria permite a análise de muitos indivíduos de modo rápido e prático, fornecendo a estimativa do nível de ploidia, identificação de mixoploides, tamanho do genoma e quantidade de DNA, além da estabilidade do genoma e estudos do ciclo celular (Galbraith et al., 1983; Doležel; Doleželova; Novak, 1994; Loureiro et al., 2007).

Esta técnica foi descrita por Galbraith et al. (1983), que consiste na análise de partículas que fluem em uma suspensão líquida, no qual utiliza uma fonte de luz para iluminar o núcleo corado e detectar a fluorescência emitida (Dhooghe et al. 2011; Wear et al., 2016). A coloração da amostra é feita com corantes específicos para o DNA (DAPI, iodeto de propídeo, brometo de etídeo), pela intensidade da fluorescência é possível avaliar e medir a quantidade de DNA nuclear presente (Doležel e Bartos, 2005). A estimativa do conteúdo de DNA da espécie de interesse é comparada com uma espécie padrão de referência, as mais utilizadas são a *Pisum sativum*, *Solanum lycopersicum*, *Raphanus sativus* e *Vicia faba* (Doležel, 1997).

O conteúdo de DNA da espécie padrão de referência deve ser próximo ao conteúdo da espécie de interesse, para que não ocorra a sobreposição entre os picos 2C e 4C. Em casos de poliploidização in vitro, plantas diploides são utilizadas como controle e comparadas com o pico G1 de plantas poliploides (Doležel, 1997).

Estudos atuais têm demonstrado que a citometria é uma técnica confiável para determinar a estabilidade do nível de ploidia dos regenerantes induzidos in vitro (Regalado et al., 2017). Sua utilização já foi descrita em *Pfaffia glomerata* (Gomes et al., 2014), *Thymus persicus* (Tavan et al., 2015), *Lavandula multifida* (Albano et al., 2016), *Kaempferia rotunda* (Soonthornkalump et al., 2017), *Impatiens walleriana* (Ghanbari et al., 2019), *Populus hopeiensis* (Wu et al., 2020), *Passiflora cincinnata* (Silva et al., 2020), *Passiflora foetida* (Mikovski et al., 2021), dentre outras.

As modificações estruturais e numéricas nos cromossomos são evidenciadas pela citogenética, uma ferramenta eficiente e confiável que possibilita a compreensão da estrutura dos cromossomos, o analisar o tamanho relativo, o número e formas dos cromossomos, além dos padrões de heterocromatina (Guerra e Souza, 2002; Viana e Souza, 2012). Por isso, a sua utilização na identificação de poliploides é relevante para examinar a variação entre os indivíduos para seleção de variedades melhoradas (Guerra, 2004).

As análises citogenéticas utilizam cromossomos mitóticos metafásicos, para isso são utilizados inibidores de tubulina que irão despolimerizar o fuso mitótico bloqueando as células em metáfase (Bickmore, 2001). Muitas vezes os padrões cromossômicos revelados são insuficientes não apresentando-se intactos, bem

espalhados, pequenos demais ou semelhantes, dificultando a análise detalhada do cariótipo (Kirov et al., 2014).

As técnicas de coloração possibilitam uma melhor visualização do perfil cromossômico, dentre elas destaca-se o bandeamento C, impregnação de nitrato de prata (AgNO₃), bandeamento com os fluorocromos base-específicos CMA₃/DAPI e hibridização *in situ* (FISH e GISH) (Bennett e Leitch, 1995; Brammer et al., 2015).

A caracterização de regiões heterocromáticas com CMA₃/DAPI possibilita a identificação de regiões ricas em DNA altamente repetitivo denominado de DNA satélite, fornecendo uma caracterização mais eficiente dos cariótipos (Guerra, 2000; Dillon, 2004). Os fluorocromos apresentam afinidades com sequências bases no DNA, o DAPI e a quinacrina apresentam afinidade por regiões ricas em adenina e timina, enquanto o CMA₃ e a mitramicina (MM) apresentam afinidade por regiões ricas em guanina e citosina (Kim et al., 2002; Dillon, 2004). O iodeto de propídeo (IP) e brometo de etídeo (BE) são recomendados para valor absoluto, uma vez que se intercalam quantitativamente na cadeia dupla de DNA (Loureiro e Santos, 2004).

Diversas aplicações são descritas para a caracterização citogenética de espécies e variedades. As divergências nos padrões de bandas com a utilização de fluorocromos foram observadas em *Citrus* sp (Guerra, 1993), *Allium communtatum* (Besendorfer et al., 2002), *Dioclea virgata* (Souza; Benko-Iseppon, 2004), *Crotalaria juncea* (Mondin et al., 2007), *Emilia fosbergii* (Moraes e Guerra, 2010) e *Clivia mirabilis* (Murray et al., 2011).

Atualmente, estudos têm demonstrado que as alterações na expressão gênica de organismos poliploides estão ligadas a processos de metilação de DNA, que exerce efeitos sobre a regulação de elementos transponíveis, ou seja, supressão da expressão gênica (Fedoroff, 1996; Suzuki; Bird, 2008). Os processos de metilação do DNA podem apresentar ligação com os processos de RNAi (RNA de interferência) e modificação de histonas e proteínas remodeladoras da cromatina, no entanto, as alterações na expressão gênica associadas pelos efeitos e causas da relação entre a metilação de DNA e modificações de histonas e proteínas remodeladoras da cromatina não são ainda conhecidas (Matzke; Mosher, 2014; Rose; Klose, 2014; Schübeler, 2015).

Em plantas, a metilação do DNA ocorre pelo incremento de um grupo metil ao carbono 5' da citosina por uma ligação covalente, sendo catalisadas pela enzima DNA metiltransferase 1 (Methyltransferase 1, MET1) em sítios simétricos formados por CpG (citosina seguida de uma guanina), pela enzima Cromometilase 3 (Chromomethylase 3, CMT3) em sítios simétricos de CpNpG (N= A, C ou T) e a Domains Rearranged Methylase (DRM) que catalisa a metilação “de novo” em sítios assimétricos CpHpH (H= C, A ou T) (Feng et al., 2010; Sahu et al., 2013).

Em sítios simétricos de CpG e CpNpG a metilação pode ser mantida após a replicação do DNA por “imprinting” parental pelas enzimas MET1 e CMT3, enquanto nos sítios assimétricos CpNpN a metilação necessita ser estabelecida “de novo” a cada ciclo de replicação do DNA pela enzima DRM em vias dependentes de siRNA (Chan; Henderson; Jacobsen, 2005; Karlsson; Weber; Fussenegger, 2011). A desmetilação do DNA pode ocorrer por proteínas DNA glicosilases, pela deficiência enzimática após a replicação do DNA ou pela função de prevenção de genes de uma metilação potencialmente deletéria (Penterman et al., 2007).

As principais técnicas utilizadas para observação das alterações dos padrões de metilação são a cromatografia RP-HPLC (reversed-phase high performance liquid chromatography) e TLC (thin-layer chromatography), que permite o propiciar as proporções de citosina metiladas e não metiladas, mas não fornecendo o nível de metilação dos genes individuais (Harrison Parlemcdermott, 2011; Alonso et al., 2016).

Mas atualmente, são empregadas técnicas moleculares que possibilitam a identificação no nível de metilação de DNA a nível genômico ou a determinado locus específicos. Como reestruturação das citosinas não metiladas em uracilas, pela ação do bissulfito de sódio, e as citosinas metiladas permanecem inalteradas no DNA e RNA, em alguns casos a técnica está associada a PCR e por enzimas de restrição (Plongthongkum et al. 2014; Schaefer 2015). As técnicas MBD-seq (Methyl binding domain) e Methyl Cap-seq utilizam proteínas ligantes a methyl CpG e precipitam os fragmentos que apresentam metilação nos sítios simétricos de CpG (Serre et al., 2009; Brinkman et al., 2010), já a MeDIP-seq (Methylated DNA immunoprecipitation sequencing) utiliza anticorpos para a precipitação de fragmentos de DNA com citosinas metiladas seguida por sequenciamento (Down et al., 2008).

Os padrões de metilação influenciam durante o desenvolvimento das plantas, expressando caracteres agrônômicos interessantes. Em *Linum usitatissimum* foi observado redução no tempo de florescimento e altura da planta (Fieldes et al., 2005), em *Nicotiana tabacum* verificaram eventos de recombinação combinado com o padrão de metilação específico, induzido pelo ataque de patógeno, levando a uma resposta adaptativa nas plantas (Boyko et al. 2007). Diversos estudos sobre polimorfismos nos padrões de metilação têm sido relatados, *Allium cepa* (Ruffini Castiglione; Giraldi; Frediani, 1995), *Triticosecale wittmack* (Castilho et al., 1999), *Oriza sativa* (Ashikawa, 2001), *Zea mays* (Tani et al., 2005), *Gossypium hirsutum* L. (Keyte et al., 2006). *Arabidopsis thaliana* (Fransz; Hoopen; Tessadori, 2006; Vaughn et al. 2007), *Brassica oleraceae* (Salmon et al., 2008), *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* e *Populus trichocarpa* (Feng et al., 2010).

A densidade estomática e o tamanho dos estômatos podem sofrer variações de acordo com o nível de poliploidização, em geral organismos poliploides exibem uma menor densidade estomática, porém com estômatos maiores (Hodgson et al. 2010). Já foram observados nas espécies *Zantedeschia elliottiana* (Cohen e Yao 1996), *Aegilops neglecta* (Aryavand et al., 2003), *Zizyphus jujuba* (Gu et al., 2005), *Centella asiatica* (Kaensaksiri et al., 2011), *Gerbera jamesonni* (Gantait et al., 2011) e *Lagerstroemia indica* (Wang et al., 2012).

A técnica de decalque foliar para análise de estômatos é uma forma fácil e rápida de separação de supostos poliploides (Cohen e Yao 1996), mantendo a integridade do molde na lâmina de vidro e podendo ser guardado por longo tempo.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACQUAAH, G. Principles of plant genetics and breeding. Polyploidy in plant breeding, **Wiley-Blackwell**. Malden. 13: 214-230, 2007.

ADAMS K.L.; WENDEL, J.F. Polyploidy and genome evolution in plants. **Current Opinion in Plant Biology**. 8(2): 135-41, 2005.

- ALEXANDRE, R.S.; LOPES, J.C.; TIRADENTES, A.T.; BRUCKNER, C.H.; OTONI, W.C. Metodologia de minienxertia em maracujazeiros. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 35: 329-332, 2013.
- ALEZA, P.; JUÁREZ, J.; CUENCA, J.; OLLITRAULT, P. Recovery of citrus triploid hybrids by embryo rescue and flow cytometry from $2x \times 2x$ sexual hybridizations and its application to extensive breeding programs. **Plant Cell Reports**. 29: 1023–1034, 2010.
- ALLUM, J.F.; BRINGLOE, D.H.; ROBERTS, A.V. Chromosome doubling in a *Rosa rugosa* Thunb. hybrid by exposure of in vitro nodes to oryzalin: the effects of node length, oryzalin concentration and exposure time. **Plant Cell Reports**. 26: 1977–1984, 2007.
- ALONSO, C.; PÉREZ, R.; BAZAGA, P.; MEDRANO, M.; HERRERA, C.M. MSAP markers and global cytosine methylation in plants: a literature survey and comparative analysis for a wild-growing species. **Molecular Ecology Resources**. 16: 80-90. 2016.
- AMORIM, F.L.; SILVEIRA, P.T.S.; SILVA, G.V.; CAFIEIRO, C.S.P. Elaboração e aceitação sensorial de licor maracujá-do-mato com diferentes tipos de calda. **Revista de Desenvolvimento e Inovação**. 1: 88- 91, 2013.
- ANTONIAZZI, C.A.; FARIA, R.B.; CARVALHO, P.P.; MIKOVSKI, A.I.; CARVALHO, I.F.; MATOS, E.M.; OTONI, W.C. In vitro regeneration of triploid plants from mature endosperm culture of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims). **Scientia Horticulturae**. 238: 408-415, 2018.
- ARAÚJO, F.P.; MELO, N. F.; FALEIRO, F.G. Produção de mudas do maracujazeiro silvestre *Passiflora cincinnata* Mast. BRS Sertão Forte (BRS SF), 2016.
- ARYAVAND, A.; EHDAIE, B.; TRAN, B.; WAINES, J.G. Stomatal frequency and size differentiate ploidy levels in *Aegilops neglecta*. **Genetic Resources and Crop Evolution**. 50: 175–182, 2003.
- ASAKURA, I.; HOSHINO, Y. Endosperm-derived triploid plant regeneration in diploid *Actinidia kolomikta*, a cold-hardy kiwifruit relative. **Scientia Horticulturae**. 219: 53-59, 2017.
- ASHIKAWA, I. Gene-associated CpG islands in plants as revealed by analyses of genomic sequences. **The Plant Journal**. 26: 617-625, 2001.

AVERSANO, R.; ERCOLANO, M.R.; CARUSO, I.; FASANO, C.; ROSELLINI, D.; CARPUTO, D. Molecular tools for exploring polyploid genomes in plants. **International Journal of Molecular Sciences**. 13(8): 10316-10335, 2012.

BAJAJ, Y.P.S.; SAINI S.S.; BIDANI, M. Production of triploid plants from the immature and mature endosperm cultures of rice. **Theoretical and Applied Genetics**. 58: 17–18, 1980.

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

BANYAI, W.; SANGTHONG, R.; KARAKET, N.; INTHIMA, P., MII, M.; SUPAIBULWATANA, K. Overproduction of artemisinin in tetraploid *Artemisia annua* L. **Plant Biotechnology**. 27: 427–433, 2009.

BARBOSA, L.V.; VIEIRA, M.L.C. Meiotic behavior of passion fruit somatic hybrids, *P.edulis* f. *flavicarpa* Degener + *P.amethystina* Mikan. **Euphytica**. 98: 121–127,1997.

BASUMATARI, M.; DAS, B.N. Karyomorphological studies in two species of *Bauhinia* Linn. and induction of polyploidy in *Bauhinia acuminata* Linn. **International Journal of Life Sciences Research**. 3: 123-1229, 2017.

BENNETT, M.D.; LEITCH, I.J. Nuclear DNA amounts in Angiosperms. **Annals of Botany**. 76: 113-176, 1995.

BERNACCI, L.C.; CERVI, A.C.; MILWARD-DE-AZEVEDO, M.A.; NUNES, T.S.; IMIG, D.C.; MEZZONATO, A.C. **Passifloraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB182>>. Acesso em: 10, novembro, 2020.

BERNACCI, L.C.; SOARES_SCOTT, M.D.; JUNQUEIRA, N.T.V.; PASSOS, I. R.S.; MELETTI, L. M. M. *Passiflora edulis* SIMS: the correct taxonomic way to cite the yellow passion fruit (and of other colors). **Revista Brasileira de Fruticultura**. 30: 566-576, 2008.

BESENDORFER, V.; SAMARDZIJA, M.; ZOLDOS, V.; SOLIC, M. E.; PAPES, D. Chromosomal organization of ribosomal genes and NOR-associated heterochromatin, and NOR activity in some populations of *Allium commutatum* Guss. (Alliaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**. 139: 99–108, 2002.

- BHARADWAJ, D.N. Polyploidy in crop improvement and evolution. pp. 619-637. In: BAHADUR, B. (Ed.), **Plant Biology and Biotechnology: Volume I: Plant Diversity**. Organization, Function, and Improvement, 2015.
- BICKMORE, W.A. Karyotype analysis and chromosome banding. **Encyclopedia of Life Sciences**. 1-7, 2001.
- BLAKESLEE, A.F.; AVERY A.G. Methods of inducing doubling of chromosomes in plants. **Journal of Heredity**. 28: 393-411, 1937.
- BLAKESLEY, D.; ALLEN, A.; PELLNY, T.K.; ROBERTS, A.V. Natural and induced polyploidy in *Acacia dealbata* Link. and *Acacia mangium* Willd. **Annals of Botany**. 90: 391-398, 2002.
- BOYKO, A.; KATHIRIA, P.; ZEMP, F.J.; YAO, Y.; POGRIBNY, I.; KOVALCHUK, I. Transgenerational changes in the genome stability and methylation in pathogeninfected plants (virus-induced plant genome instability). **Nucleic Acids Research**. 35: 1714–25. 2007.
- BRAGLIA, L.; DE BENEDETTI, L.; GIOVANNINI, A.; BIANCHINI, A.; PIPINO, L.; MERCURIA, A. In vitro plant regeneration as a tool to improve ornamental characters in *Passiflora* species. **Acta Horticulturae**. 855:47-52, 2010.
- BRAMMER, S.P.; TONIAZZO, C.; POERSCH, L.B. Corantes comumente empregados na citogenética vegetal. **Arquivo do Instituto Biológico**. 82: 1-8, 2015.
- BRINKMAN, A.B.; SIMMER, F.; MA, K.; KAAAN A.; ZHU, J.; STUNNENBERG, H.G. Whole-genome DNA methylation profiling using MethylCap-seq. **Methods**. 52: 232–236, 2010.
- CASTILHO, A.; NEVES, N.; RUFINI-CASTIGLIONE, M.; VIEGAS, W.; HESLOP-HARRISON, J.S. 5-Methylcytosine distribution and genome organization in *Triticale* before and after treatment with 5-azacytidine. **Journal of Cell Science**. 112(23), 4397-4404, 1999.
- CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; FALEIRO, F.G.; JESUS, O.N.; SANTOS, E.S. L.; SOUZA, A. P. The genetic diversity, conservation, and use of passion fruit (*Passiflora* spp.) In: AHUJA, M. R.; JAIN, S. M. (eds). **Genetic Diversity and Erosion in Plants – Case Histories**. Dordrecht, Springer International Publishing. 2: 215–231, 2010.
- CERVI, A. C. *Passifloraceae* do Brasil: estudo do gênero *Passiflora* L. subgênero *Passiflora*. **Fontqueria**. Madrid. 45 :1-92, 1997.

- CERVI, A.C. O gênero *Passiflora* (Passifloraceae) no Brasil, espécies descritas após o ano de 1950. **Adumbrationes and Summæ Editionem**. 16: 1-5, 2006.
- CHAE, W.B.; HONG, S.J.; GIFFORD, J.M.; RAYBURN, A.L.; WIDHOLM, J.M.; JUVIK, J.A. Synthetic polyploid production of *Miscanthus sacchariflorus*, *Miscanthus sinensis*, and *Miscanthus x giganteus*. **GCB Bioenergy**. 5: 338–350, 2013.
- CHATURVEDI, R., RAZDAN, M.K., BHOJWANI, S.S. An efficient protocol for the production of triploid plants from endosperm callus of neem, *Azadirachta indica* A. Juss. **Journal Plant Physiology**. 160: 557–564, 2003.
- CHAN, S.W.L.; HENDERSON, I.R.; JACOBSEN, S.E. Gardening the genome:DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. **Genetics**. 6: 351–360, 2005.
- CHEN, Z.J. Molecular mechanisms of polyploidy and hybrid vigor. **Trends in Plant Science**. 15: 57-71, 2010.
- CHITTY, D.F. El género *Passiflora* L. en El Hato Piñero, Estado Cojedes, Venezuela. **Acta Botánica Venezuelica**. 29: 27-37, 2006.
- chromosome doubling. **BioEnergy Research**. 7: 232–242, 2014.
- COHEN, D, YAO, J.L. In vitro chromosome doubling of nine *Zantedeschia* cultivars. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 47: 43–49, 1996.
- DARLINGTON, C.D **Chromosome botany and the origins of cultivated plants** (3rd ed). George Allen & Unwin Ltd., London, 1973.
- DEL POZO, J.C.; RAMIREZ-PARRA, E. Whole genome duplications in plants: an overview from *Arabidopsis*. **Journal of Experimental Botany**. 66(22): 6991-7003, 2015.
- DHOOGHE, E.; LAERE, K. V.; EECKHAUT, T.; LEUS, L.; UYLENBROECK, J. V. Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 104: 359-373, 2011.
- DIAS, L.L.C.; SANTA-CATARINA, C.; RIBEIRO, D.M.; BARROS, R.S.; FLOH, E L.S.; OTONI, W.C. Ethylene and polyamine production patterns during in vitro shoot organogenesis of two passion fruit species as affected by polyamines and their inhibitor. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 99: 199-208, 2009.
- DILLON, N. Heterochromatin structure and function. **Biology of the Cell**. 96: 631–637, 2004.

- DOLEŽEL, J.; LUCRETTI, S.; SCHUBERT, Y. Plant chromosome analysis and sorting by flow cytometry. **Critical Reviews in Plant Sciences**. 13(3): 275-309, 1994.
- DOLEŽEL, J.; DOLEŽELOVA, M.; NOVAK, F. J. Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa accuminata* and *M. balbisiana*). **Biologia Plantarum**. 36(3): 351-357, 1994.
- DOLEŽEL, J. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics**. 38(3): 285-302, 1997.
- DOLEŽEL L, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**. 95(1): 99-110, 2005.
- DRAPAL, M.; AMAH, D.; SCHÖNY, H.; BROWN, A.; SWENNEN, R.; FRASER, P.D. Assessment of metabolic variability and diversity present in leaf, peel and pulp tissue of diploid and triploid *Musa* spp. **Elsevier**. 176: 112388, 2020.
- DOWN, T.A.; RAKYAN, V.K.; TURNER, D.J.; FLICEK, P.; LI, H.; KULESHA, E.; GRAF, S.; JOHNSON, N.; HERRERO, J.; TOMAZOU, E.M.; THORNE, N. P.; BACKDAHL, L.; HERBERTH, M.; HOWE, K.L.; JACKSON, D.K.; MIRETTI, M.M.; MARIONI, J.C.; BIRNEY, E.; HUBBARD, T.J.; DURBIN, R.; TAVARÉ, S.; BECK, S. A Bayesian deconvolution strategy for immunoprecipitation-based DNA methylome analysis. **Nature Biotechnology**. 26: 779–785, 2008.
- EBRAHIMZADEH, H.; SOLTANLOO, H.; SHARIATPANAHI, M.E.; ESKANDARI, A.; RAMEZANPOUR, S.S. Improved chromosome doubling of parthenogenetic gaploid plants of cucumber (*Cucumis sativus* L.) using colchicine, trifluralin, and oryzalin. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 135: 407–417, 2018.
- EECKHAUT, T.; SAMYN, G.; VAN BOCKSTAELE, E. In vitro polyploidy induction in *Rhododendron simsii* hybrids. **Acta Horticulturae**. 572: 43-49, 2002.
- EECKHAUT, T.; WERBROUCK, S.; LEUS, L.; VAN BOCKSTAELE, E.; DEBERGH, P. Chemically induced polyploidization in *Spathiphyllum wallisii* Regel through somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 78: 241–246, 2004.
- EIGSTI, O.J.; DUSTIN, P.Jr.. Colchicine in agriculture, medicine, biology and chemistry. Ames, Iowa, U.S.A., **The Iowa State College Press**. p.470, 1955.
- ENG, W.H.; HO, W.S. Polyploidization using colchicine in horticultural plants: a review. **Scientia Horticulturae**. 246: 604–617, 2019.

- ESMAEILI, G.; VAN, LAERE, V.K.; MUYLLE, H.; LEUS, L. Artificial Chromosome Doubling in Allotetraploid *Calendula officinalis*. **Frontiers in Plant Science**. 11: 622, 2020.
- EWALD, D.; ULRICH, K.; NAUJOKS, G.; SCHRÖUDER, M.B. Induction of tetraploid poplar and black locust plants using colchicines: chloroplast number as an early marker for selecting polyploids in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 99: 353-357, 2009.
- FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.N.V.; BRAGA, M.F.; PEIXOTO, J.R.; BORGES, R.S.; ARAÚJO, S.C.B.; ANDRADE, S.R.M.; COSTA, A.M.; CASTELLEN, M.S.; VAZ, A.P.A.; SOARES-SCOTT, M.D.; BERNACCI, L.C.; ANDRADE G.A. BRS Estrela do Cerrado, BRS Rubiflora e BRS Roseflora: híbridos de maracujazeiro para uso como plantas ornamentais. In: FALEIRO, F. G.; FARIAS NETO, A.L.; RIBEIRO JUNIOR, W.; Q. **Livros e Cultivares Apresentados no II Encontro da Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas – Regional – DF**. Embrapa Cerrados, Planaltina – DF, p.45, 2009.
- FARIA, R.B.; CARVALHO, I.F.; ROSSI, A.B.; MATOS, E.M.; ROCHA, D.I.; PAIM PINTO, D.L.; OTONI, W. C.; SILVA, M.L. High responsiveness in de novo shoot organogenesis induction of *Passiflora cristalina* (Passifloraceae), a wild Amazonian passion fruit species. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**. 54: 166-174, 2018.
- FAWCETT, J.A.; MAERE, S.; PEER, Y.V. Plants with double genomes might have had a better chance to survive the Cretaceous-Tertiary extinction event. **PNAS**. 106(14): 5737-5742, 2009.
- FEDOROFF, N. Epigenetic regulation of Spm. In: RIGGS, A.; MARTIENSSEN, R.; RUSSO, V. (Ed.). Epigenetic mechanisms of gene regulation. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**. 1996: 575-592.
- FENG, S.; COKUS, S.J.; ZHANG, X.; CHEN, P.Y.; BOSTICK, M.G.G.; HETZEL, J.; JAIN, J.; STRAUSS, S.H.; HALPERN, C.U.; SADLER, K.C.; PRADHAN, S.; PELLEGRINI, M.; JACOBSEN, JACOBSEN, S.E Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 107(19): 8689-8694, 2010.
- FIELDES, M.A.; SCHAEFFER, S.M.; KRECH, M.J.; BROWN, J. C. DNA hypomethylation in 5-azacytidine-induced early flowering lines of flax. **Theoretical and Applied Genetics**. 111(1): 136–49, 2005.

FONSECA, K.G.D.; FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BARTH, M.; FELDBERG, N.P. Morphoagronomic and molecular characterization of ornamental passion fruit cultivars. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 52: 849-860, 2017.

FRANSZ, P.; HOOPEN, R.; TESSADORI, F. Composition and formation of heterochromatin in *Arabidopsis thaliana*. **Chromosome Research**. 14(1): 71-82, 2006.

FU, L.; ZHU, Y.; LI, M.; WANG, C.; SUN, H. Autopolyploid induction via somatic embryogenesis in *Lilium distichum* Nakai and *Lilium cernuum* Komar. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 139: 237-248, 2019.

GALBRAITH, D.W.; HARKINS, K. R.; MADDON, J.M.; AYRES, N.M.; SHARMA, D.P.; FIROOZABADY, E. Rapid flow cytometric analysis of the cell-cycle in intact plant tissues. **Science**. 220(4601): 1049- 1051, 1983.

GANTAIT, S.; MANDAL, N.; BHATTACHARYYA, S. DAS P.K. Induction and identification of tetraploids using in vitro colchicine treatment of *Gerbera jamesonii* Bolus cv. Sciella. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 106: 485–493, 2011.

GARG, L.; BHANDARI, N.N.; RANI, V.; BHOJWANI, S.S. Somatic embryogenesis and regeneration of triploid plants in endosperm cultures of *Acacia nilotica*. **Plant Cell Reports**. 15: 855-858, 1996.

GHANBARI, M.A.; JOWKAR, A.; SALEHI, H.; AND ZAREI, M. Effects of polyploidization on petal characteristics and optical properties of *Impatiens walleriana* (Hook.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 138: 299–310, 2019.

GILLOOLY, D.A.; TOUCHELL, D.H.; RANNEY, T.G. In vitro polyploid induction of *Ophiopogon planiscapus*. **SNA Research Conference**. 60: 181–185, 2015.

GIULIETTI, A.M.; CONCEIÇÃO, A.A.; QUEIROZ, L.P. (eds.). **Diversidade e caracterização das fanerógamas do Semi-Árido Brasileiro**. Primeira Edição. Volume 1. Instituto do Milênio do Semi-Árido, Associação Plantas do Nordeste, Recife, PE. p.488, 2006.

GLOWACKA, K.; JEZ, S.; KACZMAREK, Z. Polyploidization of *Miscanthus sinensis* and *Miscanthus x giganteus* by plant colchicine treatment. **Industrial Crops and Products**. 30: 444-446, 2009.

GMITTER, F.G.; LING, X.B.; DENG, X.X. Induction of triploid *Citrus* plants from endosperm calli in vitro. **Theoretical and Applied Genetics**. 80: 785-790, 1990.

GOMES, S.S.L.; SALDANHA, C.W.; NEVES, C.S.; TREVIZANI, M.; RAPOSO, N.R.B.; NOTINI, M.M.; DE OLIVEIRA, M.; CAMPOS, J.M.S.; OTONI, W.; VICCINI, L.F. Karyotype, genome size, and in vitro chromosome doubling of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 118(1): 45-56, 2014.

GÓRALSKI, G.; POPIELARSKA, M.; SLESIAK, H.A.L.I.N.A.; SIWINSKA, D.; BATYCKA, M. Organogenesis in endosperm of *Actinidia deliciosa* cv. Hayward cultured in vitro. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**. 47: 121-128, 2005.

GONÇALVES, L.S.A.; RODRIGUES, R.; BENTO, C.S.; ROBAINA, R.R.; AMARAL JÚNIOR., A.T. Herança de caracteres relacionados à produção de frutos em *Capsicum baccatum* var. *pendulum* com base em análise dialélica de Hayman. **Revista Ciência Agronômica**. 42(3): 662- 669, 2011.

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

GUERRA, M.S. Citogenética de angiospermas coletadas em Pernambuco, I. **Revista Brasileira de Genética**. 9: 21-40, 1986.

GUERRA, M. Hybridization in situ: princípios Básicos. In: GUERRA, M. (Org.) **FISH: conceitos e aplicações na citogenética**. Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto, 2004.

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

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

HAN, C.; XU, J.M.; DU, Z.H.; LI, G.Y.; ZENG, B.S.; WU, S.J.; WANG, W. Polyploidy induction of clone of *Eucalyptus grandis* with colchicine. **African Journal of Biotechnology**. 10(66): 14711-14717, 2011.

HARRISON, A.; PARLE-MCDERMOTT, A. DNA methylation: a timeline of methods and applications. **Front Genetics**. 2: 1-13, 2011.

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

HEGARTY, M.; HISCOCK, S. Polyploidy: doubling up for evolutionary success. **Current Biology**. 17: 927–929, 2007.

HESLOP-HARRISON, J.S.; SCHWARZACHER, T. The plant genome: an evolutionary view on structure and function organization of the plant genome in chromosomes. **The Plant Journal**. 66: 18-33, 2011.

HOVAV, R.; UDALL, J.A.; CHAUDHARY, B.; RAPP, R.; FLAGEL, L.; WENDEL, J.F. Partitioned expression of duplicated genes during development and evolution of a single cell in a polyploid plant. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 105: 6191–6195, 2008.

IANNICELLI, J.; GUARINIELLO, J.; TOSSI, J.J.; REGALADO, L.; DI-CIANCCIO, L.; VAN-BAREN, C.M.; PITTA ALVAREZ, S.I.; ESCANDÓN, A.S. The “polyploid effect” in the breeding of aromatic and medicinal species. **Scientia Horticulturae**. 260:108854, 2020.

JESUS, F.N.; MACHADO, C.F.; SOUZA, V.O.; MATOS, M.S.S.; SILVA, J.S.; LEDO, C.A.S.; FALEIRO, F.G. **Caracterização morfoagronômica de acessos da coleção de maracujá da Embrapa Mandioca e Fruticultura**. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 61. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, p.27, 2014.

JOHNSSON, H. Observations on induced polyploidy in some conifers. **Silvae Genetica**. 24 (2-3): 62-68, 1975.

JUNQUEIRA, K.P.; FALEIRO, F.G.; RAMOS, J.D.; BELLON, G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.K. Variabilidade genética de acessos de maracujá-suspiro com base em marcadores moleculares. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 29: 571-575. 2007.

KAENSAKSIRI, T.; SOONTORNCHAINAKSAENG, P.; SOONTHORNCHAREONNON, N.; PRATHANTURARUG, S. In vitro induction of polyploidy in *Centella asiatica* (L.) Urban. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 107: 187–194, 2011.

KARLSSON, M.; WEBER, W.; FUSSENEGGER, M. De novo design and construction of an inducible gene expression system in mammalian cells. **Methods Enzymol** 497: 239–253, 2011.

KAZI, N.A. Polyploidy in *Solanaceous* crops. **Asian Journal of Multidisciplinary Studies**. 3(4): 69-73, 2015.

- KERMANI, M.J.; SARASAN, V.; ROBERTS, A.V.; YOKOYA, K.; WENTWORTH, J.; SIEBER, V.K. Oryzalin-induced chromosome doubling in *Rosa* and its effect on plant morphology and pollen viability. **Theoretical and Applied Genetics**. 107: 1195-1200, 2003.
- KEYTE, A.L.; PERCIFIELD, R.; LIU, B.; WENDEL, J.F. Intraspecific DNA methylation polymorphism in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Journal of Heredity**. 97(5): 444–50, 2006.
- KHOSRAVI, P.; KERMANI, M.J.; NEMATZADEH, G.A.; BIHAMTA, M.R.; YOKOYA, K. Role of mitotic inhibitors and genotype on chromosome doubling of *Rosa*. **Euphytica**. 160: 267-275, 2008.
- KILLIP, E.P. The American species of Passifloraceae. Publications of the Field Museum of Natural History, **Botanical Series**. 19: 1-613, 1938.
- KIM, E.S.; PUNINA, E.O; RODIONOV, A.V. Chromosome CPD (PI/DAPI)- and CMA/DAPI-banding patterns in *Allium cepa* L. **Russian Journal of Genetics**. 38(4): 392-398, 2002.
- KIROV, I.; DIVASHUK, M.; VAN LAERE, K.; SOLOVIEV, A.; KHRUSTALEVA, L. An easy “SteamDrop” method for high quality plant chromosome preparation. **Molecular Cytogenetics**. 7(1): 1-10, 2014.
- KNIGHT JR., R.J. Development of tetraploid hybrid passion fruit clones with potential for the North temperature zone. **HortScience**. 26 (12): 1541 – 1543, 1991.
- LEITCH, I.J.; BENNETT, M.D. Polyploidy in angiosperms. **Trends in Plant Science**. 2(12): 470-476, 1997.
- LEUS, L.; VAN LAERE, K.; DEWITTE, A.; VAN HUYLENBROECK, J. Flow cytometry for plant breeding. **Acta Horticulturae**. 836: 221–226, 2009.
- LEVIN, D.A. **The role of chromosomal change in plant evolution**. Oxford University Press, Oxford, 2002.
- LI, Y.; YANG, J.; SONG, L.; QI, QI.; DU, K.; HAN, Q.; KANG, X. Study of variation in the growth, photosynthesis, and content of secondary metabolites in *Eucommia* triploids. **Trees**. 33: 817-826, 2019.
- LIAO, T.; CHENG, S.; ZHU, X.; MIN, Y.; KANG, X. Effects of triploid status on growth, photosynthesis, and leaf area in *Populus*. **Trees**. 30: 1137-1147, 2016.

- LIMA, A.A.; CUNHA, M.A.P. (Eds.). **Maracujá: produção e qualidade na passicultura**. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA. p.96, 2004.
- LIN, H.; JIAN, M.; LIANG, L.Y.; PEI, W.J.; LIU, X.Z.; ZHANG, H.Y. Production of polyploids from cultured shoot tips of *Eucalyptus globulus* Labill by treatment with colchicine. **African Journal of Biotechnology**. 9(15): 2252-2255, 2010.
- LIQIN, G.; JIANGUO, Z.; XIAOXIA, L.; GUODONG, R. Polyploidy-related differential gene expression between diploid and synthesized allotriploid and allotetraploid hybrids of *Populus*. **Molecular Breeding**. 39: 69, 2019.
- LOUREIRO, J.; RODRIGUEZ, E.; DOLEŽEL, J.; SANTOS, C. Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: a test with 37 species. **Annals of Botany**. 100(4): 875-888, 2007.
- MACDOUGAL, J.M.; FEUILLET, C. Systematic. In: ULMER, T.; MACDOUGAL, J.M. **Passion flowers of the world**. Timber Press, Portland, Oregon, 27-31, 2004.
- MACHADO, M.D. 2020. **Regeneração in vitro, caracteres morfoagronômicos e enzimáticos de plantas triploides de *Passiflora cincinnata* Mast**. Dissertação de Mestrado. Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade do Estado de Mato Grosso, MT.
- MANZOOR, A.; AHMAD, T.; BASHIR, M.A.; HAFIZ, I.A.; SILVESTRI, C. Studies on Colchicine Induced Chromosome Doubling for Enhancement of Quality Traits in Ornamental Plants. **Plants (Basel, Switzerland)**. 8(7):194, 2019.
- MATZKE, M.A.; MOSHER, R.A. RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. **Nature Reviews in Genetics**. 15: 394–408, 2014.
- MAYO, O. The role of duplications in evolution. **Heredity**. 25: 543-553, 1970.
- MELETTI, L.M.M.; SOARES-SCOTT, M.D.; BERNACCI, L.C.; ALVARES, V.; AZEVEDO FILHO, J.A. Caracterização de *Passiflora mucronata* Lam.: nova alternativa de maracujá. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**. 17: 87-95, 2011.
- MELETTI, L.M.M.; SOARES-SCOTT, M.D.; BERNACCI, L.C.; PASSOS, I.R. S. Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M. F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina Distrito Federal: Embrapa Cerrados, p.55-78. 2005.

MIKOVSKI, A.I.; SILVA, N.T.; SOUZA, C.S.; MACHADO, M.D.; OTONI, W.C.; CARVALHO, I.F.; ROCHA, D.I.; SILVA, M.L. Tissue culture and biotechnological techniques applied to passion fruit with ornamental potential: an overview. **Ornamental Horticulture**. 25: 189-199, 2019.

MIKOVSKI, A.I.; SILVA, N.T.; SILVA, L.A.S.; MACHADO, M.; BARBOSA, L.C.S.; REIS, A.C.; MATOS, E.M.; VICCINI, L.D.; SOUZA, C.S.; MACHADO, M.D.; OTONI, W.C.; CARVALHO, I.F.; ROCHA, D.I.; SILVA, M.L. From endosperm to triploid plants: a stepwise characterization of the de novo shoot organogenesis and morpho-agronomic aspects of an ornamental passion fruit (*Passiflora foetida* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 147: 239-253, 2021.

MIYASHITA, T.; OHASHI, T.; SHIBATA, F.; ARAKI, H.; HOSHINO, Y. Plant regeneration with maintenance of the endosperm ploidy level by endosperm culture in *Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 98: 291-301, 2009.

MOGHE, G.D.; SHIU, S-H. The causes and molecular consequences of polyploidy in flowering plants. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 1320(1): 16-34, 2014.

MOHAMED, M.E.; HICKS, R.G.T. BLAKESLEY, D. Shoot regeneration from mature endosperm of *Passiflora foetida*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 46: 161-164, 1996.

MOHAMMADI, M.; KAVIANI, B.; SEDAGHATHOOR, S. In vivo polyploidy induction of *Phalaenopsis amabilis* in a bubble bioreactor system using colchicine. **Ornamental Horticulture**. 27(2): 2021.

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

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

MOREJOHN, L.C.; BUREAU, T.E.; BAJER, M.; BAJER, A.S.; FOSKET, D.E. Oryzalin, a dinitroaniline herbicide, binds to plant tubulin and inhibits microtubule polymerization in vitro. **Planta**.172: 252-264, 1987.

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

NIAZIAN, M.; NALOUSHI, A.M. Artificial polyploidy induction for improvement of ornamental and medicinal plants. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. 142: 447-469, 2020.

NIIMI, H.; WANTANABE, M.; SERIZAWA, H.; KOBAYASHI, T.; NKAMURA, I.; MIYAMOTO, M. Amiprofosmethyl-induced efficient in vitro production of polyploids in raphanobrassica with the aid of aminoethoxyvinylglycine (AVG) in the culture medium. **Breeding Science**. 65: 396–402, 2015.

NOORI, S.A.S.; NOROUZI, M.; KARIMZADEH, G.; SHIRKOOL, K.; NIAZIAN, M. Effect of colchicine-induced polyploidy on morphological characteristics and essential oil composition of ajowan (*Trachyspermum ammi* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 130: 543–551, 2017.

NUNES, T.S.; QUEIROZ, L.P. A família Passifloraceae na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Sitientibus Série Ciências Biológicas**. 1: 33-46. 2001.

NUNES, T.S.; QUEIROZ, L.P. Flora da Bahia: Passifloraceae. **Sitientibus**, Série Ciências Biológicas, 6(3): 194-226, 2006.

OLIVEIRA JÚNIOR, M.X.; SÃO JOSÉ, A.R.; REBOUÇAS, T.N.H.; MORAIS, O.M.; DOURADO, F.W.N. Superação de dormência de maracujá-do-mato. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, 32: 584-590, 2010.

OLIVEIRA JÚNIOR, M.X.; SÃO JOSÉ, A.R.; REBOUÇAS, T.N.H.; MORAIS, O.M.; DOURADO, F.W.N. Superação de dormência de maracujá-do-mato. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 32: 584-590, 2010.

OLIVEIRA, J. C.; RUGGIERO, C. Espécies de maracujá com potencial agrônômico. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados. p.143-158, 2005.

OSBORN, T.; PIRES, C.; BIRCHLER, J.A.; AUGER, D.L.; CHEN, Z. J.; LI, H. S.; CORNAIL, L.; MADLUNG, A.; DOERGE, R.W.; COLOT, V.; MARTIENSSEN, R.A.

- Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. **Trends in Genetics**. 19(3): 141-147, 2003.
- OTONI, W.C.; PAIM PINTO, D.L.; ROCHA, D.I.; VIEIRA, L.M.; DIAS, L.L. C.; SILVA, M.L.; SILVA, C.V.; LANI, E.R.G.; SILVA, L.C.; TANAKA, F.A.O. Organogenesis and somatic embryogenesis in passionfruit (*Passifloras* sp.). In: ASLAM, J.; SRIVASTAVA, O.S.; SHARMA, M. P. (eds.) **Somatic embryogenesis and gene expression**. New Delhi; Narosa Publishing House. 1-17, 2013.
- OTTO, S.P.; WHITTON, J. The evolutionary consequences of polyploidy. **Cell**. 131: 452-462, 2007.
- PAIM PINTO, D.L.; ALMEIDA, A.M.; RÊGO, M.M.; SILVA, M.L.; OLIVEIRA, E.J.; OTONI, W.C. Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims) genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 107: 521-530, 2011.
- PARSONS, J.L.; MARTIN, S.L.; JAMES, T.; GOLENIA, G.; BOUDKO, E.A.; HEPWORTH, S.R. Polyploidization for the genetic improvement of *Cannabis sativa*. **Frontiers in Plant Science**. 10: 476, 2019.
- PEIXOTO, M. Problemas e perspectivas do maracujá ornamental. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.A.V.; BRAGA, M.F. (eds.) **Maracujá germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. 458-462, 2005.
- PENTERMAN, J.; ZILBERMAN, D.; HUH, JH.; BALLINGER, T.; HENIKOFF S.; FISCHER, R.L. DNA demethylation in the *Arabidopsis* genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 104: 6752–6757, 2007.
- PEREIRA, R.C.; DAVIDE, L.C.; TECHIO, V.H.; TIMBÓ, A.L.O. Duplicação cromossômica de gramíneas forrageiras: uma alternativa para programas de melhoramento genético. **Ciência Rural**. 42: 7, 1278-1285, 2012.
- PHILLIPS, R.L.; KAEPLER, S.M.; OLHOFT, P. Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 91(12): 5222-5226, 1994.
- PLONGTHONGKUM, N.; DIEP, D. H.; ZHANG, K. Advances in the profiling of DNA modifications: cytosine methylation and beyond. **Nature Reviews in Genetics** 15: 647–661, 2014.

- PREISIGKE, S.C.; SILVA, L.P.; SERAFIM, M.E.; BRUCKNER, C.H.; ARAÚJO, K.L.; NEVES, L.G. Seleção precoce de espécies de *Passiflora* resistente a fusariose. **Summa Phytopathologica**. 43: 321-325, 2017.
- PREDIERI, S. Mutation induction and tissue culture in improving fruits. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 64: 185–210 2001.
- QUESENBERRY, K.H.; DAMPIER, J.M.; LEE, Y.Y.; SMITH, R.L.; ACUNA, C.A. Doubling the chromosome number of bahiagrass via tissue culture. **Euphytica**. 175(1): 43-50, 2010.
- RANDOLPH, L.F. Some effects of high temperatures on polyploidy and other variations in maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 18: 222-229, 1932.
- RAMESH, H.L.; MURTHY, V.N.Y.; MUNIRA, J. Colchicine induced morphological variation in mulberry variety. **The Bioscan**. 6(1): 115-118, 2011.
- RANNEY, T.G. **Polyploidy: From Evolution to New Plant Development**. Combined Proceedings International Plant Propagators Society. 56, 2006.
- REGALADO, J.J.; CARMONA-MARTIN, E.; QUEROL, V.; VELÉZ, C.G.; ENCINA, C.L.; PITTA-ALVAREZ, S.I. Production of compact petunias through regeneration from leaf explants of multiple genotypes in *Populus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 129: 61–71, 2017.
- RÊGO, M.M.; RÊGO, E.R.; BRUCKNER, C.H.; FINGER, F.L.; OTONI, W.C. In vitro induction of autotetraploids from diploid yellow passion fruit mediated by colchicine and oryzalin. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 107: 451–459, 2011.
- RIESEBERG, L.H. Polyploid evolution: Keeping the peace at genomic reunions. **Current Biology**. 11: 925-928, 2001.
- ROCHA, D.I.; VIEIRA, L.M.; TANAKA, F.A.O.; DA SILVA, L.C.; OTONI, W.C. Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters: histocytological and histochemical evidence. **Protoplasma**. 249: 747-758, 2012.
- ROSE, N.R.; KLOSE, R.J. Understanding the relationship between DNA methylation and histone lysine methylation. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1839: 1362-1372, 2014.
- ROOSE, M.L.; GOTTLIEB. Genetic and biochemical consequences of polyploidy in *Tragopogon*. **Evolution**. 30: 818-830, 1976.

RUFFINI CASTIGLIONE, M.; GIRALDI, E.; FREDIANI, M. The DNA methylation pattern of *Allium cepa* metaphase chromosomes. **Biologisches Zentralblatt**. 114(1): 57-66, 1995.

RYBKA, A.C.; CASTRO, C.; LIMA, A.; FERREIRA, M.A.; PEREIRA, R. Elaboração de geleia de Maracujá-da-caatinga (*Passiflora cincinnata*) BRS Sertão forte. In: II Congresso Internacional de Gastronomia e Ciência de Alimentos. Fortaleza - CE, 2016. – **Anais**, Gastronomia: da tradição à inovação, Fortaleza: UFC, 2016.

SAHU, P.P.; PANDEY, G.; SHARMA, N.; PURANIK, S.; MUTHAMILARASAN, M.; PRASAD, M. Epigenetic mechanisms of plant stress responses and adaptation. **Plant Cell Reports**. 32: 1151–1159, 2013.

SALMON, A.; CLOTAULT, J.; JENCZEWSKI, E.; CHABLE, V.; MANZANARESDAULEUX, M.J. Brassica oleracea displays a high level of DNA methylation polymorphism. **Plant Science**. 174(1), p. 61–70, 2008.

SANTOS, E.A.; SOUZA, M.M.; ABREU, P.P.; CONCEIÇÃO, L.D H.C.S.; ARAÚJO, I.S.; VIANA, A.P.; ALMEIDA, A.A. F.; FREITAS, J.C.O. Confirmation and characterization of interspecific hybrids of *Passiflora* L. (Passifloraceae) for ornamental use. **Euphytica**. 184: 389–399, 2012.

SÄRKILAHTI, E.; VALANNE, T. Induced polyploidy in *Betula*. **Silva Fennica**. 24(2): 227-234, 1990.

SATTLER, M.C.; CARVALHO, C.R.; CLARINDO, W.R. The polyploidy and its key role in plant breeding. **Planta**. 243: 281-296, 2016.

SCHÜBELER, D. Function and information content of DNA methylation. **Nature**. 517: 321-326, 2015. SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; DALL'AGNOL, M. Indução de poliploidia no melhoramento de plantas. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**. 9: 155-164, 2003.

SCHIFINO-WITTMANN, M.T. Poliploidia e seu impacto na origem e evolução das plantas silvestres e cultivadas. **Revista Brasileira de Agrociência**. 10: 151-157, 2004.

SCHAEFER, M. RNA 5-methylcytosine analysis by bisulfite sequencing. **Methods in Enzymology**. 560: 297–329, 2015.

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

- SERRE, D.; LEE, B. H.; TING, A.H. MBD-isolated genome sequencing provides a high-throughput and comprehensive survey of DNA methylation in the human genome. **Nucleic Acids Research**. 38: 391–399. 2010.
- SHAO, J.; CHEN, C.; DENG, X. In vitro induction of tetraploid in pomegranate (*Punica granatum*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 75: 241-246, 2003.
- SIEBRA, A.L.A.; OLIVEIRA, L.R.; MARTINS, A.O.B P.B.; SIEBRA, D.C.; ALBURQUERQUE, R.S.; LEMOS, I.C.S.; DELMONDES, G.A.; TINTINO, S.R.; FIGUEIREIDO, F.G.; DA COSTA, J.G.M.; COUTINHO, H.D.M.; MENEZES, I R.A.; FELIPE, C.F.B.; KERNTOPF, M.R. Potentiation of antibiotic activity by *Passiflora cincinnata* Mast. front of strains *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Saudi Journal of Biological Sciences**. 25: 37-43, 2018.
- SILVA PAKXM.; CALLEGARI-JACQUES, S.; BODANESE-ZANETTINI, M.H. Induction and identification of polyploids in *Cattleya intermedia* Lindl. (Orchidaceae) by in vitro techniques. **Ciência Rural**. 30(1): 105-111, 2000.
- SILVA, C.V.; OLIVEIRA, L.S.; LORIATO, V.A.P.; SILVA, L.C.; CAMPOS, J. M.S.; VICCINI, L.F.; OLIVEIRA, E.J.; OTONI, W.C. Organogenesis from root explants of commercial populations of *Passiflora edulis* Sims and a wild passionfruit species *P. cincinnata* Masters. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 107: 407–416, 2011.
- SILVA, G.M.; CRUZ, A.C.; OTONI, W.C.; PEREIRA, T.N.; ROCHA, D.I.; SILVA, M.L. Histochemical evaluation of induction of somatic embryogenesis in *Passiflora edulis* Sims (Passifloraceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**. 51: 539-454, 2015.
- SILVA, M.L.; PAIM PINTO D.L.; GUERRA M.P.; FLOH, E.I.S.; BRUCKNER, C.H.; OTONI, W.C. A novel regeneration system for wild passion fruits species (*Passiflora cincinnata* Mast.) based on somatic embryogenesis from mature zygotic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 99: 47-54, 2009.
- SILVA, M.L.; PAIM-PINTO, D.L.; GUERRA, M.P.; LANI, E.R.G.; CARVALHO, I.F.; ROSSI, A.A.B.; OTONI, W.C. Produção de sementes sintéticas de maracujazeiro silvestre com potencial ornamental. **Ornamental Horticulture**. 21: 331-338, 2015.
- SILVA, M.L; PAIM-PINTO, D.L; CAMPOS, J.M.S; CARVALHO, I.F; ROCHA, D.I; BATISTA, D.S; OTONI, W.C. Repetitive somatic embryogenesis from wild

passion fruit (*Passiflora cincinnata* Mast.) anthers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 58: 1-7, 2021.

SILVA, M.L; PAIM-PINTO, D.L; PASSOS, A.B.; MARCELINO-GUIMARÃES, F.C.; ROSSI, A.A.B.; KRAUSE, W.; CARVALHO, I.F; BATISTA, D.S; ROCHA, D.I; OTONI, W.C. Novel and efficient transformation of wild passion fruit (*Passiflora cincinnata* Mast.) using sonication-assisted Agrobacterium-mediated transformation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**. 57: 1-7, 2020.

SILVA, N.T.; SILVA, L.A.S.; MACHADO, M.; REIS, A.C.; MATOS, E.M.; VICCINI, L.D.; OTONI, W.C.; CARVALHO, I.F.; ROCHA, D.I.; SILVA, M.L. Endosperm culture: a facile and efficient biotechnological tool to generate passion fruit (*Passiflora cincinnata* Mast.) triploid plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 142: 613-624, 2020.

SILVA, P.A.K.X.M; CALLEGARI-JACQUES, S.; BODANESE-ZANETTINI, M.H. Induction and identification of polyploids in *Cattleya intermedia* Lindl. (Orchidaceae) By in vitro techniques. **Ciência Rural**. 30(1): 105-111, 2000.

SINGH, R.J. **Plant cytogenetics. USDA-Agricultural Research Service, Soybean/Maize Germplasm**. Pathology, and Genetics Research Unit. Department of Crop Sciences, University of Illinois, Urbana-Champaign, Urbana, Illinois, USA, Boca Raton: CRC Press, 2017.

SOLTIS, D. E.; BUGGS, R. J.; DOYLE, J. J.; SOLTIS, P. S. What we still don't know about polyploidy. **Taxon**. 59(5): 1387-1403, 2010.

SOLTIS, D.E; SOLTIS, P.S. Molecular data and the dynamic nature of polyploidy. **Critical Reviews in Plant Sciences**. 12:243-273, 1993.

SONG, Q.; CHEN, Z.J. Epigenetic and developmental regulation in plant polyploids. **Current Opinion in Plant Biology**. 24: 101-9, 2015.

SOONTHORNKALUMP, S.; CHUENBOONNGARM, N.; JENJITTIKUL, T.; SOUZA, F.F.; QUEIRÓZ, M.A.; DIAS, R.C.S. Desenvolvimento e avaliação de híbridos experimentais de melancia. **Biociência**. Brasília, 2(9): 90-95, 1999.

SOUZA, M.G.C.; BENKO-ISEPPON, A.M. Cytogenetics and banding patterns on *Caesalpinioideae* and *Papilionioideae* native from Pará, Amazonas, Brasil. **Botanical Journal of the Linnean Society**. 144(1): 181-191, 2004.

- SPOELHOF, J.P.; SOLTIS, P.S.; SOLTIS, D.E. Pure polyploidy: Closing the gaps in autopolyploid research. **Journal of Systematics and Evolution**. 55(4): 340-352, 2017.
- STEBBINS, G.L. **Chromosome evolution in higher plants**. Edward Arnold, London, 1971.
- STIPANOVIC, A.J.; SMART, L.B. Ploidy level affects important biomass traits of novel Shrub Willow (*Salix*) Hybrids. **Bioenergy Research**. 8: 259-269, 2015.
- SUGIYAMA, S.I. Polyploidy and cellular mechanisms changing leaf size: comparison of diploid and autotetraploid populations in two species of *Lolium*. **Annals of Botany**. 96: 931–938, 2005.
- SUZUKI, M.M.; BIRD, A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. **Nature Reviews in Genetics**. 9: 465–476, 2008.
- TALEBI, S.F.; SAHARKHIZ, M.J.; SHARAFI, Y.; FARD, R.F. Effect of different antimetabolic agents on polyploid induction of anise hyssop (*Agastache foeniculum* L.). **Caryologia**. 70: 184–193, 2017.
- TANI, E.; POLIDOROS, A.N.; NIANIOU-OBEIDAT, I.; TSAFTARIS, A. S. DNA methylation patterns are differentially affected by planting density in maize inbreds and their hybrids. **Maydica**. 50: 19–23, 2005.
- 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**. 122(3): 573-583, 2015.
- TAYALÉ, A.; PARISOD, C. Natural pathways to polyploidy in plants and consequences for genome reorganization. **Cytogenetic and Genome Research**. 140(2-4): 79-96, 2013.
- THAMMASIRI, K.; SOONTORNCHAINAKSAENG, P. Morphological and stomatal guard cell characteristics of in vitro *Kaempferia rotunda* L. (Zingiberaceae) through Colchicine Induced Polyploidy. **Agricultural Technology and Biological Sciences**. 14(3): 235-242, 2017.
- THOMAS, T.D.; CHATURVEDI, R. Endosperm culture: a novel method for triploid plant production. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 93: 1–14, 2008.
- TOSCA, A.; PANDOLFI, R.; CITTERIO, S.; FASOLI, A.; SGORBATI, S. Determination by flow cytometry of the chromosome doubling capacity of colchicine

- and oryzalin in gynogenetic haploids of *Gerbera*. **Plant Cell Reports**. 14: 455-458, 1995.
- TOUCHELL, D.H.; PALMER, I.E.; RANNEY, T.G. In vitro Ploidy Manipulation for Crop Improvement. **Frontiers in Plant Science**. 11: 722, 2020.
- VANDERPLANK, J. **Passion flowers**. 3^a ed. Cambridge: The MIT Press. p. 224, 2000.
- VANDUREN, M.; MORPURGO, R.; DOLEŽEL, J.; AFZA, R. Induction and verification of autotetraploids in diploid banana (*Musa acuminata*) by in vitro techniques. **Euphytica**. 88: 25-34, 1996.
- VAUGHN, M.W.; Tanurdžić, M.; LIPPMAN, Z.; JIANG, H.; CARRASQUILLO, R.; RABINOWICZ, P.D.; DÉDIA, N.; McCOBIE, R.; AGER, N.; BULSKI, A.; COLO, V.; DOERGE, D.W.; MARTIENSSEN, R.A. Epigenetic natural variation in *Arabidopsis thaliana*. **PLoS Biology**. 5(7): 174, 2007.
- VIANA, A.J.C.; SOUZA M.M.; ARAÚJO I.S.; CORREA R.X.; AHNERT D. Genetic diversity determined by morphological and molecular characterization in wild *Passiflora* L. species with ornamental potential. **Biologia Plantarum**. 54: 535–538. 2010.
- VIANA, A.J.C.; SOUZA, M.M. Comparative cytogenetics between the species *Passiflora edulis* and *Passiflora cacaensis*. **Plant Biology**. 14: 820-827, 2012.
- VIEIRA, L.M.; SILVA, P.O.; FERNANDES A.M.; ROCHA, D.I.; OTONI, W.C. Protocol for somatic embryogenesis in *Passiflora cincinnata* Mast. (Passifloraceae). In: Jain MS, Gupta P. (Eds.) **Stepwise protocols for somatic embryogenesis of woody plants**. 2nd ed., Springer International Publishing AG, Cham, pp. 253-265, 2018.
- VIEIRA, M.L.C. Hibridação somática em plantas – a importância de espécies selvagens como fonte de genes. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. 3: 36–40, 1997.
- WAKANA, A.; FUKUDOME, I.; HANADA, N.; HIRAMATSU, M. ‘Bea-Kei’, a new triploid seedless grape cultivar derived from a ‘Muscat Bailey A’ x ‘Kyoho’ cross. **Journal of the Faculty Agriculture**. 53(2): 423-427, 2008.
- WANG, C.; LEI, J. In vitro induction of tetraploids from immature embryos through colchicine treatments in *Clivia miniata* Regel. **African Journal of Agricultural Research**. 7(25): 3712-3718, 2012.

- WANG, X.; CHENG, Z.M.; ZHI, S.; XU, F. Breeding Triploid Plants: A Review. **Czech Journal Genetics Plant Breeding**. 52:41–54, 2016.
- WEAR, E. E.; CONCIA, L.; BROOKS, A. M.; MARKHAM, E. A.; LEE, T. J.; ALLEN, G. C.; HANLEY-BOWDOIN, L. Isolation of plant nuclei at defined cell cycle stages using EdU labeling and flow cytometry. **Plant Cell Division: Methods and Protocols**. 1370: 69-86, 2016.
- WENDEL, J.F.; JACKSON, S.A.; MEYERS, B.C.; WING, R.A. Evolution of plant genome architecture. **Genome Biology**. 17: 1-14, 2016.
- WOOD, T.E.; TAKEBAYASHI, N.; BARKER, M.S.; MAYROSE, I., GREENSPOON, P.B.; RIESEBERG, L.H. The frequency of polyploid speciation in vascular plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 106: 13875–13879, 2009.
- WU, J.H.; FERGUSON, A.R.; MURRAY, B.G. Manipulation of ploidy for kiwifruit breeding: in vitro chromosome doubling in diploid *Actinidia chinensis* Planch. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 106(3): 503-511, 2011.
- XU, C.; HUANG, Z.; LIAO, T.; LI, Y.; KANG, X. In vitro tetraploid plants regeneration from leaf explants of multiple genotypes in *Populus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 125: 1–9, 2016.
- XU, L.; HUANG, H. Genetic and epigenetic controls of plant regeneration. **Current Topics in Developmental Biology**. 108: 1-33, 2014.
- YANG, X.; YE, C.Y.; CHENG, Z.M.; TSCHAPLINSKI, T.J.; ULLSCHLEGER, S.D.; YIN, W.; XIA, X.; TUSKAN, G.A. Genomic aspects of research involving polyploid plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 104(3): 387-397, 2011.
- YANG, Z.; SHEN, Z.; TETREAULT, H.; JOHNSON, L.; FRIEBE, B.; FRAZIER, T.; HUANG, L.K.; BURKLEW, C.; ZHANG, X.Q.; ZHAO, B. Production of autopolyploid lowland switchgrass lines through in vitro chromosome doubling. **BioEnergy Research**. 7: 232–242, 2014.
- YEMETS, A.I.; BLUME, Y.B. Progress in plant polyploidization based on antimicrotubular drugs. **The Open Horticulture Journal**. 1:15-20 15, 2008.

Capítulo I

Reprodução e caracterização de sementes e plântulas em plantas triploides de *Passiflora cincinnata* Masters

1. INTRODUÇÃO

O uso de poliploides sintéticos na agricultura ainda é limitado (Herben; Suda; Klimešová, 2017; Ruiz et al., 2020) e, fertilidade na reprodução de plantas poliploides pode ser muito útil para a fixação das características específicas, como qualidade, rendimento ou adaptação ambiental, sem os efeitos adversos de perder a função da atividade gênica (Zhang et al. 2019; Liqin et al., 2019; Bomblies, 2020; Ruiz et al., 2020; Rutland; Hall; McElroy, 2021).

A reprodução em plantas poliploides depende de um homólogo para o pareamento adequado na meiose, caso isso não ocorra, o resultado é a formação de cromossomos multivalentes em prófase I com conseqüente formação de gametas aneuploides (Ramsey e Schemske, 2002). A perda ou ganho de cromossomos pode afetar características morfológicas, anatômicas, citológicas e fisiológicas (Sheltzer e Amon, 2011; Birchler, 2013; Singh, 2020). A aneuploidia é caracterizada pelo desvio do número normal de cromossomos, perda ou ganho, resultando no desequilíbrio da dosagem de genes, levando a alterações fenotípicas graves em plantas (Makarevitch e Harris, 2009; Zeng et al., 2020).

Plantas aneuploides expressam alterações fenotípicas como o retardo do desenvolvimento vegetativo, esterilidade parcial e morte antes da fase adulta (Makarevitch e Harris, 2009; Kaya et al., 2020). O uso de aneuploides para estudos genéticos no melhoramento vegetal desempenha um importante recurso no mapeamento genético, dosagem de genes repetitivos, identificação de genes e regiões cromossômicas responsáveis a caracteres agrônômicos quantitativos (Wang et al., 2007; Birchler, 2013; Singh, 2020).

No gênero *Passiflora* observa-se número cromossômico básico de $x = 6$ e números cromossômicos secundários de $x = 9$, $x = 10$ e $x = 12$ (Melo e Guerra, 2003). No entanto, existem registros que no gênero *Passiflora* sp. há ocorrência natural de poliploidia e aneuploidia apresentando diferentes números cromossômicos sendo $2n = 14, 20, 22, 24, 36, 72$ e 84). Na *P. foetida* Soares-Scott et al (2005) também descrevem a ocorrência de aneuploidia o que acarreta variações no número cromossômico de $2n = 18, 20, 22$ e 28 .

Atualmente a produção de plantas triploides de *P. edulis* ($2n = 3x = 27$) (Antoniuzzi et al., 2018), *P. cincinnata* ($2n = 3x = 27$) (Silva et al., 2020; Machado et al., 2020) e *P. foetida* ($2n = 3x = 30$) (Mikovski et al., 2021), utilizando o endosperma como fonte de explante é considerado um método biotecnológico relativamente simples e direto para a obtenção de plantas poliploides. Machado (2020) avaliando os caracteres morfoagronômicos em *P. cincinnata* e Mikovski et al (2021) em *P. foetida*, relatam que plantas triploides expressam características vegetativas e reprodutivas superiores ao homólogo diploide. Porém, informações dos frutos e sementes de *Passiflora* sp. triploides ainda não foram estudadas.

Assim, para compreender como os mecanismos morfofisiológicos se expressam no cruzamento entre plantas triploides, o objetivo do trabalho foi realizar cruzamento entre plantas triploides e avaliar o comportamento das sementes e plântulas das progênes obtidas de *Passiflora cincinnata* Masters.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material Vegetal

Plantas diploides de *P. cincinnata* foram anteriormente germinadas em sacos plásticos pretos de polietileno de 28×14 cm, contendo substrato Plantmax[®] e mantidas em casa de vegetação com irrigação controlada.

As plantas triploides de *P. cincinnata* foram obtidas segundo o protocolo de Machado (2020), regeneradas pela via embriogênica a partir do cultivo in vitro do tecido endospermico. Plantas triploides com aproximadamente 10 cm foram retiradas

dos frascos de cultivo e lavadas em água corrente, para a remoção do excesso de meio de cultura. Em seguida, foram acondicionadas em copos plásticos (15 cm x 9 cm) contendo substrato Plantmax® umedecido com solução de MS e envolvidos por um saco plástico transparente (10 cm x 20 cm). Os copos foram cobertos com sacos plásticos transparentes, e mantidos sob fotoperíodo de 16 horas de luz, temperatura de 26 ± 2 °C por ± 20 dias, e posteriormente mantidos em casa de vegetação.

As plantas diploides e triploides de *P. cincinnata* com aproximadamente 25 cm de altura foram transferidas em vasos plásticos de 30 dm³ preenchidos com uma mistura de solo e substrato, na proporção 3:1, cultivados em casa de vegetação. Os vasos foram espaçados com 4 m entre as plantas, o sistema de condução instalado foi em espaldadeira vertical com fio de arame liso a 1,8 m de altura, sem eliminação dos brotos terminais e dos ramos laterais. A adubação foi realizada por aplicação via foliar, na formulação N (10) P (10) K (10) + M (níveis de garantia dos nutrientes (P/P%): N = 10%; P₂O = 10%; K₂O = 10%; Fe = 0,1%; Zn = 0,1%; Cu = 0,1%; S = 0,3%; Mn = 0,5%) uma vez ao mês na fase vegetativa e de 15 em 15 dias na fase reprodutiva, na dosagem de 3-9 litros/hectare.

Para o controle, foram utilizadas três plantas diploides germinadas pela via seminífera e três plantas triploides regenerada pela via embriogênica a partir do cultivo in vitro do tecido endospermico de *P. cincinnata*, e posteriormente confirmadas mediante a estimativa do conteúdo de DNA nuclear através de análise em citometria de fluxo (Doležel e Bartos, 2005) e citogenética (Carvalho e Saraiva, 1993; 1997).

O cruzamento entre as plantas triploides de *P. cincinnata* foi realizado entre três plantas, constituindo o primeiro cruzamento em autopolinização (P1♀ x P1♂), o segundo e terceiro polinização cruzada (P1♂ x P2♀) (P1♂ x P3♀), sendo o macho doador de pólen planta 1 (P1) conforme esquema descrito na Fig. 1a.

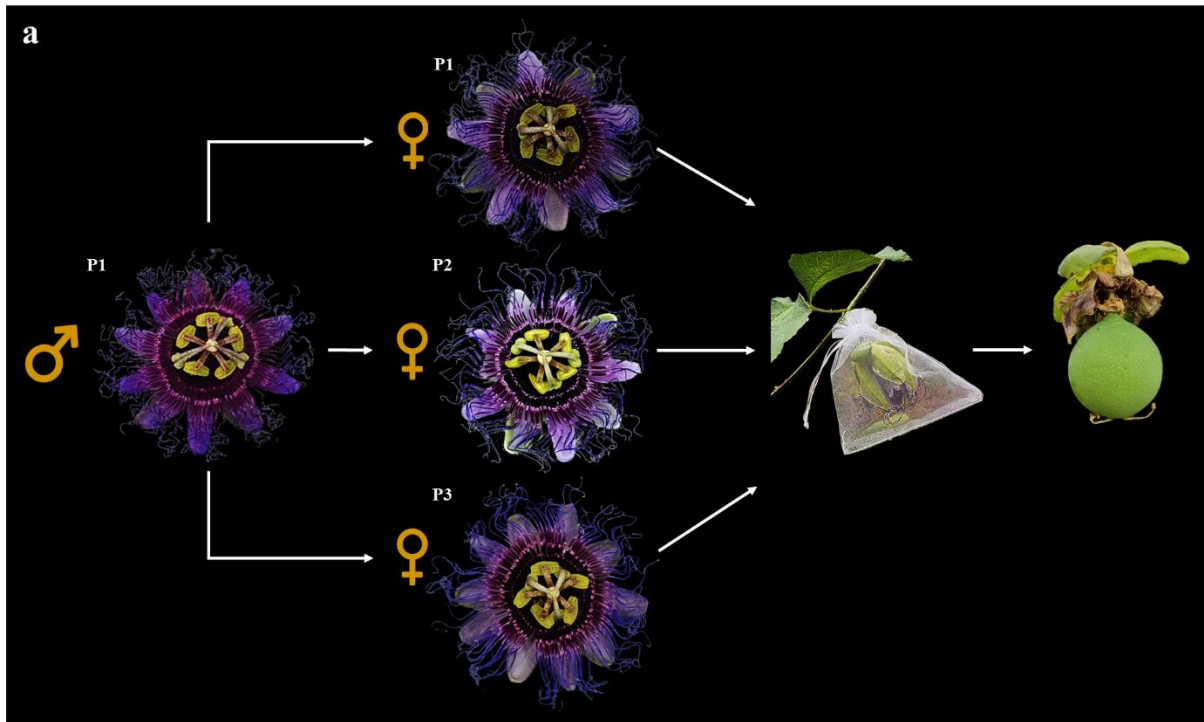


Figura 1. Esquema do cruzamento entre plantas triploides de *P. cincinnata* regeneradas in vitro a partir do tecido endospermico pela via embriogênica cultivadas em casa de vegetação. (P1♀ x P1♂), (P1♂ x P2♀) (P1♂ x P3♀).

A transferência de pólen para o estigma foi realizada com o auxílio de uma pinça, esfregando-se cuidadosamente a antera sobre o estigma de cada flor e em seguida as flores foram isoladas em sacos de tecido do tipo tule. Foram polinizadas 50 flores por planta, totalizando 150 flores. O mesmo processo de polinização foi realizado em plantas diploides. Após 120 dias, os frutos produzidos das plantas foram quantificados e as sementes foram extraídas manualmente e lavadas em água corrente, sendo friccionadas em peneira até a eliminação do arilo e da mucilagem. Em seguida foram colocadas sobre papel, à sombra, em temperatura ambiente para secagem.

2.2. Volume e concentração de açúcares do néctar produzido por flores triploides de *P. cincinnata*

Para a quantificação do volume e concentração de néctar produzido, foram utilizadas 3 plantas para o citótipo diploide e triploide, sendo coletadas 10 flores por planta 2x e 3x em antese no horário de 10:00 horas da manhã e com o auxílio de seringa de insulina foi medido o volume total de néctar por flor. A concentração de

açúcares do néctar foi medida com o auxílio de um refratômetro manual da Instrutherm Mod. RT-280 (0 – 90%).

2.3. Avaliação morfométrica de sementes obtidas a partir do cruzamento entre plantas triploides

A caracterização morfométrica das sementes das plantas diploides como controle e das sementes produzidas resultantes dos cruzamentos entre as plantas, foram realizadas utilizando-se de 25 sementes por citótipo, totalizando 75 sementes, selecionadas de forma aleatória. Os parâmetros comprimento, largura e espessura das sementes foram mensurados com paquímetro digital (Mtx[®]).

Para mensurar o peso foram utilizadas 100 sementes de cada citótipo, totalizando 300 sementes avaliadas para citótipos diploides e triploides, sendo pesadas em balança de precisão (Shimadzu[®]).

Foram utilizadas 300 sementes de cada citótipo 2x e 3x para a avaliação da estrutura interna. As sementes foram abertas com o auxílio de uma mini morsa e as características avaliadas foram o número médio de sementes ocas com ausência dos endospermas e embrião zigótico, número médio de sementes completas com a presença dos endospermas e embrião zigótico, número médio de malformações com as características de atrofiamento dos endospermas e do embrião zigótico, desidratação dos endospermas e embrião zigótico e a ausência dos endospermas e/ou embrião.

2.4. Germinação in vitro

Para avaliar a germinação in vitro de sementes das plantas diploides utilizadas como controle e das sementes triploides resultantes do cruzamento entre as três plantas triploides, foram utilizadas 60 sementes. Posteriormente, o tegumento das sementes foram removidos com auxílio de mini morsa. Sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar, as sementes foram desinfestadas e imersas em 70% (v v) álcool por 3 minutos, seguido pela imersão em 2,5% (v v) de hipoclorito de sódio a durante 30

minutos e com o acréscimo de 3 gotas de Tween-20^o e, submetidas a quatro enxágues consecutivos em água destilada e autoclavada.

As sementes foram cultivadas em frascos de cultivo contendo 60 mL de meio, composto por sais básicos de MS (Calsson Labs, Smithfield, UT, USA) (Murashige e Skoog, 1962), 0,01% (p v) mio inositol, 3% (p v) sacarose e 0,8% de ágar (p v) (Acumedia[®]; Neogen, Lansing, MI, USA) como agente gelificante. As culturas foram mantidas em sala de cultivo durante 30 dias na ausência de irradiância e 25 ± 2 °C. Após 30 dias de cultivo in vitro, os materiais foram transferidos para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e $36 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de irradiância (Luz do Dia Especial, 20 W, Osram, Barueri, Brasil), e 25 ± 2 °C. Aos dez dias de incubação foram avaliados a porcentagem de germinação e, aos 45 dias o comprimento de parte aérea e número de folhas. Foram consideradas germinadas as sementes que apresentaram protrusão da radícula.

2.5. Índice de velocidade de germinação (IVG)

A avaliação do índice de velocidade de germinação (IVG) foi realizada após o sétimo dia da inoculação in vitro das sementes dos citótipos de *P. cincinnata* RAS (Brasil, 2009 adaptado).

2.6. Aclimatização das plântulas

Plantas completas com aproximadamente 10 cm de altura foram lavadas em água corrente para a remoção do excesso de meio de cultura. Em seguida, foram acondicionadas em copos plásticos (15 cm x 9 cm) contendo substrato Plantmax[®] umedecido com solução de MS e envolvidos por um saco plástico transparente (10 cm x 20 cm). Os copos foram cobertos com sacos plásticos transparentes, e mantidos sob fotoperíodo de 16 horas de luz e 25 ± 2 °C por ± 20 dias. Após 5 dias pequenos orifícios foram feitos no saco plástico e mantido em sala de cultivo por mais 5 dias e em seguida cultivadas em casa de vegetação.

2.7. Determinação do conteúdo de DNA

Para a estimativa de DNA nuclear das plantas germinadas in vitro resultantes da germinação de sementes dos cruzamentos entre as plantas triploides e germinadas pela via seminífera de *P. cincinnata.*, sendo utilizada seis plantas resultantes do cruzamento entre plantas triploides e seis plantas germinadas a pela via seminífera.

As suspensões dos núcleos foram obtidas através de secções de folhas jovens com o uso de uma lâmina de aço descartável em tampão de isolamento WPB (Loureiro et al., 2007). A suspensão foi aspirada por meio de duas camadas de gaze, com uma pipeta de plástico e filtrada em membrana de Nylon com malha de 50 µm para a remoção de fragmentos de células e restos de tecidos, sendo em seguida adicionado 25 µL de iodeto de propídio 1 mg mL e 5 µL de RNase 1 mg mL para corar o DNA.

Após 30 minutos em ambiente protegido de luz as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo. Foi realizada três repetições e, pelo menos, 10.000 núcleos foram analisados para a quantificação da emissão da fluorescência com o uso do citômetro de fluxo CytoFLEX (Beckman Coulter, CA, EUA). Como padrão interno, foi utilizada a espécie *Pisum sativum* com conteúdo de DNA 2C = 9.09 pg (Doležel et al., 1998). Os histogramas foram gerados e analisados pelo programa CytExpert 2.0.1 e o conteúdo de DNA (pg) calculado de acordo Doležel e Bartos (2005):

Conteúdo 2C de DNA (em pg):

$$\frac{\text{Média do pico G1 de } Passiflora \text{ cincinnata} \times 9,09}{\text{Média do pico G1 de } Pisum \text{ sativum}}$$

2.8. Análise cromossômica

A análise cromossômica foi realizada utilizando-se de três plântulas germinadas a partir de sementes e três plântulas resultantes do cruzamento entre plantas triploides germinadas de sementes do cultivo in vitro de *P. cincinnata.* Ápices radiculares de aproximadamente 1,5 cm foram coletadas e tratados com 0,003 M de 8 hidroxiquinolina (Sigma, EUA) por 8 horas a 4 °C, e posteriormente fixados em

solução de Carnoy (3:1 etanol: ácido acético glacial) e armazenadas em refrigerador por 24 horas. A remoção da parede celular ocorreu a partir da solução enzimática Pectinase (Sigma) e Celulase (Serva-Onozuka R-10) a 20% e 2%, por cerca de 4 horas a 37 °C. As lâminas foram confeccionadas a partir da técnica de dissociação celular com secagem ao ar (Carvalho e Saraiva, 1993; 1997).

2.9. Análise estomática

As plantas analisadas foram as produzidas pela via seminífera (2x), triploides oriundas de regeneração de endosperma (3x) e folhas das progênies das plantas triploides. O decalque foliar foi realizado no terço médio na parte abaxial próximo a nervura central da folha, para a retirada da epiderme utilizou-se de adesivo instantâneo à base de etila (Three Bond Brasil Ind. Com. Ltda, Brasil) para fixação das impressões epidérmicas em lâmina. As variáveis analisadas foram densidade estomática (mm²), área estomática, comprimento e largura estomática, densidade de células ordinárias, área de células ordinárias, largura e comprimento das células ordinárias. Na avaliação de densidade estomática e células ordinárias foram utilizadas 3 folhas, efetuando-se cinco observações por ploidia, um total de 15 observações, conduzidas em microscópio de luz (Biobal) acoplado ao sistema de câmera U-photo com ocular de 10x e um computador rodando o software TSView 73.1.7.

A medição do comprimento e largura dos estômatos e células ordinárias foram realizadas em um microscópio de luz (Biobal) acoplado ao sistema de câmera U-photo com uma ocular de 40x, sendo utilizadas 4 folhas e cinco medições realizadas num total de 20 medições por nível de ploidia, usando o software TSView 73.1.7.

2.10. Delineamento experimental

Para a quantificação do volume e concentração de néctar, 30 flores por citótipo de *P. cincinnata* foram avaliadas.

Para a morfometria das sementes foram utilizadas 75 sementes para cada citótipo de *P. cincinnata* e 100 sementes por planta para a quantificação do peso (g). Já

para as características morfológicas das sementes ocas, sementes com malformações e sementes completas, foram utilizadas 300 sementes por citótipo diploide e triploide. A germinação in vitro das sementes completas resultantes do cruzamento entre plantas triploide e das plantas diploides, consistiu em 6 repetições com 10 sementes por frasco, para cada citótipo foram utilizadas 60 sementes, as variáveis foram dadas em média da porcentagem de germinação, média do comprimento da parte aérea e número médio de folhas.

O IVG foi calculado segundo a equação de Maguire (1962), em que: $IVG = G1/D1 + G2/D2 + \dots + Gn/Dn$. Onde: IVG = Índice de Velocidade de Germinação G1, G2, ..., Gn = nº de radículas emergidas, observadas no intervalo da 1ª, 2ª, ..., última contagem; D1, D2, ..., Dn = nº de dias de semeadura à 1ª, 2ª, ..., última contagem.

Todos os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e diferenças entre as médias comparados pelo teste de Tukey a 5% significância de probabilidade, utilizando o programa computacional 'GENES' (Cruz, 2006).

3. RESULTADOS

3.1. Quantificação e concentração de açúcares do néctar

A média da quantidade de néctar nas plantas diploides foram de 219,6 µL em flores diploides e 220,3 µL em flores triploides (Fig. 2a). A concentração de açúcares no néctar em plantas diploides foi de 40,9% em diploides e 41,73% em plantas triploides (Fig. 2b), diferindo dos homólogos diploides.

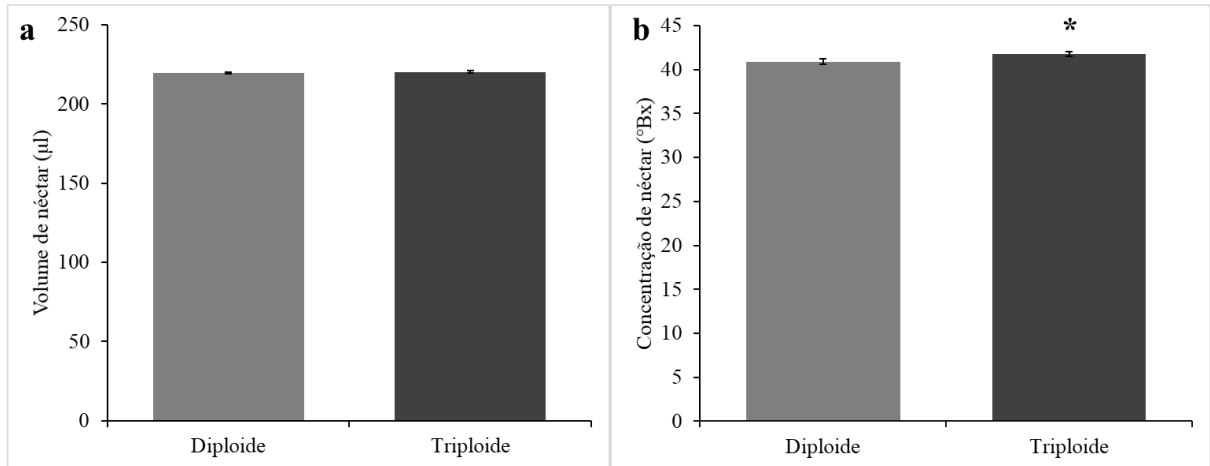


Figura 2. Quantidade de néctar e concentração de açúcares em plantas diploides e triploides de *P. cincinnata*. a – Volume de néctar (µl). b – Concentração de açúcares no néctar. As barras de erro indicam o erro padrão. Os asteriscos referem-se a diferenças estatísticas entre os citótipos dentro de cada parâmetro de acordo com o teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

3.2. Avaliação e produção de sementes em plantas triploides

Plantas diploides e triploides de *P. cincinnata* produziram botões florais e flores no período de setembro a outubro e a frutificação ocorreu mês de dezembro. A pré-antese das flores iniciou-se com o afastamento gradual das sépalas, pétalas e fímbrias da corona e simultaneamente com a exposição das estruturas florais. A antese das flores iniciou-se no horário de 5:00 a 6:30 h, e o fechamento ocorreu próximo às 18:00 horas. Após 7 dias da realização da polinização foi observado rápido desenvolvimento do ovário. Em diploides uma frequência 63,33% dos botões florais abortaram e 88,66 % nas plantas triploides.

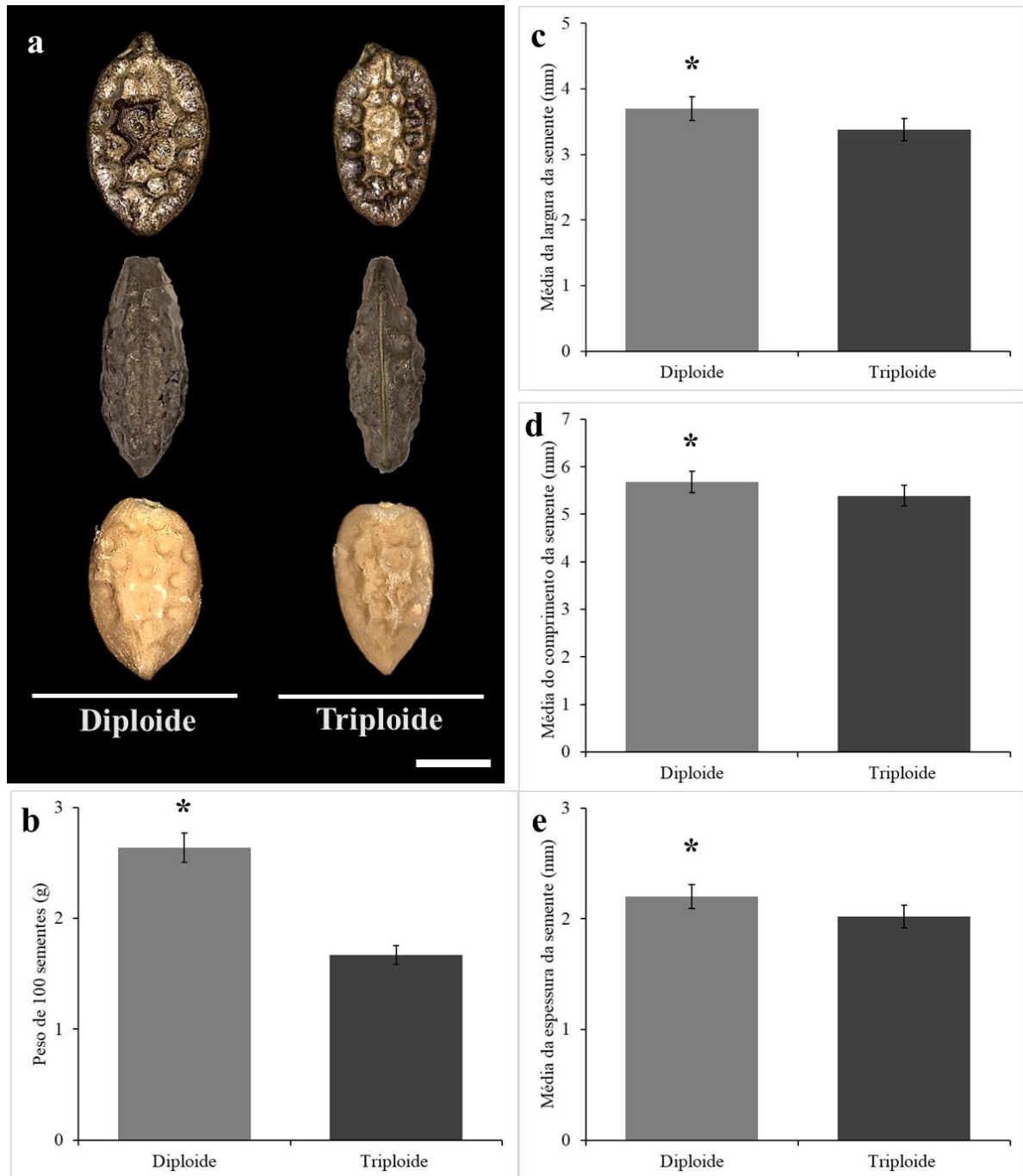


Figura 3. Morfometria das sementes produzidas por plantas diploides e triploides de *P. cinnnata*. a – Visão frontal, lateral e do endosperma das sementes. Bar. 3,8 μ m. b – Peso médio de 100 sementes. c – Largura média das sementes. d – Comprimento médio. e – Espessura média. As barras de erro indicam o erro padrão. Os asteriscos referem-se a diferenças estatísticas entre os citótipos dentro de cada parâmetro de acordo com o teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Nas plantas diploides e triploides o amadurecimento dos frutos ocorreu aproximadamente em 120 dias. Plantas diploides produziram 55 frutos, sendo distribuídos em P1 2x (16), P2 2x (21) e P3 2x (18), com a média de 187,52 sementes

por fruto e as plantas 3x produziram um total 17 frutos, sendo distribuídos em P1 3x (4), P2 3x (5) e P3 3x (8), com a média de 37,17 sementes por fruto.

Para variável peso de 100 sementes, as plantas 2x produziram sementes com média de 2,64 g e as plantas 3x com média de 1,67 g (Fig. 3b). Em relação a largura e comprimento das sementes, as plantas 2x apresentaram médias de 3,7 mm e 5,68 mm, respectivamente. Já plantas triploides apresentaram sementes com comprimento médio de 3,38 mm e média de largura de 5,39 mm (Fig. 3c-d). Para espessura média das sementes, as plantas 2x apresentaram média de 2,2 mm e as plantas 3x, 2,02 mm (Fig. 3e).

3.3. Germinação in vitro de sementes do cruzamento de plantas triploides

A avaliação das 300 sementes por citótipo foi encontrada a frequência média de 1,33% de sementes ocas com ausência dos endospermas e do embrião zigótico para citótipo 2x e 33,33% de frequência média para o citótipo 3x (Fig. 4a). Para o parâmetro malformação, foram encontradas frequência de 0,33% para citótipo 2x e frequência de 30% para citótipo 3x (Fig. 4b). A maior frequência média de sementes completas foi de 98,33% para o citótipo 2x e 36,66% para o citótipo 3x (Fig. 4c).

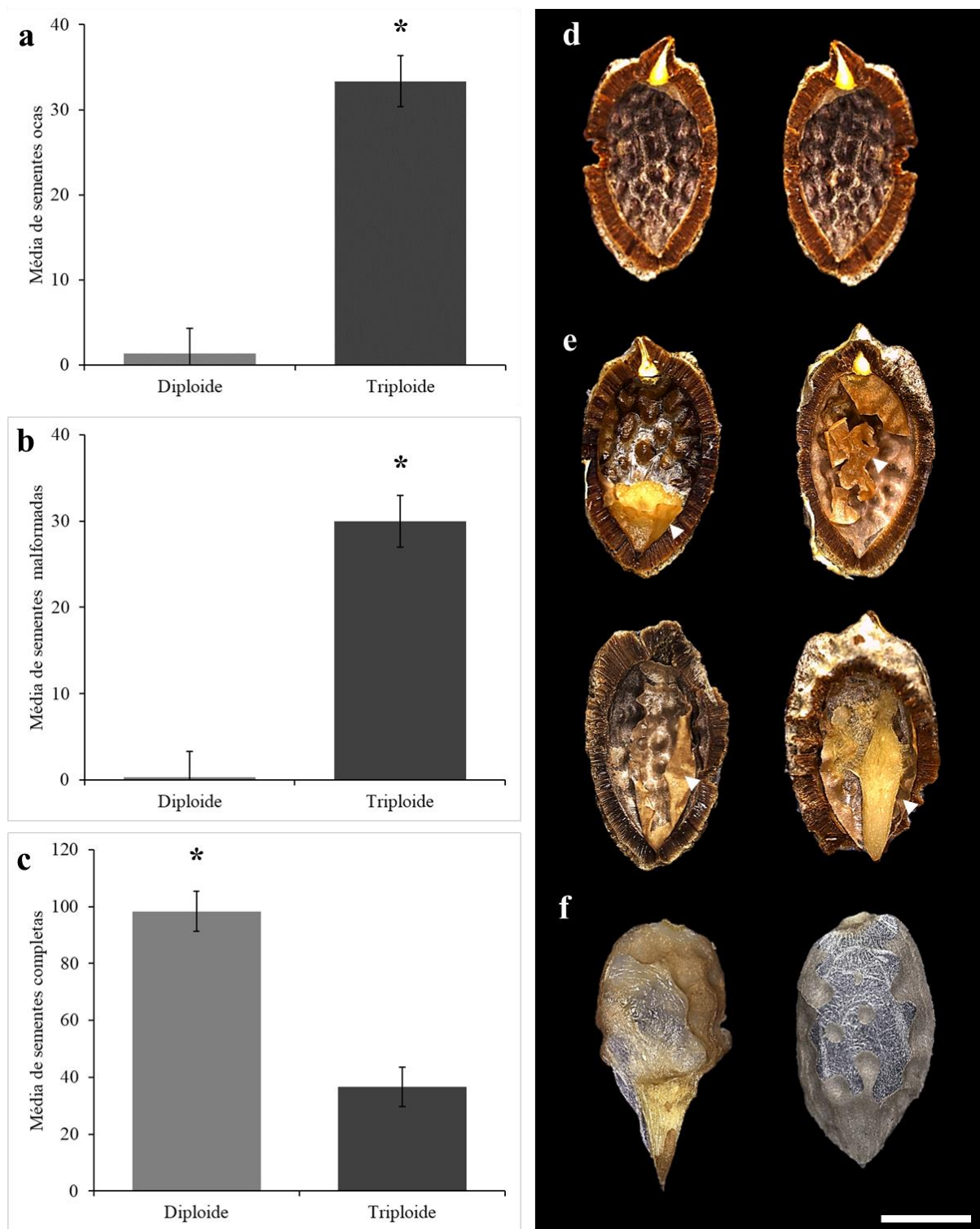


Figura 4. Avaliação de caracteres morfológicos de sementes produzidas por citótipos diploide e triploide de *P. cincinnata*. a – Média de sementes ocas. b – Média de sementes com malformações. c - Média de sementes completas produzidas. d - Sementes ocas com ausência dos endospermas e embriões zigóticos. e – Sementes com atrofiamento e desidratação dos endospermas em citótipo 3x de *P. cincinnata*. f - Sementes com deterioração dos endospermas e embriões zigóticos, em citótipos 3x de *P. cincinnata*. Bar. 4,6 μ m. As barras de erro

indicam o erro padrão. Os asteriscos referem-se a diferenças estatísticas entre os citótipos dentro de cada parâmetro de acordo com o teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Sementes das plantas diploides cultivadas in vitro obteve um percentual de germinação de 80%, e as sementes dos cruzamentos entre as plantas triploides foi de 53,3%, conforme observado na Fig. 5a. As plântulas diploides apresentaram comprimento médio de 61,61 mm, já as plântulas triploides o número médio foi de 34,96 mm de comprimento (Fig. 5b). O maior número médio de folhas foi observado em plântulas do citótipo diploides com 3,06 folhas, a progênie do citótipo dos triploides apresentou média de 1,56 (Fig. 5c).

Na avaliação do índice de velocidade de germinação, as sementes do citótipo diploides apresentaram valor superior de 9,9 e a progênie das plantas triploides apresentaram IVG de 6,72 (Fig. 5d). Ao final do vigésimo primeiro dia de avaliação do IVG, foi observado baixa uniformidade na germinação das sementes do cruzamento de plantas triploides, evidenciando diferença significativa entre os citótipos (Fig. 5e-f).

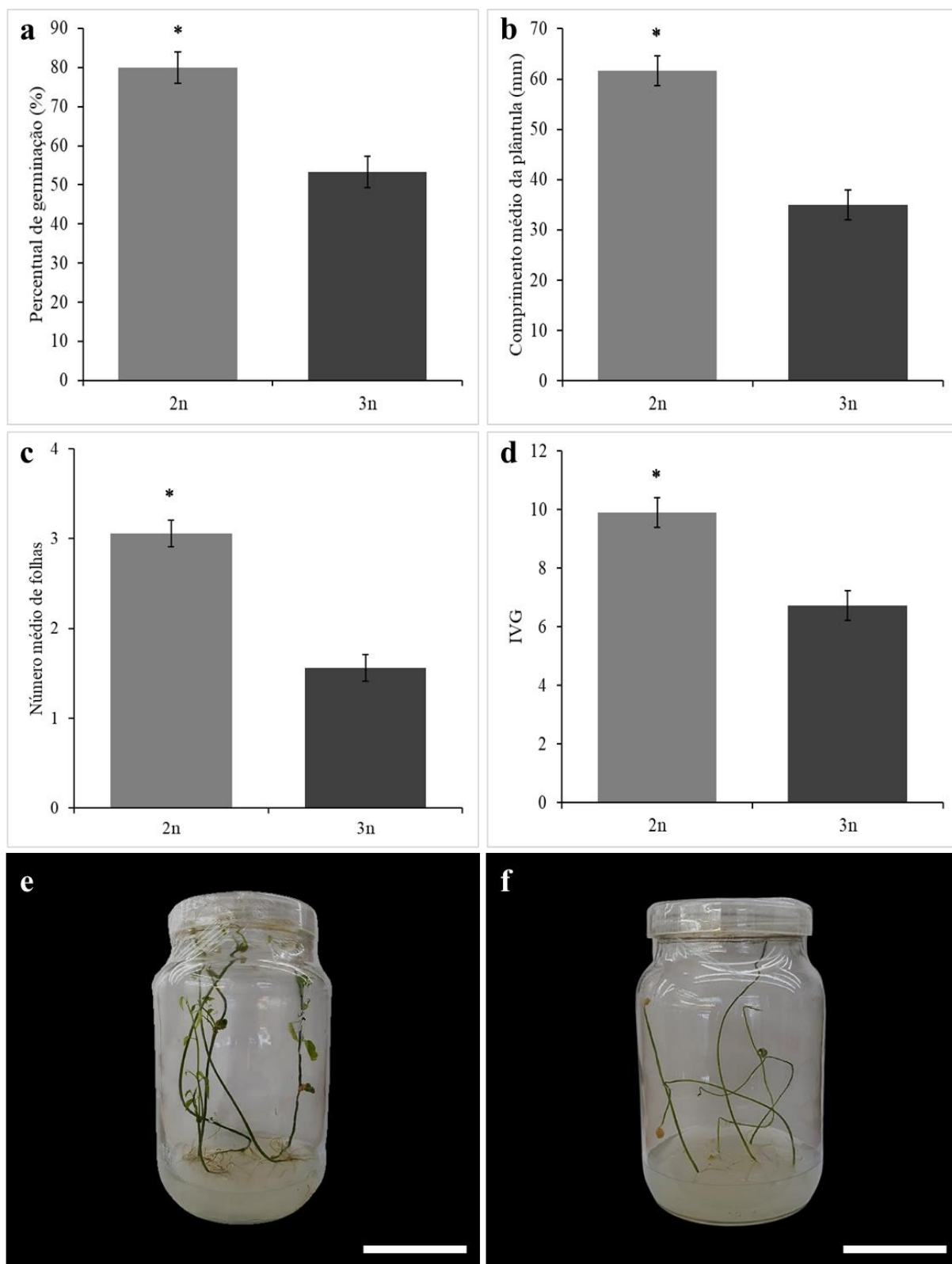


Figura 5. Germinação in vitro de sementes diploide e sementes oriundas entre os cruzamentos entre plantas triploides de *P. cincinnata*. a – Percentual de germinação in vitro a partir das sementes dos citótipos 2x e 3x de *P. cincinnata*. b – Comprimento médio das plântulas (mm). c – Número médio de folhas. d – Índice de velocidade de germinação. e – Plântulas provenientes de sementes 2x de *P. cincinnata*. Bar. 130 mm. f – Plântulas resultantes do cruzamento entre plantas triploides de *P. cincinnata*. Bar. 130 mm. As barras

de erro indicam o erro padrão. Os asteriscos referem-se a diferenças estatísticas entre os citótipos dentro de cada parâmetro de acordo com o teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

3.4. Citometria de fluxo e citogenética

Plantas diploides de *P. cincinnata* apresentaram a estimativa de DNA nuclear de 3,29 pg com coeficiente de variação de 4,56% e o DNA nuclear e das plantas triploides foi de 4,95 pg e 3,55% coeficiente de variação (Fig. 6a). Plântulas obtidas do cruzamento entre triploides apresentaram conteúdo nuclear de 3,37 pg e coeficiente de variação de 2,84% (Fig. 6b). A confirmação do número cromossômico dos citótipos 2x e 3x foi realizada por meio da contagem do número cromossômico de $2n = 2x = 18$ e $2n = 3x = 27$, respectivamente (Fig. 6c-d). A progênie do cruzamento envolvendo plantas triploides, apresentou $2n = 19$ cromossomos ($2n + 1$) (Fig. 6e-f).

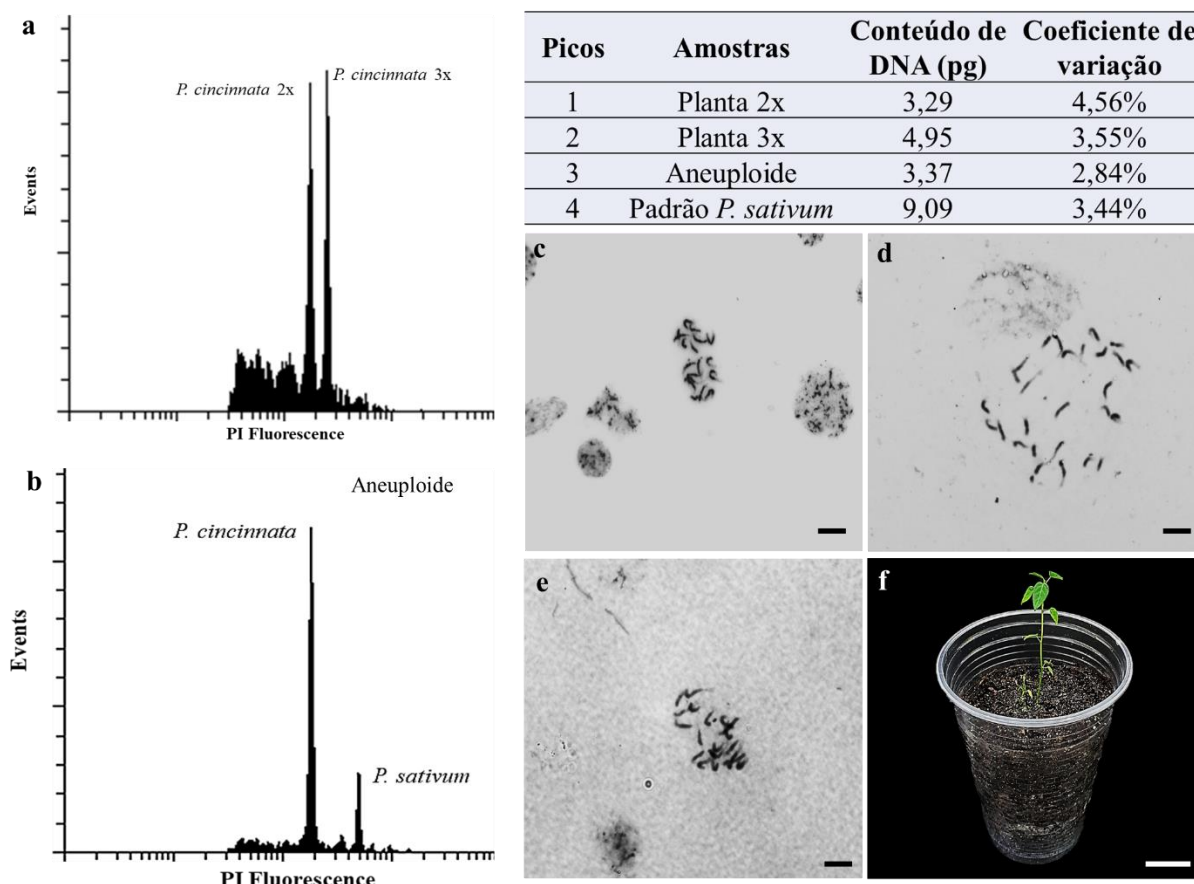


Figura 2. Estimativa do conteúdo de DNA nuclear através das análises de citometria de fluxo em citótipos diploide, triploide e aneuploide de *P. cincinnata*. a - Histograma que compararam o DNA nuclear da plântula diploide (2x) e da planta regenerada do endosperma (3x). b -

Histograma que comparam o DNA nuclear das plantas aneuplóides e planta padrão de *P. sativum*. c – Número cromossômico de plantas diploide $2n = 18$. Bar. 5 μm . d - Número cromossômico de plantas triploides $3n = 27$. Bar. 5 μm . e – Número cromossômico de plantas aneuploides $2n = 19$. Bar. 5 μm . f – Plântula aneuploide aclimatizada em casa de vegetação. Bar. 125 mm.

3.5. Caracterização estomática

Verificou-se diferenças entre os valores de densidade estomática, comprimento e área estomática, entre os citótipos diploides, triploides e aneuploides (Fig. 7a-b-c). A maior densidade estomática foi observada para plantas diploides com média de 42,9 estômatos por mm^2 , seguida de plantas triploides com média de 29,6 estômatos e aneuploides com 18,4 estômatos (Fig. 7d). As plantas diploides e triploides apresentaram média de 0,21 e 0,23 μm para comprimento estomático, e as plantas aneuploides média de 0,29 μm , diferindo estatisticamente das plantas diploides e triploides (Fig. 7e). Para a largura estomática não houve diferenças significativas entre as amostras 3x com média de 0,17 μm e aneuploides com 0,167 μm , as plantas 2x teve a menor média de 0,155 μm (Fig. 7f). Os aneuploides apresentaram a maior média de 0,03 μm para área estomática, diferindo do 2x e 3x que apresentaram média de 0,02 μm (Fig. 7g).

Diferenças entre os valores de densidade de células ordinárias, largura e área foram encontradas entre os citótipos analisados. Em relação a densidade de células ordinárias presentes na epiderme, verificou-se que plantas triploides apresentaram a menor densidade com 70,7 células por mm^2 , seguido dos aneuploides com média de 81,1 células ordinárias e maior densidade foi de 114 células por mm^2 em plantas diploides (Fig. 7h). A maior média para o comprimento de células ordinárias foi de 0,55 μm em plantas aneuploides e a menor em plantas diploides com média de 0,48 μm , plantas triploides teve média de 0,50 μm (Fig. 7i).

Comparando a largura das células ordinárias, a menor média foi de 0,26 μm para plantas diploides e aneuploides, sendo a maior média de 0,38 μm em plantas triploides (Fig. 7j). Em relação a área de células ordinárias verificou-se que a maior

média foi 0,16 μm amostrada em plantas aneuploides, seguido das plantas triploides com área de 0,13 μm e diploides com área de 0,07 μm (Fig. 7k).

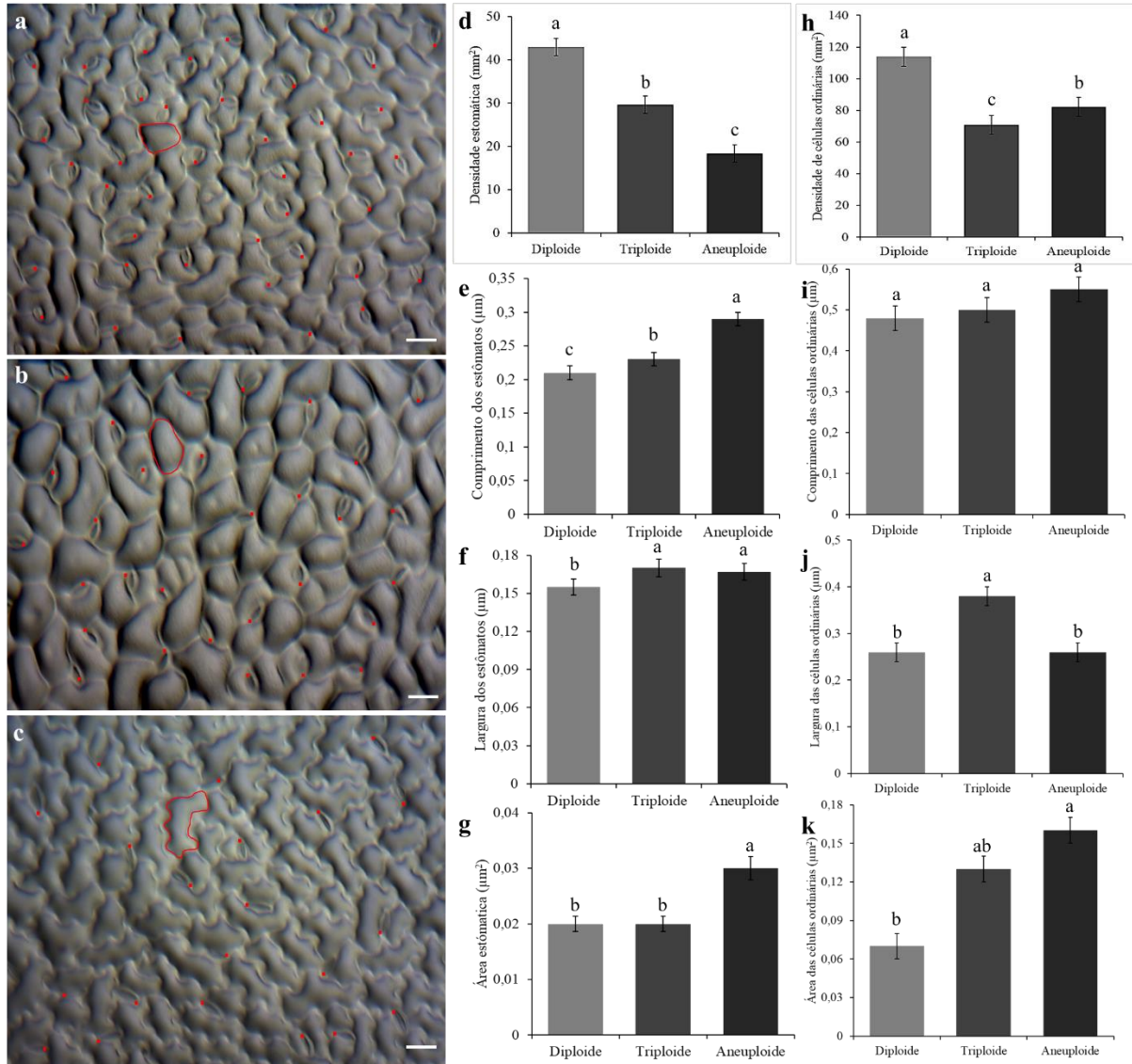


Figura 7. Caracterização da epiderme das plantas diploides, triploides da via embriogênica e aneuploides, cultivadas em casa de vegetação. a – Epiderme da folha diploide (2x), controle. b – Epiderme da folha triploide (3x). c – Epiderme da folha aneuploide. Bars. 100 μm . d – Densidade estomática (mm^2). e – Comprimento dos estômatos (μm). f – Largura dos estômatos (μm). g – Área estomática (μm^2). h – Densidade de células ordinárias (mm^2). i – Comprimento das células ordinárias (μm) da epiderme. j – Largura das células ordinárias (μm). k – Área de células ordinárias (μm^2) da epiderme. As barras de erro indicam o erro padrão. Médias seguidas por letras distintas dentro de cada variável, diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

4. DISCUSSÃO

Em geral, as plantas triploides apresentam distúrbios meióticos, comprometendo a viabilidade dos gametas, ocasionando a redução da fertilidade, esterilidade completa ou parcial das sementes e abortamento dos frutos (Grosser et al., 2014; Sattler et al., 2015; Wang et al., 2016), produzindo número muito reduzido ou ausência de sementes (Aleza et al., 2010).

Em plantas triploides de *P. cincinnata* a produção de frutos e sementes ocorre quando polinizadas, e o baixo índice de frutos e sementes produzidos pelas plantas triploides quando comparados com cruzamentos diploides, pode ser devido à baixa fertilidade dos acessos triploides, uma vez que a homologia das cromátides induz à formação de trivalentes, bivalentes e univalentes durante a meiose (Svačina et al., 2020). A formação de gametas não balanceados já foram observadas em outros poliploides (Jauhar, 1970; Mohr, 1986; Cheng et al., 2005), justificando assim o declínio na fertilidade dos triploides (Otto; Whinton, 2000). A disfunção da meiose em plantas triploides acarreta a irregularidades durante a meiose como pontes, cromossomos retardatários e quebras cromossômicas, o que dificulta a reprodução sexual dessas plantas (Cuenca, 2010; Wang et al., 2016). Em melancia triploide, irregularidades na meiose origina sementes inviáveis resultando em melancia sem semente verdadeira, apenas com a presença de sementes vestigiais (Cheng et al., 2005; Sumarji e Suparno et al., 2017).

Outro fator que limita a capacidade reprodutiva da espécie *P. cincinnata* é a autoincompatibilidade que bloqueia bioquimicamente a formação do tubo polínico de grãos de pólen oriundos da mesma flor ou de flores do mesmo indivíduo (Aular et al. 2004). Assim, o sistema de autoincompatibilidade do maracujazeiro impede a formação de frutos e sementes (Bruckner et al., 2005). A fertilização vai depender da presença de diferentes genótipos, entretanto, há registro de formação de frutos em testes de autopolinização para *P. cincinnata* que obteve taxa de 7,6%, quando comparado com 63,2% da polinização cruzada (Aular et al. 2004; Costa et al., 2008).

Em poliploides de espécies ornamentais a baixa fertilidade não implica em desvantagem, pois o desenvolvimento do fruto reduz o período de floração o que

diminui o valor ornamental (Schifino-Wittman e Dall’Agnol 2003; Manzzor et al., 2019). No gênero *Passiflora*, a produção de plantas triploides para fins ornamentais mostra-se viável, pois possuem órgãos vegetativos e reprodutivos com maiores dimensões como observado em *P. cincinnata* (Machado, 2020) e *P. foetida* (Mikovski et al., 2021), aumentando significativamente a diversidade fenotípica dos maracujazeiros, o que agrega maior interesse para o uso como planta ornamental.

As sementes produzidas pelas plantas triploides de *P. cincinnata* podem ser diferenciadas das sementes diploides com base no comprimento, largura, espessura e peso, pois são sementes menores, ocas e com malformações. Essas diferenças no tamanho e peso das sementes triploides estão relacionadas como um menor desenvolvimento do endosperma ou devido à finalização mais precoce do seu desenvolvimento (Esen e Soost, 1975). Segundo Kaiser et al. (2016) a variação no tamanho das sementes é uma característica que apresenta plasticidade, devido às variações ambientais no amadurecimento, fatores genéticos, taxa de polinização, disponibilidade de nutrientes, água e luz.

O endosperma constitui um tecido de reserva, encontrado nas angiospermas com a função de suprir o embrião durante o desenvolvimento até que a plântula se torne autotrófica, o sucesso da germinação depende da formação e desenvolvimento adequado do endosperma (An et al., 2020). No entanto, sementes triploides de *P. cincinnata* apresentavam a degradação do endosperma e de embriões, tornando-se completamente inviáveis, enquanto outras se desenvolvem de maneira relativamente normal no início, mas depois exibem deterioração fisiológica durante a germinação *in vitro*.

A perda do vigor da semente implica na capacidade da semente em produzir plântulas normais, essa perda no potencial fisiológico da semente é acarretado pelas alterações físicas, fisiológicas e bioquímicas que ocorrem durante o seu desenvolvimento (Krzyzanowski e Neto, 2001; Peske et al., 2003). O baixo vigor nas sementes triploides de *P. cincinnata* infere no potencial fisiológico, como na velocidade de germinação, crescimento e desenvolvimento da plântula. Por meio do índice de velocidade de germinação (IVG), verificou-se que o vigor das sementes foi responsável pela baixa porcentagem de germinação de 53,3% em sementes triploides,

em comparação as sementes diploides com 80%. O baixo vigor da semente pode ser responsável pela baixa uniformidade na germinação *in vitro*, crescimento e desenvolvimento das plântulas.

Em razão a baixa fertilidade dos acessos triploides, as plantas triploides tendem a produzir gametas aneuploides (Otto e Whinton, 2000). Plantas aneuploides foram obtidas do cruzamento entre triploides de *P. cincinnata*, com conteúdo nuclear de 3,37 pg e número cromossômico de $2n + 1 = 19$. O ganho e a perda de cromossomos afetam características morfofisiológicas (Sheltzer e Amon, 2011; Birchler, 2013; Singh, 2020), esse desequilíbrio na dosagem de genes expressam alterações fenotípicas como o retardo do desenvolvimento vegetativo, baixo vigor e uniformidade na germinação e morte na fase juvenil da planta, como observados na progênie das plantas triploides de *P. cincinnata*. Híbridos do cruzamento de *P. sub lanceolata* ($2n = 22$) x *P. foetida* ($2n = 22$) exibiram aneuploidia ($2n = 22 - 2$) provavelmente devido supressão da função do centrômero e assincronia das fases do ciclo celular (Santos et al., 2012).

A expressão gênica em plantas aneuploides é afetada pelo desequilíbrio da dosagem gênica (Zhu et al., 2015; Zeng et al., 2020). As alterações nos padrões de expressão gênica em aneuploides estão correlacionadas a pequenas alterações em genes localizados em regiões cromossômicas duplicadas, no qual apresentam aumento de 1,5 vezes na da dosagem gênica, levando a diferenças qualitativas e quantitativas nos padrões de expressão gênica (Makarevitch e Harris, 2009; Zhu et al., 2015). Essas interações gênicas complexas causam grandes alterações no funcionamento da rede gênica, implicando em mudanças quantitativas na expressão de genes de caracteres morfológicos, anatômicas, citológicas e fisiológicas (Birchler, 2013; Singh, 2017; Singh, 2020). A identificação de regiões gênicas a um cromossomo específico associados a caracteres morfológicos e quantitativos através de indivíduos aneuploides, permitem a identificação de genes responsáveis por características agrônômicas importantes para o melhoramento genético de plantas (Birchler, 2013; Singh, 2017; Singh, 2020).

As análises estomáticas de *P. cincinnata* revelaram que as plantas aneuploides apresentaram menor frequência estomática de 18,2 estômatos, seguido de plantas 3x

(29,6) e plantas 2x (42,9). Os estômatos dessas plantas são aparentemente maiores em relação as plantas 2x e 3x, no entanto, para as células ordinárias da epiderme, plantas triploides apresentaram menor densidade de 70,7 células por mm², seguido dos aneuploides (81,1) e diploides (114). Essas variações na densidade estomática em poliploides de *Passiflora* também foram encontradas em *P. edulis* (Antoniazzi et al., 2018), *P. cincinnata* (Silva et al., 2020) e *P. foetida* (Mikovski et al., 2021). Embora as plantas triploides de *P. cincinnata* possuam performance inferior as plantas diploides na produção de sementes e no desenvolvimento no cultivo in vitro das sementes, as plantas 3x compensam no aumento de metabólitos secundários como observado no volume e na concentração de açúcares do néctar.

Plantas aneuploides serve como importante instrumento na identificação de genes e regiões cromossômicas responsáveis a caracteres agrônômicos de grande valor a serem incorporados nos programas de melhoramento genético de *P. cincinnata*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIORAFICAS

ALEZA, P.; JUÁREZ, J.; CUENCA, J.; OLLITRAULT, P. Recovery of citrus triploid hybrids by embryo rescue and flow cytometry from 2x × 2x sexual hybridizations and its application to extensive breeding programs. **Plant Cell Reports**. 29: 1023–1034, 2010.

AN, L.; TAO, Y.; CHEN, H.; HE, M.; XIAO, F.; LI, G.; DING, Y.; LIU, Z. Embryo-Endosperm Interaction and Its Agronomic Relevance to Rice Quality. **Frontiers in Plant Science**. 11. 2020.

ANTONIAZZI, C.A.; FARIA, R.B.; CARVALHO, P.P.; MIKOVSKI; A.I.; CARVALHO; I.F.; MATOS, E.M.; REIS, A.C.; VICCINI, L.F.; PAIM PINTO, D.L.; ROCHA, D.I.; OTONI, W.C.; SILVA, M.L. In vitro regeneration of triploid plants from mature endosperm culture of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims). **Scientia Horticulturae**. 238: 408–415, 2018.

AULAR, J.; PARÉS, J.; IADE, P.; RODRÍGUEZ, Y. Crecimiento reproductivo de *Passiflora cincinnata* Mast. **Bioagro**. 16: 205-212, 2004.

ASAKURA, I.; HOSHINO, Y. Endosperm-derived triploid plant regeneration in diploid *Actinidia kolomikta*, a cold-hardy kiwifruit relative. **Scientia Horticulturae**. 219: 53–59, 2017.

- BIRCHLER, J.A.; 2013. Aneuploidy in plants and flies: The origin of studies of genomic imbalance. **Seminars in Cell and Developmental Biology**. 24: 315–319, 2013.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, p 398, 2009.
- BRUCKNER, C.H.; SUASSANA, T.M.F.; RÊGO, M.M.; NUNES, E.S. Autoincompatibilidade do maracujá – implicações no melhoramento genético. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados. p. 316-338, 2005
- BOMBLIES, K. When everything changes at once: Finding a new normal after genome duplication: Evolutionary response to polyploidy. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**. 287, 2020.
- CARVALHO, C.R.D.E.; SARAIVA, L.S. A new heterochromatin banding pattern revealed by modified HKG banding technique in maize chromosomes. **Heredity**. 70: 515–519, 1993.
- COSTA, A.F.S.; COSTA, A.N.; VENTURA, J.A.; FANTON, C.J.; LIMA, I.M.; CAETANO, L.C.S.; SANTANA, E.N. **Recomendações técnicas para o cultivo do maracujazeiro**. Vitória, ES: Incaper, p. 56, 2008.
- CUENCA, J.; ALEZA, P.; JUAREZ, J.; PINA, J.A.; NAVARRO, L. 'Safor' mandarin: A new citrus mid-late triploid hybrid. **Journal of Horticultural Sciences**. 45: 977-980, 2010.
- ESEN A, SOOST RW. Distribution of enzymatic browning of young shoot homogenates the Aurantioideae. **American Journal of Botany**. 62: 1078-1083, 1975.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**. 35: 1039–1042, 2011.
- GROSSER, J.W.; GMITTER, F.G. Protoplast fusion for production of tetraploids and triploids: Applications for scion and rootstock breeding in citrus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 104: 343–357, 2011.
- HERBEN, T.; SUDA, J.; KLIMEŠOVÁ, J. Polyploid species rely on vegetative reproduction more than diploids: A re-examination of the old hypothesis. **Annals of Botany**. 120: 341–349, 2017.
- HOSHINO, Y.; MIYASHITA, T.; THOMAS, T.D. In vitro culture of endosperm and its application in plant breeding: Approaches to polyploidy breeding. **Scientia Horticulturae**. 130: 1–8, 2011.

- JAUHAR, P.P. Chromosome behaviour and fertility of the raw and evolved synthetic tetraploids of pearl millet, *Pennisetum typhoides* stapf et hubb. **Genetica**. 1: 407, 1970.
- JEDIYI, H.; NAAMANI, K.; ELKOCH, A.A.; DIHAZI, A.; FELS, A.E.A.E.; ARKIZE, W. First study on technological maturity and phenols composition during the ripeness of five *Vitis vinifera* L grape varieties in Morocco. **Scientia Horticulturae**. 246: 390-397, 2019.
- KAISER, D.K.; MALAVASI, M.D.M.; MALAVASI, U.C.; DRANSKI, J.A.L.; FREITAS, L.C.N.D.; KOSMANN, C.R.; ANDRIOLI, K.K. Physiological maturity of seeds and colorimetry of the fruits of *Allophylus edulis* [(A. St.-Hil., A. Juss. & Cambess.) Hieron. exNiederl.]. **Journal of Seed Science**. 38(2): 92-100, 2016.
- KAWAMURA, S.; IDA, K.; OSAWA, M.; IKEDA, T. No effect of seed presence or absence on sugar content and water status of seeded and seedless watermelon fruits. **Horticultural Science**, 53: 304-312, 2018.
- KRZYZANOWSKI, F.C.; NETO, J.B.F. Vigor de sementes. **Informativo Abrates**. 11: 81-84, 2001.
- LIQIN, G.; JIANGUO, Z.; XIAOXIA, L.; GUODONG, R. Polyploidy-related differential gene expression between diploid and synthesized allotriploid and allotetraploid hybrids of *Populus*. **Molecular Breeding**. 39, 2019
- LOUREIRO, J.; RODRIGUEZ, E.; DOLEŽEL, J.; SANTOS, C. Two New Nuclear Isolation Buffers for Plant DNA Flow Cytometry: A Test with 37 Species. **Annals of Botany**. 875–888, 2007.
- MACHADO, M.D. 2020. **Regeneração in vitro, caracteres morfoagronômicos e enzimáticos de plantas triploides de *Passiflora cincinnata* Mast**. Dissertação de Mestrado. Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade do Estado de Mato Grosso, MT.
- MADANI, H.; ESCRICH, A.; HOSSEINI, B.; SANCHEZ-MUÑOZ, R.; KHOJASTEH, A.; PALAZON, J. Effect of polyploidy induction on natural metabolite production in medicinal plants. **Biomolecules**. 11(6): 899, 2021.
- MAKAREVITCH, I.; HARRIS, C. Aneuploidy causes tissue-specific qualitative changes in global gene expression patterns in maize. **Plant Physiology**. 152: 927–938, 2009.
- MANZOOR, A.; AHMAD, T.; BASHIR, M.A.; HAFIZ, I.A.; SILVESTRI, C. Studies on colchicine induced chromosome doubling for enhancement of quality traits in ornamental plants. **Plants** 8: 1–16, 2019.
- MELO, N.F.; CERVI, A.C.; GUERRA, M. Karyology and cytotaxonomy of the genus *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Plant Systematics and Evolution**. 226; 69–84, 2001.

- MIKOVSKI, A.I.; SILVA, N.T.; SILVA, L.A.S.; MACHADO, M.; BARBOSA, L.C.S.; REIS, A.C.; MATOS, E.M.; VICCINI, L.F.; SOUZA, C.S.; MACHADO, M.D.; OTONI, W.C.; CARVALHO, I.F.; ROCHA, D.I.; SILVA, M.L. From endosperm to triploid plants: a stepwise characterization of the de novo shoot organogenesis and morpho-agronomic aspects of an ornamental passion fruit (*Passiflora foetida* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 147: 239–253, 2021.
- MOHR, H.C. Watermelon breeding. In: Bassett, M. J., ed. **Breeding vegetable crops**. 37-66, 1986.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**. 15: 473-497, 1962.
- OTTO S.P.; WHITTON, J. Polyploidy incidence and evolution. **Annual Review of Genetics**. 34: 401-437, 2000.
- PESKE, S.T.; ROSENTHAL, M.A.; ROTA, G.R.M. **Sementes: fundamentos científicos e tecnológicos**. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas. Editora Universitária, 2003.
- RAMSEY, J.; SCHEMSKE, D.W. Neopolyploidy in flowering plants. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**. 33: 589–639, 2002.
- RUIZ, M.; OUSTRIC, J.; SANTINI, J.; MORILLON, R. Synthetic Polyploidy in Grafted Crops. **Frontiers in Plant Science**. 11, 2020.
- RUTLAND, C.A.; HALL, N.D.; MCELROY, J.S. The Impact of Polyploidization on the Evolution of Weed Species: Historical Understanding and Current Limitations. **Frontiers in Agronomy**. 3: 1–12, 2021.
- SANTOS, E.A.; SOUZA, M.M.; ABREU, P.P.; CONCEIÇÃO, L.D.H.C.S.; ARAÚJO, I.S.; VIANA, A.P.; ALMEIDA, A.A.F.; FREITAS, J.C.O. Confirmation and characterization of interspecific hybrids of *Passiflora* L. (Passifloraceae) for ornamental use. **Euphytica**. 184:389–399, 2012.
- SATTLER, M.C.; CARVALHO, C.R.; CLARINDO, W.R. The polyploidy and its key role in plant breeding. **Planta**. 243: 281–296, 2015.
- SCHIFINO WITTMANN, M.T.; DALL’AGNOL, M. Indução De Poliploidia No Melhoramento De Plantas. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**. 9: 155–164, 2003.
- SHELTZER, J.M.; TORRES, E.M.; DUNHAM, M.J.; AMON, A. Transcriptional consequences of aneuploidy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 109: 12644–12649, 2012.
- SINGH, N.; RAUPP, J.; KOO, D.H.; FRIEBE, B.; GILL, B.; POLAND, J. In-silico detection of aneuploidy and chromosomal deletions in wheat using genotyping-by-sequencing. **Plant Methods**. 16: 1–6, 2020.

- SILVA, N.T.; SILVA, L.A.S.; REIS, A.C.; MACHADO, M.; MATOS, E.M.; VICCINI, L.F.; OTONI, W.C.; CARVALHO, I.F.; ROCHA, D.I.; SILVA, M.L. Endosperm culture: a facile and efficient biotechnological tool to generate passion fruit (*Passiflora cincinnata* Mast.) triploid plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 42: 613-624, 2020.
- SUN, D.Q.; LU, X.H.; LIANG, G.L.; GUO, Q.G.; MO, Y.W.; XIE, J.H. Production of triploid plants of papaya by endosperm culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 104: 23–29, 2011.
- SUMARJI, M.P.; SUPARNO, M.H. The effectiveness of colchisin giving on watermelon polyploidization (*Citrullus vulgaris* Schard). **International Journal of Applied Environmental Sciences**. 12: 1951-1967, 2017.
- SINGH, R.J. **Plant Cytogenetics**. Third edition. Boca Raton: Taylor & Francis, p. 528, 2017.
- SOARES-SCOTT, M.D.; MELETTI, L.M.M.; BERNACCI, L.C.; PASSOS, I.R.S. Citogenética clássica e molecular em Passifloras. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, cap. 9, 211-240, 2005.
- SVAČINA, R.; SOURDILLE, P.; KOPECKÝ, D.; BARTOŠ, J. Chromosome Pairing in Polyploid Grasses. **Frontiers in Plant Science**. 11: 1–17, 2020.
- WANG, X.; CHENG, Z.M.M.; ZHI, S.; XU, F. Breeding triploid plants: A review. **Czech Journal of Genetics and Plant Breeding**. 52: 41–54, 2016.
- WET, J.M.J. Origins of polyploids. Lewis Polyploidy: **Biological relevance**. New York, Plenum. 3-15, 1980.
- ZENG, D.; GUAN, J.; LUO, J.; ZHAO, L.; LI, Y.; CHEN, W.; ZHANG, L.; NING, S.; YUAN, Z.; LI, A.; ZHENG, Y.; MAO, L.; LIU, D.; HAO, M. A transcriptomic view of the ability of nascent hexaploid wheat to tolerate aneuploidy. **BMC Plant Biology**. 20: 1–11, 2020.
- ZHU, B.; SHAO, Y.; PAN, Q.; GE, X.; LI, Z. Genome-wide gene expression perturbation induced by loss of C2 chromosome in allotetraploid *Brassica napus* L. **Frontiers in Plant Science**. 6, 2015.

Capítulo II

Endoduplicação sintética de plantas triplóides derivadas de endosperma como meio de gerar hexaplóide de *Passiflora cincinnata* Masters

1. INTRODUÇÃO

A poliploidia é a existência de três ou mais conjuntos cromossômicos no núcleo celular, podendo ocorrer em células de um tecido específico ou em organismo (Schifino-Wittmann e Agnol 2001; Hegarty et al., 2013; Osborn, 2013; Storme e Mason, 2014; Wendel et al. 2016; Rangan et al., 2020; Iannicelli et al., 2020). Plantas poliploides podem surgir eventualmente em populações naturais (Soltis e Burleigh, 2009; Van de Peer et al., 2021) por métodos assistidos através da hibridação sexual seguido de duplicação genômica (Otto 2007; Aleza et al., 2009), fusão de protoplasto (Grosser e Gmitter, 2011) ou a partir da cultura in vitro de tecidos vegetais (Thomas e Chaturvedi 2008; Wang et al., 2016, Antoniazzi et al., 2018; Silva et al., 2020; Mikovski et al., 2021).

A poliploidização natural pode ocorrer por meio da fusão de gametas não reduzidos ($2n$) originados pelo processo meiótico anormal. Falhas durante o pareamento e a segregação cromossômica impedem a redução do número cromossômico, formando gametas com número cromossômico somático. A posterior fusão desses gametas originam os poliploides (Ramsey e Schemske, 1998; Schifino-Wittmann e Agnol 2001; Acquaah, 2007).

Os efeitos da duplicação completa do genoma podem causar mudanças genéticas e epigenéticas significativas o que leva há possíveis alterações fenológicas, fenotípicas e fisiológicas dos genótipos poliploides, em relação aos seus respectivos diploides e, em geral, aumentam a sua complexidade biológica (Yang et al. 2011; Van de Peer et al., 2017). Os mecanismos que contribuem pelos quais a poliploidia expressa novos caracteres não são bem compreendidos. No entanto, podem permitir que os poliploides se adaptem à novos nichos ou aumentem suas chances de serem selecionados para uso na agricultura (Wittmann e Agnol 2001; Osborn et al., 2003). A

proeminência da poliploidia em plantas implica em algum significado adaptativo a partir de mudanças nas características do fenótipo como redução do tamanho das árvores, aumento da biomassa de órgãos vegetativos, maior concentração do teor de metabólitos primários e secundários, maior tolerância ou resistência a tensões abióticas e bióticas (Ruiz et al., 2020), aumento da heterose, redundância genética, apomixia, robustez mutacional e plasticidade fenotípica (Comai, 2005; Sattler et al., 2015; Touchel et al., 2020), produção hormonal e melhor sistemas antioxidantes (Santa et al., 2018). Aumento de atributos reprodutivos com flores maiores, intensidade na cor, tempo de florescimento, fragrância e período pós-colheita (Liqin et al., 2019; Vichiato et al., 2019).

A manipulação do nível de ploidia *in vitro* em plantas é comumente induzida de forma mais rápida e confiável com o uso de agentes antimitóticos como colchicina, oryzalina, trifluralina, pronamida e amiprofosme (APM) (Germana, 2012; Esmaeili et al., 2020; Touchell et al., 2020). Dos agentes antimitóticos, a colchicina se destaca como o mais amplamente utilizado na duplicação do genoma em plantas (Blakeslee e Avery, 1937; Doležel et al., 1994; Glowacka et al., 2009).

A colchicina interfere nas funções do citoesqueleto celular através da inibição da polimerização dos dímeros α e β -tubulina dos microtúbulos, causando mudança conformacional na polimerização do fuso mitótico e meiótico (Quesenberry et al., 2010; Touchell et al., 2020), impedindo a segregação dos cromossomos e resultando na duplicando do número cromossômico (Ade e Rai, 2010; Manzzor et al., 2019). O aumento do número de cópias de genes causa o efeito “giga”, que acarreta alterações, bioquímicas, funcionais, estruturais e fenotípicas, correlacionadas pelo aumento de conteúdo de DNA e aumento da dosagem gênica (Wu et al., 2010; Sattler et al., 2016; Salma et al., 2017). A indução da duplicação do genoma requer um emparelhamento sinérgico de penetração eficiente do agente antimitótico, sendo dependente do tempo de exposição, concentrações dos agentes, tipos de tecidos, interações com o meio de cultura e reguladores de crescimento vegetal (Doležel et al., 1994; Eeckhaut et al., 2002; Eng e Ho 2019; Esmaeili et al., 2020; Touchell et al., 2020; Niazian e Nalouse, 2020).

Em maracujazeiros, a obtenção de plantas poliploides tem sido descrita a partir do cultivo *in vitro* de endosperma, tecido naturalmente triploide, sendo obtido para as espécies *P. edulis* (Antoniazzi et al., 2018), *P. cincinnata* (Silva et al., 2020) e em *P. foetida* (Mohamed et al., 1996; Mikovski et al., 2021). Todos esses sistemas foram obtidos a partir da indução de gemas adventícias. Atualmente um sistema de regeneração, via embriogênese somática, foi estabelecimento para a obtenção de plantas triploides de *P. cincinnata* ($2n = 3x = 27$) Machado (2020). Sistemas de regeneração *in vitro* fornecem ferramentas para manipular a ploidia e facilitar a expansão da reprodução afim de disponibilizar novas cultivares em plantas (Touchell et al., 2020; Catalano et al., 2021; Zhang et al., 2020). Esses sistemas estabelecidos para *Passiflora cincinnata* surgem como possibilidade de utilização de triploides de *Passiflora cincinnata* como fonte de explante para endoduplicação sintética do genoma, a fim de plantas com níveis adicionais de ploidia.

Os efeitos morfofisiológicos causados pela poliploidia tornam os poliploides mais vigorosos em relação aos diploides, devido ao maior vigor vegetativo e reprodutivo, o que os tornam mais produtivos. O objetivo do trabalho foi induzir hexaploides de brotações adventícias e embriões somáticos regenerados a partir do tecido endospermico de *Passiflora cincinnata*, visando uma possível aplicação futura em programas de melhoramento para a espécie.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Sementes de *P. cincinnata* obtidas por polinização aberta foram coletadas e extraídas manualmente e lavadas, sendo friccionadas em peneira até a eliminação do arilo. Em seguida foram colocadas sobre papel, à sombra em temperatura ambiente por um período de sete dias para secagem.

Posteriormente, o tegumento das sementes foram removidos com auxílio de mini morsa. Sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar, as sementes foram desinfestadas e imersas em 70% (v/v) álcool por 3 minutos, seguido pela imersão em 2,5% (v/v) de hipoclorito de sódio a durante 30 minutos e com o acréscimo de 3 gotas

de Tween-20° e, submetidas a quatro enxágues consecutivos em água destilada e autoclavada. As sementes foram mantidas em overnight em água destilada e autoclavada para facilitar a remoção dos endospermas. Os embriões zigóticos foram retirados e os endospermas isolados.

Para a produção de brotações adventícias os endospermas foram cultivados em placas de Petri de poliestireno 90 x 15 mm contendo 30 mL do meio, composto por sais básicos de MS (Calsson Labs, Smithfield, UT, USA) (Murashige e Skoog, 1962), 0,01% (p v) mio inositol, 3% (p v) sacarose e 0,8% de ágar (p v) (Acumedia®; Neogen, Lansing, MI, USA) como agentes gelificantes e com a adição de 2,0 mg L⁻¹ BA, conforme protocolo descrito por Silva et al. (2020), com fotoperíodo de 16 horas e 36 μmol m⁻²s⁻¹ de irradiância (Luz do Dia Especial, 20 W, Osram, Barueri, Brasil), 25 ± 2 °C por 30 dias.

Para a obtenção de embriões somáticos os endospermas foram cultivados no meio de MS, como anteriormente descrito na presença de 3,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ de BA (Machado, 2020). Os endospermas cultivados para indução da embriogênese somática foram mantidos na ausência de irradiância. O pH para o cultivo dos endospermas foi ajustado em 5,7± 0,1 e o meio de cultura autoclavado durante 15 minutos a 121 °C a uma pressão de 1,1 atm. As culturas foram mantidas em sala de cultivo durante 30 dias e 25 ± 2 °C. Massas proembriogênicas com 30 dias de cultivo in vitro foram transferidas para placas de Petri contendo meio basal de MS, como descrito anteriormente, sem adição de reguladores por 45 dias. As culturas foram mantidas em sala de crescimento, nas mesmas condições ambientais descritas anteriormente.

2.2. Indução de poliploides in vitro

Solução estoque de colchicina foi na concentração de 10%, sendo preparada dissolvendo 3 g da colchicina INLAB® em 30 mL de água destilada esterilizada em condições assépticas, em seguida filtroesterilizada em unidade filtrante operada com seringa de 0,45 μm da Millex™ e armazenada em geladeira.

Na indução de hexaploides com o uso de brotações adventícias de aproximadamente 5mm e com 45 dias de cultivo *in vitro*, e embriões somáticos em estágio cotiledonar, foram isolados e inoculados em placa de Petri de 60 x 15 mm contendo 30 mL do meio semi-sólido basal de MS, nas concentrações de 0,01%; 0,02%; 0,05%; 0,1%; 0,2% e 0,5 %, do agente indutor da duplicação do genoma nos tempos 72, 144 e 216 horas de exposição.

As placas foram vedadas com filme PVC e as culturas mantidas em sala de cultivo. As culturas após o tempo de exposição a colchicina foram transferidas para meio de MS na concentração total dos básicos, cultivados em frascos de cultura e mantidas sob irradiância por 60 dias.

2.3. Acclimatização de plantas regeneradas

As brotações adventícias em todos os tratamentos na presença das concentrações de colchicina senesceram, assim, plantas completas convertidas da via embriogênica com cerca de 10 cm de altura foram retiradas dos frascos de cultivo e lavadas em água corrente, para a remoção do excesso de meio de cultura. Em seguida, as plântulas foram acondicionadas em copos plásticos (15 cm x 9 cm) contendo substrato Plantmax[®] umedecido com solução de MS e envolvidos por um saco plástico transparente (10 cm x 20 cm). Os copos foram cobertos com sacos plásticos transparentes, e mantidos sob fotoperíodo de 16 horas de luz, temperatura de 26 ± 2 °C por ± 20 dias. Após 5 dias pequenos orifícios foram feitos no saco plástico e mantidos em sala de cultivo por mais 5 dias, posteriormente foram levadas para casa de vegetação.

2.4. Estimativa do conteúdo de DNA

Para a confirmação dos níveis de ploidia das plantas regeneradas, o conteúdo de DNA foi estimado. Como controle, foram usadas três amostras de plantas triploides germinadas *in vitro* pela via seminífera e 160 plantas de *P. cincinnata* expostas na presença das concentrações de colchicina.

As suspensões de núcleos foram obtidas através de secções de folhas jovens com o uso de uma lâmina de aço descartável em tampão de isolamento WPB (Loureiro et al., 2007). A suspensão foi aspirada por meio de duas camadas de gaze, com uma pipeta de plástico e filtrada em membrana de Nylon com malha de 50 µm para a remoção de fragmentos de células e restos de tecidos, sendo em seguida adicionado 25 µL de iodeto de propídio 1 mg mL e 5 µL de RNase 1 mg mL para corar o DNA.

Após 30 minutos em ambiente protegido de luz, as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo. Foi realizada três repetições e, pelo menos, 10.000 núcleos foram analisados para a quantificação da emissão da fluorescência com o uso do citômetro de fluxo CytoFLEX (Beckman Coulter, CA, EUA). O padrão interno utilizado para calcular o *C*-value das amostras foi *Pisum sativum* ($2C = 9,09$ pg). Entretanto, indivíduos diploides de *P. cincinnata* com conteúdo de DNA $2C = 2,29$ pg também foram utilizados como referência para as análises. Os histogramas foram gerados e analisados pelo programa CytExpert 2.0.1 e o conteúdo de DNA (pg) calculado de acordo Doležel e Bartos (2005):

Conteúdo 2C de DNA (em pg):

Média do pico G1 de P. cincinnata x 9,09

Média do pico G1 de P. sativum

2.5. Número cromossômico das plantas poliploides

Para a confiabilidade do sistema de poliploidização das plantas obtidas, análises cromossômicas foram realizadas utilizando-se de três plântulas germinadas a partir de sementes (controle), três plântulas triploides regeneradas do cultivo in vitro dos endospermas de *P. cincinnata* pela via embriogênica e três plantas hexaploides confirmadas através das análises de citometria de fluxo.

Ápices radiculares de aproximadamente 1,5 cm foram coletadas e tratados com 0,003 M 8 hidroxiquinolina (Sigma, EUA) por 8 horas a 4 °C, e posteriormente fixados em solução de Carnoy (3:1 etanol: ácido acético glacial) e armazenadas em

refrigerador por 24 horas. A remoção da parede celular ocorreu a partir da solução enzimática Pectinase (Sigma) e Celulase (Serva-Onozuka R-10) a 20% e 2%, por cerca de 4 horas a 37 °C. As lâminas foram confeccionadas a partir da técnica de dissociação celular com secagem ao ar (Carvalho e Saraiva, 1993; 1997).

2.6. Análises estomática

As plantas analisadas foram as produzidas pela via seminífera (2x), triploides oriundas de regeneração de endosperma (3x), folhas das plantas hexaploides (6x) e plantas mixoploides. O decalque foliar foi realizado no terço médio na parte abaxial próximo a nervura central da folha, para a retirada da epiderme utilizou-se de adesivo instantâneo à base de etila (Three Bond Brasil Ind. Com. Ltda, Brasil) para fixação das impressões epidérmicas em lâmina. As variáveis analisadas foram densidade estomática (mm²), área estomática, comprimento e largura estomática, densidade de células ordinárias, área de células ordinárias, largura e comprimento das células ordinárias. Na avaliação de densidade estomática e células ordinárias foram utilizadas 3 folhas, efetuando-se 5 observações por ploidia, um total de 15 observações, conduzidas em microscópio de luz (Biobal) acoplado ao sistema de câmera U-photo com ocular de 10x e um computador rodando o software TSView 73.1.7.

A medição do comprimento e largura dos estômatos e células ordinárias foram realizadas em um microscópio de luz (Biobal) acoplado ao sistema de câmera U-photo com uma ocular de 40x, 4 folhas foram utilizadas e 5 medições realizadas, num total de 20 medições por nível de ploidia, usando o software TSView 73.1.7.

2.7. Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo que cada repetição foi composta por dez explantes endospermicos. Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial (6 × 3) sendo o primeiro fator seis concentrações de colchicina (0,01%, 0,02%, 0,05%, 0,1%, 0,2% e 0,5%) e o segundo fator três tempos de exposição ao agente antimitótico (72, 144 e 216 horas).

Foram avaliadas o número de plantas obtidas, número de plantas triploides não poliploidizadas, número de plantas hexaploides e número de plantas mixoploides. Todos os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F a 1 e 5% significância de probabilidade, utilizando o programa computacional 'GENES' (Cruz, 2006). Os resultados significativos foram submetidos ao teste de Tukey a 5% significância de probabilidade, utilizando o programa computacional 'GENES' (Cruz, 2006).

Os parâmetros estomáticos e de células ordinárias foram submetidos à análise de variância e diferenças entre as médias comparados pelo teste de Tukey a 5% significância de probabilidade, utilizando o programa computacional 'GENES' (Cruz, 2006).

3. RESULTADOS

3.1. Indução de poliploides em embriões somáticos de *P. cincinnata*

A indução de poliploidia foi obtida a partir de embriões somáticos de *P. cincinnata*. Endospermas de *P. cincinnata* cultivados em meio suplementado com o 2,0 mg L⁻¹ de BA (Fig. 1a), primeiramente estruturas nodulares aos 10 dias de cultivo in vitro foram observadas e aos 15 dias primórdios de brotações adventícias desenvolveram-se (Fig. 1b). Aos 30 dias de cultivo in vitro, multibrotações adventícias foram observadas (Fig. 1c). As brotações isoladas (Fig. 1d) e cultivadas em meio de indução da duplicação na presença das concentrações colchicina após 15 dias de cultivo in vitro em todos os tratamentos senesceram.

Aos 15 dias de cultivo in vitro dos endospermas de *P. cincinnata* cultivados na presença de 3,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ de BA já se observou a produção de massa proembriogênica (Fig. 1e). Aos 30 dias de cultivo in vitro embriões somáticos foram produzidos (Fig. 1f). Os embriões somáticos em estágio cotiledonar cultivados em todos os tratamentos e tempo de exposição a colchicina sobreviveram (Fig. 1g). Plântulas com 30 dias de cultivo in vitro de aproximadamente 10 cm foram aclimatizadas em condições de casa de vegetação (Fig. 1h-i-j).

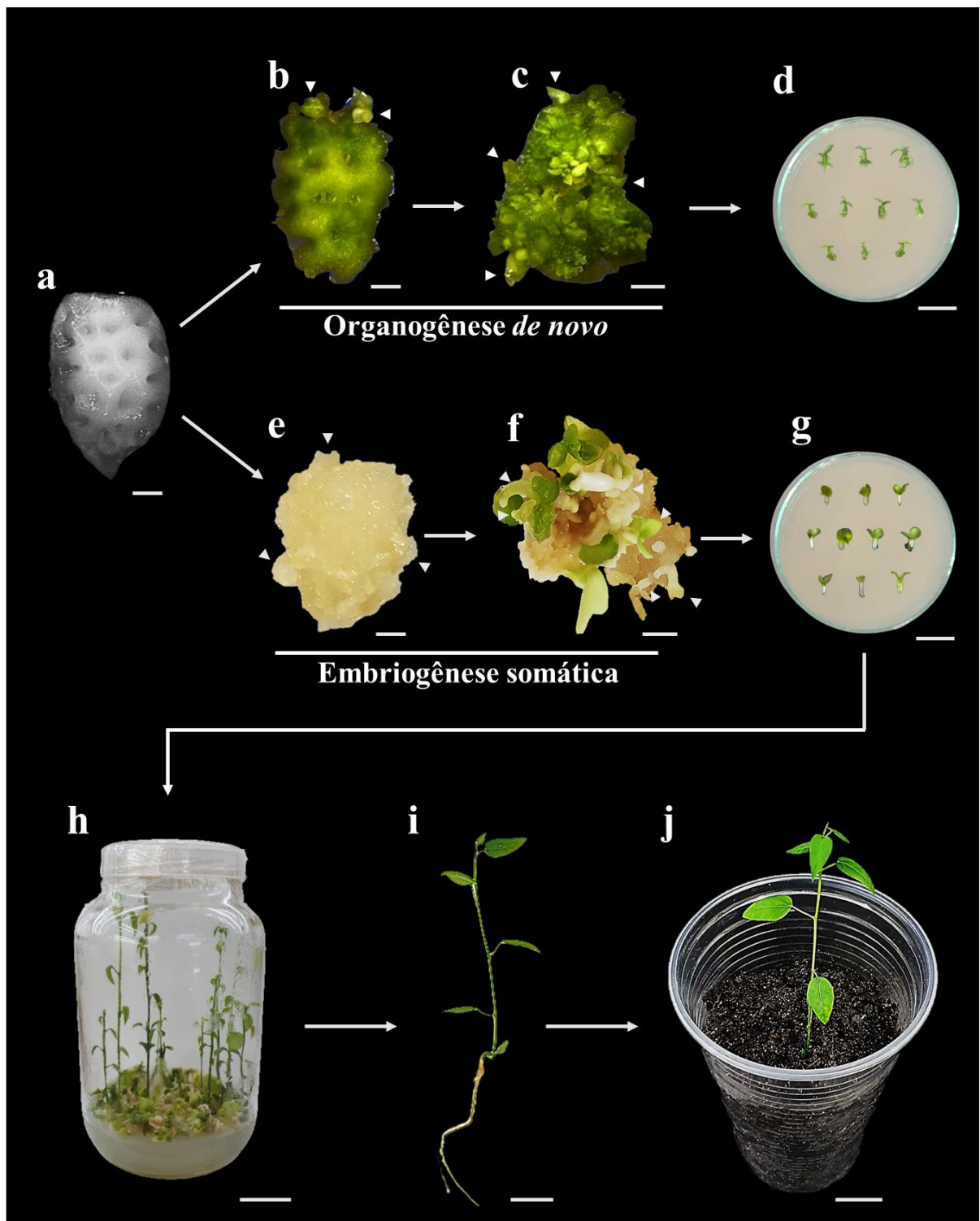


Figura 1. Sistema de indução de poliploides in vitro a partir de gemas adventícias e embriões somáticos de *P. cincinnata*. a – Organogênese *de novo*. Bar. 20 μm . b – Formação de primórdios das brotações adventícias aos 15 dias de cultivo in vitro. Bar. 20 μm . c - Multibrotações adventícias com 30 dias de cultivo in vitro de endosperma. Bar. 25 μm . d – Gemas adventícias de *P. cincinnata* inoculados em meio MS +

colchicina. Bar. 65 mm. e - Produção de massas proembriogênica com 15 dias de cultivo in vitro de endosperma. Bar. 20 μ m. f – Produção de embriões somáticos com 30 dias de cultivo in vitro de endosperma. Bar. 25 μ m. g - Embriões somáticos de *P. cincinnata* inoculados em meio MS + colchicina. Bar. 65 mm. h – Plântulas com 30 dias de cultivo in vitro em meio MS. Bar. 135 mm. i,j - Processo de aclimatização das plântulas após tratamentos com colchicina. Bar. 100 mm e 120 mm.

A estimativa do conteúdo de DNA nuclear confirmou os níveis de ploidia e a efetividade da colchicina na duplicação de genoma em embriões somáticos de *P. cincinnata*. Plantas com nível de ploidia 2x de origem seminífera apresentaram conteúdo de DNA nuclear $2C = 3,29$ pg com coeficiente de variação (CV) de 4,56%, enquanto as plantas convertidas via embriogênese somática o DNA nuclear foi de $2C = 4,95$ pg e 3,55% o coeficiente de variação, conforme o histograma observado na Fig. 2a. Plantas hexaploides (6x) apresentaram o conteúdo 2C de DNA nuclear próximo a 9,00 pg com o coeficiente de variação de 3% (Fig. 2b). Algumas plantas apresentaram duas ploidias no tecido foliar, mixoploides, com valores equivalentes a células triploides e hexaploides, neste caso, o coeficiente de variação foi de aproximadamente 3,47% (Fig. 2c). Entretanto, as plantas mixoploides foram submetidas a uma nova análise do conteúdo de DNA, a fim de se verificar a permanência da mixoploidia. Os resultados revelaram que após 30 dias da primeira análise os indivíduos reverteram ao estágio inicial, apresentando apenas células triploides com conteúdo 2C de DNA = 4,49 pg e coeficiente de variação de 3,47%.

Plantas diploides apresentaram número cromossômico de $2n = 2x = 18$ (Fig. 2d) e plantas triploides regeneradas a partir do tecido endospermico pela via embriogênica apresentaram número cromossômico de $2n = 3x = 27$ (Fig. 2e). As plantas hexaploides apresentaram 54 cromossomos ($2n = 6x = 54$), exatamente o dobro do observado nas plantas triploides (Fig. 2f).

Ao final do experimento, obtivemos 30 plantas hexaploides que corresponde a 18,75%. Por outro lado, 73,75% das plantas tratadas não tiveram seu genoma duplicado, permanecendo triploides. A frequência das plântulas que duplicaram parcialmente o seu genoma, os mixoploides, foi de 7,5%.

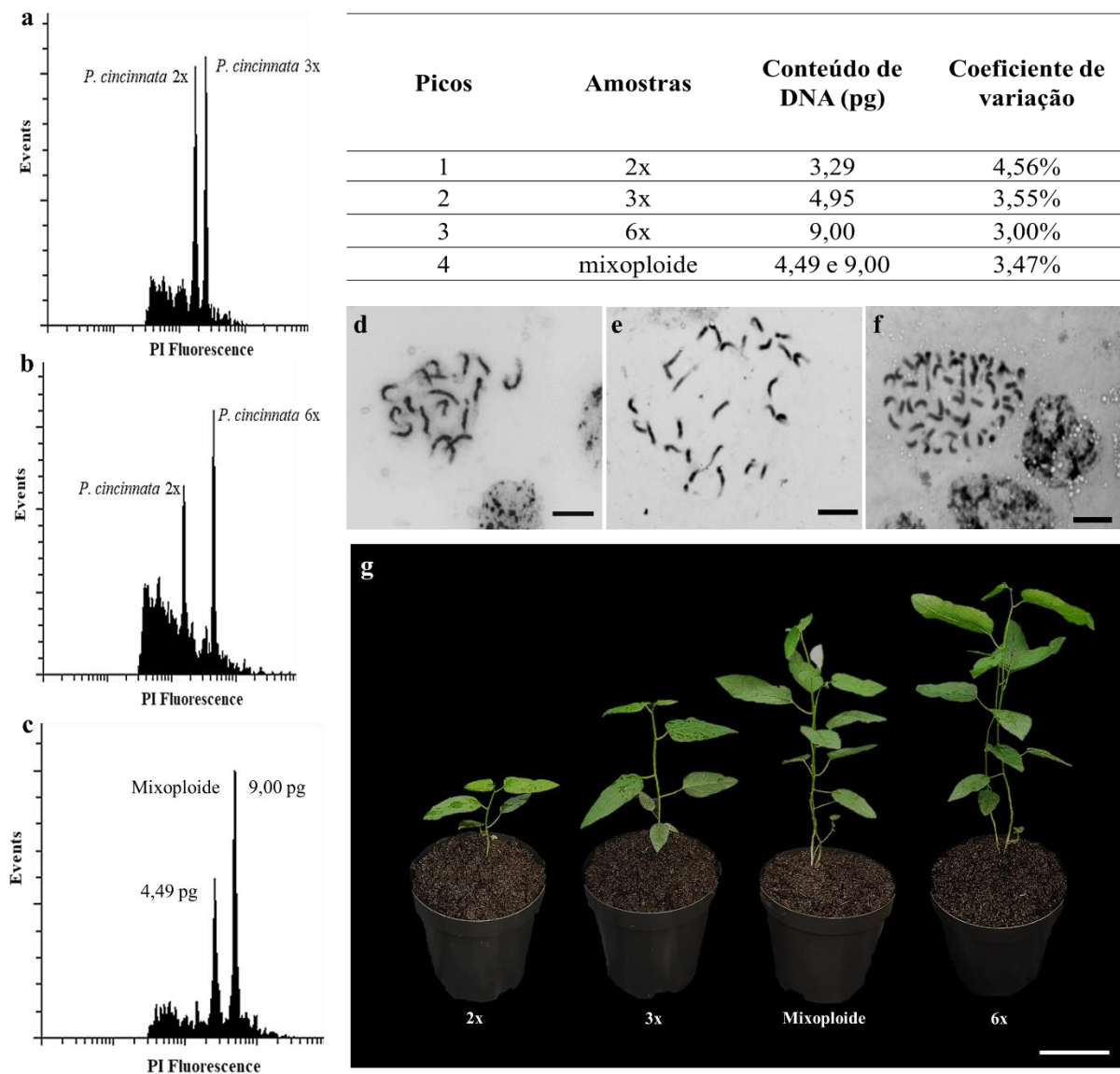


Figura 2. Estimativa do conteúdo de DNA nuclear através das análises de citometria de fluxo e número cromossômico das plantas diploide, triploide, hexaploide e (mixoploide) de *P. cincinnata*. a-c – Histogramas comparando o conteúdo de DNA nuclear dos citótipos estudados. Note a tabela que acompanha os histogramas. d-f – Número de cromossomos derivado de plantas obtidas pela via seminífera ($2n = 2x = 18$) (d) Plantas regeneradas in vitro a partir do endosperma ($2n = 3x = 27$) (e) Plantas hexaploides obtidas após exposição dos embriões somáticos a colchicina em *P. cincinnata* ($2n = 6x = 54$) (f). Bars. 10 μ m. g – Plantas diploide (2x), triploide (3x), mixoploide e hexaploide (6x) cultivadas em casa de vegetação. Bar. 130 mm.

O teste F não detectou diferenças significativas para o fator tempo de exposição dos explantes à colchicina. No entanto, fator concentrações de colchicina foi significativo para o número de plantas obtidas. O número de plantas triploides

apresentou diferenças entre si, no entanto, quando se verifica para número de plantas hexaploides obtidas diferenças não foram detectadas.

Em relação ao número de plantas obtidas, a maior frequência média foi de 12,66 plantas ocorrendo no tratamento 0,5% de colchicina, seguido dos tratamentos nas concentrações de 0,02% com 11,66 plantas e 0,05% com 9,33 plantas, conforme a Tabela 1 (Fig. 3a). Plantas triploides foram obtidas em todos as concentrações de colchicina, sendo a maior frequência de 96,07% na concentração de 0,02%, e a menor frequência média de 47,61 plantas triploides não duplicadas foi na concentração 0,1% de colchicina (Fig. 3b).

A maior frequência de plantas hexaploides foi no tratamento de 0,01% com percentual de 17,90% em tempo de exposição de 144 horas, seguido dos tratamentos nas concentrações de 0,1% com 16,66% e 0,5% com 13,33% em tempo de exposição de 72 horas. A menor frequência de plantas hexaploides ocorreu no tratamento com 0,02% de colchicina com 1,96% (Fig. 3c). O tratamento com 0,02% de colchicina apresentou a maior frequência de 18,80% de plantas mixoploides obtidas, seguido dos tratamentos nas concentrações 0,05% com 11,42% e 0,5% com 6,38%, sendo que na concentração de 0,01% de colchicina houve ausência de plantas mixoploides (Fig. 3d).

Tabela 1. Percentual de plantas poliploides e avaliação dos níveis de ploidia, por citometria de fluxo em *P. cincinnata*.

Concentração (%)	Tempo (H)	N° embriões somáticos	N° plantas regeneradas	N. médio de plantas regeneradas	% plantas poliploides		
					3x	6x	mixoploide
0,01	72	40	10	7,66	38,80%	4,48%	0%
	144	40	7		12,93%	17,90%	0%
	216	40	6		25,87%	0%	0%
0,02	72	40	9	11,66	26,20%	0%	0%
	144	40	17		43,67%	1,96%	1,96%
	216	40	9		26,20%	0%	0%
0,05	72	40	7	9,33	17,96%	0%	3,90%
	144	40	6		14,37%	7,77%	0%
	216	40	15		35,92%	7,77%	11,65%
0,1	72	40	14	6	28,60%	16,66%	2,38%
	144	40	4		19,01%	0%	0%
	216	40	0		0%	0%	0%
0,2	72	40	13	6	38%	12,82%	14,10%
	144	40	3		11,19%	0%	4,70%
	216	40	2		11,19%	0%	0%
0,5	72	40	15	12,66	24,40%	13,33%	0
	144	40	8		18,95%	0%	3,19%
	216	40	15		32,50%	4,44%	3,19%

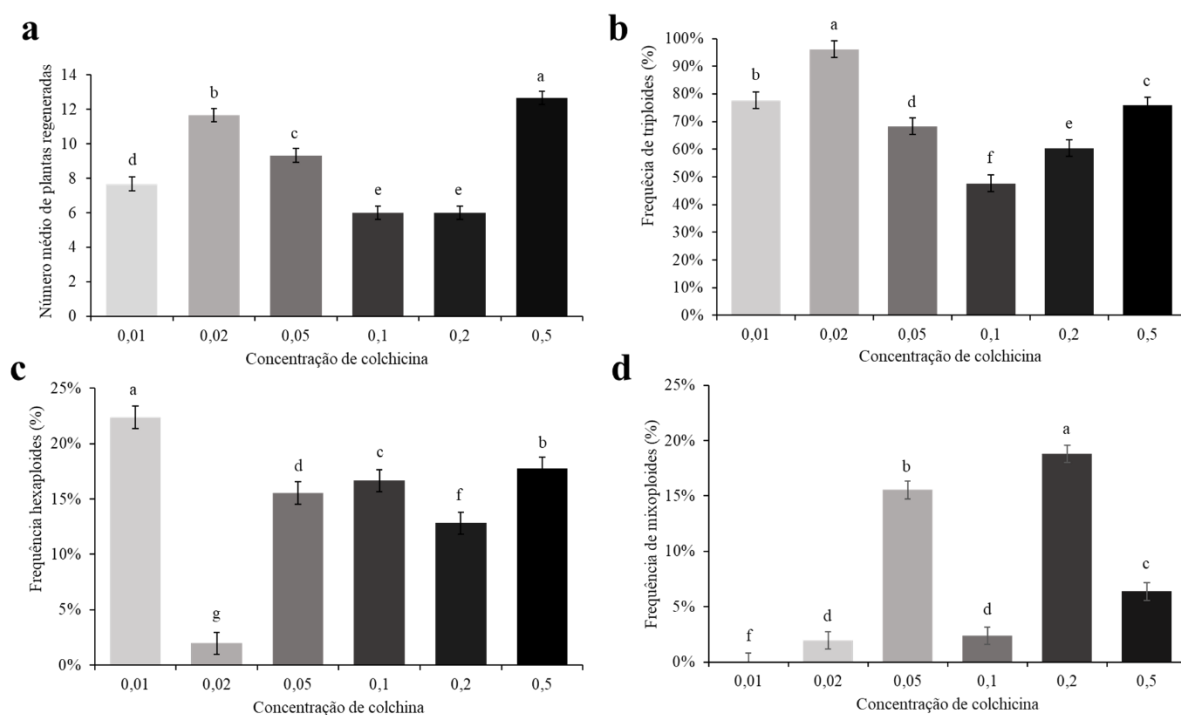


Figura 3. Frequências de plantas poliploides de *P. cincinnata* obtidas nas concentrações de 0,01%, 0,02%, 0,05%, 0,1%, 0,2% e 0,5% de colchicina. a – Número médio de plantas obtidas. b – Frequência de plantas triploides de *P. cincinnata* não poliploidizadas. c – Frequência de plantas hexaploides de *P. cincinnata*. d – Frequência de plantas mixoploides de *P. cincinnata*. As barras de erro indicam o erro padrão. Médias seguidas por letras distintas, diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade e a dispersão em torno da média é representada pelo desvio padrão.

3.2. Caracterização estomática

Variações no nível de ploidia alteraram o tamanho e a frequência de estômatos e das células ordinárias em *P. cincinnata* (Fig. 4a-d). A maior densidade média estomática da epiderme foi observada em folhas de plantas 2x foi de 42,9 estômatos por mm², seguida das plantas 3x com 29,6 e mixoploide com 23,7 estômatos. A menor densidade média estomática foi observada em folhas de plantas 6x com 15 estômatos por mm² (Fig. 4e).

Em relação a largura e comprimento dos estômatos as plantas hexaploides tiveram as maiores médias de 0,17 μm e 0,29 μm , diferindo significativamente, enquanto as menores dimensões foram observadas em plantas 2x (0,14 μm - 0,20 μm), 3x (0,16 μm - 0,24 μm) e mixoploide (0,15 μm - 0,24 μm) (Fig. 4f-g). A maior média

para área estomática foi observado em plantas 6x com 0,026 μm , diferindo significativamente das plantas 2x, 3x e mixoploide. As plantas 2x, 3x e mixoploide tiveram médias de 0,025 a 0,030 μm , respectivamente (Fig. 4h).

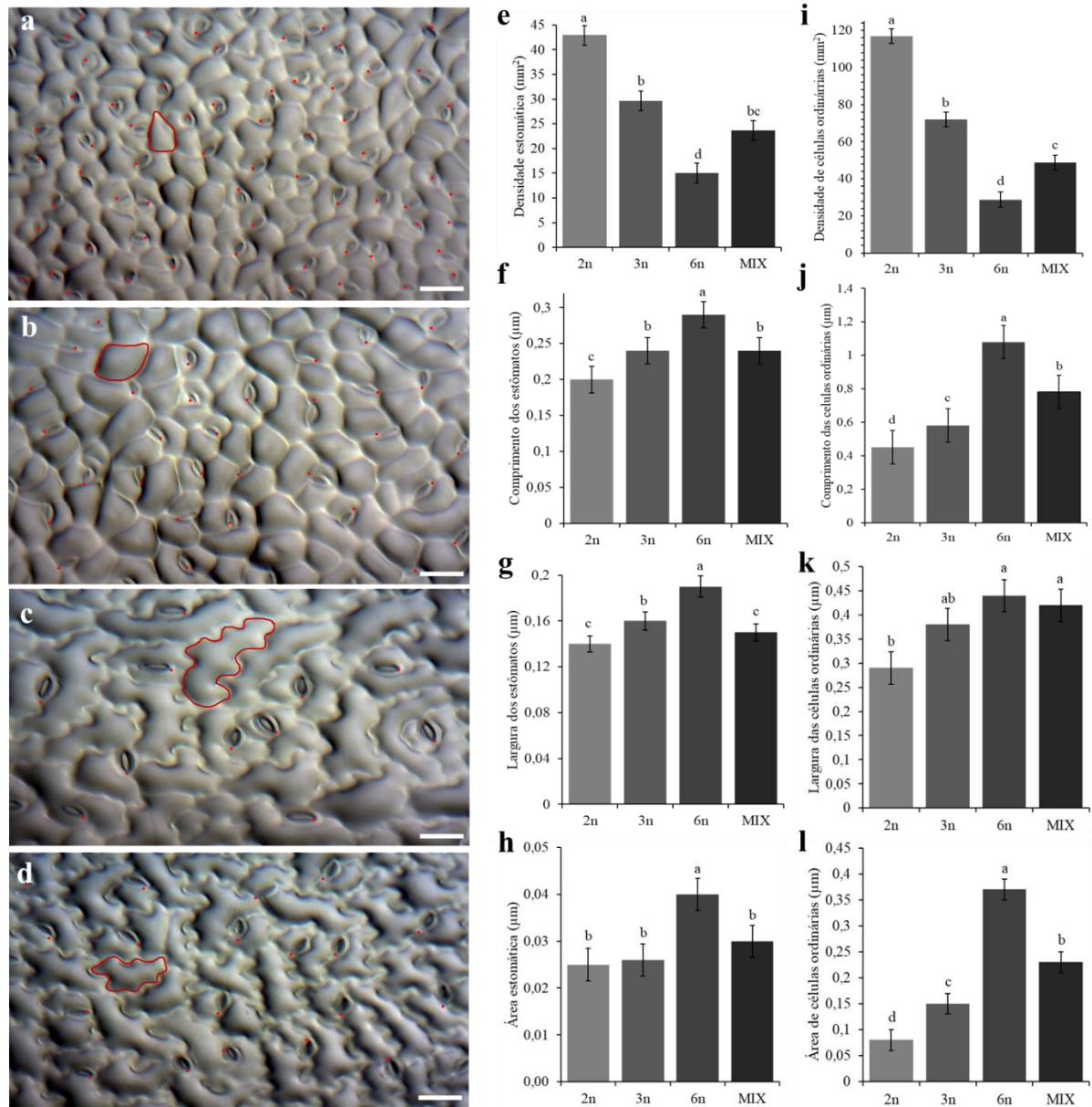


Figura 4. Caracterização estomáticas das plantas controle, poliploidizadas e mixoploides. a – Epiderme da folha diploide (2x), controle. b – Epiderme da folha triploide (3x). c – Epiderme da folha hexaploide do tratamento 0,1% por 72 horas (6x). D – Epiderme da folha mixoploide do tratamento 0,2% por 72 horas. Pontos vermelhos representam estruturas estomáticas e o contorno vermelho células ordinárias. Bars. 100 μm . e – Densidade estomática (mm^2) das plantas 2x, 3x, 6x e mixoploide. f – Comprimento dos estômatos (μm) das plantas 2x, 3x, 6x e mixoploide. g – Largura dos estômatos (μm) das plantas 2x, 3x, 6x e mixoploide. h – Área estomática (mm^2) das plantas 2x, 3x, 6x e mixoploide. i – Densidade de células ordinárias (mm^2) das plantas 2x, 3x, 6x e mixoploide. j – Comprimento das células ordinárias (μm) das plantas 2x, 3x, 6x e mixoploide. k – Largura das células ordinárias (μm) das plantas 2x, 3x, 6x e mixoploide. l – Área de células ordinárias (μm) das plantas 2x, 3x, 6x

e mixoploide. As barras de erro indicam o erro padrão. Médias seguidas por letras distintas dentro de cada variável, diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Para a densidade média de células ordinárias na epiderme, a maior frequência foi observada em plantas 2x com 116,8 células ordinárias por mm^2 , seguindo das plantas 3x com 71,9 e mixoploide com 48,7 células ordinárias. Os hexaploides apresentam a menor frequência média de 28,8 células ordinárias por mm^2 (Fig. 4i).

Foi observado as maiores média em relação a largura e comprimento das células ordinárias em plantas hexaploides, de 0,44 μm a 1,08 μm , respectivamente, diferindo significativamente apenas para o comprimento das células ordinárias, seguido das plantas 2x (0,29 μm - 0,45 μm), 3x (0,38 μm - 0,58 μm) e mixoploide (0,42 μm - 0,78 μm) (Fig. 4j-k). A maior média para a área de células ordinárias foi de 0,37 μm em plantas hexaploides, diferindo dos outros níveis de poliploidia, seguido de 0,23 μm em plantas mixoploides, 0,15 μm em plantas triploides e 0,08 μm em plantas diploides (Fig. 4l).

4. DISCUSSÃO

Poliploides podem ocorrer naturalmente, mas também podem ser o resultado de indução artificial, por meio do uso de agentes antimetabólicos (Eng e Ho, 2019). A poliploidização artificial tem se tornado uma estratégia proeminente na produção agrícola (Eng e Ho, 2019) e, confere a planta plasticidade genotípica aumentando o número de cópias do genoma ou na adição de diferentes genomas (Linquin et al., 2019; Ruiz et al., 2020).

A colchicina é um agente mutagênico amplamente utilizado nos programas voltados para o melhoramento de culturas agrícolas, espécies florestais e plantas ornamentais como agente poliploidizante (Esmaeili et al., 2020; Touchell et al., 2020). A utilização de embriões somáticos 3x de *P. cinnamomum* como fonte de explante na duplicação cromossômica revelou que a concentração baixa de 0,02% interferem na duplicação do genoma. Entretanto, o aumento da dosagem para 0,5% da colchicina também promove a duplicação no genoma triploide para hexaploide nos embriões

somáticos cotiledonares de *P. cincinnata*. O protocolo de embriogênese somática de *P. cincinnata* foi estabelecido por Silva et al (2009) com o uso de embriões zigóticos maduros, e posteriormente descrito com o uso de anteras (Silva et al., 2021). A aquisição da competência embriogênica de *P. cincinnata* seguem os mesmos padrões morfogenéticos obtidos por (Paim Pinto et al., 2011; Rocha et al., 2012; Otoni et al., 2013; Rocha et al., 2020; Silva et al., 2020; Silva et al., 2021). A hexaploidia é pela primeira vez relatado com o uso de tecido endospermico na produção de embriões somáticos triploides de *P. cincinnata*. A espécie é considerada modelo para o gênero *Passiflora* por expressar alta responsividade morfogenética in vitro (Silva et al., 2009; Rocha et al., 2020) e baixo grau de instabilidade cromossômica (Paim Pinto et al., 2011).

A hexaploidia natural ocorre em *Passiflora misera* Kunth. ($2n = 6x = 36$) Melo e Guerra (2003), essa variação ocorreu devido a poliploidia e disploidia natural no processo evolutivo da espécie. Os novos arranjos genômicos causam extensa reestruturação, alterando padrões de expressão gênica, alterações no padrão de metilação, perdas de sequências de DNA, amplificação ou redução de sequências repetitivas, além da ativação de elementos de transposição (Hegarty; Hiscock, 2008; Tayalé; Parisod, 2013; Song e Chen, 2015; Iannicelli et al., 2020). Rearranjos de genoma dos poliploides, variações fenotípicas, microestruturais e bioquímicas estão ligadas pelas novas interações regulatórias relacionadas ao nível de expressão do transcriptoma em plantas (Hieu, 2019), acarretando mudanças nas funções dos genes e alternância da regulação gênica (Vaughan; Balázs; Heslop-Harrison, 2007).

A determinação do conteúdo de DNA e do nível de ploidia de plantas poliploides é essencial para validar a sistema de poliploidização, pois essas plantas geralmente exibem alterações genômicas que podem implicar na fisiologia, desenvolvimento e adaptação das plantas (Touchell et al., 2020; Goluch et al., 2021). A citometria de fluxo e contagem de cromossomos confirmaram que 18,75% das plantas poliploidizadas de *P. cincinnata* eram hexaploides, com 54 cromossomos ($2n = 6x = 54$), em comparação com 27 cromossomos em triploides ($2n = 3x = 27$) e 18 cromossomos em diploides ($2n = 2x = 18$). A identificação de poliploides regenerados a partir do cultivo in vitro do endosperma foi relatado por Antoniazzi et al. (2018)

trabalhando com *P. edulis* principal espécie comercial, produzindo plantas triploides com $2n = 3x = 27$ cromossomos. Silva et al. (2020) identificaram que plantas triploides de *P. cincinnata* regeneradas pela via organogênica são geneticamente estáveis e apresentam $2n = 3x = 27$ cromossomos. Machado et al. (2020), relatam que plantas triploides de *P. cincinnata* regeneradas a partir da embriogênese somática apresentam estabilidade cariotípica com número cromossômico de $2n = 3x = 27$. Mikovski et al., (2021) verificaram que plantas triploides de *P. foetida* regeneradas a partir do tecido endospermico apresentaram número cromossômico 1,5 vezes maior que o respectivo diploide com $2n = 3x = 30$ cromossomos.

Em decorrência ao aumento do genoma, ocorre a variação de caracteres celulares, anatômicos, bioquímicos e morfológicos nas plantas poliploides. Essas alterações ocorrem em resposta as mudanças no nível de ploidia, variando entre espécies e entre as cultivares (Laere et al., 2011; Riddle et al., 2006). A análise estomática possibilita a pré-seleção de possíveis poliploides, reduzindo o número de indivíduos a serem submetidos nas futuras análise de citogenética e citometria de fluxo (Souza e Queiróz, 2004).

Em *Arabidopsis thaliana* com diferentes níveis de ploidia somática (2x, 4x, 6x e 8x), Corneillie et al (2019) observaram que plantas poliploides desenvolveram mais lentamente do que os diploides, e que as plantas tetraploides e hexaploides geraram rosetas maiores devido ao florescimento tardio, e ao analisar a morfometria das folhas verificou que as células do pavimento epidérmico tiveram aumento do tamanho celular e redução do número de células com relação ao aumento da ploidia.

Segundo Silva et al. (2020) ao analisar os estômatos de triploides de *P. cincinnata*, observaram mudanças significativas na frequência estomática de 43,6%, resultado menor em relação ao diploide, no entanto, comparando o comprimento e largura dos estômatos as plantas triploides destacaram-se, em relação a diploides. Isso foi evidenciado por Antoniazzi et al. (2018) onde observou menor frequência estomática em plantas triploides de *P. edulis* em comparação com as plantas diploides. Mikovski et al. (2021), observaram aumento nas dimensões dos órgãos vegetativos e reprodutivos de triploides de *P. foetida*.

Hexaploides de *Crocus sativus* L., aumento no tamanho estomático e densidade estomática reduzida foram observados em relação ao seu respectivo diploide (Kashtwarium et al., 2021). Em hexaploides de *M. sinensis* e *M. x giganteus*, Głowacka et al (2010), relatam o aumento no comprimento e largura dos estômatos, diâmetro do grão de pólen e comprimento das espiguetas em relação aos diploides. A correlação entre densidade estomática reduzida e o tamanho estomático maior sugere que a duplicação dos cromossomos pode não apenas resultar em redundância cromossômica, mas também em alterações epigenéticas (Song e Chen, 2015; Marfl et al., 2018; Hieu, 2019; Van de Peer et al., 2021).

As alterações na densidade e no tamanho das estruturas estomáticas em plantas poliploides influenciam no desenvolvimento e produtividade, pois estão relacionadas ao processo de produção de energia por meio da fotossíntese e na taxa de transpiração da água (Li et al., 1996; Brodribb; Sussmilch; McAdam, 2020).

A poliploidização de embriões somáticos 3x de *P. cincinnata* como fonte de explante na duplicação cromossômica, possibilitou o estabelecimento de um sistema responsivo para a produção de plantas hexaploides para a espécie, podendo ser empregado em estudos futuros com a espécie triploide de *P. edulis*. A produção de hexaploides a partir de plantas triploides de *Passiflora* ssp. é uma estratégia relevante em programas de melhoramento genético de plantas para a seleção de genótipos superiores, possibilitando a obtenção de cultivares de *Passiflora* spp. com características morfoagronômicas melhoradas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACANDA, Y.; MARTÍNEZ, Ó.; GONZÁLEZ, M.V.; PRADO, M.J.; REY, M. Highly efficient in vitro tetraploid plant production via colchicine treatment using embryogenic suspension cultures in grapevine (*Vitis vinifera* cv. Mencía). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 123:547–555, 2015.

ACQUAAH, G. **Principles of plant genetics and breeding**. Polyploidy in plant breeding, Wiley-Blackwell, Malden. 13:214-230, 2007.

ANTONIAZZI, C.A.; FARIA, R.B.; CARVALHO, P.P.; MIKOVSKI, A.I.; CARVALHO, I.F.; MATOS, E.M.; OTONI, W.C. In vitro regeneration of triploid

plants from mature endosperm culture of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims). **Scientia Horticulturae**. 238: 408-415, 2018.

BHARADWAJ, D.N. Polyploidy in crop improvement and evolution. In: BAHADUR, B. (Ed.), **Plant Biology and Biotechnology**: Volume I: Plant Diversity. Organization, Function and Improvement. p.619-637, 2015.

BLAKESLEE, A.F.; AVERY, A.G. Methods of inducing doubling of chromosomes in plants. **Journal of Heredity**. 28:393-411, 1937.

CARMONA-MARTÍN, E.; REGALADO, J.J.; RAGHAVAN, L.; ENCINA, C.L. In vitro induction of autooctoploid asparagus genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 121:249–254, 2015.

CATALANO, C.; ABBATE, L.; MOTISI, A.; CRUCITTI, D.; CANGELOSI, V.; PISCIOTTA, A.; LORENZO, R.; CARIMI, F.; CARRA, A. Autotetraploid Emergence via Somatic Embryogenesis in *Vitis vinifera* Induces Marked Morphological Changes in Shoots, Mature Leaves, and Stomata. **Cells**. 10: 1336, 1-15, 2021.

CARVALHO, C.R.; SARAIVA, L.L. High-resolution HKG-banding in maize mitotic chromosomes. **Journal of Plant Research**. 110: 417-420, 1997.

CARVALHO, C.R.; SARAIVA, L.S. A new heterochromatin banding pattern revealed by modified hkg banding technique in maize chromosomes. **Heredity**. 70:515-519, 1993.

CHEN, C.; HOU, X.; ZHANG, H.; WANG, G.; TIAN, L. Induction of *Anthurium andraeanum* “Arizona” tetraploid by colchicine in vitro. **Euphytica**. 181:137–145, 2011.

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

DOLEŽEL, J.; DOLEŽELOVA, M.; NOVAK, F.J. Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa accuminata* and *M. balbisiana*). **Biologia Plantarum**. 36:3, 351-357, 1994.

DOLEŽEL, L.J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**. 95: 1, 99-110, 2005.

EECKHAUT, T.; SAMYN, G.; VAN BOCKSTAELE, E. In vitro polyploidy induction in *Rhododendron simsii* hybrids. **Acta Horticulturae**. 72:43-49, 2002.

ECKHAUT, T.; WERBROUCK, S.; LEUS, L.; VAN BOCKSTAELE, E.; DEBERGH, P. Chemically induced polyploidization in *Spathiphyllum wallisii* Regel through somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 78, 241–246, 2004.

ESMAEILI, G.; VAN, LAERE, V.K.; MUYLLE, H.; LEUS, L. Artificial Chromosome Doubling in Allotetraploid *Calendula officinalis*. **Frontiers in Plant Science**. 11:622, 2020.

FU, L.; ZHU, Y.; LI, M.; WANG, C.; SUN, H. Autopolyploid induction via somatic embryogenesis in *Lilium distichum* Nakai and *Lilium cernuum* Komar. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 139: 2, 237-248, 2019.

GANTAIT, S.; MANDAL, N.; BHATTACHARYYA, S.; DAS, P.K. Induction and identification of tetraploids using in vitro colchicine treatment of *Gerbera jamesonii* Bolus cv. Sciella. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 106:485–493, 2011.

GLOWACKA, K.; JEZ, S.; KACZMAREK, Z. Polyploidization of *Miscanthus sinensis* and *Miscanthus x giganteus* by plant colchicine treatment. **Industrial Crops and Products**. 30:444 - 446, 2009.

GROSSER, J.W.; GMITTER, F.G. Protoplast fusion for production of tetraploids and triploids: applications for scion and rootstock breeding in citrus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 104: 343–357, 2011.

HARLAN, J.R.; DE WETT, J.M.M.J. On ö Winge and prayer: the origin of polyploidy. **The Botanic Review**. 41:4, 311-390, 1975.

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

HIEU, P.V. Polyploid gene expression and regulation in polysomic polyploids. **American Journal of Plant Sciences**. 10: 1409–1443, 2019.

HOSHINO, Y.; MIYASHITA, T.; THOMAS, T. D. In vitro culture of endosperm and its application in plant breeding: Approaches to polyploidy breeding. **Scientia Horticulturae**. 130: 1-8, 2011.

KAENSAKSIRI, T.; SOONTORNCHAINAKSAENG, P.; SOONTHORNCHAREONNON, N.; PRATHANTURARUG, S. In vitro induction of polyploidy in *Centella asiatica* (L.) Urban. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 107:187–194, 2011.

KATO, M. Polyploids of camellia through culture of somatic embryos. **HortScience**. 24: 1023–1025, 1989.

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

LAERE, K.V.; FRANC, S.C.; VANSTEENKISTE, H.; HUYLENBROECK, J.V.; STEPPE, K.; LABEKE, M.C. Influence of ploidy level on morphology, growth and drought susceptibility in *Spathiphyllum wallisii*. **Acta Physiologiae Plantarum**. 33:1149–1156, 2011.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**. 52: 201-220, 1964.

LIN, H.; JIAN, M.; LIANG, L.Y.; PEI, W.J.; LIU, X.Z.; ZHANG, H.Y. Production of polyploids from cultured shoot tips of *Eucalyptus globulus* Labill by treatment with colchicine. **African Journal of Biotechnology**. 9(15): 2252-2255, 2010.

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

MACHADO, M.D. 2020. **Regeneração in vitro, caracteres morfoagronômicos e enzimáticos de plantas triploides de *Passiflora cincinnata* Mast**. Dissertação de Mestrado. Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade do Estado de Mato Grosso, MT.

MADLUNG, A.; WENDEL, J. F. Genetic and epigenetic aspects of polyploid evolution in plants. **Cytogenetic and Genome Research**. 140:270-285, 2013.

MELLO e SILVA, P.A.K.X.; CALLEGARI-JACQUES, S.; BODANESE-ZANETTINI, M.H. Induction and identification of polyploids in *Cattleya intermedia* Lindl. (Orchidaceae) By in vitro techniques. **Ciência Rural**. v. 30:1, 105-111, 2000.

MIKOVSKI, A.I.; SILVA, N.T.; SOUZA, C.S.; MACHADO, M.D.; OTONI, W.C.; CARVALHO, I.F.; ROCHA, D.I.; SILVA, M.L. Tissue culture and biotechnological techniques applied to passion fruit with ornamental potential: an overview. **Ornamental Horticulture**. 25: 189-199, 2019.

MIKOVSKI, A.I.; SILVA, N.T.; SILVA, L.A.S.; MACHADO, M.; BARBOSA, L.C.S.; REIS, A.C.; MATOS, E.M.; VICCINI, L.D.; SOUZA, C.S.; MACHADO, M.D.; OTONI, W.C.; CARVALHO, I.F.; ROCHA, D.I.; SILVA, M.L. From endosperm to triploid plants: a stepwise characterization of the de novo shoot organogenesis and morpho-agronomic aspects of an ornamental passion fruit (*Passiflora foetida* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 147: 239-253, 2021.

MORGAN, E.R.; HOFMANN, B.L.; GRANT, J.E. Production of tetraploid *Gentiana triflora* var. japonica. Royal Blue. plants. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**. Auckland. 31:65- 68, 2003.

MOHAMED, M.E.; HICKS, R.G.T.; BLAKESLEY, D. Shoot regeneration from mature endosperm of *Passiflora foetida*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. 46: 161-164, 1996.

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

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

OTONI, W.C.; PAIM PINTO, D.L.; ROCHA, D.I.; VIEIRA, L.M.; DIAS, L.L. C.; SILVA, M.L.; SILVA, C.V.; LANI, E.R.G.; SILVA, L.C.; TANAKA, F.A.O. Organogenesis and somatic embryogenesis in passionfruit (*Passiflora* sp.). In: ASLAM, J.; SRIVASTAVA, O.S.; SHARMA, M. P. (eds.) **Somatic embryogenesis and gene expression**. New Delhi; Narosa Publishing House. 1-17, 2013.

PAIM PINTO, D.L.; ALMEIDA, A.M.; RÊGO, M.M.; SILVA, M.L.; OLIVEIRA, E.J.; OTONI, W.C. Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims) genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 107: 521-530, 2011.

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J.D. **Cultura de tecidos: tecnologia e aplicações**. Lavras: Ed. Brasil, 1997.

RANGAN, P. Endosperm variability: from endoreduplication within a seed to higher ploidy across species, and its competence. **Seed Science Research**. 30(3):173-185, 2020.

RAMESH, H.L.; MURTHY, V.N.Y.; MUNIRA, J. Colchicine induced morphological variation in mulberry variety. **The Bioscan**. 6:1, 115-118, 2011.

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

RANNEY, T.G. Polyploidy: From Evolution to New Plant Development. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**. 56, 2006.

RÊGO, M.M.; RÊGO, E.R.; BRUCKNER, C.H.; FINGER, F.L.; OTONI, W.C. In vitro induction of autotetraploids from diploid yellow passion fruit mediated by colchicine and oryzalin. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 107:451–459, 2011.

RIDDLE N.C.; KATO, A.; BIRCHLER J.A. Genetic variation for the response to ploidy change in *Zea mays* L. **Theoretical and Applied Genetics**. 114:101-111, 2006.

ROCHA, D.I.; VIEIRA, L.M.; TANAKA, F.A.O.; DA SILVA, L.C.; OTONI, W.C. Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters: histocytological and histochemical evidence. **Protoplasma**. 249: 747-758, 2012.

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

SANTA, J.; BERDUGO, J.; CELY-PARDO, L.; SOTO-SUAREZ, M.; MOSQUERA, T.; AND GALEANO, C. QTL analysis reveals quantitative resistant loci for *Phytophthora infestans* and *Tecia solanivora* in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.). **PLoS One**. 13(7): e0199716, 2018.

SCHIFINO-WITTMANN, M.T. Poliploidia e seu impacto na origem e evolução das plantas silvestres e cultivadas. **Revista Brasileira de Agrociência**. 10: 151-157, 2004.

SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; AGNOL, M.D. Indução de poliploidia no melhoramento de plantas. **Pesquisa Agropecuária**. 9: 155-164, 2003.

SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; DALL'AGNOL, M. Gametas não reduzidos no melhoramento de plantas. **Ciência Rural**. 31:1, 169-171, 2001.

SHI, Q.H.; LIU P, LIU, M.J.; WANG, J.R.; XU, J. A novel method for rapid in vivo induction of homogeneous polyploids via calluses in a woody fruit tree (*Ziziphus jujuba* Mill.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 121:423–433, 2015.

SILVA, M.L.; PAIM PINTO D.L.; GUERRA M.P.; FLOH, E.I.S.; BRUCKNER, C.H.; OTONI, W.C. A novel regeneration system for wild passion fruits species (*Passiflora cincinnata* Mast.) based on somatic embryogenesis from mature zygotic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 99: 47-54, 2009.

SILVA, M.L.; PAIM-PINTO, D.L.; GUERRA, M.P.; LANI, E.R.G.; CARVALHO, I.F.; ROSSI, A.A.B.; OTONI, W.C. Produção de sementes sintéticas de maracujazeiro silvestre com potencial ornamental. **Ornamental Horticulture**. 21: 331-338, 2015.

SILVA, M.L; PAIM-PINTO, D.L; CAMPOS, J.M.S; CARVALHO, I.F; ROCHA, D.I; BATISTA, D.S; OTONI, W.C. Repetitive somatic embryogenesis from wild passion fruit (*Passiflora cincinnata* Mast.) anthers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 58: 1-7, 2021.

SILVA, M.L.; PAIM-PINTO, D.L.; PASSOS, A.B.; MARCELINO-GUIMARÃES, F.C.; ROSSI, A.A.B.; KRAUSE, W.; CARVALHO, I.F.; BATISTA, D.S.; ROCHA, D.I.; OTONI, W.C. Novel and efficient transformation of wild passion fruit (*Passiflora cincinnata* Mast.) using sonication-assisted Agrobacterium-mediated transformation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**. 57: 1-7, 2020.

SILVA, N.T.; SILVA, L.A.S.; MACHADO, M.; REIS, A.C.; MATOS, E.M.; VICCINI, L.D.; OTONI, W.C.; CARVALHO, I.F.; ROCHA, D.I.; SILVA, M.L. Endosperm culture: a facile and efficient biotechnological tool to generate passion fruit (*Passiflora cincinnata* Mast.) triploid plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 142: 613-624, 2020.

SILVA, P.A.K.X.M.; CALLEGARI-JACQUES, S.; BODANESE-ZANETTINI, M.H. Induction and identification of polyploids in *Cattleya intermedia* Lindl. (Orchidaceae) by in vitro techniques. **Ciência Rural**. 30:105-111, 2000.

SOUZA, F.F.; QUEIROZ, M.A. Avaliação de caracteres morfológicos úteis na identificação de plantas poliploides de melancia. **Horticultura Brasileira**. 22:3, 516-520, 2004.

SONG, Q.; CHEN, Z.J. Epigenetic and developmental regulation in plant polyploids. **Current Opinion in Plant Biology**. 24:101-109, 2015.

STORME, N.; MASON, A. Plant speciation through chromosome instability and ploidy change: cellular mechanisms, molecular factors and evolutionary relevance. **Current Plant Biology**. 1:10-33, 2014.

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

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

TOUCHELL, D.H.; PALMER, I.E.; RANNEY, T.G. In vitro Ploidy Manipulation for Crop Improvement. **Frontiers in Plant Science**. 11:722, 2020.

VICHIATO, M.R.M.; Vichiato, M.; CASTRO, D.M.; DUTRA, F.L.; PASQUAL, M.; JUNIOR, W.M.; LIMA, C.D.F.; SLAGADO, C.C. Análises estomática e morfométrica de folhas de plantas diplóides e tetraplóides de *Dendrobium nobile* Lindl. **Revista Ceres**. 53:310, 541- 548, 2006.

WENDEL, J.F.; JACKSON, S.A.; MEYERS, B.C.; WING, R.A. Evolution of plant genome architecture. **Genome Biology**. 17:1-14, 2016.

- WU, H.; MA, Z.; WANG, M.M.; QIN, A.L.; RAN, J.H.; WANG, X.Q. A high frequency of allopolyploid speciation in the gymnospermous genus *Ephedra* and its possible association with some biological and ecological features. **Molecular Ecology**. 25: (5) 1192-1210, 2016.
- XIE, X.; AGUËRO, C.B.; WANG, Y.; WALKER, M.A. In vitro induction of tetraploids in *Vitis x Muscadinia* hybrids. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 122:675–683, 2015.
- XU, L.; NAJEEB, U.; NAEEM, M. S.; DAUD, M. K.; CAO, J. S.; GONG, H. J.; SHEN, W. Q.; ZHOU, W. J. Induction of tetraploidy in *Juncus effusus* by colchicine. **Biologia Plantarum**. 54:4, 659-663, 2010.
- XU, L.; HUANG, H. Genetic and epigenetic controls of plant regeneration. **Topics in Developmental Biology**. 108: 1-33, 2014.
- YANG X, CAO Z, AN L, WANG Y, FANG X. In vitro tetraploid induction via colchicine treatment from diploid somatic embryos in grapevine (*Vitis vinifera* L.). **Euphytica**. 152:217–224, 2006.
- YE, Y.M.; TONG, J.; SHI, X.P.; YUAN, W.; LI, G.R. Morphological and cytological studies of diploid and colchicine-induced tetraploid lines of crape myrtle (*Lagerstroemia indica* L.). **Scientia Horticulturae**. 124:95-101, 2010.
- YE, Z.Y.; WANG Y.Y.; TIAN, H.Q. Regeneration of plantlets and tetraploidy induction in *Pseudostellaria heterophylla*. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**. 51:13–18, 2010.
- ZENG, F.; ZHANG, X.; ZHU, L.; TU, L.; GUO, X.; NIE, Y. Isolation and characterization of genes associated to cotton somatic embryogenesis by suppression subtractive hybridization and macroarray. **Plant Molecular Biology**. 60: 167–183, 2006.
- ZHANG, Q.; LUO, F.; LIU, LI.; GUO, F. In vitro induction of tetraploids in crape myrtle (*Lagerstroemia indica* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 101:41-47, 2010.

6. CONCLUSÃO GERAL

As plantas triploides de *P. cincinnata* são capazes de produzir frutos e sementes, a progênie do cruzamento de plantas triploides foi evidenciada como aneuploides ($2n + 1 = 19$) com conteúdo nuclear de 3,37 pg, sendo um importante recurso no mapeamento genético e na dosagem de genes responsáveis por características agronômicas de interesse econômico.

Na duplicação cromossômica os embriões somáticos 3x de *P. cincinnata* apresentaram maior resposta na produção de hexaploides em tratamentos 0,01%, 0,1% e 0,5% de colchicina. As análises de citometria de fluxo e citogenética, confirmaram a produção de plantas hexaploides geneticamente estáveis a partir da utilização de embriões somáticos triploides de *P. cincinnata*, apresentando conteúdo de DNA nuclear de 9,19 pg e número cromossômico de $2n = 6x = 54$ cromossomos. As plantas hexaploides nas análises estomáticas demonstraram os melhores resultados em todas as variáveis analisadas, o que favorece o seu interesse nos programas de melhoramento da espécie *P. cincinnata*.