

EMANUEL ORESTES DA SILVEIRA  
Engenheiro Agrônomo *Msc*

**“INDUÇÃO À PLOIDIA E CARACTERIZAÇÃO EM  
*ECHYNOCHLOA POLYSTACHYA* (KUNTH) HITCHC NA  
AMAZÔNIA OCIDENTAL”**

Tese apresentada à Universidade Federal do Amazonas, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

MANAUS – AM  
2020

EMANUEL ORESTES DA SILVEIRA  
Engenheiro Agrônomo *Msc*

**“INDUÇÃO À PLOIDIA E CARACTERIZAÇÃO EM  
*ECHYNOCHLOA POLYSTACHYA* (KUNTH) HITCHC NA  
AMAZÔNIA OCIDENTAL”**

Orientadora:

**Dra. Maria Teresa Gomes Lopes**

Coorientadores

**Dr. Ricardo Lopes**

**Dr. Fabio Jacob Dias**

Tese apresentada à Universidade Federal do Amazonas, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

MANAUS – AM  
2020

### Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S587i Silveira, Emanuel Orestes da  
Indução à ploidia e caracterização em *Echinochloa polystachya*  
(Kunth) Hitchc na Amazônia Ocidental / Emanuel Orestes da  
Silveira . 2020  
155 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Maria Teresa Gomes Lopes  
Coorientador: Ricardo Lopes  
Coorientador: Fabio Jacob Dias  
Tese (Doutorado em Agronomia Tropical) - Universidade Federal  
do Amazonas.

1. canarana verdadeira. 2. colchicina. 3. poliploidia. 4. análise  
estomática. 5. citometria de fluxo. I. Lopes, Maria Teresa Gomes. II.  
Universidade Federal do Amazonas III. Título

EMANUEL ORESTES DA SILVEIRA

**“INDUÇÃO À PLOIDIA E CARACTERIZAÇÃO EM  
*ECHYNOCHLOA POLYSTACHYA* (KUNTH) HITCHC NA  
AMAZÔNIA OCIDENTAL”**

Tese apresentada à Universidade Federal do Amazonas, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**APROVADA EM: 11/02/2020**

---

---

---

---

*A Sociedade Amazonense e em especial ao povo da querida cidade de Parintins-AM, e aos colegas, professores, técnicos em educação e zeladores do Instituto de Ciências Sociais, Educação e Zoostecnia – ICSEZ...*

*Ofereço*

*A Fabiana, minha metade...meu coração...*

*A Raquel, minha filha, meu recomeço...*

*A André Vitor, meu filho, minha superação ...*

*E a Gabriel Elias, meu filho, minha conquista ....*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a, D'us de meus ancestrais, meu D'us, único, indivisível e incorpóreo, pois é ele quem coloca circunstâncias, pessoas e recursos em nossa jornada; ao Criador, muito obrigado;

A minha Família, esposa e filhos que sempre acreditaram na realização desta conquista e que em todos os momentos, bons e ruins, nunca desistiram de mim, sempre ao meu lado, obrigado pelo seu amor;

Minha orientadora, Professora Dra. Maria Teresa Gomes Lopes, pelo apoio incondicional em todos os momentos, dedicação, paciência e confiança – ETERNA GRATIDÃO!!;

A meus familiares, meus pais, meu irmão e minhas irmãs, sobrinhos e sobrinhas, que mesmo distantes sempre me apoiaram e me incentivaram a esta conquista; amo vocês;

Ao meu grande amigo Prof. Dr. Sebastião Brasil de Campos Lustosa, sem o qual, sem o seu braço estendido, jamais chegaria a esta etapa em minha vida;

Ao amigo, Dr. Marcelo Domingues Martins Raizer pelos preciosos ensinamentos, colaboração, ajuda e valorosa amizade, no decorrer deste período;

A técnica de Laboratório de Melhoramento de Plantas da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Suelen Cristina Lima e colegas de orientação e amigos de jornada; Jennifer Souza Tomaz, Adriel Lira Cordeiro, Brisa Flor, Jhon Paul Mathews Delgado, Marleson dos Santos Tavares, Jekiston de Souza Silva Andrade e demais companheiros de orientação pelo carinho e amizade;

Aos meus coorientadores: Prof Dr. Fabio Jacob e Dr. Ricardo Lopes orientação e apoio;

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Amazônia Ocidental; pela disponibilidade de sua infraestrutura para a realização dos experimentos;

A equipe de funcionários do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa, Amazônia Ocidental, em especial e as técnicas do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Amazônia Ocidental, Pamela Keiko Harada, Dona Rosimar Fernandes de Souza e demais companheiros de bancada pela dedicação e disposição para a transmissão de conhecimentos impreciosáveis neste trabalho;

Aos amigos e colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Amazônia Ocidental, Daniele Simões Araújo, Cibelle Azamora dos Santos e

Eduardo José dias da Silva, pelo dialogo, apoio, ajuda na condução dos trabalhos de campo e conforto oferecido nas horas difíceis;

Aos técnicos de laboratório do laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Ocidental: Karina Prycilla de Araújo Bichara e Jeferson Cruz das Chagas, pelo apoio e ajuda;

Aos funcionários do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Universidade Federal de Lavras – UFLA, em particular ao Dr. Filipe Almendagna Rodrigues, disponibilidade e instrução na parte de citometria de fluxo;

A Universidade Federal do Amazonas - UFAM, pela oportunidade desta capacitação e ao Curso de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical, muito obrigado;

Aos professores e colegas do Curso de Pós Graduação em Agronomia tropical, os quais no decorrer destes quatro ano passamos momentos, estatisticamente significativos!

A todos os professores da UFAM, colegas de curso, técnicos e alunos que de forma direta ou indireta participaram na realização deste trabalho,

Este trabalho é de todos nós. Foi realizado por seu sorriso, seu olhar, suas palavras de incentivo, seu carinho, seu apoio, seu desejo sincero de sucesso, sua colaboração e ajuda, pois são estes os verdadeiros méritos que levaremos para a eternidade.

A todos, Eterna Gratidão...

B”H.

## Veterano

*Está findando o meu tempo  
A tarde encerra mais cedo  
Meu mundo ficou pequeno  
E eu sou menor do que penso.*

*O bagual tá mais ligeiro  
O braço fraqueja às vezes  
Demoro mais do quero  
Mas alço a perna sem medo.*

*Encilho o cavalo manso  
Mas boto o laço nos tentos  
Se a força falta no braço  
Na coragem me sustento.*

***Se lembra os tempos de quebra  
A vida volta pra trás  
Sou bagual que não se entrega  
“Assim no más”.***

*Nas manhãs se primavera  
Quando vou parar rodeio  
Sou menino de alma leve  
Voando sobre os pelegos*

*Cavalo do meu potreiro  
Mete a cabeça no freio  
Encilho no parapeito  
Mas não ato nem maneio*

*Se desencilho o pelego  
Cai o banco onde me sento  
Água quente e erva buena  
para matear em silêncio*

***Se lembra os tempos de quebra  
A vida volta pra trás  
Sou bagual que não se entrega  
“Assim no más”.***

*Neste fogo onde me aqueço  
Remôo as coisas que penso  
Repasso o que tenho feito  
Para ver o que mereço*

*Quando chegar meu inverno  
Que me vem branqueando o cerro*

*Vai me encontrar venta aberta  
De coração estrelado*

*Mui carregado de sonhos  
Que habitam o meu peito  
E que irão morar comigo  
No meu novo paradeiro*

***Se lembra os tempos de quebra  
A vida volta pra trás  
Sou bagual que não se entrega  
“Assim no más”.***

**Letra:** Antônio Augusto Ferreira  
**Música:** Ewerton dos Anjos Ferreira

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	iii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE QUADROS .....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	xii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT .....	xvi
INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1. Taxonomia e descrição morfológica.....	3
2.2. Distribuição da espécie.....	4
2.3. Ecologia, Utilização e Manejo.....	4
2.4. Propagação vegetativa in vitro .....	10
2.5. Indução de poliploidia .....	14
2.6. Variabilidade genética em plantas forrageiras.....	20
2.7. Caracterização dos estômatos .....	21
2.8. Citometria de fluxo.....	25
3. OBJETIVOS .....	26
3.1. Objetivo geral .....	26
3.2. Objetivos específicos.....	26
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	27
CAPITULO I - Introdução e multiplicação in vitro de <i>Echinochloa polystachya</i> (Kunth) Hitchc.....	36
Resumo .....	36
Abstract.....	37
Introdução.....	38
Material e métodos .....	39
Resultados e discussões .....	43
Conclusão .....	53
Referências bibliográficas .....	53
CAPITULO II - Indução de ploidia em <i>Echinochloa polystachya</i> (Kunth) Hitchc .....	58
Resumo .....	58
Abstract.....	59
Introdução.....	61
Material e métodos .....	64
Resultados e discussões .....	70

Conclusão .....	90
Referências bibliográficas .....	90
CAPITULO III – Identificação e caracterização de ploidia em plantas de <i>Echinochloa polystachya</i> Kunth) induzidas por colchicina.....	95
Resumo .....	95
Abstract.....	96
Introdução.....	97
Material e métodos .....	101
Resultados e discussões .....	104
Conclusão .....	123
Referências bibliográficas .....	123
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	128

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Número de explantes, porcentagem de brotação e contaminação em cultivo in vitro de <i>Echinochloa polystachya</i> –	44
Figura 2 -	a) -Taxas de brotação e b) - contaminação dos explantes de <i>Echinochloa polystachya</i> submetidos a diferentes doses de sacarose em meio de cultura MS (letras iguais não apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade) –	45
Figura 3 -	Taxas de brotação dos explantes de <i>Echinochloa polystachya</i> submetidos a diferentes doses de BAP em 2 meios de cultura MS, a) - com 30 g.L <sup>-1</sup> e b) – 60 g.L <sup>-1</sup> de sacarose (letras iguais não apresentam diferenças significativas pelo teste de tuckey a 5% de probabilidade) -	48
Figura 4 -	Taxas de contaminação dos explantes de <i>Echinochloa polystachya</i> submetidos a diferentes doses de BAP em 2 meios de cultura MS, a) - com 30 g.L-1 e b) – 60 g.L-1 de sacarose –	49
Figura 5 -	Número de explantes de <i>Echinochloa polystachya</i> em função das dosagens de BAP quando em associação a duas doses de sacarose -	50
Figura 6 -	Taxa de brotação de <i>Echinochloa polystachya</i> em diferentes concentrações do meio de cultura MS e da redução da concentração da fitagel em 30% -	51
Figura 7 -	Porcentagem de Emergência de segmentos nodais de <i>Echynoclhoa polystachya</i> em função das diferentes concentrações de colchicina após o plantio em casa de vegetação. - modelo linear: P-value = 0,00015/ Porcentagem de emergência de segmentos nodais de <i>Echynoclhoa polystachya</i> em função dos diferentes tempos de exposição de colchicina após o plantio em casa de vegetação – modelo linear: P-value = 0,00000 e modelo quadrático P-value = 0,03224 -	72
Figura 8 -	Porcentagem de mortalidade em pré emergência de segmentos nodais de <i>Echynoclhoa polystachya</i> em função das diferentes concentrações de colchicina após o plantio em casa de vegetação. - modelo linear: P-value = 0,00015/ Porcentagem de mortalidade em pré emergência de segmentos nodais de <i>Echynoclhoa polystachya</i> em função dos diferentes tempos de exposição de colchicina após o plantio em casa de vegetação modelo linear: P-value = 0,00000 e modelo quadrático P-value = 0,03224 -	73
Figura 9 -	Porcentagem de Plântulas tombadas e mortas de <i>Echynoclhoa polystachya</i> em função das diferentes concentrações de colchicina após o plantio em casa de vegetação.- modelo linear: P-value = 0,0000 / Porcentagem de Plântulas tombadas e mortas de <i>Echynoclhoa polystachya</i> em função dos diferentes tempos de exposição de colchicina após o plantio em casa de vegetação- modelo linear: P-value = 0,00000 -	73
Figura 10 -	Porcentagem de mortalidade total das plantas de <i>Echynoclhoa polystachya</i> em função das diferentes concentrações de colchicina após o plantio em casa de vegetação- modelo linear: P-value =	74

	0,00022/ Porcentagem de mortalidade total das plantas de <i>Echinochloa polystachya</i> em função dos diferentes tempos de exposição de colchicina após o plantio em casa de vegetação - modelo linear: P-value = 0,0000 -	
Figura 11 -	Amplitude de variação entre e dentro dos tratamentos de indução a poliploidia em <i>Echinochloa polystachya</i> considerando as mensurações das variáveis PLEM (Porcentagem de plantulas emergentes e mortas) e PPLANOM (Porcentagem de plântulas anômalas) por repetição -	76
Figura 12 -	Amplitude de variação entre e dentro dos tratamentos de indução a poliploidia em <i>Echinochloa polystachya</i> considerando as mensurações das variáveis ALPE (Altura do perfilho estendido em cm) e CF3 (Comprimento da folha 3 em cm) por repetição -	76
Figura 13 -	Densidades estomáticas da planta matriz (A) e da Planta 4 de <i>Echinochloa polystachya</i> resultante da concentração 0,01 de colchicina e tempo 0 de exposição em colchicina (mergulho rápido). Visualização em microscópio ótico e aferidos sob objetiva de 40X -	81
Figura 14 -	Mensurações morfométricas (Estômato e comprimento de células) da planta matriz (A) e da Planta 5 de <i>Echinochloa polystachya</i> resultante da concentração 0,01 de colchicina e tempo 0 de exposição em colchicina (mergulho rápido). Visualização em microscópio ótico e aferidos sob objetiva de 40X -	82
Figura 15 -	Mensurações morfométricas (Estômato e comprimento de células e largura entre os feixes vasculares) da planta matriz (A) e da Planta 4 de <i>Echinochloa polystachya</i> resultante da concentração 0,01 de colchicina e tempo 24 horas de exposição em colchicina (mergulho rápido). Visualização em microscópio ótico e aferidos sob objetiva de 40X -	84
Figura 16 -	Distribuição e comparação de médias das densidades estomáticas (DE) observadas nas plantas de <i>Echinochloa polystachya</i> . As densidades estomáticas médias seguidas pela mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott-Knot a 5% de probabilidade -	85
Figura 17 -	Distribuição dos teores de clorofila das folhas 1, 2 e 3 (Índice SPAD, índices da medição indireta de clorofila) nas plantas triadas como poliploides de <i>Echinochloa polystachya</i> . Os teores de clorofila médios seguidos pela mesmas letra não apresentam diferença significativa pelo de Scott Knott a 5% de probabilidade. O Índice de Clorofila da Folha 3 (ICF3) é repetido na linha em negrito para salientar em escala real os valores mensurados para melhor avaliação -	87
Figura 18 -	Correlação entre a largura dos feixes vasculares (LIF) e o Comprimento das células dos feixes vasculares (CCF) das plantas de <i>Echinochloa polystachya</i> , 1, 5, 7, 8, 9 e 21, que apresentaram maior índice de clorofila -	89
Figura 19 -	Distribuição e comparação conteúdos de DNA (Mpb = Mega pares de bases) obtidos por citometria de fluxo e desvio padrão dessas medidas das plantas de 1 a 21 de <i>Echinochloa polystachya</i> submetidas a diferentes concentrações de colchicina comparadas a planta padrão VF ( <i>Vicia faba</i> sp) -	106

- Figura 20 - Diferentes níveis de ploidia em *Echinochloa polystachya*, analisados por citometria de fluxo e expressos em picogramas (pg). Os conteúdos de DNA (Mpb - Megapares de base) são apresentados no eixo das abscissas e o número de núcleos lidos por fluorescência se encontram no eixo das ordenadas. Figura A: Planta 15 (P15 em preto - pico maior), originados dos tratamentos 0,05% de concentração de colchicina e tempo 0 horas de exposição, comparada a *Vicia faba* (planta padrão – pico menor); Figura B: Planta 20 (P20) (picogramas na cor preta) concentração 0,1% e tempo 0 de exposição, comparadas com a a planta original (P.O.) (Tracejada em azul) e a Planta 05, (P5) (em branco) concentração 0,01 e tempo 0 horas de exposição - 107
- Figura 21 - Distribuição e comparação conteúdos de DNA em picograma (pg) e desvio padrão das plantas de 1 a 21 de *Echinochloa polystachya* submetidas a diferentes concentrações de colchicina, comparadas a planta padrão VF (*Vicia faba* sp) por citometria de fluxo. Os valores médios dos desvios padrões seguidos das mesmas letras não diferem nos conteúdos de DNA estimados - 108
- Figura 22 - Diferentes níveis de ploidia em *Echinochloa polystachya*, analisados por citometria de fluxo e expressos em picogramas (pg). Os conteúdos de DNA (Mpb - Megapares de base) são apresentados no eixo das abscissas e o número de núcleos lidos por fluorescência se encontram no eixo das ordenadas. Figura A: Planta original (P.O - picogramas na cor preta) comparada com a plantas 04 (P4 - em branco) concentração 0,01% e tempo 0 horas de exposição); Figura B: Planta original (P.O - picogramas na cor preta) comparada plantas 05 (P5 – cor branca) - concentração 0,01 e tempo 0 horas de exposição) - 109
- Figura 23 - Diferentes níveis de ploidia em *Echinochloa polystachya*, analisados por citometria de fluxo e expressos em picogramas (pg). Os conteúdos de DNA (Mpb - Megapares de base) são apresentados no eixo das abscissas e o número de núcleos lidos por fluorescência se encontram no eixo das ordenadas. Figura A: Planta original (P.O - picogramas na cor preta) comparada com a plantas 06 (P6 – cor branca) concentração 0,01 e tempo 12 horas de exposição); Figura B: Planta original (P.O - picogramas na cor preta) comparada plantas 07 (P7 -cor branca) concentração 0,01 e tempo 24 horas de exposição) - 109
- Figura 24 - Diferentes níveis de ploidia em *Echinochloa polystachya*, analisados por citometria de fluxo e expressos em picogramas (pg). Os conteúdos de DNA (Mpb - Megapares de base) são apresentados no eixo das abscissas e o número de núcleos lidos por fluorescência se encontram no eixo das ordenadas. Figura A: Planta original (P.O - picogramas na cor preta) comparada com a plantas 08 (P8 - concentração 0,01 e tempo 24 horas de exposição); Figura B:Planta original (P.O - picogramas na cor preta) comparada plantas 09 (P9 – cor branca) concentração 0,01 e tempo 24 de exposição) - 110
- Figura 25 - Diferentes níveis de ploidia em *Echinochloa polystachya*, analisados por citometria de fluxo e expressos em 110

- picogramas (pg). Os conteúdos de DNA (Mpb - Megapares de base) são apresentados no eixo das abscissas e o número de núcleos lidos por fluorescência se encontram no eixo das ordenadas. Figura A: Planta original (P.O - picogramas na cor preta) comparada com a plantas 10 (10 – cor branca) concentração 0,01 e tempo 24 horas de exposição; Figura B: Planta original (P.O - picogramas na cor preta) comparada plantas 11 (P11 – cor branca) concentração 0,025 e tempo 0 de exposição -
- Figura 26 - Diferentes níveis de ploidia em *Echinochloa polystachya*, analisados por citometria de fluxo e expressos em picogramas (pg). Os conteúdos de DNA (Mpb - Megapares de base) são apresentados no eixo das abscissas e o número de núcleos lidos por fluorescência se encontram no eixo das ordenadas. Figura A: Planta original (P.O - picogramas na cor preta) comparada com a plantas 12 (12 – cor branca) concentração 0,025 e tempo 0 horas de exposição; Figura B: Planta original (P.O - picogramas na cor preta) comparada plantas 13 (P13 – cor branca) concentração 0,025 e tempo 0 horas de exposição. - 111
- Figura 27 - Diferentes níveis de ploidia em *Echinochloa polystachya*, analisados por citometria de fluxo e expressos em picogramas (pg). Os conteúdos de DNA (Mpb - Megapares de base) são apresentados no eixo das abscissas e o número de núcleos lidos por fluorescência se encontram no eixo das ordenadas. Figura A: Planta original (P.O - picogramas na cor preta) comparada com a plantas 14 (P14 – cor branca) concentração 0,05 e tempo 0 horas de exposição; Figura B: Planta original (P.O - picogramas na cor preta) comparada plantas 15 (P15 – cor branca) concentração 0,05 e tempo 0 horas de exposição - 111
- Figura 28 - Diferentes níveis de ploidia em *Echinochloa polystachya*, analisados por citometria de fluxo e expressos em picogramas (pg). Os conteúdos de DNA (Mpb - Megapares de base) são apresentados no eixo das abscissas e o número de núcleos lidos por fluorescência se encontram no eixo das ordenadas. Figura A: Planta original (P.O - picogramas na cor preta) comparada com a plantas 16 (P16 – cor branca) concentração 0,5 e tempo 0 horas de exposição; Figura B: Planta original (P.O - picogramas na cor preta) comparada plantas 17 (P17 – cor branca) concentração 0,5 e tempo 12 horas de exposição - 112
- Figura 29 - Diferentes níveis de ploidia em *Echinochloa polystachya*, analisados por citometria de fluxo e expressos em picogramas (pg). Os conteúdos de DNA (Mpb - Megapares de base) são apresentados no eixo das abscissas e o número de núcleos lidos por fluorescência se encontram no eixo das ordenadas. Figura A: Planta original (P.O - picogramas na cor preta) comparada com a plantas 18 (P18 – cor branca) concentração 0,05 e tempo 24 de exposição; Figura B: e na proxima figura a planta Planta original (P.O - picogramas na cor preta) comparada plantas 19 (P19 – cor branca) concentração 0,1 e tempo 0 de exposição - 112
- Figura 30 - Diferentes níveis de ploidia em *Echinochloa polystachya*, analisados por citometria de fluxo e expressos em 113

- picogramas (pg). Os conteúdos de DNA (Mpb - Megapares de base) são apresentados no eixo das abscissas e o número de núcleos lidos por fluorescência se encontram no eixo das ordenadas. Figura A: Planta original (P.O - picogramas na cor preta) comparada com a plantas 04 (P4 – cor branca) concentração 0,1 e tempo 0 de exposição; Figura B: Planta original (P.O - picogramas na cor preta) comparada plantas 05 (P5 -cor branca) concentração 0,01 e tempo 36 horas de exposição - 110
- Figura 31 - Porcentagens das Alterações dos conteúdos de DNA (pg) das plantas de *Echinochloa polystachya*, analisados por citometria de fluxo comparadas à planta matriz – planta 1 - 114
- Figura 32 - Mensurações morfométricas (Estômato e comprimento de células) da planta matriz (A) (aproximação 1.200X) e da Planta 5 (B) de *Echinochloa polystachya* resultante da concentração 0,01 de colchicina e tempo 0 de exposição em colchicina (mergulho rápido) (aproximação 800X). Visualização em microscopia de varredura - 1 117
- Figura 33 - Mensurações morfométricas (Estômato e comprimento de células) da planta matriz (A) (aproximação 1.200X) e da Planta 7 (B) de *Echinochloa polystachya* resultante da concentração 0,01 de colchicina e tempo 24 de exposição em colchicina. (aproximação 800X). Visualização em microscopia de varredura - 118
- Figura 34 - Visualização em microscopia de varredura do limbo foliar da Planta 5 de *Echinochloa polystachya* resultante da concentração 0,01 de colchicina e tempo 0 (Mergulho rápido). A: aproximação 200X; B: aproximação 700X 118
- Figura 35 - Visualização em microscopia de varredura do feixe vascular foliar da planta 5 de *Echinochloa polystachya* resultante da concentração 0,01 de colchicina e tempo 0 de exposição. A: aproximação de 1.400X; B: aproximação de 2.823X. 119
- Figura 36 - Visualização em microscopia de varredura do feixe vascular foliar e estômato adjacente da planta 5 de *Echinochloa polystachya* resultante da concentração 0,01 de colchicina e tempo 0 de exposição. A: aproximação de 2.035X; B: aproximação de 6.000X, presença de hifas de fungo envolvendo tricoma e estômatos fechados. - 119
- Figura 37 - Correlações das densidades estomáticas das plantas de 1 a 21 de *Echinochloa polystachya* em relação ao Diâmetro equatorial (DQ) e Diâmetro polar (DP) dos estômatos; Densidade estomática ( $\mu\text{m}$ ) x Diâmetro equatorial - DQ ( $\mu\text{m}$ ) ( $r= 0,1$ ) / : Densidade estomática ( $\mu\text{m}$ ) x diâmetro polar - DP ( $\mu\text{m}$ ) ( $r= 0,91$ ) - 120
- Figura 38 - Correlação em *Echinochloa polystachya* dos caracteres avaliados: A: Comprimento das células dos feixes vasculares das plantas de 1 a 21 e da densidade estomática da região adaxial ( $r=0,81$ ); B: Correlação entre a largura das células dos feixes vasculares de *Echinochloa polystachya* e a densidade estomática ( $r=0,8$ ) - 121
- Figura 39 - Correlação em *Echinochloa polystachya* dos caracteres avaliados das plantas de 1 a 21: Figura A: o conteúdo de DNA (pg) e a largura 123

dos feixes vasculares das plantas 7 = 6,61pg; 21 = 6,49pg; 12 = 6,32pg; 14 = 6,21pg; 15 = 6,15 pg; 5 = 6,15pg; 2 = 5,78pg; 1 = 5,73 pg; (r= 0,86); Figura B: Correlação entre o conteúdo de DNA (pg) e a largura dos feixes vasculares das plantas 3 =5,72pg; 4 = 5,68pg; 18 = 5,62pg; 19 = 5,47pg; 10 = 5,33pg; 11 = 5,09pg; 13 = 4,91pg; 17 = 4,85pg; 8 = 4,83pg; 16 = 4,66pg; 20 = 4,33 pg; (r= 0,01) -

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Comparação da composição básica dos principais meios de cultivo -	11
Tabela 2	Probabilidades e coeficientes de variação do resultado das análises de variâncias dos resultados dos números de brotos da interação entre BAP x Sacarose observadas de <i>Echynoclhoa polystachya</i> , analisadas pelo Teste-F, Manaus, 2019	47
Tabela 3 -	Componentes e dosagens sugeridos para a introdução, multiplicação e enraizamento de <i>Echinochloa polystachya</i> -	53
Tabela 4 -	Tratamentos com diferentes concentrações de colchicina e tempos de exposição dos segmentos nodais de <i>Echinochloa polystachya</i> para exposição a diferentes soluções -	65
Tabela 5 -	Probabilidades e coeficientes de variação do resultado das análises de variâncias de características avaliadas da morfogênese e taxa de crescimento, dos segmentos nodais de <i>Echynoclhoa polystachya</i> , do plantio até aos 30 dias de avaliação, Manaus, 2019 -	72
Tabela 06 -	Modelos de regressão, equação de regressão, R <sup>2</sup> e P-Value das diferentes variáveis observadas em relação a morfogênese e taxas de crescimento de <i>Echynoclhoa polystachya</i> do plantio até aos 30 dias de avaliação em relação ao fator (Tempo ou Concentração) verificadas pelo Teste-F, Manaus, 2019 -	77
Tabela 7 -	Médias diferentes variáveis observadas em relação a morfogênese e taxas de crescimento de <i>Echynoclhoa polystachya</i> do plantio até aos 30 dias de avaliação em relação ao fator concentração verificadas pelo Teste-F, Manaus, 2019 -	77
Tabela 8 -	Médias diferentes variáveis observadas em relação a morfogênese e taxas de crescimento de <i>Echynoclhoa polystachya</i> do plantio até aos 30 dias de avaliação em relação ao fator tempo verificadas pelo Teste-F, Manaus, 2019 -	78
Tabela 9 -	Porcentagem de platas (%), número de plantas (%) de <i>Echynoclhoa polystachya</i> induzidas a ploidia selecionadas mediante os critérios das maiores alturas e larguras da folha 3 e respectivas correspondências aos tratamentos de colchicina e aos tempo de exposição -	80
Tabela 10 -	Probabilidades e coeficientes de variação do resultado das análises de variâncias das características morfométricas observadas a partir do limbo foliar das plantas selecionadas de <i>Echynoclhoa polystachya</i> , analisadas pelo Teste-F, Manaus, 2019 -	80
Tabela 11 -	Características morfométricas do limbo foliar das plantas selecionadas (1-21) de <i>Echynoclhoa polystachya</i> para confirmação de ploidia e tratamentos a que foram submetidas -	83
Tabela 12 -	Características morfométricas do limbo foliar da planta matriz de <i>Echynoclhoa polystachya</i> e das plantas 5, 7, 8, 9 e 21 que se destacaram pelo teor de clorofila e tratamentos a que foram submetidos -	89
Tabela 13 -	Conteúdo de DNA (pg) obtido por Citometria de fluxo das plantas de <i>Echinochloa polystachya</i> (1 a 21) submetidas a diferentes	105

	concentrações de colchicina comparadas a planta padrão VF ( <i>Vicia faba sp</i> ) -	
Tabela 14 -	Probabilidades e coeficientes de variação e P-Value do resultado das análises de variâncias de características morfométricas do limbo foliar das plantas selecionadas de <i>Echynoclhoa polystachya</i> , Manaus, 2019 -	115
Tabela 15 -	Conteúdo de DNA (pg) e Características estomáticas do limbo foliar das plantas 1 a 21 de <i>Echynoclhoa polystachya</i> . Manaus, 2019 -	116.
Tabela 16 -	Conteúdo de DNA (pg) e Características morfométricas do limbo foliar da planta matriz de <i>Echynoclhoa polystachya</i> e das plantas 5, 7, 8, 9 e 21 com níveis de ploidias que se destacam por suas características morfogenéticas	122

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Características avaliadas e calculadas do limbo foliar (os 60 dias após a germinação) dos 20 supostos poliploides de <i>Echinochloa polystachya</i> plantados em vasos em casa de vegetação –	67
Quadro 2 -	Índice de clorofila do limbo foliar (Leitura SPAD) das folhas dos 20 supostos poliploides de <i>Echinochloa polystachya</i> plantados em vasos em casa de vegetação -	68
Quadro 3 -	Índice de clorofila do limbo foliar (Leitura SPAD) das folhas dos 20 supostos poliploides de <i>Echinochloa polystachya</i> plantados em vasos em casa de vegetação.	69

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>µm</b>	Micrômetro
<b>ALPE</b>	Altura do afilho estendido
<b>ALTE</b>	Alterações cromossômicas
<b>BAP</b>	6-Benzillaminopurina
<b>Biocida PPM®</b>	PLANT PRESERVATIVE MIXTURE
<b>CCE</b>	Comprimento das células da epiderme
<b>CCF</b>	Comprimento das células dos feixes vasculares
<b>CF1</b>	Comprimento de folha 1
<b>CF2</b>	Comprimento de folha 2
<b>CF3</b>	Comprimento de folha 3
<b>CV %</b>	Coefficiente de variação
<b>DE</b>	Densidade estomática
<b>DE</b>	Densidade estomática média
<b>DEABA</b>	Densidade estomática da região abaxial
<b>DEADA</b>	Densidade estomática da região adaxial
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DP</b>	Diâmetro polar do estômato
<b>DPE</b>	Dias para Emergência
<b>DQ</b>	Diâmetro equatorial do estômato
<b>EMBRAPA</b>	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
<b>FN</b>	Funcionalidade estomática
<b>ICF1</b>	Índice de clorofila da folha 1
<b>ICF2</b>	Índice de clorofila da folha 2
<b>ICF3</b>	Índice de clorofila da folha 3
<b>LCE</b>	Largura das células da epiderme
<b>LCF</b>	Largura das células dos feixes Vasculares
<b>LIF</b>	Largura (Distância) entre feixes vesculares
<b>Mpb</b>	Mega pares de base
<b>MS</b>	Meio de cultivo Murashige e Skoog – Meio MS
<b>MS - 50</b>	Meio MS com 50% da concentração de sais
<b>MS - 100</b>	Meio MS com 100% da concentração de sais
<b>N</b>	Nitrogênio
<b>PE</b>	Porcentagem de emergência
<b>pg</b>	Picograma
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>PLTOM</b>	Porcentagem de plantas Tombadas e mortas
<b>PMPRE</b>	Porcentagem de mortalidade em pré emergência
<b>PMTOT</b>	Porcentagem da mortalidade total
<b>PPLMPOS</b>	Porcentagem de mortalidade em pós emergência
<b>RPM</b>	Rotações por minuto
<b>SPAD</b>	Leitura SPAD do teor de clorofila

<b>TXALPE</b>	Taxa de crescimento da ALPE (cm/dia)
<b>TXC1</b>	Taxa de crescimento da folha 1 (cm/dia)
<b>TXC2</b>	Taxa de crescimento da folha 2 (cm/dia)
<b>TXC3</b>	Taxa de crescimento da folha 3 (cm/dia)
<b>TXCF</b>	Comprimento das células dos feixes
<b>TXCF</b>	Comprimento das células dos feixes
<b>TXCM</b>	Comprimento das células do mesófilo
<b>TXCM</b>	Comprimento das células do mesófilo
<b>TXMC</b>	Taxa média de crescimento da folha (cm/dia)
<b>TRAT</b>	Tratamentos
<b>U.A.</b>	Unidade animal (450 kg de peso vivo – PV)
<b>UFAM</b>	Universidade Federal do Amazonas
<b>UFLA</b>	Universidade Federal de Lavras

## RESUMO

O capim canarana (*Echinochloa polystachya*) é uma das principais espécies forrageiras presentes na região do baixo Amazonas e pode ser uma alternativa para alimentação animal no período de cheia do Rio Amazonas. Estudos de propagação *in vitro* e obtenção de poliploides a partir de diplóides dessa espécie podem resultar em indivíduos com maior produtividade, melhor desenvolvimento vegetativo e vigor que os diplóides dos quais se originaram para cultivo. O objetivo do trabalho foi realizar a introdução de *Echinochloa Polystachya in vitro*, induzir poliploidia com o uso de colchicina e caracterizar os genótipos obtidos por meio da citometria de fluxo e densidade estomática visando ampliar a variabilidade genética para melhorar a produtividade dessa forrageira. Foram coletados colmos no município de Manaus, realizados uma pré limpeza, pré-assepsia e retirada da bainha foliar e o material senescente. Foram submetidos ao processo de desinfestação conforme proposto por Passos e Köpp (2010), seguir foram inoculados tubos de ensaio individuais contendo o meio de cultura inicial: 15 mL do meio Murashige e Skoog (1962) com metade das concentrações dos sais, isento de reguladores de crescimento, acrescido de 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, BAP 4,5 mL.L<sup>-1</sup>, do biocida PPM na concentração de 2 mL.L<sup>-1</sup> e de 2 g.L<sup>-1</sup> de Fitagel e corrigido para pH 5,8 antes da autoclavagem. Trinta dias após, os explantes foram repicados e transferidos para novos tubos individuais com novos meios de cultura iguais ao meio inicial e verificados as taxas de brotação e contaminação. Também experimentos foram realizados para se avaliar os efeitos das concentrações de sacarose, BAP sobre a taxa de perfilhamento dos explantes. A partir do aumento do teor de sacarose a partir de 45 g/L-1 houveram respostas na taxa de multiplicação. As doses de BAP e sacarose interferiram no desenvolvimento e multiplicação do cultivo *in vitro*, no entanto, para o estabelecimento de um protocolo eficiente para a propagação *in vitro* para *Echinochloa Polystachya* deve realizar ajustes no teor de sacarose e de BAP no decorrer de sucessivas repicagens devido à diminuição dos internódios e a consequente perda do vigor. Para o estudo de poliploidia, segmentos nodais de uma única planta de canarana verdadeira foram coletados no município de Manaus e submetidas a diferentes concentrações de colchicina e tempos de exposição. em um delineamento inteiramente casualizado em sistema fatorial 5x4. As concentrações de colchicina foram: 0; 0,01; 0,025; 0,05 e 0,1. Os tempos de exposição foram: 0; 12; 24 e 36 horas. Foram realizados assim 20 tratamentos com 3 repetições, onde cada repetição foi composta por 10 plantas, em um total de 600 segmentos nodais avaliados. Foi avaliado o tempo de emergência a partir do plantio. A avaliação da morfogênese e taxa de crescimento foi realizada pela técnica dos “afilhos marcados” (adaptado), cuja metodologia é detalhada por Carrère et al. (1997) e Davies (1993). A melhor germinação recebendo a colchicina, foi observada em 50% de nas concentrações de 0,01 mL.L<sup>-1</sup> e no tempo 0 (zero) de exposição. As porcentagens de mortalidade em pré emergência, foram afetadas pelas concentrações e tempo a que foram expostos, em que, na concentração 0,1 mL.L<sup>-1</sup> e no tempo 36 horas foram de 85%. A maior sobrevivência, foram, nas concentrações 0,01 mL.L<sup>-1</sup> e no tempo 0 (zero) de exposição, em uma taxa de sobrevivência de 33,1%. Verificou-se também que plantas anômalas não ocorreram nos

tratamentos onde a concentração de colchicina foi 0 (zero), pode-se inferir que as plantas foram afetadas em seu metabolismo por alterações moleculares, não causando a mortalidade imediata, mas afetando as divisões celulares. Em termos gerais dos 600 segmentos nodais submetidos aos tratamentos, 172 sobreviveram, refletindo em uma taxa de sobrevivência de 28%, em que 159 plantas expressaram suas características fenotípicas após a exposição as concentrações e tempos originando assim supostos poliploides. 20 plantas supostamente poliploides foram selecionadas para as mensurações em relação a densidade estomática e características morfométricas das células do limbo foliar. Observou alterações nas densidades estomáticas, funcionalidade estomática, distância entre os feixes vasculares, comprimento e largura das células da epiderme e das células dos feixes vasculares. Nas diferentes plantas analisadas por citometria de fluxo, houveram alterações tanto o aumento como a eliminação no conteúdo de DNA (pg). Estas alterações não apresentaram correlação entre os comprimentos e larguras das células da epiderme e as células do feixe, porém originaram plantas com diferentes níveis de ploidia e características morfométricas. Pode-se inferir que houve um “rearranjo” das células do limbo foliar em função das consequentes ploidias. Não foi observada a correlação entre as maiores distâncias entre os feixes vasculares a as maiores quantidades de conteúdo de DNA. Para as plantas cujos conteúdos de DNA foram maiores que a planta original (P5, P6, P7, P12, P14, P15 e 21), foi verificado um índice de correlação ( $r= 0,86$ ), entre O conteúdo de DNA (pg) e as distâncias entre os feixes vasculares, fato que confirma os diversos trabalhos que mencionam as maiores ploidias, a maiores tamanhos de tecidos e órgãos das plantas. Fato verificado foi que, as plantas com a eliminação do conteúdo de DNA (P4, P8, P9, P10, P11, P13 P16 P17 P18 P19 P20) apresentaram baixa correlação com as larguras entre os feixes vasculares ( $r=0,1$ ), não corroborando com estas afirmações. As plantas que se destacaram em termos características morfométricas, quando comparado com a Planta P1, foram as plantas P5, P7, P8, P9 e P21. Destas, destaca-se as plantas, P8 e P9, que apesar dos conteúdos de DNA, significativamente inferior, apresentaram características morfométricas de interesse, superiores a planta original P1. Pode se concluir que as concentrações e doses de colchicina em foram submetidos a espécie *Echinochloa polystachya* influenciou diretamente nos eventos moleculares, acarretando em plantas com diferentes níveis de ploidias e características morfométricas distintas, indicando potenciais plantas mutagênicas que poderão entrar em um posterior trabalho de melhoramento

**Palavras-chave:** Micropropagação, canarana verdadeira, cultura de tecidos, micropropagação, reguladores de crescimento vegetal, poliploidia, colchicina, análise estomática, citometria de fluxo.

## ABSTRACT

Canarian grass (*Echinochloa polystachya*) is one of the main forage species present in the lower Amazon region and can be an alternative for animal feed during the flood period of the Amazon River. In vitro propagation studies and obtaining polyploids from diploids of this species can result in individuals with higher productivity, better vegetative development and vigor than the diploids from which they originated for cultivation. The objective of the work was to perform the introduction of *Echinochloa Polystachya* in vitro, induce polyploidy with the use of colchicine and to characterize the genotypes obtained through flow cytometry and stomatal density in order to increase the genetic variability to improve the productivity of this forage. Stems were collected in the city of Manaus, pre-cleaning, pre-aseptic and removal of the leaf sheath and senescent material were performed. They were submitted to the disinfection process as proposed by Passos and Köpp (2010), then individual test tubes containing the initial culture medium were inoculated: 15 mL of Murashige and Skoog medium (1962) with half the concentrations of salts, free of regulators growth, plus 30 g, sucrose L<sup>-1</sup>, BAP 4.5 ml.L<sup>-1</sup>, of the biocide PPM in the concentration of 2 ml.L<sup>-1</sup> and 2 gL<sup>-1</sup> of Fitagel and adjusted to pH 5, 8 before autoclaving. Thirty days later, the explants were picked and transferred to new individual tubes with new culture media equal to the initial medium and the rates of sprouting and contamination were checked. Experiments were also carried out to evaluate the effects of sucrose, BAP concentrations on the tillering rate of explants. From the increase in the sucrose content from 45 g / L<sup>-1</sup>, there were responses in the multiplication rate. The doses of BAP and sucrose interfered in the development and multiplication of the in vitro culture, however, for the establishment of an efficient protocol for the in vitro propagation for *Echinochloa Polystachya* must make adjustments in the sucrose and BAP content during successive subcultures due the decrease in internodes and the consequent loss of vigor. For the study of polyploidy, nodal segments from a single true canarana plant were collected in the municipality of Manaus and subjected to different concentrations of colchicine and exposure times. in a completely randomized design in a 5x4 factorial system. The concentrations of colchicine were: 0; 0.01; 0.025; 0.05 and 0.1. The exposure times were: 0; 12; 24 and 36 hours. Thus, 20 treatments were performed with 3 repetitions, where each repetition was composed of 10 plants, in a total of 600 nodal segments evaluated. The emergence time from planting was evaluated. The evaluation of morphogenesis and growth rate was performed using the technique of "marked tillers"

(adapted), whose methodology is detailed by Carrère et al. (1997) and Davies (1993). The best germination receiving colchicine was observed in 50 % at concentrations of 0.01 ml.L<sup>-1</sup> and at time 0 (zero) of exposure. The percentages of mortality in pre-emergence were affected by the concentrations and time to which they were exposed, in which, at concentration 0.1 ml.L<sup>-1</sup> and 36 hours were 85%, with the highest survival at 0.01 ml.L<sup>-1</sup> and 0 (zero) exposure times, with a survival rate of 33.1 %. It was also found that anomalous plants did not occur in treatments where the concentration of colchicine was 0 (zero), it can be inferred that the plants were affected in their metabolism by molecular changes, not causing immediate mortality, but affecting cell divisions. In general terms of the 600 nodal segments submitted to the treatments, 172 survived, reflecting a 28% survival rate, in which 159 plants expressed their phenotypic characteristics after exposure to the concentrations and times thus giving rise to supposed polyploids. 20 supposedly polyploid plants were selected for measurements in relation to stomatal density and morphometric characteristics of leaf cell cells. He observed changes in stomatal densities, stomatal functionality, distance between vascular bundles, length and width of epidermal cells and cells of vascular bundles. In the different plants analyzed by flow cytometry, there were changes in both the increase and the elimination in the content of DNA (pg). These changes did not show correlation between the lengths and widths of the cells of the epidermis and the cells of the bundle, however they originated plants with different levels of ploidy and morphometric characteristics. It can be inferred that there was a “rearrangement” of the cells of the leaf blade due to the consequent ploidy. No correlation was observed between the greatest distances between the vascular bundles and the largest amounts of DNA content. For plants whose DNA content was higher than the original plant (P5, P6, P7, P12, P14, P15 and 21), a correlation index ( $r = 0.86$ ) was found between DNA content (pg ) and the distances between the vascular bundles, a fact that confirms the various studies that mention the largest ploidy, the largest tissue sizes and plant organs. A verified fact was that the plants with the elimination of the DNA content (P4, P8, P9, P10, P11, P13 P16 P17 P18 P19 P20) presented a low correlation with the widths between the vascular bundles ( $r = 0.1$ ), not corroborating these statements. The plants that stood out in terms of morphometric characteristics, when compared to Plant P1, were plants P5, P7, P8, P9 and P21. Of these, the plants, P8 and P9, stand out, which despite the DNA content, significantly lower, presented morphometric characteristics of interest, superior to the original plant P1. It can be concluded that the concentrations and doses of colchicine in submitted to the species *Echinochloa polystachya* directly

influenced the molecular events, resulting in plants with different levels of ploidy and different morphometric characteristics, indicating potential mutagenic plants that may enter into further breeding work.

**Keywords:** Micropropagation, real canarana, tissue culture, micropropagation, plant growth regulators, polyploidy, colchicine, stomatal analysis, flow cytometry.

## INTRODUÇÃO

O capim canarana (*Echinochloa polystachya* Kunth Hitchc) é uma das principais espécies forrageiras nativas presentes na região do baixo Amazonas, uma alternativa potencial para alimentação animal no período de cheia do Rio Amazonas. A espécie é consumida por herbívoros naturais (peixe-boi, capivaras, peixes) e por animais introduzidos na Amazônia, como bovinos e bubalinos. Apresenta vigoroso crescimento e uma elevada produtividade de matéria verde na região e por isso é considerada uma das mais importantes forrageiras na Amazônia Central de ocorrência natural (PIEDADE, 1993).

O capim canarana é uma planta aquática da várzea amazônica, C4, perene, forma extensos grupamentos monotípicos mais frequentes nas regiões inundáveis sujeitas a grande flutuações e que tem ocorrência preferencial em praias, baixios argilosos e lamacentos dos canais e rios inundáveis da Bacia Amazônica (BARBOSA et al., 2008; PIEDADE, 1993). Na sucessão ecológica, esta gramínea substitui comunidades de plantas anuais, devido ao agressivo desenvolvimento e posteriormente são substituídas por árvores tolerantes ao encharcamento e assim são eliminadas por sombreamento. Em relação a sua reprodução na natureza, sabe-se que esta ocorre de forma predominantemente vegetativa, devido a inviabilidade de suas sementes causada pelo ataque de pragas, especialmente larvas de Cecidomyiidae (Díptera) que podem eliminar mais de 90% das sementes produzidas (PIEDADE, 1993).

Apesar do potencial da canarana, sua maior utilização e reconhecimento como forrageira é comprometida pelo seu baixo valor nutritivo e digestibilidade, principalmente na planta adulta. Com o avanço do crescimento e maturidade da planta, ocorre redução de folhas, de matéria seca e do valor nutritivo, com a redução dos teores de Mg e K (CAMARÃO et al., 1988; MARTIN, 1997). Nesta fase verifica-se principalmente a menor quantidade de lâminas verdes por ocasião da maturidade fisiológica e características morfológicas inadequadas ao consumo animal, como a grande quantidade de células do aerênquima caulinar que comprometem a digestibilidade desta forrageira ao consumo animal (FARIAS e PIEDADE, 2000; BIAZÃO, 2012). Devido ao seu potencial produtivo e aceitabilidade desta forrageira nas fases iniciais de seu crescimento vegetativo é necessário um maior conhecimento desta espécie e melhoramento genético, com o prolongamento de sua fase vegetativa buscando ampliar o uso desta forrageira na alimentação animal.

Trabalhos da literatura mostraram que a obtenção de poliploides artificiais a partir de diploides resultaram em indivíduos com maior produção de matéria seca de forragem e valor nutricional em *Paspalum Notatum* cv. pensacola e milho amarelo com considerável aumento de teores de nutrientes. Resultaram também indivíduos com melhor desenvolvimento vegetativo e vigor que os diploides dos quais se originaram, tendendo a produzir folhas mais largas e cores mais escuras, flores e sementes de maior tamanho e células maiores (SCHIFINO-WITTMANN, 2004; WEILER et al., 2015). Portanto, a duplicação de genomas por meio da obtenção de poliploides artificiais é uma estratégia que pode ser utilizada para a obtenção de novas cultivares em diferentes espécies vegetais visando o aumento de matéria seca e qualidade nutricional, assim como em capim canarana.

Considerando o potencial produtivo, relevância regional para a bovinocultura e escassez de pesquisas relacionadas ao melhoramento de *E. polystachya* e ainda o potencial da poliploidização para o aumento de matéria seca em espécies vegetais, este trabalho objetivou obter e caracterizar poliploides de capim canarana para uso como forrageira. Um genótipo de *E. polystachya* foi introduzido in vitro e propágulos desse genótipo foram submetidos à indução de poliploidia com o uso do agente mutagênico colchicina. Os poliploides obtidos foram caracterizados quanto ao conteúdo de DNA com o uso da citometria de fluxo e análises de estomáticas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Taxonomia e descrição morfológica

*Echinochloa polystachya* (Kunth) Hitchc, var. *spectabilis* (Nees ex Trin.) Mart. Crov., pertence ao gênero *Echinochloa sp.*, família Poaceae (Gramineae), e ordem das monocotiledôneas. A espécie foi classificada por Hitchcock (1935) e na região amazônica é popularmente conhecida como capim canarana, canarana-verdadeira e canarana de pico. Na literatura são encontrados outros nomes como capim de Angola em Portugal; pardegrão e prasi-grasi no Suriname; pasto alemão na Venezuela; aleman e German grass na Austrália e Panamá; creeping river grass (América do Norte); mudflat millet, habetz grass, perennial barnyard grass e water bermuda na Inglaterra; e zacate asto chiguirera, yerba de rio na Espanha (HEUZÉ et al., 2017).

O gênero *Echinochloa* é amplamente estudado devido a sua importância ecológica em regiões inundáveis e agrícolas. A espécie *E. polystachya* é uma planta perene aquática ou sub-aquática medindo entre 1 a 2,5 m de altura, espessa nas partes inferiores, de rizomas longos, entrenós glabros, nós glabros ou obscuramente pubescentes. A lígula apresenta um aro de tricomas firmes e amarelados até 4 mm de comprimento. As lâminas foliares possuem entre 20 a 60 cm de comprimento e entre 10 a 25 mm de largura, com margens ásperas. As panículas em sua maioria de 15 a 25 mm de comprimento, densas apresentando ramos curtos e grossos cujas espigas se apresentam lanceoladas entre 5 a 7 mm de comprimento. Sua inflorescência superior é hermafrodita, 5 a 6 mm de comprimento e 5 a 7 mm de diâmetro. As inflorescências inferiores possuem estames com lemas de 7 a 17 mm de comprimento. Os pêlos da lígula possuem de 1 a 1,5 mm de comprimento. As lâminas das folhas medem de 30 a 36 cm de comprimento e 10 a 12 mm de largura. O eixo da panícula mede de 20 a 30 cm de comprimento e as espigas medem de 4,5 a 5,5 mm de comprimento com 1,7 a 2,0 mm de largura (HEUZÉ et al., 2017).

As diferenças mais distintivas são as lemas das inflorescências da variedade "Amity" (introduzidas na Austrália oriundas de Orinoco, Delta da Venezuela, Reg. No. A-25a-1 Registrado July 1988); as lemas de *E. polystachya* são normalmente mais arredondadas. A variedade "Amity" tem folhas planas, glabras e lineares, estreitando-se até um ápice estreito, arredondado ou auriculado na base. Panícula com eixo aspero; ramos primários com espiguetas aprisionadas no eixo central, 2,5 a 9,0 cm de

comprimento. Pedicelos de 0,2 a 2,0 mm de comprimento, com escamas na base da espiguetas. Espigas plano-convexas, lanceoladas. O glume inferior possui de 2,5 a 3,0 mm de comprimento, sendo ovado-lanceolado. Possui gluma superior com 4,5 a 5,5 mm de comprimento, lanceolada com 6 a 7 nervuras, glabra, enrugada nas nervuras apicais, acuminada, com 5,0 a 5,5 mm de comprimento. A lema na inflorescência inferior é de 5,0 a 5,5 mm x 1,0 a 1,5 mm, lanceolada, cartácea, 7 a 9 nervuras, superfície glabra, acuminada e curta com 1,0 a 1,5 mm de longitude; com pálea inferior linear e aguda. A lema da inflorescência superior possui 4,5 mm de comprimento, sendo branco, liso, ovado-lanceolado, acuminado e é curta com 0,5 mm de comprimento. A pálea superior é lisa e envolvida em seu ápice pela lema (HEUZÉ et al., 2017).

## **2.2. Distribuição da espécie**

*Echinochloa polystachya* é encontrada em pântanos, margens do lago e terras úmidas desde Hitchcock (1936) cita a sua ocorrência desde o México até a Argentina, incluindo as índias ocidentais (ilhas do caribe, denominadas Antilhas e Bahamas). É encontrada e nativa desde a América do Norte: México, USA (Florida, Louisiana e Texas); na América Central: Belize, Costa Rica, Honduras, Nicarágua, Panamá, Caribe: Antígua e Barbuda, Cuba, República Dominicana, Haiti, Jamaica, Martinique, Porto Rico, St. Lucia, Trinidad & Tobago. Na América do Sul pode ser encontrada desde Argentina, Bolívia, Brasil, Equador, Guiana Francesa, Guiana, Paraguai, Peru, Suriname e Uruguai. É naturalizada nas regiões tropicais, África do Sul, Ásia e Havaí e introduzida no nordeste da Austrália (HEUZÉ et al., 2017).

## **2.3. Ecologia, Utilização e Manejo**

O crescimento de *E. polystachya* é sincronizado pelo nível dos rios, sendo que na Amazônia central, verifica-se uma amplitude de inundação variando de 10 a 15 metros acima do nível do mar e cujo tempo inundado pode variar de 50 a 270 dias, conforme a altura do relevo considerada (BARBOSA, 2008). O ciclo de vida da espécie pode ser dividido nas fases: aquática, onde os colmos submersos se alongam em função dos níveis dos rios e terrestre, quando o nível da água diminui, expondo os sedimentos (outubro e novembro). No início da fase terrestre, os perfilhos da velha geração senescente iniciam o processo de decomposição, formando novos brotos em seus nós que rapidamente de

fixam ao sedimento, enraizando de maneira vigorosa. A princípio observa-se um crescimento cespitoso e com alta densidade de folhas jovens, ao passo que o perfilho original se decompõe de maneira gradual. Dentre os brotos que emergem de um perfilho, apenas um se desenvolve, enquanto os demais são eliminados por competição e ao que parece os nutrientes do perfilho original são translocados para a nova planta. Portanto, desta maneira, cada nova planta é constituída por um caule individual originado de maneira vegetativa a partir de um perfilho “mãe”. Desta maneira a cada período de águas baixas” um novo grupo de plantas individuais é formado, já que em geral a maioria das plantas secam. Logo se inicia o período chuvoso (dezembro a março) e que desempenham um importante papel no estabelecimento das plantas novas (PIEDADE, 1993; BARBOSA, 2008).

Devido a esta adaptabilidade entre fases terrestres e aquáticas, a espécie apresenta diferenças de morfologia externa que podem ser relacionadas às duas condições. Com relação ao tamanho da folha, em ambas as fases de desenvolvimento, enquanto uma lâmina foliar expandida mede cerca de 80 cm de comprimento e cinco centímetros de largura, uma planta jovem tem metade destas dimensões, porém invariavelmente, uma única folha é formada por nó e os entre nós das plantas podem chegar a medidas de até 30 centímetros quando em pleno desenvolvimento. Por ocasião da alagação as plantas apresentam de 1 a 2 metros de altura e seu crescimento é vertical na medida em que novos “nós” vão se formando (PIEDADE, 1993). O crescimento vigoroso objetiva a manutenção da condição aéreas das folhas fotossintetizantes alongando desta forma o caule submerso que ganha certa tortuosidade, na qual a inundação pode ser muito rápida, numa taxa de crescimento de até 4 cm por dia nos meses iniciais de inundação. As folhas e perfilhos aéreos se constituem um dossel homogêneo, de aproximadamente 1,5 cm acima da água. Assim que a água recobre a folha esta rapidamente entra em fase de decomposição sob a superfície enquanto outra nova é formada em uma taxa de reposição de folhas em torno de 34 dias e assim após a submersão em cada nó há o surgimento de raízes adventícias de maneira imediata. Não se conhece quanto nem em que extensão essas raízes substituem a raiz basal, porém há o fato de que estas plantas continuam a crescer mesmo com a morte do perfilho e raiz principais, mostrando o importante papel destas raízes adventícias subaquáticas. O crescimento da planta foi contínuo desde a fase terrestre até a fase aquática, porém a velocidade variou. A porcentagem da biomassa submersa atingiu 90% durante o pico das cheias (julho/agosto) e somente os novos entre nós permaneceram acima da superfície da água (PIEDADE, 1993).

O início do surgimento das inflorescências ocorre em março e o ápice entre abril e julho terminando em setembro. Apesar da predominância da propagação vegetativa, como já exposto, a dispersão das sementes se dá por hidrocoria (quando as sementes ou frutos pequenos e leves, com um envoltório plumoso, são levados pela água da chuva, promovendo a disseminação da espécie), sendo que a endozoocoria, embora exista (aves e peixes), provavelmente atua mais como impacto de predação do que como estratégia de dispersão. Após a fase de floração de abril a julho concomitantemente inicia-se a redução da coluna d'água, porém as plantas mantem ainda folhas verdes, todavia em sua base, fixa ao substrato, ocorre a decomposição e o “descolamento” da planta deste substrato em função das condições anaeróbicas, bem como a formação de gás sulfídrico nas porções mais profundas. Com a redução da coluna d'água é exposto a parte superior do caule anteriormente submerso, logo abaixo das folhas verdes. As raízes adventícias passam a ser responsáveis pela retirada de nutrientes da água e estas secam gradualmente de cima para baixo e quando o processo atinge todas as raízes, o caule e as folhas da extremidade superior finalmente seca. No período que sucede, na vazante (outubro e novembro), nova rebrota terá início a partir dos perfilhos, já senescentes da geração anterior, reiniciando desta forma um novo ciclo (PIEDADE, 1993).

Devido a estratégia de crescimento em função dos níveis e períodos de alagamento, esta gramínea apresenta vigoroso crescimento e uma elevada produtividade, sendo considerada uma das espécies mais importantes na Amazônia Central, especialmente pelo seu consumo, tanto por herbívoros naturais (peixe-boi, capivaras, peixes), quanto por animais introduzidos (bovinos e bubalinos) (PIEDADE, 1993; BARBOSA, 2008).

O acesso pelo gado pode ser limitado pela profundidade da água na medida que os níveis sazonais de inundação diminuem. Pode ser pastejado ou conservado em superfícies secas do solo. Em relação a fertilidade de solo, *E. polystachya* tolera um largo espectro de condições de fertilidade do solo, mas responde melhor em solos de fertilidade média a alta. Na Colômbia é encontrado em solos argilosos. Está adaptado ao pH do solo entre 4,0 e 8,0 e possui alguma resistência à solos salinos. Muito tolerante a solos mal drenados, haja vista a sua adaptação ecológica em terras inundáveis cujo habitat natural em zonas úmidas apresenta condições de precipitação muito elevadas (> 1.900 mm). Não tolera temperaturas baixas e geadas e não há relatos de produção de sementes viáveis na região norte da Austrália (PITTAWAY et al., 1996; FARIAS e PIEDADE, 2000; HEUZÉ et al., 2017).

Devido a sua baixa produção de sementes viáveis o estabelecimento se faz via propagação vegetativa, onde é normalmente plantado em mudas, estacas em covas, caule ou estolão (1-2 t/ha) em espaçamentos de 1 m entre linhas (HEUZÉ et al., 2017) ou no espaçamento de 50cm x 50 cm (SOUZA-FILHO et al., 1990). Os colmos são seccionados com 2 a 3 nós deixando 1 nó acima da superfície. Podem ser plantados anualmente, ou a lanço em águas rasas e empurrados para o solo por meio de rodas especiais em um trator leve. O consórcio com outras espécies geralmente não é compatível, devido a condições de inundação. Todavia observa-se espécies acompanhantes como *Brachiaria mutica* (água até 30 cm de profundidade) e *Hymenachne amplexicaulis* (água em profundidade superior a 1m). Em relação a pragas e doenças, não há relatos de altas infestações, porém fungos que atacam outras gramíneas nativas podem a apresentar alto potencial, haja vista o ambiente úmido em que se encontram, onde estolões e pedaços de material vegetal transportados pela água se encontram em abundância. Em ambientes e área úmidas podem formar estandes mono-específicos ao espalhar as várias espécies de vegetação competitiva, como outras gramíneas e ervas subaquáticas. Em geral, em ambiente natural, a nutrição é dependente da mineralização da flutuação da água do solo e em particular a mineralização do nitrogênio, pela rápida decomposição da matéria orgânica e pela atividade de bactérias fixadoras de nitrogênio nas raízes. No entanto, pode ser muito sensível aos altos níveis de fertilizante nitrogenado (PITTAWAY et al., 1996; FARIAS e PIEDADE, 2000; HEUZÉ et al., 2017).

Em relação a produção total de matéria seca, a espécie apresenta valores próximos a 99 ton/ha/ano (toneladas por hectare por ano) e teores de proteínas nas folhas em torno de 11,8% e nos colmos de 2,75% (PIEADADE, 1993). A produção de matéria seca no pico das cheias (julho) chegou a 8,48 ton/ha de matéria seca (MS) da parte aérea e 33,90 ton/ha de MS na parte submersa (BARBOSA, 2008).

Em relação ao manejo há registros de utilização em pastejo e como silagem, cortes muito baixos (abaixo de 40 cm) reduz o rendimento. A espécie suporta altas taxas de lotação com pastoreio rotativo com descanso de 45 dias. A utilização do fogo não é aplicável devido as condições úmidas, mas pode-se recuperar em incêndios moderados de caules e rizomas. Em regime de corte, as variedades canarana-ereçta-lisa, canarána-de-paramaribo (*E. polystachya*) constituíram nas mais promissoras para as condições de várzea alta do Amapá e apresentaram produções de matéria seca em torno de 17,5 toneladas de matéria seca por hectare/ano (SOUZA-FILHO et al., 1990). A variedade

canarana-de-paramaribo (*E. polystachya*) apresentou produção anual de 16,44 toneladas por hectare em intervalos de corte de 54 dias para (NASCIMENTO et al., 1988).

A adubação nitrogenada aplicada na terceira semana após o estabelecimento não melhorou significativamente o comprimento da planta, porém fez aumentar a produção de folhas com valores médios de 14 folhas para os tratamentos sob cortes e 12 folhas nos tratamentos sem cortes. O nitrogênio deve ser alocado em partes fotossinteticamente ativa das plantas devido proporcionar melhor produção foliar a cada corte (FARIAS e PIEDADE, 2000). A seca também pode afetar o crescimento das plantas. Esta ideia é reforçada por estudos associados que demonstram a fertilização nitrogenada e irrigação, estes estudos mostram que a água é um fator mais limitante para *E. polystachya* durante a fase terrestre (FARIAS e PIEDADE, 2000).

Em pastejo rotativo foi observado a produção de matéria seca de 2904 kg/ha/ano em amostragens de intervalo de 60 dias entre os cortes, com uma redução expressiva da produção, sugerindo que o tempo de pastejo de 12 dias e/ou o retorno a cada 40 dias constituíram um manejo inadequado (ABREU et al. 2006). Este fato deve ser levado em consideração, haja vista a relação entre a massa de forragem produzida e a carga animal, bem como a estrutura da pastagem que interferem diretamente no comportamento ingestivo do animal em pastejo, bem como a persistência da espécie vegetal quando em pastejo (MOTT, 1984; HOGDSON, 1995; DEL AGUILA, 2000).

Canarana respondeu bem as doses de adubação (250- 100- 80 kg/ha/ano de N-P-K, respectivamente), sendo a ureia aplicada após cada pastejo, e o melhor resultado foi a utilização de 3,55 UAs por hectare/ano em *E. polystachya*. Em relação as exigências nutricionais e na categoria animal em pastejo (zebuínos de sobreano) as gramíneas pesquisadas atenderam satisfatoriamente, aos requerimentos mínimos de proteína bruta exigidas pelos ruminantes, em todas as épocas de pastejo (18,15% em média de proteína bruta) e a digestibilidade “*in vitro*” apresentou variações ente de 55 a 63% (ABREU et al., 2006). Foram ainda encontradas variações de proteínas nas folhas em torno de 11,8% e 2,75% nos colmos, onde o vasto crescimento de aerênquima se apresenta como mecanismos fisiológicos característicos desta espécie semiaquática (PIEADÉ, 1993).

Em relação a produção de sementes viáveis, a baixa produção de sementes é um problema nas condições Amazônicas, devido principalmente ao ataque de larvas do Diptero da família Cecidomyidae. Também em Quesland (Austrália), nenhuma produção se sementes foi verificada. Estudos de germinação no Texas (USA), mostraram que as sementes colhidas de plantas cultivadas em campos em regimes parciais de inundação,

mostraram-se significativamente melhor (41% de germinação) do que a semente colhida de um plantio totalmente inundado. Testes de germinação de sementes colhidas de canarana cultivada na Lousiana (USA) apresentaram germinação de 70% e que as plântulas apresentaram bom vigor. No Texas, o capim canarana pode ter rendimentos de sementes de 110 kg/ha e uma média de 1.090.000 sementes/kg (BOTTOMS et al., 2006).

*E. polystachya*, embora classificada como forragem muito útil nos pântanos nativos da América tropical, é considerada como uma erva daninha ambiental potencialmente significativa em alguns outros países (HEUZÉ et al., 2017). Verifica-se nos trabalhos de Webster et al. (2007) e Griffin et al. (2008), entre outros, a importância do conhecimento da sua biologia nos programas de controle e manejo de plantas daninhas do arroz. Outra relevância se faz da despoluição de águas e solos contaminados.

O crescimento e o desenvolvimento de *E. polystachya* foi observado em solos contaminados sob a influência do petróleo, verificou-se a organização estrutural e os micro-organismos presentes na região rizosférica atuando na degradação dos hidrocarbonetos de petróleo (BIAZÃO, 2012). *E. polystachya* demonstrou tolerância ao solo contaminado com o petróleo e apresentou o desenvolvimento de estratégias morfofisiológicas características da espécie subaquática, como o aumento no teor de clorofila, na espessura do mesofilo e maior área de aerênquima para sua sobrevivência e, conseqüente, desenvolvimento quando cultivada em substrato contaminado com petróleo. Em tratamentos inoculados com micro-organismos (fungos e bactérias), observou-se o crescimento destes micro-organismos nas rizosferas das plantas que cresceram em substrato contaminado com petróleo (BIAZÃO, 2012; RIVERA-CRUZ et al., 2014). *E. polystachya* pode ser cultivada em sítios contaminados com petróleo, e a alta produção de sua biomassa possui potencial para contribuir com uma recuperação mais rápida de solos contaminados.

*Echinochloa polystachya* se constitui uma excelente alternativa para a produção pecuária na região amazônica, dado seu intenso crescimento e aceitação especialmente por búfalos, e gado bovino. Contudo, devido a sua grande importância para a região amazônica (BARBOSA, 2008) ainda existe poucas informações na literatura sobre diversos aspectos, como por exemplo, sobre o seu estabelecimento em terra firme, germinação, uso da espécie em plantios, a existência de ecotipos e desempenho agrônômico e sua produção em pastejo.

## 2.4. Propagação vegetativa in vitro

A propagação vegetativa in vitro ou micropropagação consiste em um processo pelo qual fragmentos vegetais (tecidos embrionários) são isolados dos organismos ou obtidas a partir destes, sendo assepticamente cultivadas em um meio de cultura apropriado sob condições favoráveis). Uma planta cultivada in vitro tem seu metabolismo heterotrófico (modificado e dependente de: água, macro e micronutrientes e carboidratos do meio para a síntese de de carbono). Tais características permitem aos tecidos, células e órgãos vegetais serem mantidos indefinidamente em cultura (PIERIK, 1988; QUISEN et al, 2008).

No cultivo de tecidos são fundamentais, para todas as suas técnicas, o explante (que é todo o tecido ou órgão vegetal), a assepsia, o meio nutritivo e os fatores ambientais: luz, temperatura, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e oxigênio (O<sub>2</sub>), segundo (CID, 2001). Para evitar a contaminação dos meios por impurezas minerais, todos os sais utilizados na sua preparação devem ser de qualidade analítica. A cultura de tecidos consiste em um processo biotecnológico de cultivo de órgãos, células ou tecidos vegetais em meio nutritivo apropriado, em condições ambientais assépticas (QUISEN e ANGELO 2008).

A partir do momento que se tem a matriz e objetivo de propagação clonal, é estabelecido um processo de desinfestação. É um processo para esterilizar a superfície do explante, livrando-o de fungos, bactérias e fungos. O processo utiliza-se de hipoclorito de sódio. O tempo, esquemas para aplicação e concentração de hipoclorito variam conforme tipo e idade do tecido. Após o processo de desinfecção, a cultura pode ser regenerada através de organogênese ou embriogênese somática. O processo organogênese busca estabelecer material a partir de partes dos órgãos vegetais, como brotos e/ou raízes. A indução trata em fazer as células, através de sua característica de totipotência, estabelecer processo caulinar, folhas e/ou raízes. O processo de embriogênese somática envolve o trabalho com os embriões das plantas propriamente ditos. Após o estágio de obtenção do indivíduo vegetal, é preciso estabelecer macropropagação e aclimatização. Neste período, a planta passa por processos de exposição ao ambiente externo, onde a umidade relativa é menor, tendo também variação das condições de luminosidade e temperatura (QUISEN e ANGELO 2008)

De maneira geral os meios de cultura são misturas balanceadas de macronutrientes, micronutrientes, carboidratos, vitaminas e reguladores de crescimento e que de maneira balanceada tem como objetivo o suprimento de suprir os nutrientes

exigidos para a manutenção e crescimento dos tecidos vegetais propagados in vitro bem como as condições químicas e físicas do meio são fatores preponderantes para o sucesso do cultivo in vitro. Em relação a composição dos elementos macro e microminerais exigidos, estes são em função dos requerimentos da cultura. O Meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) é o meio de cultivo mais utilizado na cultura de meristemas e regeneração de plantas e caracteriza-se pela elevada concentração de sais. Porém vários são os meios existentes, cujos elementos e concentrações variam de acordo com os mais variados tipos de tecidos vegetais e objetivos dos processos (QUISEN e ANGELO 2008). Na Tabela 1 pode ser visualizado a comparação entre as diferentes composições dos meios de cultivo.

**Tabela 1: Comparação da composição básica dos principais meios de cultivo.**

Componente	BS*	H	LS	MS	White*	WPM	SH
mg L <sup>-1</sup>							
<b>Macronutrientes</b>							
CaCl <sub>2</sub>	-	166,0	-	-	-	-	-
CaCl <sub>2</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	150,0	-	440,0	440,0	-	96,0	200,0
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . 4 H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	300,0	556,0	-
KCl	-	-	-	-	65,0	-	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	68,0	170,0	170,0	-	170,0	-
KNO <sub>3</sub>	2.500,0	950,0	1900,0	1900,0	80,0	-	2.500,0
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	-	-	-	990,0	-
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	250,0	185,0	370,0	370,0	720,0	370,0	400,0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	150,0	-	-	-	19,0	-	-
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	-	-	200,0	-	-
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	-	720,0	1650,0	1650,0	-	400,0	-
NH <sub>4</sub> Cl	-	-	-	-	-	-	300,0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	134,0	-	-	-	-	-	-
<b>Micronutrientes</b>							
CoCl <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O	0,025	-	0,025	0,025	-	-	0,1
CuSO <sub>4</sub>	-	-	-	-	-	-	-
CuSO <sub>4</sub> . 5 H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,025	0,025	0,001	0,25	0,2
Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	-	-	-	-	2,5	-	-
H <sub>2</sub> BO <sub>3</sub>	3,0	10,0	6,2	6,2	1,5	6,2	5,0
KI	0,75	-	0,83	0,83	0,75	-	1,0
MnSO <sub>4</sub> . 4 H <sub>2</sub> O	13,2	-	-	22,3	5,0	22,3	13,2
MnSO <sub>4</sub> . 4 H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	1,25	-	-
H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	0,25	0,25	0,25	0,25	-	0,25	0,1
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	2,0	10,0	8,8	8,8	3,0	8,8	1,0
ZnSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	27,8**	27,8	27,8	27,8	-	27,8	15,0
Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	37,2**	37,2	37,2	37,2	-	37,2	20,0
Na <sub>2</sub> EDTA . 2 H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	-	-	-
<b>Orgânicos</b>							
Ácido fólico	-	0,1	-	-	-	-	-
Ácido indol acético	1,0	5,0	-	0,5	-	-	5,0
Ácido nicotínico	-	0,05	-	-	-	-	-
Biotina	-	2,0	-	2,0 <sup>†</sup>	-	-	-
Glicina	100***	100	100	100	-	-	1000
Mio-inositol	1,0***	0,5	-	0,5	-	-	0,5
Piridoxina.hcl	10,0***	0,5	0,4	0,1	-	1,0 <sup>†</sup>	5,0
Tiamina.hcl	-	-	-	-	-	-	-

\*White (1963), <sup>†</sup> White (1937),  
 \*\*Originalmente 28 mg/l de FeDTPA,  
 \*\*\*Gamborg (1977) incluiu 1,3 mg L<sup>-1</sup> de nicotinamida; <sup>†</sup> Gamborg (1968); <sup>†</sup>Murashige e Skoog (1962) suplementado também incluiu 1g L<sup>-1</sup> de hidrolisado protéico.

Fonte: Quisen e Angelo (2008).

Como muitas células e tecidos vegetais não apresentam condições adequadas do meio como concentração de CO<sub>2</sub>, Luz e teores de clorofila, seu metabolismo se apresenta heterotrófico e são dependentes dos carboidratos como fonte de energia e que devem estar presentes no meio de cultivo. Muitos são as fontes de carbono utilizada, entre eles a lactose, a maltose, a galactose e o amido, no entanto são inferiores em produção de energia quando comparado a sacarose, que pode ser rapidamente hidrolisada a frutose e glicose (QUISEN e ANGELO 2008).

Devido a esta exigência de um aporte externo de carboidratos, a sacarose é geralmente a fonte de carboidratos mais comum utilizada para esta suplementação. Para verificar o requerimento de carboidratos em *Desmodium incanum*, Maldaner et al (2014) pode concluir que as diferentes concentrações de sacarose (0; 15; 30 e 45 g L<sup>-1</sup>), não influenciou a altura nem favoreceu o número de raízes, todavia a concentração de 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose favoreceu a emissão de brotações e o número de folhas de plantas e a produção de biomassa e que esta concentração de sacarose para esta espécie foi suficiente para a promoção do crescimento (QUISEN e ANGELO 2008).

Para orquídeas, pode verificar que o crescimento inicial de *Miltonia flavescens*, cultivada em quatro meios de cultivo com diferentes concentrações de sacarose, (25, 30, 35, 40 e 45g L<sup>-1</sup>) que o teor de massa fresca e a emissão de raízes dos explantes foram fortemente influenciados pelas concentrações de sacarose quando comparada ao tempo de cultivo (LEMES et al., 2016). Foi observado que concentrações entre 20 a 25 g L<sup>-1</sup> puderam favorecer o enraizamento e a maior quantidade da massa fresca da parte aérea em orquídeas. Desta forma pode-se deduzir que concentrações superiores a estas em meio de cultivo (para orquídeas) podem interferir na diminuição da absorção de sais e no conseqüente crescimento da planta (QUISEN e ANGELO 2008).

Pode-se perceber nestas informações a forte correlação entre o conteúdo de sacarose do meio de cultivo com a formação do sistema radicular, e que em dadas concentrações não somente podem prejudicar a formação do sistema radicular, como a emissão e crescimento da parte aérea. Meios de cultivo com altas concentrações de sais podem ser prejudiciais, inibindo o enraizamento inicial (LEMOS et al., 2002). Desta forma devem ser substituídos por meios com baixas concentrações de sais. O benefício destas baixas concentrações pode estar associado ao baixo requerimento de nitrogênio para a formação do sistema radicular (THORPE et al., 2008).

Outras substâncias como vitaminas e aminoácidos que são sintetizados pelas plantas devem ser incluídas no meio de cultivo para suprir suas demandas metabólicas.

De igual modo os fito-hormônios apresentam fundamental importância na regulação dos processos de crescimento e desenvolvimento dos vegetais e dentre os diversos reguladores de crescimento as citocininas são sintetizadas em raízes e brotações concomitante com outros fito-hormônios como a auxina. Assim a adição da citocinina exógena (Benzilaminapurina-BAP) torna-se eficiente nos processos de brotações, ao induzir o surgimento de gemas adventícias auxiliando desta forma os processos de brotação em culturas in vitro (QUISEN e ANGELO 2008; GRATTAPLAGIA e MACHADO, 1990).

A partir de calos oriundos de inflorescências de *Paspalum vaginatum* Swartz foi desenvolvido protocolo de propagação utilizando 1 mg/L<sup>-1</sup> de benzilaminopurina associadas a 2,4-diclorofenolacético e/ou 3,6-dicloro-2-acidometoxibenzoico (dicamba) puderam desta forma verificar os sucessos nas regenerações embriogênicas para futuras transformações genéticas nesta espécie (NEIBAUR et al., 2008). Em estudo semelhante, foi obtido sucesso na regeneração de calos originados de raízes em “vertiver grass” (*Vetiveria zizanioides* (L.) Nash) entre 85% a 90% utilizando a concentração média de BAP de 2,0 mg/L<sup>-1</sup> associados a outros fitoreguladores (SOMPORNPAILIN e KHUNCHUAY, 2016).

Estes resultados podem demonstrar que o BAP é um importante indutor de brotação e que quando associado a concentrações de outros produtos bioquimicamente ativos, promovem uma eficiente regeneração embriogênica, crescimento e maturidade, sendo desta forma importantes ferramentas para a cultura de tecido em seus mais diferentes objetivos. Em contrapartida quando aplicados na cultura do tomilho (*Thymus vulgaris* L) em concentrações de BAP entre 0, 1 e 2 mg L<sup>-1</sup> e três de concentrações de ANA (acidonafetalenoacético - 0, 0,25 e 0,5 mg L<sup>-1</sup>), adicionadas ao meio MS (com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol puderam concluir que as concentrações mais baixas de ANA e sem a adição de BAP proporcionou melhores condições fisiológicas como (o alongamento da parte aérea) no cultivo in vitro desta espécie. Assim a preconização de protocolos em doses adequadas para cada espécie deve ser investigado, uma vez que o seu excesso pode vir a ser fitotóxico, encurtando os entrenós (LANE, 1979; LESHEM et al., 1988; RUBIN et al., 2007).

As características físicas do meio, como a solidificação se relaciona diretamente com o sucesso do início da cultura in vitro e sua manutenção, haja vista que o meio, substrato para o tecido vegetal, deve apresentar condições propícias para a sustentação do explante a absorção das diversas substâncias nutritivas. Os meios de cultivo podem ser

semi-sólidos ou líquidos. Para a geilificação dos meios são utilizados vários produtos são utilizados e testados, como a agarose, amido, agar e fitagel, entre outros. O agar, produzido a partir de algas marinhas, é o agente geleificante utilizado com maior frequência (QUISEN e ANGELO 2008). Outro produto alternativo é a fitagel. Produto produzido a partir de da bactéria *Pseudomonas elodea*. Comparado ao Ágar, seu custo passa a ser menor, uma vez que é utilizado em doses significativamente menores, também seu grau de pureza é maior e apresenta um produto final mais translúcido (JAEGER et al., 2015)

Portanto, a técnica da micropropagação in vitro, bem como o sucesso de um protocolo de micropropagação oferece excelentes oportunidades para a propagação comercial de plantas, como também pode auxiliar em programas de melhoramento, possibilitando, neste caso, grande economia de tempo, facilita a obtenção de grande número de plantas, em curto espaço de tempo e em área reduzida de laboratório. Assim o sucesso da micropropagação in vitro pode ser medido principalmente pelas taxas de multiplicação no decorrer das repicagens e transplantes sucessivos que como conseqüências se somam as quantidades de mudas obtidas naquele intervalo de tempo. (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990; OLIVEIRA et al., 1991; PAIVA e GOMES, 1995).

Na agricultura, esta técnica tem se mostrado fundamental e em programas de melhoramento para obtenção de clones de cultivares de alta produtividade. Em particular em forrageiras de valor agrônômico a micropropagação in vitro tem sido muito utilizada em diversas espécies. Dentre os diversos objetivos podem ser citados: a conservação de germoplasma em capim elefante (VIDIGAL et al., 1998). Na duplicação e poliploidização de híbridos de *Brachiária*, *Paspalum notatum*, *Penisetum sp* e *Lolium sp*, entre outras (BARBOSA, 2004; PEREIRA, 2012). No aumento da variabilidade genética e regeneração, conservação e coleção de genótipos de interesse do gênero *Brachiária*, (CABRAL et al., 2003), na propagação de leguminosas nativas com potencial forrageiro (*Desmodium incanum*) (MALDANER, 2014) e na propagação clonal de palma forrageira (SILVA, 2017).

## **2.5. Indução de poliploidia**

Poliploidia é a existência de mais do que dois genomas, em um mesmo núcleo celular. Também células ou tecidos poliploides podem ocorrer em um organismo

diplóide, como napolissomatia, comum nas raízes das leguminosas. A poliploidia pode ocorrer na natureza em decorrência de um erro meiótico, gerado a partir da não redução do número cromossômico e produção de gametas com números cromossômicos de células somáticas ou pela endomitose ocorrida em células precursoras da meiose (WITTMANN e DALL'AGNOL, 2003). Neste último caso, células com genoma duplicado entram na fase de mitose, que ocorre de forma incompleta, não havendo o rompimento da carioteca, nem a divisão celular, o que produzirá células poliploides as quais, passarão ao processo de meiose (LEE et al., 2008).

Processos de indução artificial de poliploidização também podem ser realizados visando a junção de núcleos, através da fusão de protoplastos, ou com uso de agentes químicos capazes de atuar em diferentes pontos do ciclo mitótico. Os indivíduos poliploides podem ser originados pela duplicação de um mesmo genoma (autopoliploides), onde se espera uma alta frequência de multivalentes na meiose e herança polissômica (SYBENGA, 1992).

Quando ocorre a duplicação de genomas diferentes em híbridos, onde o pareamento cromossômico ocorre apenas entre os cromossomos do mesmo genoma em que se espera herança dissômica, estes indivíduos são chamados alopoliploides. Também existe os indivíduos intermediários, os poliploides segmentares que são formados pela duplicação dos genomas de espécies aparentadas. Estes indivíduos, ainda mantêm homologia suficiente entre seus cromossomos e desta forma pode ocorrer um pareamento parcial, onde formas variadas e intermediárias de herança são apresentadas, ou seja, dissômica para algumas características e polissômica para outras (STEBBINS, 1971; SYBENGA, 1992).

Os Poliploides são em geral bons colonizadores, podendo ocupar habitats pioneiros aos quais os progenitores diplóides não se mostram adaptados. As plantas poliploides, normalmente apresentam características superiores às plantas matrizes e desta forma gerando grande interesse sobre o material produzido (WITTMANN e DALL'AGNOL, 2003). Devido à baixa frequência da poliploidização natural, o uso de técnicas de indução artificial tem crescido nos programas de melhoramento genético, levando a um aprimoramento das técnicas (DHOOGHE et al., 2010).

A propagação vegetativa torna-se um importante e fundamental instrumento na indução a poliploidia, ao ser possível a produção de inúmeros propágulos de forma homogênea, para a imersão, ou aplicação dos indutores a poliploidia. Esta técnica auxilia

os programas de melhoramento uma vez que em em curto espaço de tempo um grande número de propágulos, podem ser obtidos (PAIVA e PAIVA, 2001).

As plantas podem ser induzidas a poliploidia via somática ou sexual. De maneira geral se induz a poliploidia através de um agente inibidor do fuso. As substâncias que induzem a poliploidia atuam sobre as fibras do fuso acromático durante a divisão celular, impedindo sua polimerização ou promovendo a sua fragmentação, e assim não permitem que ocorra a separação dos cromossomos. Desta forma, células iniciam o ciclo celular seguinte com a mesma quantidade de DNA duplicado. Dentre estes antimitóticos, o alcalóide colchicina é o mais conhecido e empregado. A aplicação pode ser feita, plântulas ou partes vegetativas com tecidos meristemáticos ativos, como afilhos e estolhos. Dentre os métodos sugeridos de aplicação da colchicina sempre existe a necessidade de ajustes e padronizações. Ainda é citado que tempos de aplicação em que soluções aquosas em tecidos com altas taxas de divisão celular (tecidos meristemáticos) e próximas de 0,2% de concentração e tempos de exposição entre 1 a 16 horas são aquelas que apresentam os melhores resultados (WITTMANN e DALL'AGNOL, 2003).

A colchicina, que é um alcalóide responsável por bloquear a divisão celular na metáfase e induzir a duplicação do número de cromossomos, gerando uma divisão celular incorreta que produz células com diferentes níveis de ploidia. Estas células podem ter seu número cromossômico multiplicado, produzindo indivíduos poliploides, que irão possivelmente apresentar características diferentes do material doador (EIGSTI e DUSTIN, 1955; DHOOGHE et al., 2010).

O efeito da colchicina está relacionado a sua capacidade em ligar-se aos dímeros de tubulina, impedindo a formação dos microtúbulos e conseqüentemente das fibras do fuso, importantes para a migração dos cromossomos aos pólos da célula durante a mitose (DHOOGHE et al., 2010). Extraída de sementes e bulbos de *Colchicum autumnale* L. (Liliaceae), esta substância teve seus primeiros relatos apresentados no “*Ebers papyrus*”, um documento egípcio preparado por volta de 1550 a.C., com sua utilização para tratamento de reumatismo e especialmente da gota. Apesar de seu amplo uso, a colchicina apresenta elevada toxicidade ao ser humano, e quando usada in vitro em altas concentrações, apresenta elevada fitotoxicidade, podendo acarretar em aumento da frequência de mixoploidia nas plantas regeneradas (VAN DUREN et al., 1996; GANGA e CHEZHIYAN, 2002; YEMETS e BLUME, 2008).

Plantas submetidas ao tratamento com colchicina, se bem sucedido, apresentam um aumento no número cromossômico que, em geral, é refletido pela célula, através do

aumento de seu volume que, por conseguinte, pode ser observado também com o crescimento de alguns órgãos da planta como tamanho das células dos estômatos, densidade de estômatos por área e diâmetro dos grãos de pólen são muito utilizados para identificar poliploides (GRANER, 1942; ARMSTRONG e ROBERTSON, 1960; SILVA et al., 2000; MORGAN et al., 2003), da mesma forma que o número de plastídios nas células dos estômatos (BINGHAM, 1968; BOAVENTURA et al., 1981).

Desta forma a poliploidia induzida pode ser um eficiente instrumento para programas de melhoramento genético e que pode ser empregada objetivando a poliploidia da própria espécie, como um modo de se tentar conseguir plantas maiores e melhores (DEWEY, 1980). Em particular a poliploidia, em plantas forrageiras de pastagens, torna-se uma estratégia muito interessante, uma vez que a produção da biomassa, o aumento das características de interesse agrônomo, tais como valor nutricional e produção de forragem, distribuição da produção de forragem de acordo com o ciclo vegetativo, resistência a pragas e doenças, tolerância a estresses abióticos são o foco principal (PEREIRA et al., 2012). Exemplos podem ser citados como os autotetraplóides de *Lolium perenne* e *Lolium multiflorum* e nos alopoliploides de *Lolium x Festuca* (EVANS, 1981; CARNAHAN e HILL, 1961). Estes e vários trabalhos demonstram que os poliploides podem ser extremamente produtivos, e em alguns casos, todavia a diminuição da fertilidade, refletida pela baixa produção de sementes, pode ser superada por seleção (WITTMANN e DALL'AGNOL, 2003).

A descoberta de agentes poliploidizantes, como a colchicina, e da capacidade deste agente em provocar alterações em componentes envolvidos no ciclo celular e indiretamente no material genético de diversos indivíduos e por consequência, refletindo na morfologia, despertou o interesse de geneticistas e de agricultores, visando a sua utilização para o melhoramento vegetal (DIXON e MALDEN, 1908; EIGSTI, 1938). Seguindo esta vertente, vários processos de indução de mutações artificiais foram desenvolvidos, visando acelerar o processo de mutação nos organismos, e consequentemente aumentar a variabilidade genética e aprimorar o processo de melhoramento vegetal (VAN-HARTEN, 1998).

Diversas cultivares vegetais têm sido desenvolvidas através do uso da colchicina em que apresentam características agrônomicas desejáveis e que atendem aos mais diversos ramos do mercado agrícola (EIGSTI e DUSTIN, 1955). Como exemplos, podem ser citadas plantas com características de resistência a adversidades ambientais, resistente ao estresse hídrico (NTULI e ZOBOLO, 2008), assim como variedades de flores e plantas

ornamentais, *Dendrobium nobile* (UNEMOTO et al., 2009), *Oncidium flexuosum* (VICHATO et al., 2007), *Heliconia bihail* (CAVALCANTI-FILHO, 2011). Para que experimentos na indução à poliploidia tenham resultados satisfatórios, existe a necessidade de testes para a espécie de interesse, utilizando desta forma, como uma ferramenta a micropropagação vegetativa e a padronização de protocolos de micropropagação vegetativa para espécie de interesse. *Paspalum notatum* é uma das mais importantes espécies das pastagens nativas do Sul do Brasil, e principal fonte forrageira para a pecuária desta região. Os ecótipos nativos são tetraploides e de reprodução apomítica, o que impede o registro e a proteção de cultivares. Porém, uma variedade cultivada, é diplóide e sexual (WEILER et al., 2015).

Para a obtenção de poliploides, plântulas de sementes *Paspalum notatum* var. *saurae* (cultivar Pensacola) foram colocadas em imersão com soluções de colchicina por tempo de exposição variável. Três plantas confirmaram número cromossômico tetraploide. Com relação as dosagens utilizadas e tempo de imerção, a dose e a duração da exposição à colchicina podem ser maiores no tratamento com sementes, já que em seu trabalho, doses de 0,10 e 0,15% por 24 h foram efetivas para obtenção de resultados em sementes, enquanto que as mudas foram influenciadas por 0,08% de colchicina por 6 h (WEILER et al., 2015).

Em trabalho com a indução de gengibre a colchicina, Adanya e Shirai (2001) distinguiram seus mixaploides entre dois tipos: aqueles que apresentaram células diploides e tetraploides em um mesmo primórdio foliar (explantes não induzidos) e aqueles que apresentaram ramos totalmente definidos como diploides ou tetraploides em uma mesma planta o que chamou de “quimeras setoriais” (explantes induzidos). Células diploides remanescentes apresentam taxas de divisão celular maior, apresentando desta forma uma proliferação superior às células poliploides, e por este motivo os tecidos podem apresentar reversão parcial ou total para a condição original após alguns ciclos de divisão (CARVALHO, 2000; GIACOMELLI, 2000; PAGLIARINI, 2001). Desta forma a estabilização dos setores e/ou da poliploidia em muitos casos somente é alcançado em sucessivas propagações clonais da quimera poliploidizada ou isolando as gemas das partes das plantas ou folhas comprovadamente poliploides (MEDRI e LLERAS, 1981; DERMEN e DILLER, 1992; PIO, 2008).

Respostas e eventos aleatórios que atuam na performance fisiológica das plantas comumente são observados devido a ação da colchicina como agente antimitótico. Os eventos moleculares que ocorrem como consequência desta ação de forma aleatória e

diferenciada em diferentes tecidos do órgão da planta exposta a estes agentes. Observa-se que a colchicina assim como outros agentes antimitóticos, agem de forma eficiente e células que estão em divisão e desta forma podem não agir de maneira uniforme em todas as células uma vez que estão em ciclos diferentes de divisão e/ou crescimento. Desta forma tecidos embrionários, explantes ou segmentos tratados respondem de maneira diferenciada. Além disto o mesmo tecido tratado com mesmas dosagens e tratamentos podem responder ao acaso e apresentar diferentes níveis de ploidia (DOLEZEL, et al., 1991; CARVALHO, 2005; DIAS 2016).

Ao ocasionar o funcionamento assíncrono dos eventos nucleares da célula, pela inibição da formação dos fusos mitóticos, os micronúcleos (porções de cromatina intracitoplasmática originadas pela quebra ou perdas de cromossomos inteiros, variando pela potencialidade da substância mutagênica e que podem estar envolvidos por enzimas que atuam no sistema de reparo celular das alterações cromossômicas). A colchicina apesar de sua afinidade pela tubulina vegetal ser inferior aos demais herbicidas antimitóticos e de provocar diversas alterações cromossômicas, ainda é considerada um dos agentes antimitóticos mais eficientes na inibição da polimerização dos microtúbulos, principalmente para gramíneas sendo este fator preponderante, para que comenta que a razão preferencial pela escolha desta substância para a poliploidização em gramíneas (HEDDLE et al., 1983; VERHOEVEN et al, 1990; MOREJOHN, 1991; HANSEN e ANDERSEN, 1996; BINSFELD, 2000; BARBOSA, 2004).

Todavia, despolimerização dos microtúbulos e a dinâmica da indução de micronúcleos indução causados por este antimitótico se torna uma ferramenta interessante a medida em que não somente a poliploidia pode ser induzida, objetivando a poliploidia da própria espécie, como um modo de se tentar através de mutações conseguir plantas maiores e melhores e também se torna uma fonte para a produção de protoplastos quando pretende-se isolar micronúcleos. As consequências mutagênicas são dependentes fundamentalmente, da eficiência da despolimerização dos microtúbulos da espécie que será usada, da eficácia do antimitótico usado para despolimerizar os microtúbulos, e também da disponibilidade de uma cultura celular que esteja em crescimento ativo e sincronizado (DEWEY, 1980; BINSFIELD, 2000).

Bisfield (2000) verificou a cinética da despolimerização dos microtúbulos e a dinâmica da indução de micronúcleos ao utilizar dois herbicidas com ação antimitótica, amiprofós-metil (APM) e oryzalin (ORY), em células de *Helianthus maximiliani*. A aplicação de ambos os herbicidas em células com ativo crescimento resultou num elevado

número de células com micronúcleos, em virtude das modificações mitóticas causadas pela ausência de microtúbulos. Para este autor o prolongamento do período de tratamento elevou a frequência de micronúcleos deformados, bem como aumentou a morte celular. Seus resultados confirmaram os de Hansen e Andersen (1996); Van Harten (1998) e concluem que os herbicidas APM e ORY, são potentes agentes antimitóticos, sendo capazes de despolimerizar rapidamente os microtúbulos promover a indução de elevado número de micronúcleos em protoplastos de *H. maximiliani*.

Rodrigues et al (2011) pode avaliar os efeitos de diferentes concentrações de colchicina (0; 1,25; 2,5 e 5,0 mM) e amiprofos-metil (APM) (0; 40 e 80  $\mu$ M) em períodos de exposição de 24 e 48. Foi constatado que ambos os agentes antimitóticos a que foram submetidos os híbridos de bananeira, resultaram em duplicação cromossômica de diplóides, obtendo desta forma diferentes porcentagens de plantas tetraploides, tanto para a colchicine como para o APM. Para o híbrido 1304-04 foi verificado 66,67% de plantas tetraplóides com o uso de APM (40  $\mu$ M por 24 ) e no genótipo 8694-15 de 18,18% plantas tetraplóides com o tratamento de 80  $\mu$ M por 48 h. Para colchicina, no genótipo 1304-04, apenas o tratamento de 1,25 mM por 48 h apresentou plantas tetraplóides a 25% e no genótipo 8694-15, a concentração de 5,0 mM por 48 h produziu 50% de plantas tetraplóides. Para Rodrigues et al (2011), observou que as dosagens utilizadas de APM tiveram um efeito menos tóxico em comparação com colchicinas.

## **2.6. Variabilidade genética em plantas forrageiras**

A variabilidade genética refere-se às variações dos genes entre indivíduos de uma população e determina o seu conjunto de características morfológicas e fisiológicas, tornando os capazes de se adaptar às mudanças ambientais. Esta pode ocorrer em nível de genes, de cromossomos ou genomas. Tem origem através de mutações e recombinações gênicas, sendo a matéria prima sobre a qual a seleção natural atua e corresponde a qualquer alteração no material genético de um organismo. Para que possa ser feita a caracterização e confirmação da variabilidade genética em nível de genes em indivíduos submetidos a algum processo de indução de mutação e duplicação cromossômica, é necessário a caracterização do conteúdo de DNA, determinação do nível de ploidia, podendo ser utilizado métodos diretos, como a contagem do número de cromossomos em células mitóticas e meióticas (GUERRA, 1989; VILLA, 1995). Contudo, este tipo de análise é um procedimento laborioso e demorado, que exige muita

técnica e conhecimento, sendo praticamente inviável quando se possui um grande número de amostras a serem quantificadas (VILLA, 1995; MAGALHÃES, 1996; SARI et al., 1999).

Os métodos indiretos podem ser utilizados para identificação do nível de ploidia como a caracterização morfológica e citoanatômica, que possibilitam o estudo das alterações estruturais como diâmetro do grão de pólen, número de cloroplastos por par de células-guarda, tamanho e densidade dos estômatos foliares. Dentre os métodos indiretos, a análise estomática é a mais citada na literatura para inferir o número de ploidia em plantas submetidas a indução de poliploidia (VILLA, 1995; MAGALHÃES, 1996; SOUZA e QUEIROZ, 2004). Porém, vários autores enfatizam que os métodos indiretos podem ser influenciados pelo ambiente e a análise individual de algumas variáveis poderá ocasionar a classificação equivocada de determinados genótipos quando se trata do nível de ploidia sendo necessário análises complementares (MAGALHÃES et al., 1996; SARI et al., 1999; SOUZA e QUEIROZ, 2004).

A associação entre o nível de ploidia e características morfológicas pode auxiliar na separação de plantas poliploides, principalmente porque essas características estão relacionadas com o aumento do tamanho das células, como resultantes da poliploidização. A diversidade de plantas na ordem Zingiberales e a conseqüente importância econômica de muitas espécies despertam o interesse da criação de novas cultivares, buscando aumentar a variedade e qualidade de seus produtos (BABU e RAVINDRAN, 2005; BERMÚDEZ-CARABALLOSO et al., 2010).

## **2.7. Caracterização dos estômatos**

Os estômatos são pequenos orifícios localizados principalmente na superfície das folhas e estão relacionados diretamente com a entrada de CO<sub>2</sub> e a perda de água viatranspiração, sendo o principal mecanismo regulador destes processos (AL AFAS et al., 2006; BUSSIS et al., 2006). A palavra estômato vem do grego (stoma) e significa boca, o nome se dá pelo fato de que suas estruturas, vistas ao microscópio, assemelham-se a pequenas bocas. É constituído pelo ostíolo, abertura responsável pelas trocas gasosas, por um par de células chamadas decélulas-guarda e um conjunto de células adjacentes às células-guarda, que se diferem ou não das demais células da epiderme. Quando as células na linha mais próxima das células-guarda (adjacentes) não se diferem das demais células

da epiderme, elas são chamadas de células vizinhas, mas quando estas células se diferenciam em textura, tamanho ou até mesmo em forma, são denominadas subsidiárias.

O conjunto formado pelo estômato, mais as células vizinhas ou subsidiárias, constitui o complexo estomático ou aparato estomático (METCALFE e CHALK, 1950; ESAU, 1960; TAIZ e ZEIGER, 2013). O póro estomático é formado entre duas células guarda, que são células especializadas da epiderme. No que tange a forma, estas células podem ser de dois tipos: reniforme (elípticas – comum na maioria das dicotiledôneas), e em forma de halter (mais comum em monocotiledôneas). Em comparações entre plantas diploides e tetraploides de *Dendrobium nobile*, observou-se que as plantas poliploides apresentaram menor crescimento quando comparadas com as diploides e conseguiram determinar o grau de ploidia utilizando as análises estomática e morfométrica (VICHATO et al., 2006).

Muitas vezes utiliza-se, incorretamente, o termo estômato para designar não apenas o poro estomático, mas também as células guarda e outras células adjacentes que formam o complexo estomático. Se as células adjacentes são morfologicamente diferentes das restantes células da epiderme chamam-se células subsidiárias e se são semelhantes denominam-se células vizinhas (WEYERS e MEIDNER, 1990). Os tipos estomáticos podem variar bastante entre diferentes grupos de plantas, mas, ocasionalmente, vários tipos estomáticos podem ocorrer em uma mesma planta dando origem ao polimorfismo (TIMONIN, 1986).

Plantas que apresentam polimorfismo estomático são também chamadas de heteroestomáticas e plantas que apresentam apenas um tipo de complexo estomático (ou somente um tipo estomático) é chamada de homoestomática (BARANOVA, 1992). O termo “heteroestomatocidade” deve ser usado para referir-se a dois ou mais tipos estomáticos ocorrendo na mesma folha e o termo “polimórfico” para descrever variações em um determinado tipo estomático, ou seja, no caso de haver diferenças estruturais no tamanho, textura e forma de qualquer parte de um mesmo tipo de complexo estomático (CAMARGO, 2009).

De acordo com o tipo de células subsidiárias em Dicotyledoneae, os estômatos podem ainda ser classificados como anomocítico (ausência de células subsidiárias), diacítico (presença de 2 células subsidiárias perpendiculares às células-guarda), paracítico (presença de 2 células subsidiárias paralelas às células-guarda) e anisocítico (presença de 3 ou mais células subsidiárias, sendo uma delas menor que as demais). Com base na disposição dos estômatos nas folhas, distribuem-se ao acaso quando a nervação é

reticulada, comum em Dicotyledoneae, e em arranjos lineares quando a nervação é paralela, caso de Monocotyledoneae. As células guarda só apresentam plasmodesmos entre elas e não apresentam qualquer tipo de conexão com as restantes células do complexo estomático. Assim, todos os compostos importados para o seu interior têm de atravessar a membrana plasmática. Esta característica do complexo estomático é extremamente importante em termos fisiológicos (CAMARGO, 2009).

Além dos estômatos a epiderme não apresenta espaços intercelulares. As paredes mais exteriores da epiderme e das células guarda apresentam cutícula que continua numa forma mais fina nas paredes ventral e laterais das células guarda, e nas paredes interiores das células da epiderme que limitam uma câmara subestomática (WEYERS e MEIDNER, 1990). Como a poliploidia causa nas plantas uma série de consequências fenotípicas como o aumento do número cromossômico, que normalmente repercute em aumento nas células, tecidos e órgãos vegetais e a análise estomática é uma metodologia fácil e simples, que possibilita a identificação de supostos poliploides e testemunhas diploides de um ensaio, através da contagem e medição comparativa de estômatos (VICHIAITTO et al., 2006) a caracterização do material pode ser realizada por comparações entre os estômatos dos poliploides com os de plantas diploides (normais).

Alterações no tamanho das células-guarda de estômatos de folhas de plantas tratadas com colchicina pode ser utilizada como característica indicativa da existência de poliploidia. Logo, diversos trabalhos de indução de poliploidia em vegetais utilizaram essa característica para selecionar putativos poliploides, como em *Manihot esculenta* (GRANER, 1942), *Cattleya intermedia* (SILVA et al., 2000), *Heliconia bihai* (CAVALCANTI-FILHO, 2011), *Centella asiática* (KAENSAKSIRI et al., 2011), *Gerbera jamesonii* (GANTAIT et al., 2011) e *Lagerstroemia indica* (WANG et al., 2012).

A densidade estomática (ou frequência estomática) de uma epiderme com estômatos pode variar muito dependendo da espécie, podendo chegar a 2 000 poros  $\text{mm}^{-2}$ , porém, a maioria das plantas possuem em torno de 40 a 350 poros  $\text{mm}^{-2}$ . Sua aferição é feita pela contagem do número de estômatos por área. Por meio da densidade estomática podemos calcular também o índice estomático, com a quantificação dos estômatos e das células epiteliais. Quando as células completam a sua diferenciação, o índice estomático torna-se independente do tamanho da folha, por esta razão, as estimativas tanto de densidade estomática quanto do índice estomático, são realizadas com folhas maduras (completamente expandidas). Quando se determina a densidade e a média da área dos

estômatos, então a área total dos poros estomáticos pode ser calculada como uma percentagem da área foliar. Este valor situa-se geralmente entre os 0.3 a 2 % se o diâmetro médio do poro for cerca de 6 mm (WEYERS e MEIDNER, 1990).

## 2.8. Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica que envolve a análise das propriedades óticas (dispersão da luz e fluorescência) de partículas (células, núcleos, cromossomos, organelas) que fluem em uma suspensão líquida (DOLEZEL, 1997). Esse princípio pode ser usado, por exemplo, para medir a quantidade de DNA de uma célula (DOLEZEL e BARTOS, 2005). Em plantas, é possível obter milhões de núcleos em suspensão a partir de poucos gramas de tecido foliar em um procedimento relativamente simples que envolve a maceração desse tecido em uma solução tampão que mantém a integridade nuclear (GALBRAITH et al., 1983). A coloração dessa amostra com corantes específicos para o DNA (DAPI, iodeto de propídeo, brometo de etídeo) permite ao aparelho estimar a quantidade de DNA (DOLEZEL e BARTOS, 2005).

A citometria de fluxo é uma técnica utilizada para contar, examinar e classificar partículas microscópicas suspensas em meio líquido em fluxo. Permite a análise de vários parâmetros simultaneamente através de um aparelho de detecção óptico-eletrônico. São possíveis análises de características físicas e químicas de uma simples célula. Desta maneira, podem ser realizadas análises quantitativas de DNA e revelar a ploidia de células em suspensão. A técnica de citometria de fluxo é uma poderosa ferramenta para o estudo de genomas vegetais e apresenta diversas aplicações. Espera-se que o número de aplicações práticas aumente e que a citometria de fluxo seja rotineiramente utilizada em estudos de melhoramento vegetal e taxonomia.

A análise por citometria de fluxo do conteúdo em DNA nuclear em células em interfase é uma excelente alternativa aos métodos clássicos de coloração e contagem de cromossomos ao microscópio (LOUREIRO e SANTOS, 2005). Comparativamente, a citometria de fluxo apresenta as seguintes vantagens: é mais conveniente (a preparação da amostra é fácil), rápida (processamento de dezenas de amostras num único dia), não necessita de células em divisão, é uma metodologia não destrutiva (uma amostra pode ser preparada a partir de 50 mg de tecido foliar) e é capaz de detectar mixoploidias (quimerismo).

Os resultados gerados pelas análises são apresentados em “histogramas” citométricos de fluxo, cujo conteúdo do DNA nuclear é apresentado no eixo das abscissas e o número de núcleos lidos por fluorescência se encontram no eixo das ordenadas. Para se fazer uma leitura consisa dos resultados visualizados deve-se ter em mente que durante o ciclo celular, a replicação do DNA é seguida pela distribuição equitativa do material

genético para as células filhas. Os eventos moleculares das plantas superiores, a divisão celular que resulta no crescimento da planta são processos cíclicos, que precede a mitose em um modelo de ciclo celular que pode se dividir em três fases, G1, S e G2. Na fase “G1” ocorre o crescimento celular, em que uma célula apresenta o conteúdo  $2n$ , descrito nesta metodologia como  $2C$  de DNA contido no núcleo, onde  $C$  equivale ao conjunto haploide de cromossomos). Na fase “S” ocorre a duplicação do conteúdo nuclear e na fase seguinte fase “G2” em que ocorre o segundo ciclo de crescimento celular em que a célula é mantida em um nível nuclear “ $4C$ ” procedido da mitose (M) em que a célula se divide originando assim a formação de duas células com conteúdo “ $2C$ ”. Desta forma os resultados observados pela citometria de fluxo através das folhas analisadas podem ser lidas um conjunto de pontos que pode ser visualizado em “histograma”, cujo pico dominante corresponde aos núcleos que se encontram na fase “G1” do ciclo celular e um pico menor correspondente aos núcleos que se encontram na fase “G2”. Como a distribuição do conteúdo celular corresponde a um total de células em diferentes fases de divisão e/ou crescimento, é apresentada uma parcela de conteúdo celular entre os picos. Assim o pico dominante correspondente aos núcleos que se encontram na fase G1 do ciclo celular pode ser comparada ao pico dominante G1 de uma planta padrão com o conteúdo nuclear conhecido (DOLEZEL, 1997; PLANCHAIS, et al 2000; DOLEZEL e BARTOS, 2005; LOUREIRO e SANTOS, 2005).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Induzir poliploidia em *E. polystachya* visando ampliar a variabilidade genética a fins de melhoramento vegetal dessa planta forrageira.

#### **3.2. Objetivos específicos**

Estabelecer um protocolo para a propagação in vitro para *E. polystachya*;

Realizar a indução a poliploidia em um genótipo de *E. polystachya* com diferentes níveis de colchicina;

Realizar mensurações do tamanho dos estômatos e a densidade estomática dos poliploides e;

Realizar análise de conteúdo de DNA por citometria de fluxo dos poliploides.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, E. M. A., FERNANDES, A. R., MARTINS, A. R.A., RODRIGUES, T. E. Produção de forragem e valor nutritivo de espécies forrageiras sob condições de pastejo, em solo de várzea baixa do rio Guamá. Acta amazônica, [s.l.], vol 36, n1, p. 11 – 18., mar. 2006.

ADANYA, S. e Shirai D, 2001. QYLWUR induction of tetraploid ginger (=LQJLEHURI; FLQDOH Roscoe) and its pollen fertility and germinability. Scientia Horticulturae. 88: 277–287.

ALCANTARA, G.B.; DIBAX, R.; OLIVEIRA, R.A.; FILHO, J.B.; DAROS, E. Plant regeneration and histological study of the somatic embryogenesis of sugarcane (*Saccharum* spp.) cultivars RB855156 and RB72454. Acta Scientiarum. Agronomy Maringá, v. 36, n. 1, p. 63-72, Jan.-Mar., 2014

AL AFAS, N.; MARRON, N; CEULEMANS, R. Clonal variation in stomatal characteristics related to biomass production of 12 Poplar (*Populus*) clones in a short rotation coppice culture. Environmental and Experimental Botany, v. 58, p. 279-286, dez. 2006.

ARMSTRONG, J.M.; ROBERTSON, R.W. Studies of colchicine induced tetraploids of *Trifolium hybridum* L. II. Comparison of characters in tetraploid and diploid. Canadian Journal of Genetics and Cytology, Ottawa, v. 2, n. 4, p. 371-378, Jul. 1960.

BABU, K. N.; RAVINDRAN, P. N. Ginger: The genus *Zingiber*. Boca Raton, Flórida, USA, CRC press, p. 551. 2005.

BARANOVA, M.A. Principles of comparative stomatographic studies of flowering plants. The Botanical Review, Bronx, v. 58, p. 49–99. Jan. 1992.

BARBOSA, S. Micropropagação e duplicação cromossômica de híbridos triplóides de capim-elefante e milho. Lavras, UFLA, tese, 119p. 2004.

BARBOSA, K. M. DO N; PIEDADE, M.T.F; KICHNER, F.F. 2008. Estudo Temporal da vegetação da várzea da Amazônia central. FLORESTA, Curitiba PR. v. 38. n 1. p. 89-96. 2008. Jan-mar. 2008

BERMÚDEZ-CARABALLOSO, I.; et al. Mutant plantains (*Musa* spp.) with height reduction obtained by in vitro mutagenesis. Euphytica, v. 176. p. 105-112. set.2010.

BIAZÃO, T. C. Utilização de *Echinochloa polystachya* (Kunth) Hitchc. (Poaceae) na fitorremediação de solo contaminado com petróleo. 61 f. Curitiba. 2012.

BINSFELD, P.C.; PETERS, J. A.; SCHNABL, H. Efeito de herbicidas sobre a polimerização dos microtúbulos e micronúcleos em protoplastos de *Helianthus maximiliani*. R. Bras. Fisiol. Veg., 12(3):263-272, 2000

BINGHAM, E. T. Stomatal chloroplasts in alfalfa at four ploidy levels. Crop Science, Madison, v. 8, p. 509-510, Fev.1968.

BOAVENTURA, Y. M. S.; MEDINA, D.M.; VIEIRA, M.J.F.R. Número de cloroplastos e nível de ploidia em espécies de Coffea. Revista Brasileira de Botânica, Ribeirão Preto, v. 4. p. 15-21. 1981.

BOTTOMS, S.L, WEBSTER, E.P, ZHANG, W, GRIFFIN, R.M, HENSLEY, J.B and LEVY R. 'Response of Creeping River Grass (*Echinochloa polystachya*) to rice production practices', Proceedings of the 59th Annual Meeting of the Southern Weed Science Society, 23–25 January 2006, San Antonio, Texas. 2006.

BUSSIS, D.; VON GROLL, V; FISAHN, J; ALTMAN, T. Stomatal aperture can compensate altered stomatal density in *Arabidopsis thaliana* at growth light conditions. Functional Plant Biology, São Paulo. v. 33. p. 1037–1043. nov. 2006.

CABRAL, G. B. et al. Introdução in vitro, micropropagação e conservação de plantas de *Brachiaria* sp. Comunicado Técnico, 101. 4 p. (). Brasília: EMBRAPA/CENARGEM, 2003.

CAMARÃO, A. P., MATOS, A. O., BATISTA, H. A. M. Teores minerais do capim canarana erecta lisa (*Echinochloa pyramidalis*) em três idades. Belém: EMBRAPA-CPATU, p. 12. (EMBRAPA/CPATU, Circular técnica, 54). 1988.

CAMARGO, M. A. B.; Características Estomáticas em Espécies Arbóreas da Amazônia Central. 52 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Dissertação) - Área de concentração Botânica. Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia. 87 f. Manaus: UFAM. 2009.

CARNAHAN, H.L.; HILL, D.H. Cytology and genetics of forage grasses. Botanical Review, New York. v. 27. p. 1-162. 1961

CARVALHO, J.F.R.P. Análise cariotípica e indução in vitro de poliploidia em Urucum (*Bixa Orellana* L). 174 p. (Tese de doutorado e, Genética e Melhoramento de plantas). Viçosa: UFV, 2000

CARVALHO, J.F.P.; CARVALHO, C.R.; OTONI, W.C. In vitro induction of polyploidy in annatto (*Bixa orellana* L.). Plant Cell Tiss Organ Cult. V.8. p. 69-75. 2005

CASTRO, E.M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. Histologia Vegetal: estrutura e função dos órgãos vegetativos. Lavras: UFLA, 234 p. 2009.

CAVALCANTI FILHO, G. J. F. Indução de Poliploidia in vitro com aplicação de *Heliconia bihai*. Trabalho de conclusão de curso (Dissertação) – Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 64 f. Jan. 2011.

CRUZ, C. D. Programa GENES: estatística experimental e matrizes. Viçosa: UFV. 2013

DEL AGUILA, D. C.W. Capacidad de carga y ganancia de peso de toretes cebuinos bajo pastoreo em *Echinochloa polystachya* em tropico humedo. Universidad Nacional Agrária de la selva Tingo Maria. Escuela de Posgrado. Maestría en Gestión de los Recursos

Naturales. Mención en Sistemas Agro-Silva-Pastoriles. Tesis para optar el grado de Magister Scientiae 56 f. Tingo Maria, Peru-2000.

DERMEN, H.; DILER, J.D. Colchicoidy of Chetnuts. *Forest Sci.* v.8 (1). p. 43-50. 1962.

DEWEY, D.R. Some applications and misapplications of induced polyploidy to plant breeding. In: LEWIS, W.H. *Polyploidy: biological relevance.* p. 445-469. New York: Plenum. 1980

DHOOGHE, Van Laere, K; S; Eeckhaut; T. Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 104, p 359–373. mar.2010.

DIAS, R.Z. Poliploidização induzida in vitro, como estratégia biotecnológica para otimização da cultura do eucalipto. Dissertação (Mestrado). USP- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”.65p. Piracicaba, 2016.

DIXON, W. E.; MALDEN, W. Colchicine with special reference to its mode of action and effect on bone marrow. *Journal of Physiology*, v. 37, p. 50-76, mai.1908.

DOLEZEL, J. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. *Phytochemical Analysis* 2: 143-154. 1991

DOLEZEL, J. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. *Journal of Applied Genetics*, Poznan, v. 38. n. 3. p. 285-302. 1997.

DOLEZEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany*, Oxford: Oxford University Press. v. 95. p. 99-110. 2005.

EIGSTI, O. J. A Cytological study of colchicine effects in the induction of polyploidy in plants. *Proceedings of the National Academy of Science United States of America*, v. 24, n. 2, p. 56-63, Feb. 1938.

EIGSTI, O. J.; DUSTIN, P. Jr. *Colchicine in agriculture, medicine, biology and chemistry.* Ames, Iowa, United States of America: The Iowa State College Press, 470 p. 1955.

ESAU, K. *Anatomy of seed plants.* John Willey & Sons: New York, 376 p. 1960.

EVANS, A. M. The production and identification of polyploids in red clover, white clover and lucerne. *The New Phytologist*, Oxford, v. 54, p. 149-162, 1955.

FARIAS, M.L; PIEDADE, M.T.F. Growth and biomass of *Echinochloa polystachya* (Poaceae) under nitrogen fertilization and different harvest treatments. *German-Brazilian Workshop on neotropical ecosystems; Living Resources Management*, p. 913-917. Hamburg 2000.

FOSSARD, R. A. de; BENNETT, M. T.; GORST, J. R.; BOURNE, R. A. Tissue culture propagation of *Eucalyptus ficifolia* F. Muell. **Combined Proceedings of Annual Meetings of the International Plant Propagators' Society**, Seattle, v. 28, p. 427-435, 1978.

FROTA, M.H.; CARNEIRO, M.S.; ZÁRATE, R.M.L.; CAMPOS, F.A.P.; PEIXOTO, M.J.A. Efeitos do BAP e do AIA na indução e no crescimento in vitro de brotos de dez clones de palma forrageira. **Revista Ciência Agronômica**, vol. 35, Número Especial, out., 2004: 279 - 283

GALBRAITH, D.W.; et al. Rapid flow cytometric analysis of the cell-cycle in intact plant tissues. *Science*, Washington, v. 220, p. 1049-1051, jun. 1983.

GANGA, M.; CHEZHIYAN, N. Influence of the antimetabolic agents colchicine and oryzalin on in vitro regeneration and chromosome doubling of diploid bananas (*Musa* spp.). *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, London, v. 77, n. 5, p. 572-575, mai. 2002.

GANTAIT, S MANDAL, N; BHATTACHARYYA S; DAS, P.K. Induction and identification of tetraploids using in vitro colchicine treatment of *Gerbera jamesonii* Bolus cv. Sciella. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, v. 106 (3), p. 485–493. set. 2011.

GIACOMELLI, F.R.B.; PAGLIARINI, M.S.; ALMEIDA, J.L. de. Elimination of micronuclei from microspore in Brazilian oat (*Avena sativa* L.0 variety). *Genetic Molecular biology*, v.23, n. 3, 2000.

GRANER, E.A. Notas sobre florescimento e frutificação da mandioca. *Bragantia*, Campinas, v.2, p.1-14, jan. 1942.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A.. Micropropagacao, 99-169. In: torres, A.C.; Caldas, L.S. (Eds.). *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília: Embrapa-CNPQ. 1990.

GRIFFIN, R. M, WEBSTER, E. P., ZHANG, W., BLOUIN, D.C. Biology and Control of Creeping Rivergrass (*Echinochloa polystachya*) in Rice. *Weed Technology* v. 22 (1):p. 1-7. 2008.

GUERRA, M. Introdução a citogenética geral. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. P. 142. 1989.

HANSEN. N.J.P.; ANDERSEN, S.B. Chromosome doubling potencial of colchicines, oryzalin, trifluralin, and APM in *Brassica napus* microspore culture. *Euphytica*. V.88, n. 2, p. 159-164, 1996

HEDDLE, J. A.; HITE, M.; IRKHART, B.; MACGREGOR, J. T. E.; SALAMONE, M. F. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity a measure of the US environmental protection agency gene-tox program, *Mutation Research* 123 (1983) 61-118.

HEUZÉ V., TRAN G., GIGER-REVERDIN S., LEBAS F., 2017. German grass (*Echinochloa polystachya*). Feedipedia, a programme by INRA, CIRAD, AFZ and FAO. <https://www.feedipedia.org/node/449>. Last updated on April 26, 2017.

HITCHCOCK, A. S. Manual of the grasses of the United States. USDA. Washington. US. Dep. of Agriculture. P. 1040. 1935.

HITCHCOCK, A.S. Manual of the grasses of the West Indies. Washington DC. US Dep. of Agriculture. Miscellaneous. Division of Plant Exploration and Introduction. p.243-493. Washington, D. C. nov 1936

HODGSON, J. The significance of sward characteristics in the management of temperate sown pastures. International Grassland Congress, 15. Kyoto. Proceedings. p. 31-34. 1985.

ISHIGAKI, G.; GONDO, T.; SUENAGA, K; AKASHI, R. Multiple shoot formation, somatic embryogenesis and plant regeneration from seed-derived shoot apical meristems in ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*). **Grassland Science**. v.55, n.1; p.46-51. 2009.

JAEGER PA, MCELFRISH C, WONG LR, IDEKER T. Beyond agar: gel substrates with improved optical clarity and drug efficiency and reduced autofluorescence for microbial growth experiments. *Appl Environ Microbiol* 81:5639 –5649. 2015.

KAENSAKSIRI T.; SONTORNCHAINAKSENG P., SOONTHORNCHAREONNON N.; PRATHANTURARUNG S. In vitro induction of polyploidy in *Centella asiatica* (L.) Urban. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* v. 107, p. 187–194, nov.2011.

LANE, W.D. **Regeneration of pear plants from shoot meristem: tips**. *Plant Science Letters*, 16: 337-342. 1979.

LEE, G. J.; CHUNG, S.J.; PARK, I. S.; LEE, J.S.; KIM, J.B.; KIM, S.D.; KANG, S.Y. Variation in the Phenotypic Features and Transcripts of Color Mutants of *Chrysanthemum* (*Dendranthema grandiflorum*) Derived from Gamma ray Mutagenesis. *Journal of Plant Biology*. v. 51. n. 6. p. 418-423. nov. 2008.

LEMES, C.S.R.; SORGATO, J.C., SOARES, J.S.; ROSA, Y.B.C.J. Meios de cultivo e sacarose no crescimento inicial in vitro de *Miltonia flavescens*. **Ciência Rural**, v.46, n.3, mar, 2016.

LEMO, E.E.P.; FERREIRA, M.S.; ALENCAR, L.M.C.; NETO, C.E.R. Conservação in vitro de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa agropecuária brasileira..**, Brasília, v. 37, n. 10, p. 1359-1364, out. 2002.

LESHEM, B.; WERKER, E.; SHALER, D.P.. The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. *Anais of Botany*. 62: 271-276, 1988.

LOUREIRO, J.; SANTOS, C. Métodos em Biotecnologia - Citometria de Fluxo I. Aplicação da Citometria de Fluxo ao estudo do Genoma Vegetal. *Boletim de Biotecnologia*. Jan/2005. LUZ, P. B.; et al. Cultivo de flores tropicais. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte. v. 26. n. 227. p. 62-72. 2005.

MALDANER, J.; SCHWALBERT, R.; STEFFEN, P.K.; SALDANHA, C.W.; MORAIS, R.M. Efeito de concentrações de sacarose na morfogênese in vitro de *Desmodium incanum* DC. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.19; p.846. 2014.

- MAGALHÃES, E. Determinação cito-morfológica do nível de ploidia de clones de batata (*Solanum tuberosum* L.) obtidos por cruzamentos interespecíficos. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 20. n. 4. p. 480-484. out-dez. 1996.
- MARTIN, L.C.T. *Bovinos-Volumosos suplementares*. P.143. São Paulo: Nobel, 1997.
- MEDRI, M.E.; LLERS, E. Comparação anatômica entre folhas de um clone diploide (LAN 873) e dois clones poliploides (IAC 207, 222) de *Hevea brasiliensis* Mull. Arg. *Acta. Amaz.* V.11. (1). 35-47.p. 1981
- MENGARDA, L.H.G.; POVOAS, L.; DEBIASI, C.; PESCADOR, R. Estado físico do meio de cultura na propagação in vitro de bromeliaceae. *Scientia Agraria*, Curitiba, v.10, n.6, p.469-474, Nov./Dec. 2009
- METCALFE, C. R.; CHALK, L. *Anatomy of the dicotyledons*, Clarendon Press, Oxford, v. 2. p. 96. 1950.
- MOREJOHN, L.C.; FOSKET, DE. The biochemistry of compounds with anti-microtubule activity in plant cells. *Pharmacology & Therapeutics*. Volume 51, Issue 3, Pages 377-40. 1991.
- 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. v. 31. p. 65- 68, fev. 2003.
- MOTT, G.O. Relationship of available forage and animal performance in tropical grazing systems. IN: *FORAGE AND GRASSLAND CONFERENCE (1984: Houston, texas)*. Lexington: American Forage and Grassland Council. p.373-377. 1984
- MURASHIGE, T, SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962
- NASCIMENTO, C.N.B; CAMARÃO, A.P.; SALIMOS, E.P. Avaliação de gramíneas forrageiras em área de mangue da ilha de Marajó. Belém: EMBRAPA – CPATU. p 18. (Boletim de Pesquisa, 93). 1988
- NEIBAUR, I.; GALLO, M.; ALTPETER, F. The effect of auxin type and cytokinin concentration on callus induction and plant regeneration frequency from immature inflorescence segments of seashore paspalum (*Paspalum vaginatum* Swartz). ***In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant***. v.44, n.xx; p.xxx. December, 2008
- NTULI, R.; ZOBOLO, A. M. Effect of water stress on growth of colchicine induced polyploid *Coccinia palmata* and *Lagenaria sphaerica* plants. *African Journal of Biotechnology*. v. 7, n. 20. p. 3548-3652. out. 2008.
- OLIVEIRA, E.T. DE, GROTHGE, M.T. GONÇALVES, A.N., et. Al. Micropropagação de *Pinus* tropicais. In: CROCOMO, O.J., SHARP, W.R., MELO, M. eds. *Biotechnologia para a produção vegetal*. Piracicaba: CEBTEC/FEALQ. p. 355-370. 1991

PAGLIARINI, M.S. Citogenética aplicada ao melhoramento. In. NASS, L. L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. Recursos genéticos e melhoramento. Rondonópolis: Fundação mato Grosso, p. 871-910; 2001.

PAIVA, H. N.e GOMES, J. M. Propagação vegetativa de espécies florestais. Viçosa, MG: UFV. 40 p. (Boletim, 322). 1995.

PAIVA, R, PAIVA. P.D.O., CULTURA DE TECIDOS. - Curso de Pós-Graduação "Lato Sensu" Especialização a Distância: Biotecnologia: Fundamentos Técnicos, Aplicações e Perspectivas. p. 97. UFV – FAEPE. 2001

PEREIRA, F. R. A. Caracterização morfoagronômica e molecular de meio irmãos de *Heliconia bihai* L., *H. chartacea* Lane ex Barreiros e *H. walgueriana* Petersen. 56 f. Trabalho de conclusão de curso (Dissertação) – Agronomia, Universidade Federal Rural do Pernambuco, Recife. fev. 2012.

PIEIDADE, M. T.F., Biologia e Ecologia de *Echinochloa Polystachya* (H.B.K.) Hitchcok (Graminea=Poaceae), capim semi-aquático da várzea amazônica. *Acta Limnológica Brasiliensia*. v.1. p. 173-185.1993.

PIERIK, R.L.M. Handicaps for the large scale commercial application of micropropagation. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.230, p.63-71, 1988

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

PITTAWAY, P.A.; WILDIN J.H. AND MCDONALD, C.K. Beef production from ponded pastures. *Tropical Grassland Society of Australia Occasional Publication*. n. 7. 1996.

PLANCHAIS, S. GLABB, D.I.; BERGOUNIOUXB, C. Chemical inhibitors: a tool for plant cell cycle studies. *FEBS Letters*. v. 476.p. 78 – 83. 2000.

Quisen R C e Angelo P C S 2008. Manual de procedimentos do laboratório de cultura de tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental. Embrapa Amazônia Ocidental, 61, 44 p. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/47132/1/Doc-61-A5.pdf>

RIVERA CRUZ, M. D. C. R. CARMEN, CERRATO, R. F. GARCIA, P. S.S, HALLER, V.V. LENARES, L.F, VAZQUEZ, R.R. Descontaminación de suelos com Petróleo crudo mediante microorganismos autóctonos y pasto Alemán. *Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchc. v. 38: p. 12. 2014.

RUBIN, S.; MADRUGA, C.S.; BANDIRA, M.B; RIBEIRO, M.V.; BETNITZ, L.C.; PETERS, J. A.; BRAGA, E.J.B. Reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de *Thymus vulgaris* L. Nota científica. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 480-482, jul. 2007

RODRIGUES, F.A.; SOARES, J.D.R. SANTOS, R.R.; PASQUAL, M.;SILVA, S.O. Colchicine and amiprofos-methyl (APM) in polyploidy induction in banana plant. *African Journal of Biotechnology* Vol. 10(62), pp. 13476-13481, 12 October, 2011.

SARI, N.; ABAK, K; PITRAT, M. Comparison of ploidy level screening methods in watermelon: *Citrullus lanatus* (Thunb.). *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v. 82, n. 3-4, p. 265-277, dez. 1999.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Poliploidia e seu impacto na origem e evolução das plantas silvestres e cultivadas. *Revista Brasileira de Agrociência*. v. 10. n. 2. p. 151-157. abr-mai. 2004.

SILVA, J.P.G.S.; COSTA, T.P.D.; COSTA, M.K.C.; ARAÚJO, M.R.S.; ARAÚJO, K.S.; SILVA, A.C.M.; OLIVEIRA, P.C.; SAI, E.F. Efeito da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) sobre o estabelecimento in vitro de segmentos nodais de *Rosa* sp. *Agroecossistemas*, v. 9, n. 2, p. 370 – 380, 2017.

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*, Santa Maria, v. 30. p. 105-111. Jan-Mar. 2000.

SOUZA FILHO, F; SILVA, A.P. PIMENTEL, D. M. Avaliação de gramíneas forrageiras em área de Macapá. (. Boletim de Pesquisa, 07). EMBRAPA-UEPAE de Macapá, p.16 1990.

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

SOMPORNPAILIN, K; KHUNCHUAY, C. Synergistic effects of BAP and kinetin media additives on regeneration of vetiver grass (*Vetiveria zizanioides* L. Nash) . *Australian Journal of Crop Science*. v.10. n. 5 p. 726-731. 2016

STEBBINS, G.L. Chromosomal evolution in higher plants. p.216. Reading: Addison-Wesley, 1971

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 5. ed. Artmed, p. 954. 2013.

TIMONIN, A. K. On the taxonomic value of stomatal characteristics and evolution of the stomatal complexes in flowering plants. *Bjull. Moscovsk. Byulleten' Moskovskogo Obshchestva Ispytatelei Prirody. Otdel Biologicheskii*. v. 91, p. 72–81. 1986.

THORPE, T. et al. The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotic and pH effects and support systems. In: GEORGE, E.F. et al. *Plant propagation by tissue culture*. 3.ed. v.1, 501p. Netherland: Springer, 2008.

UNEMOTO, L. K.; et al. Sobrevivência e diferenciação de protocormos de *Oncidium flexuosum*. *Acta Scientiarum. Agronomy*. Maringá, v. 31. n. 3. p. 503-508. 2009.

VAN DUREN, M.; et al. Induction and verification of autotetraploids in diploid banana (*Musa acuminata*) by in vitro techniques. *Euphytica*, v. 88. n. 1. p. 25-34. 1996.

- VAN HARTEN, A. M. Mutation breeding: theory and practical applications. Ucraina: Cambridge University Press. p. 353. 1998.
- VERHOEVEN, H.A.; RAMULU, K.S. & DIJKHUIS, P.A. comparison of the effects of various spindle toxins on metaphase arrest and formation of micronuclei in cell-suspension cultures of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Planta*, 182:408-411, 1990
- VIDIGAL, M.C.; PASSOS, L.P.; SILVA, J.L.O. Conservação in vitro do germoplasma de capim-elefante por meio da micropropagação de meristemas axilares. *Ciência Rural*. v.28. n.3. p. 379-385. S. Maria, 1998.
- VICHIATO, M. R. M.; et al. Análises estomática e morfométrica de folhas de plantas diplóides e tetraplóides de *Dendrobium nobile* Lindl. *Revista Ceres*. v. 53. n. 310. p. 541-548. nov-dez. 2006.
- VICHIATO, M. R. M.; VICHIATO, M.; PASQUAL, M.; CASTRO, D.M.; DUTRA, L.F. Indução e identificação de tetraplóides em *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). *Revista Ciência Agronômica, Fortaleza*, v. 38, n. 4. p. 385-390, out-dez. 2007.
- VILLA, V. B. Análise citomorfoanatômica e eletroforética de híbridos de *Solanum tuberosum* L. X (*Solanum tuberosum* L. X *Solanum chacoense* Bitt). 76 f. Trabalho de conclusão de curso (Dissertação) - Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade Federal de Lavras, Lavras. 1995.
- WANG, C.; LEI, J. In vitro induction of tetraploids from immature embryos through colchicine treatments in *Clivia miniata* Regel. *African Journal of Agricultural Research, Nigeria*, v.7. n.25. p. 3712-3718. jul. 2012.
- WEBSTER, E. P. GRIFFIN, R. M, BLOUIN, D.C. Managing creeping rivergrass (*Echinochloa polystachya*) Herbicide Programs for Managing Creeping Rivergrass (*Echinochloa polystachya*) in Rice. n 7. p. 85. 2007.
- WEILER, R. L, KRYCKI, K. C, GUERRA, D. CARINE SIMIONI, C., DALL'AGNOL, M. Chromosome doubling in *Paspalum notatum* var. saure (cultivar Pensacola). *Crop Breeding and Applied Biotechnology* v. 15. p. 106-111. Brazilian Society of Plant Breeding. 2015
- WEYERS, J. D. B.; MEIDNER, H. *Methods in Stomatal Research*. Longman Scientific and Technical, Essex. p. 233. 1990.
- WITTMANN, M. T. S, DALL'AGNOL, M. Indução de poliploidia no melhoramento de plantas. *Pesq. Agrop. Gaúcha*. v. 9. n. 1-2. p. 155-164. 2003
- YEMETS, A. I.; BLUME, Y. B. Progress in plant polyploidization based on antimicrotubular drugs. *The Open Horticulture Journal*. v.1. p.15-20 15. Out. 2008.

## **CAPITULO I - Introdução e multiplicação in vitro de *Echynochloa polystachya* (Kunth) Hitchc**

### **Resumo**

O objetivo do trabalho foi realizar a introdução de *Echynochloa Polystachya* in vitro, para estabelecer um protocolo de propagação para trabalhos que envolvam seleção de genótipos superiores e o cultivo da espécie. Foram coletados colmos de *E. Polystachya* no município de Manaus. Três perfilhos contendo três a quatro nós cada, foram seccionados para uma pré limpeza, pré-asepcia e retirada da bainha foliar e material senescente foram submetidos ao processo de desinfestação conforme proposto por Passos e köpp (2010). Em seguida, foram inoculados tubos de ensaio individuais contendo o meio de cultura inicial: 15 mL do meio Murashige e Skoog (1962) com metade das concentrações dos sais, isento de reguladores de crescimento, acrescido de 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, BAP 4,5 ml.L<sup>-1</sup>, do biocida PPM na concentração de 2 ml.L<sup>-1</sup> e de 2 g.L<sup>-1</sup> de Fitagel e corrigido para pH 5,8 antes da autoclavagem. trinta dias após, os explantes foram repicados e transferidos para novos tubos individuais com novos meios de cultura iguais ao meio inicial e verificados as taxas de brotação e contaminação. Também experimentos foram realizados para se avaliar os efeitos das concentrações de sacarose, BAP sobre a taxa de perfilhamento dos explantes. Cada tratamento foi constituído de duas repetições com cinco explantes por repetição em um total de 10 plantas por tratamento. Constatou-se que ao decorrer as sucessivas repicagens houve a diminuição dos internódios e a consequente perda do vigor. A partir do aumento do teor de sacarose a partir de 45 g/L-1 houveram respostas na taxa de multiplicação. Foi observado que as doses de BAP e sacarose interferiram no desenvolvimento e multiplicação do cultivo in vitro e que os teores de sacarose, quando em conjunto a outro estimuladores de crescimento, como no caso da citocinina exógena (Benzilaminapurina-BAP) é prejudicial devido ao excesso encurtando os entrenós. O estado fisiológico dos explantes para a espécie em estudo foi intrinsecamente atrelado aos teores de sacarose utilizados para o meio de cultivo e as concentrações de BAP. Desta forma, os valores das concentrações de sacarose e BAP sugeridos para o cultivo in vitro de *E. Polystachya* devem ser ajustados no decorrer das sucessivas repicagens.

**Palavras-chave:** Micropropagação, canarana verdadeira, cultura de tecidos, reguladores de crescimento vegetal, sacarose e BAP.

### **Abstract**

The objective of the work was to perform the introduction of *Echynoclhoa Polystachya* in vitro, to establish a propagation protocol for works involving the selection of superior genotypes and the cultivation of the species. *E. Polystachya* stalks were collected in the municipality of Manaus. Three tillers containing three to four nodes each, were sectioned for pre-cleaning, pre-aseptic and removal of the leaf sheath and senescent material were submitted to the disinfection process as proposed by Passos and Köpp (2010). Then, individual test tubes containing the initial culture medium were inoculated: 15 mL of Murashige and Skoog (1962) medium with half the concentrations of the salts, free of growth regulators, plus 30 g L<sup>-1</sup> sucrose, BAP 4.5 ml L<sup>-1</sup>, of the biocide PPM in the concentration of 2 ml L<sup>-1</sup> and 2 g L<sup>-1</sup> of Fitagel and corrected to pH 5.8 before autoclaving. thirty days later, the explants were harvested and transferred to new individual tubes with new culture media equal to the initial medium and the budding and contamination rates were checked. Experiments were also carried out to evaluate the effects of sucrose, BAP concentrations on the tillering rate of explants. Each treatment consisted of two repetitions with five explants per repetition in a total of 10 plants per treatment. It was found that during the successive peaks there was a decrease in internodes and the consequent loss of vigor. From the increase in the sucrose content from 45 g L<sup>-1</sup>, there were responses in the multiplication rate. It was observed that the doses of BAP and sucrose interfered in the development and multiplication of in vitro culture and that the sucrose levels, when together with other growth stimulators, as in the case of exogenous cytokinin (Benzylaminapurine-BAP), is harmful due to the excess shortening internodes. The physiological state of the explants for the species under study was intrinsically linked to the sucrose levels used for the culture medium and the BAP concentrations. Thus, the values of sucrose and BAP concentrations suggested for the in vitro cultivation of *E. Polystachya* must be adjusted during the successive subcultures.

**Keywords:** Micropropagation, true canarana, tissue culture, plant growth regulators, sucrose and BAP

## Introdução

A propagação vegetativa *in vitro* ou micropropagação pode ser definida como um processo pelo qual fragmentos vegetais (tecidos embrionários) são isolados dos organismos ou obtidas a partir destes, sendo assepticamente cultivadas em um meio de cultura apropriado sob condições favoráveis (AMARAL e SILVA, 2003). Uma planta cultivada *in vitro* tem seu metabolismo heterotrófico (modificado e dependente de: água, macro e micronutrientes e carboidratos do meio para a síntese de de carbono) (PIERIK, 1988). A propagação vegetativa é dita também assexuada e nela os tecidos, células e órgãos vegetais são multiplicados indefinidamente.

Diante da possibilidade de se obter plantas completas a partir do cultivo de tecidos ou órgãos vegetais, a micropropagação *in vitro* se apresenta como uma importante ferramenta no melhoramento de plantas, uma vez que além da multiplicação massal, da economia de tempo e espaço, pode-se obter indivíduos com características genéticas idênticas a matriz original além do fato de ser uma estratégia interessante e eficiente na conservação de plantas (OLIVEIRA et al., 1991; PENCE, 2011).

*Echinochloa polystachya* se constitui uma excelente alternativa para a produção pecuária na região amazônica, dado seu intenso crescimento e aceitação especialmente por búfalos, e gado bovino. Contudo, devido a sua grande importância para a região amazônica (BARBOSA, 2008) ainda existe poucas informações na literatura sobre diversos aspectos, como por exemplo, sobre o seu estabelecimento em terra firme, germinação, uso da espécie em plantios, a existência de ecotipos e desempenho agrônomico e sua produção em pastejo. O estabelecimento de um protocolo para a micropropagação de *Echinochloa polystachya* (canarana verdadeira) mostra-se uma alternativa o cultivo da espécie, haja vista o seu potencial produtivo, sua importância regional e somando a escassez de pesquisas relacionadas à identificação de genótipos superiores com espécies nativas de pastagens no estado do Amazonas. Até o presente momento não se encontra registros de trabalhos que abordem o tema proposto em Canarana, e assim o objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo eficiente para o cultivo *in vitro* de *Echinochloa polystachya*.

## Material e métodos

### Estabelecimento in vitro

Para realização dos experimentos de estabelecimento e multiplicação in vitro, foi coletado um colmo inteiro de canarana no município de Manaus (3°06'56.3"S 60°02'01.9"W). O colmo coletado foi levado para ser plantado em vasos e mantidos em viveiro na Embrapa Amazônia Ocidental para a manutenção do genótipo a ser utilizado nos experimentos in vitro. A retirada dos explantes para inoculação in vitro foi realizada após a emissão de perfilhos, utilizando perfilhos contendo de 3 a 4 nós cada. Os perfilhos foram seccionados e levados para o laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Amazônia Ocidental, onde passaram pela fase de pré limpeza e desinfestação inicial, retirada da bainha foliar e material senescente e obtidos os seguimentos nodais que foram utilizados como explantes para inoculação do genótipo in vitro. Após a fase inicial, os segmentos nodais foram levados para a camara de fluxo laminar, previamente esterelizada (luz UV), onde foram submetidos ao processo de desinfestação conforme proposto por Passos e Köpp (2010) (adaptado), constituído de imersão em álcool 70% por 2 min, seguido por uma solução de hipoclorito de cálcio 50% ( $\text{CaCl}_2 \text{O}_2$ ) por 15 min. Após a desinfestação os explantes foram lavados três vezes em água destilada autoclavada, em seguida, com ajuda de bisturis e pinças os segmentos nodais foram reduzidos a 1,0 cm de tamanho e inoculados individualmente em tubos de ensaio com dimensões de 150 mm x 25 mm contendo 15 mL do meio Murashige e Skoog (1962).

Na introdução in vitro foi utilizado o meio de cultura, MS, formulado por Murashige e Skoog (1962), com 50% da concentração de sais minerais (MS-50), acrescido de  $4,5 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP,  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose,  $2 \text{ mL L}^{-1}$  do biocida PPM e  $2 \text{ g.L}^{-1}$  do agente solidificante Fitagel e isento de reguladores de crescimento. Por ocasião do preparo do meio de cultivo, o pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. Após a inoculação o material foi mantido no escuro a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , durante oito dias, em seguida, passaram a um ambiente com fotoperíodo de 16 h, a uma intensidade de 90 a 110  $\text{mols m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

## Multiplicação in vitro

Após 30 dias de cultivo in vitro, para indução de brotações e multiplicação do material, os explantes foram transferidos para meio de cultura MS, com concentração integral de sais minerais (MS-100), acrescido de 4,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 2 mL L<sup>-1</sup> do biocida PPM e 2 g.L<sup>-1</sup> do agente solidificante Fitagel e isento de reguladores de crescimento. Por ocasião do preparo do meio de cultivo, o pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. Nesta fase de multiplicação do material in vitro, foram realizadas repicagens a cada 20 dias, e inoculados em novos meios de cultivo MS-100 para a propagação do material e contagem do número de brotações por explante.

Com o material estabelecido in vitro foram realizados experimentos para avaliar o efeito do agente solidificante fitagel, da concentração da sacarose no meio de cultura, do regulador de crescimento benzilaminopurina (BAP).

## Efeito da concentração da sacarose na multiplicação in vitro

No experimento para avaliação do efeito da sacarose foram utilizados explantes provenientes da fase da multiplicação in vitro. Os explantes foram submetidos a 6 níveis de sacarose (0 g.L<sup>-1</sup>, 15 g.L<sup>-1</sup>, 30 g.L<sup>-1</sup>, 45 g.L<sup>-1</sup>, 60 g.L<sup>-1</sup>, 75 g.L<sup>-1</sup>) em meio de cultura Murashige e Skoog (1962) – MS-100, acrescido de 4,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 2 mL L<sup>-1</sup> do biocida PPM e 2 g.L<sup>-1</sup> do agente solidificante Fitagel e isento de reguladores de crescimento. Por ocasião do preparo do meio de cultivo, o pH foi ajustado para 5,8.

Os explantes foram cultivados individualmente em tubos de ensaio com dimensões de 150 mm x 25 mm contendo 15 mL de meio. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com seis tratamentos e duas repetições, cada repetição representada por cinco explantes, num total de 10 explantes por tratamento. Após 30 dias de cultivo in vitro foi avaliado o número de brotações produzidas por explante. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas por meio do RBIO, um programa integrado ao ambiente R (BHERING, 2017). Os testes de análise de normalidade dos dados foram verificados com os testes de Shapiro-Wilk e de Lilliefors,

utilizando o aplicativo computacional em genética e estatística, Programa GENES, versão 6.1, da Universidade Federal de Viçosa – UFV (CRUZ, 2013).

#### Efeito do BAP na multiplicação dos explantes

No experimento para avaliação do efeito da concentração do BAP na multiplicação de brotos foram utilizados explantes provenientes da fase de multiplicação *in vitro*. Para se verificar os níveis mais adequados de BAP para o meio de cultivo *in vitro* para Canarana, os explantes foram submetidos a cinco níveis de BAP (0,0 mL L<sup>-1</sup>, 1,5 mL L<sup>-1</sup>, 3,0 mL L<sup>-1</sup>, 4,5 mL L<sup>-1</sup> e 6,5 mL L<sup>-1</sup>) em meio de cultura Murashige e Skoog (1962) - MS-100, e em acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, de 4,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 2 mL L<sup>-1</sup> do biocida PPM e 2 g.L<sup>-1</sup> do agente solidificante Fitagel e isento de reguladores de crescimento. Por ocasião do preparo do meio de cultivo, o pH foi ajustado para 5,8. Os explantes foram cultivados individualmente em tubos de ensaio com dimensões de 150 mm x 25 mm contendo 15 mL de meio. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos e duas repetições, cada repetição representada por cinco explantes, num total de 10 explantes por tratamento. Após 30 dias de cultivo *in vitro* foi avaliado o número de brotações produzidas por explante. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas por meio do RBIO, um programa integrado ao ambiente R (BHERING, 2017). Os testes de análise de normalidade dos dados foram verificados com os testes de Shapiro-Wilk e de Lilliefors, utilizando o aplicativo computacional em genética e estatística, Programa GENES, versão 6.1, da Universidade Federal de Viçosa – UFV (CRUZ, 2013).

#### Interação sacarose x BAP na multiplicação de explantes

No experimento para avaliação do efeito da interação entre concentrações de sacarose e BAP na multiplicação de brotos foram utilizados explantes provenientes da fase de multiplicação *in vitro*. Os explantes foram submetidos a cinco níveis de BAP (0,0 mL L<sup>-1</sup>, 1,5 mL L<sup>-1</sup>, 3,0 mL L<sup>-1</sup>, 4,5 mL L<sup>-1</sup> e 6,5 mL L<sup>-1</sup>) e duas concentrações de sacarose (30 g L<sup>-1</sup> e 60 g L<sup>-1</sup>) em meio de cultura Murashige e Skoog (1962) – MS – 100, acrescido de 1 mL L<sup>-1</sup> de PPM e 2 g L<sup>-1</sup> de fitagel e isento de reguladores de crescimento.

Por ocasião do preparo do meio de cultivo, o pH foi ajustado para 5,8. Os explantes foram cultivados individualmente em tubos de ensaio com dimensões de 150 mm x 25 mm contendo 15 mL de meio. O experimento foi conduzido em arranjo fatorial 5 (concentrações de BAP) x 2 (concentrações de sacarose) no delineamento inteiramente casualizado com 2 repetições, cada repetição representada por cinco explantes, num total de 10 explantes por tratamento. Após 30 dias de cultivo in vitro foi avaliado o número de brotações produzidas por explante. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de tukey a 5% de probabilidade e análise de regressão. As análises estatísticas foram realizadas por meio do RBIO, um programa integrado ao ambiente R (BHERING, 2017). Os testes de análise de normalidade dos dados foram verificados com os testes de Shapiro-Wilk e de Lilliefers, utilizando o aplicativo computacional em genética e estatística, Programa GENES, versão 6.1, da Universidade Federal de Viçosa – UFV (CRUZ, 2013).

#### Efeito da concentração do fitagel na taxa de brotação de explantes

Explantes provenientes da fase de estabelecimento in vitro foram utilizados para comparar o efeito da concentração do agente solidificante do meio na multiplicação dos explantes. Foram avaliadas duas concentrações do agente solidificante fitagel, 1,4 g L<sup>-1</sup> e 2,0 g L<sup>-1</sup> no meio de cultura MS, composição integral de sais minerais, 4,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 2 mL L<sup>-1</sup> do biocida PPM. Os explantes foram cultivados individualmente em tubos de ensaio com dimensões de 150 mm x 25 mm contendo 15 mL de meio. Em cada tratamento foram avaliados 30 explantes em cada período por tratamento em dois períodos. Foram realizadas avaliações nos subcultivos de 22/04 e 28/06 de 2020, de cultivo in vitro em que foram registrados o número de brotos produzidos por explante. As médias do número de brotações foram comparadas pelo teste de tukey a 5% de probabilidade.

#### Enraizamento dos explantes multiplicados in vitro

Na fase de enraizamento, 144 explantes foram utilizados originados das brotações dos experimentos anteriores (BAP e sacarose). Para enraizamento dos explantes obtidos no experimento de multiplicação foi utilizado o meio de cultura formulado por Murashigue e Skoog (1962), com 50% da concentração de sais minerais – MS-50, acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 2 mL L<sup>-1</sup> do biocida PPM e 2 g L<sup>-1</sup> do agente

solidificante Fitagel e isento de reguladores de crescimento. Por ocasião do preparo do meio de cultivo, o pH foi ajustado para 5,8. Os explantes foram cultivados individualmente em tubos de ensaio com dimensões de 150 mm x 25 mm contendo 15 mL de meio. Após a inoculação do material no meio de enraizamento, a cultura foi mantida em ambiente com fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de 90 a 110  $\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

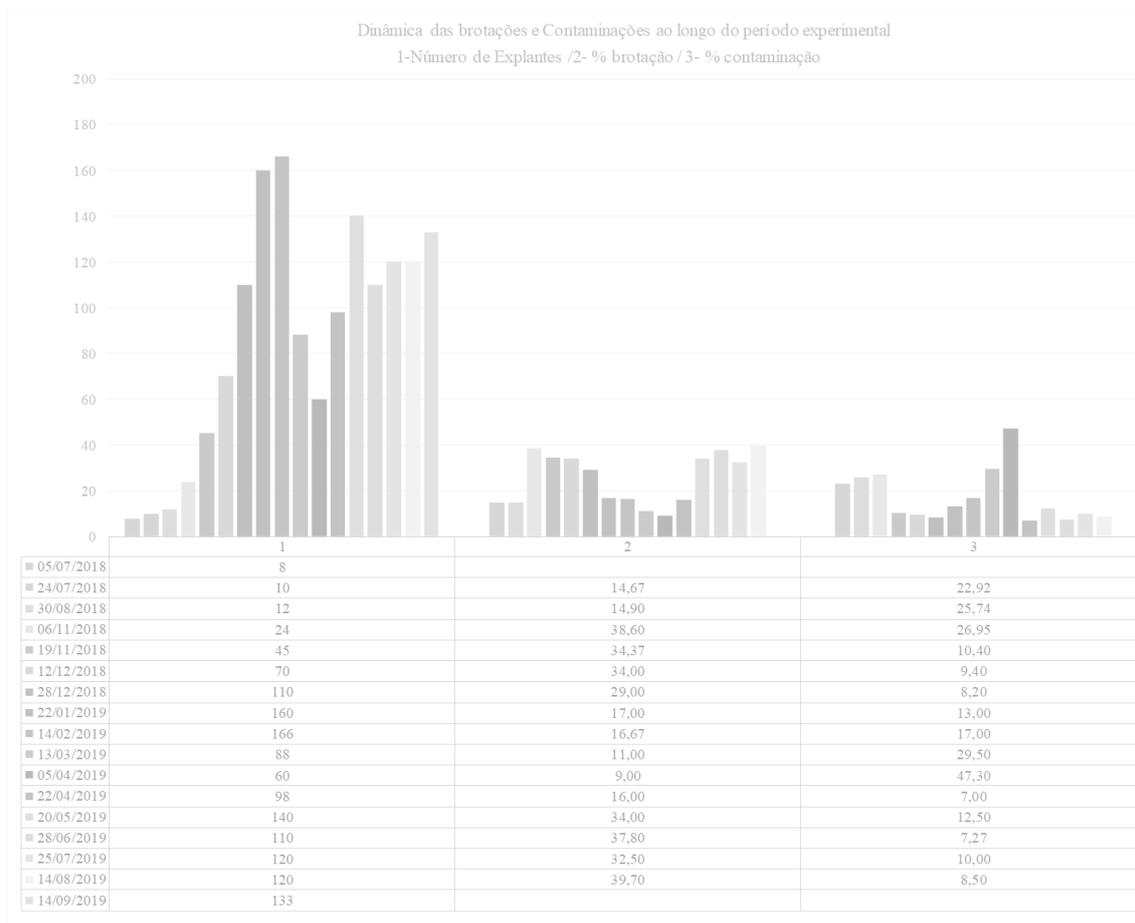
## **Resultados e discussões**

### Estabelecimento e multiplicação dos explantes in vitro

Na fase de estabelecimento e multiplicação o material foi cultivado in vitro durante 14 meses, com subcultivos, aproximadamente, a cada 20 dias. No decorrer do período, o percentual de contaminação foi de quantificado e apresentado na figura 1, com maior ocorrência no terceiro subcultivo, 25,74%. As contaminações no primeiro subcultivo são originadas de falhas na assepsia do material e também de manipulação e, a partir da eliminação do material contaminado, nos subcultivo posteriores, espera-se que as contaminações tenham origem apenas em falhas de manipulação, por isso a contaminação é maior nos primeiro subcultivos, quando o material é introduzido in vitro, levando em consideração as maiores taxas de brotação nos primeiros subcultivos.

Durante o período de estabelecimento in vitro, verificou-se também o surgimento de brotações, comparando o efeito da dose de sais minerais proposto por Murashigue & Skoog (1962). No cultivo com composição integral do meio MS -100 a taxa de brotação foi de 35,65%, enquanto com MS -50 foi de 14,78%.

Na Figura 1 são apresentados os números de explantes, porcentagem de brotação e de contaminação no período experimental ocorrido entre 05/07/2018 a 14/08/2019.



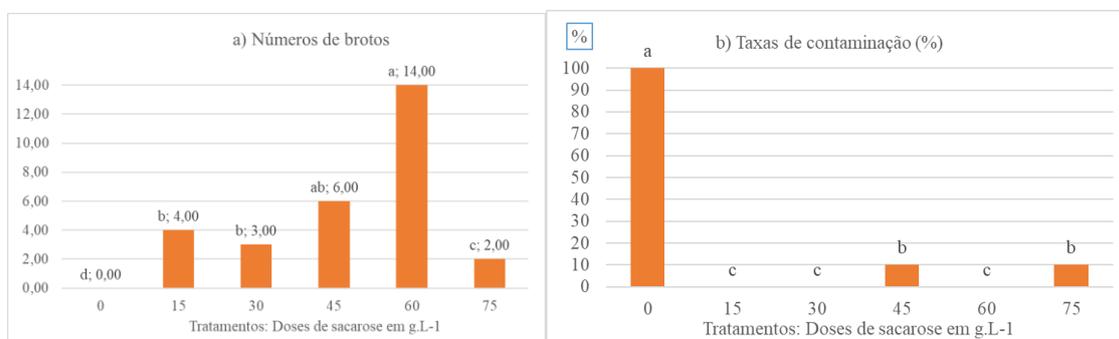
**Figura 1: Número de explantes, porcentagem de brotação e contaminação em cultivo in vitro de *Echinochloa polystachya*.**

Foi observado que os explantes ao longo de sucessivas repicagens começaram a perder o vigor consideravelmente. Esta relação da perda do vigor entre os genótipos e o comportamento morfogenético in vitro é complexo e é influenciado por vários fatores fisiológicos e ambientais que podem afetar aporte de nutrientes e reguladores de crescimento e a biossíntese. As respostas morfogênicas de gramíneas ao cultivo in vitro são as mais variadas. Este fato é reportado por Vidigal et al. (1998) que para verificar o aumento do vigor na conservação in vitro de capim elefante introduziu meristemas axilares repicados sucessivamente adicionados ou não ao meio com 0,125 uM de ANA (ácido naftaleno acético que pode proporcionar a regeneração da planta através dos meristemas. Das 51 cultivares avaliadas por Vidigal et al. (1998) apenas uma (cv Mercker comum) não apresentou resposta satisfatória. Desta forma a adição do ácido naftaleno acético pode aumentar o vigor dos explantes, promovendo uma estratégia para manter o vigor dos explantes através das sucessivas repicagens.

## Efeito da concentração de sacarose na multiplicação do material estabelecido in vitro

No experimento realizado para avaliar o efeito da concentração da sacarose no meio de cultura sobre o número de brotos, tratamento com 60 g L<sup>-1</sup> superou todos os demais (Figura 2a), por outro lado, não foram observadas brotações no tratamento sem a adição de sacarose. Pode-se concluir também que concentrações acima de 60 g L<sup>-1</sup> são desfavoráveis para taxa de brotação, visto que com 75 g L<sup>-1</sup> o valor observado (2 brotações) foi inferior a todos os tratamentos utilizando entre 15 g L<sup>-1</sup> e 60 g L<sup>-1</sup>.

Com relação a contaminação dos explantes, com excessão do tratamento sem adição de sacarose, onde 100% dos explantes apresentaram contaminação.



**Figura 2: a) -Taxas de brotação e b) - contaminação dos explantes de *Echinochloa polystachya* submetidos a diferentes doses de sacarose em meio de cultura MS (letras iguais não apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade).**

Os resultados com as diferentes doses de sacarose demonstram a importância da fonte externa de carbono para aumento do número de brotações, o que é desejado quando realizada a propagação in vitro. Pode-se perceber que no tratamento cujo teor de sacarose foi nulo, não houve a ocorrência de brotações. Desta forma o aumento do teor de sacarose foi essencial para a manutenção e formação de novos brotos, que atestam a necessidade do aporte de carboidratos em plântulas cultivadas *in vitro* considerando a característica heterotrófica do sistema. Porém a taxa de contaminação no tratamento em que não houve a adição de sacarose (Figura 2) chegou a 100 % dos explantes inferindo ao fato da morte

dos explantes pela falta de sacarose e posteriormente contaminação, quando comparado a diminuição expressiva da contaminação nos tratamentos com a presença de sacarose.

No cultivo *in vitro* de embriões de pinhao manso (*Jatropha curcas*) Lopes et al. 2012 verificaram que concentrações de sacarose entre 15 a 30 g L<sup>-1</sup> promoveram melhor alongamento da parte aérea e do sistema radicular.

Para o cultivo *in vitro* de *Desmodium incanum* Maldaner et al. (2014) concluíram que as diferentes concentrações de sacarose (0; 15; 30 e 45 g L<sup>-1</sup>), não influenciaram a altura das plântulas nem número de raízes, todavia a concentração de 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose favoreceu emissão de brotações, número de folhas e produção de biomassa da plântulas, concluindo que esta concentração de sacarose é adequada para o cultivo *in vitro* da espécie.

O efeito de altas concentrações da sacarose no meio de cultivo podem também ser prejudiciais as plântulas, diminuindo desta forma as taxas de emissões de novos brotos e afetando a absorção de nutrientes devido a ao aumento da oxidação do meio de cultivo (THORPE et al., 2008). Utilizando gemas apicais de brotos de cana de açúcar de quarta repicagem foi observado o efeito da temperatura, de sacarose, manitol e sorbitol, como fontes de carbono e reguladores osmóticos, e do ácido abscísico, como regulador de crescimento na conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar (LEMOS et al., 2002). As concentrações mais baixas de sacarose (10 e 20 g/L) no meio de cultura limitaram o crescimento dos explantes, mas mantiveram as melhores viabilidades e as menores porcentagens de oxidação dos meios, proporcionando, assim, maior longevidade dos explantes açúcar (LEMOS et al., 2002). Para a espécie em estudo e nas condições com 40 g/L de sacarose apresentou alta porcentagem de oxidação do meio de cultura e a manutenção da viabilidade dos explantes foi significativamente reduzida. Lemos et al. (2002) observaram nos tratamentos em que houve a combinação entre menores temperaturas, os resultados foram melhores, sugerindo que o tratamento conjunto de altas temperaturas e da concentração de sacarose são prejudiciais à sobrevivência dos explantes porque as altas concentrações de sacarose são absorvidas mais rapidamente, aumentando a massa foliar e conseqüente senescência dos explantes. Os resultados também demonstraram o que se pode verificar que altas concentrações de sacarose promovem a oxidação do meio de cultura e a deterioração das culturas devido ao expressivo potencial osmótico do meio (LEMOS et al., 2002; FOSSARD et al., 1978).

Em orquídeas foi observado que o crescimento inicial de *Miltonia flavescens*, cultivada em quatro meios de cultivo com diferentes oncentrações de sacarose, (com 25,

30, 35, 40 e 45g L<sup>-1</sup>), que o teor de massa fresca e a emissão de raízes dos explantes foram influenciados pelas concentrações de sacarose quando comparada ao tempo de cultivo (LEMES et al., 2016). Foi observado neste estudo que concentrações entre 20 a 25 g L<sup>-1</sup> puderam favorecer a maior quantidade da massa fresca da parte aérea. Já no nosso estudo para *E. polystachya* verificamos que concentrações superiores a estas em meio de cultivo (para orquídeas) podem interferir na diminuição da absorção de sais e no consequente crescimento da planta.

#### Efeito da interação do BAP e sacarose na brotação dos explantes

Conforme a tabela 02 pode se observar os resultados das probabilidades da análise de variância em que foi verificado efeito significativo das concentrações de BAP p-value = 0,03286. Para as doses de sacarose e para a interação dos fatores não foi observado efeito significativo

**Tabela 02: Probabilidades e coeficientes de variação do resultado das análises de variâncias dos resultados dos números de brotos da interação entre BAP x Sacarose observadas de *Echynochloa polystachya*, analisadas pelo Teste-F, Manaus, 2019.**

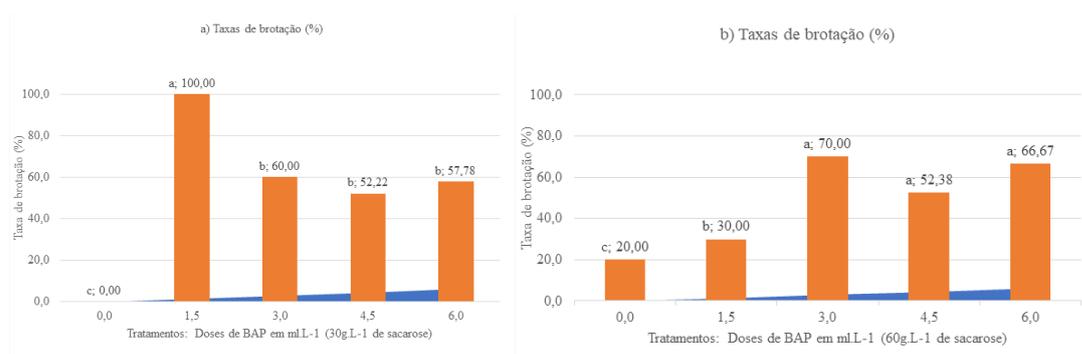
FATORES		P-VALUE	CV%
BAP	*	0.03286	
SACAROSE	ns	0.36514	47,14
BAP X SACAROSE	ns	0.28445	

\* = Significativo a 5% de probabilidade pelo Teste-F; ns = Não significativo a 5% de probabilidade pelo Teste-F.

Uma vez que, a interação entre os efeitos da interação, não se mostraram significativos, foi proposto uma análise de variância das médias dos fatores de maneira individual cujas comparações das médias das diferentes concentrações de BAP foram realizadas dentro de cada uma das concentrações de sacarose avaliadas (Figura 3). Quando utilizadas 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose o tratamento com 1,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP superou todos os demais, com taxa de brotação de 100%, enquanto no tratamento com 0,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP nenhum explante apresentou brotação, sendo este inferior aos demais tratamentos. Os resultados obtidos com 60 g L<sup>-1</sup> de sacarose foram diferentes dos observados com 30 g L<sup>-1</sup>, visto que a taxa de brotação foi superior nos tratamentos com concentrações de 3,0 mg

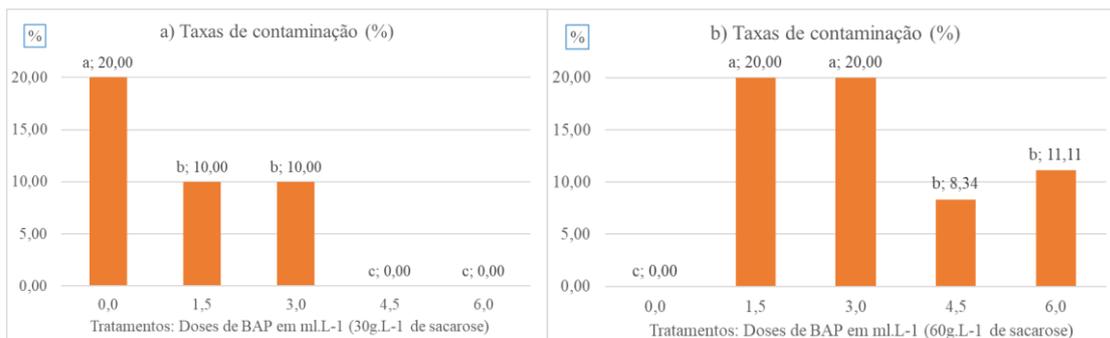
L<sup>-1</sup> a 6 mg L<sup>-1</sup> de BAP, enquanto na concentração de 1,5 mg L<sup>-1</sup> a taxa de brotação superou apenas o tratamento sem adição de BAP.

As taxas de contaminação foram maiores no meio de cultivo com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose deduzindo a importância da sacarose no meio de cultivo quando a planta é estimulada ao crescimento em contrapartida ao meio de cultivo com 60 g L<sup>-1</sup> de sacarose onde as contaminações foram maiores. Interessante salientar que para o tratamento cuja concentração de BAP foi 0,0 mL.L<sup>-1</sup> meio em que continha 60 g.L<sup>-1</sup> de sacarose as plântulas permaneceram estagnadas, sem crescimento e no decorrer do tempo se mostraram senescentes.



**Figura 3: Taxas de brotação dos explantes de *Echinochloa polystachya* submetidos a diferentes doses de BAP em 2 meios de cultura MS, a) - com 30 g.L<sup>-1</sup> e b) – 60 g.L<sup>-1</sup> de sacarose (letras iguais não apresentam diferenças significativas pelo teste de tuckey a 5% de probabilidade).**

Quando utilizada a concentração de 30 g.L<sup>-1</sup> (Figura 4a) as taxas de contaminação foram maiores em menores concentrações de BAP, quando o meio de cultivo apresenta a concentração de sacarose com, e a concentração 0 (zero) de BAP. No meio com 60 g.L<sup>-1</sup> de sacarose (Figura 4b), diferente do observado com 30 g.L<sup>-1</sup>, a menor taxa de contaminação (0%) foi verificada no tratamento sem BAP, apresentando maiores taxas a partir de 3,0 mL.L<sup>-1</sup> de BAP no meio de cultivo. Desta forma pode se observar a importância da sacarose no meio de cultivo quando a planta é estimulada ao crescimento em contrapartida ao meio de cultivo que continha 60 g.L<sup>-1</sup> de sacarose onde as contaminações foram maiores. Para o tratamento cuja concentração de BAP foi 0,0 mL.L<sup>-1</sup> no meio em que continha 60 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, as plântulas permaneceram estagnadas, sem crescimento e no decorrer do tempo se mostraram senescentes.

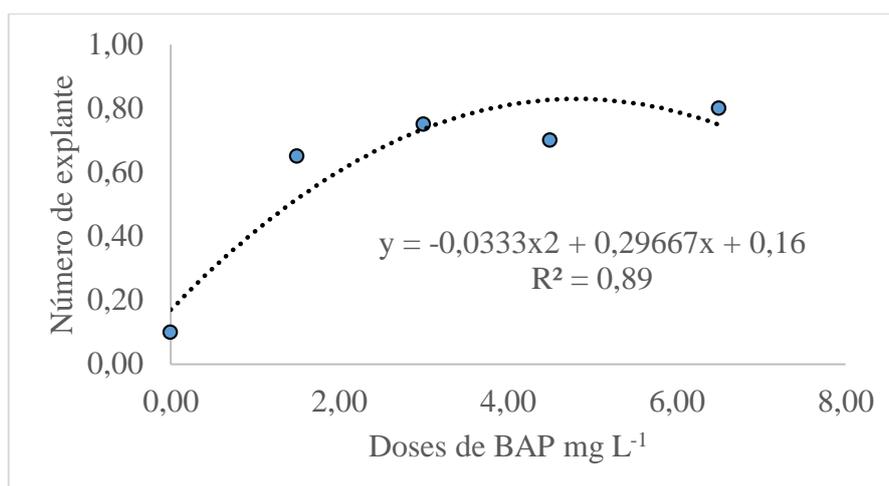


**Figura 4: Taxas de contaminação dos explantes de *Echinochloa polystachya* submetidos a diferentes doses de BAP em 2 meios de cultura MS, a) - com 30 g.L-1 e b) – 60 g.L-1 de sacarose (letras iguais não apresentam diferenças significativas pelo teste de tuckey a 5% de probabilidade).**

Quando utilizado BAP (benzilaminopurina) e ácido indolacético (AIA) no meio de cultivo para a propagação de palma forrageira, Frota et al. (2004) verificaram que a maior a indução de brotos ocorreu com BAP 2,00 mg L<sup>-1</sup> + AIA 0,25 mg L<sup>-1</sup>, induzindo de 70 até 100 % de taxa de brotação (utilizando 5% de sacarose). Concentrações contendo 2 mg/L de benzilaminopurina (associadas a concentrações de nas 2,4-dichlorophenolacético (2,4-D) e Giberilinas) e 2 mg/L benzilaminopurina associadas a concentrações de ácido naftalenoacético (ANA) foram eficientes na regeneração embriogênica, crescimento e maturidade de *Brachiaria ruziziensis* (ISHIGAKI et al., 2009).

Neibaur et al. (2008) utilizando calos oriundos de inflorescências de *Paspalum vaginatum* Swartz preconizaram os protocolos de propagação utilizando 1 mg/L-1 de benzilaminopurina associadas a 2,4-dichlorophenolacético e/ou 3,6-dichloro-2-acidomethoxybenzoico (dicamba) e utilizando 2% de sacarose. puderam desta forma verificar os sucessos nas regenerações embriogênicas e futuras transformações genéticas nesta espécie. De semelhante modo, Sompornpailin e Khunchuay (2016) obtiveram sucesso na regeneração de calos originados de raízes em “vertiver grass” (*Vetiveria zizanioides* (L.) Nash) entre 85% a 90% utilizando a concentração média de 2,0 mg/L-1 e utilizando 2% de sacarose associados a outro fitoregulador (Figura 5).

Para número de perfilhos, na análise de regressão foi verificado que o modelo quadrático ( $R^2 = 89\%$ ) é adequado para representar a resposta da variável em função da variação na concentração do regulador de crescimento BAP (Figura 5). De acordo com a equação, a estimativa de número máximo de perfilhos é alcançado com 4,83 mg L<sup>-1</sup> de BAP.



**Figura 5: Número de explantes de *Echinochloa polystachya* em função das dosagens de BAP.**

Dados menores de BAP utilizados por Silva et al (2017), (0,0; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 mg/L em meio MS acrescido de sacarose 30g/L<sup>-1</sup> puderam verificar que apesar destas dosagens não foram influenciadas significativamente, a nível de 5% entre os tratamentos, o número de explantes estabelecidos in vitro, proporcionou maior sobrevivência e brotações nos segmentos nodais de *Rosa* sp.

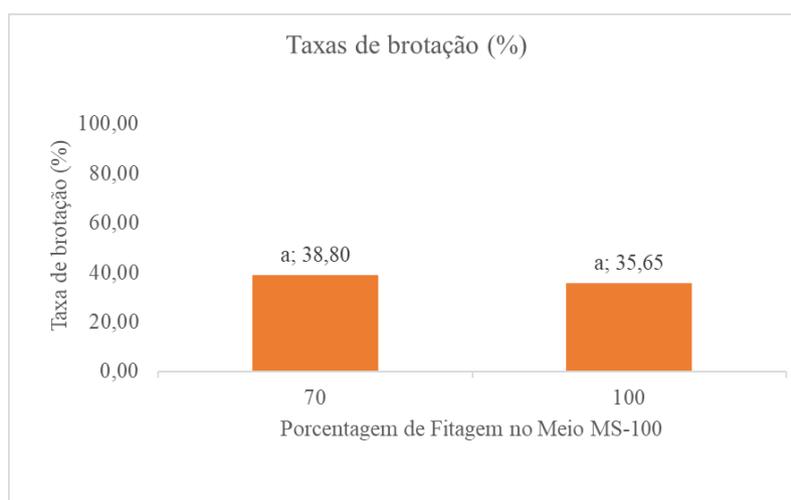
Os resultados obtidos demonstram que o BAP é um importante indutor de brotação para canarana e que quando associado a concentrações de outros produtos bioquimicamente ativos. Em contrapartida quando aplicados na cultura do tomilho (*Thymus vulgaris* L.) em concentrações de BAP entre 0, 1 e 2 mg L<sup>-1</sup> e três de concentrações de ANA (0, 0,25 e 0,5 mg L<sup>-1</sup>), adicionadas ao meio MS (com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, Rubin et al, 2007 puderam concluir que as concentrações mais baixas de ANA e sem a adição de BAP proporcionou melhores condições fisiológicas como (o alongamento da parte aérea) no cultivo in vitro desta espécie.

Efeito da concentração do fitagel e de sais do meio MS na taxa de brotação dos explantes

A taxa de brotação dos explantes não foi afetada pela variação na concentração do agente geleificante fitagel (Figura 6), a média obtida com MS-100 + 2,0 g L<sup>-1</sup> (35,65%) não diferiu significativamente da obtida com MS-100 + 1,4 g L<sup>-1</sup> (38,80%). Já a composição do meio MS teve efeito significativo na taxa de brotação, com média do

tratamento MS-50 + 2,0 g L<sup>-1</sup> (14,78%) estatisticamente inferior a média do tratamento MS-100 + 2,0 g L<sup>-1</sup> (35,65%) (Figura 6).

A solidificação do meio pode favorecer a emissão de brotações dependendo da espécie que se está trabalhando (PEREIRA et al., 2003). Ganhos na eficiência de multiplicação in vitro da batata foram verificados quando utilizado meio de cultura líquido (PEREIRA et al., 2003). Na micropropagação de Bromélias (*Neoregelia cruenta*, *Tillandsia stricta*, *Vriesea gigantea*, *V. guttata* e *V. incurvata*) o meio de cultura líquido estático apresentou melhores resultados quando comparado a meio semi-sólido e líquido sob-agitação (Mengarda et al., 2009).



**Figura 6: Taxa de brotação de *Echynochloa polystachya* em diferentes concentrações do meio de cultura MS e da redução da concentração da fitagem em 30%. Colunas com mesma letra indicam que as médias não diferem entre si pelo teste Tukey ( $p < 0,05$ ).**

#### Enraizamento das brotações

Na fase de enraizamento, 144 explantes foram utilizados originados das brotações dos experimentos anteriores (BAP e sacarose). Destes explantes inoculados 45% apresentaram enraizamento. Por falta de dados na literatura sobre enraizamento in vitro da espécie, não é possível afirmar se este valor estaria dentro ou fora dos padrões. Por outro lado, é esperado que a composição do meio pode ter efeito no enraizamento dos brotos de canarana produzidos in vitro, por isso, sugere-se que em próximos experimentos sejam avaliadas outras composições de meio nesta fase, por exemplo, concentrações de sacarose e de reguladores de crescimento. A concentração de sacarose pode afetar a

porcentagem de explantes oxidados devido a alteração do potencial osmótico do meio de cultura, desta forma também o enraizamento. Altas concentrações de sais também podem ser prejudiciais, inibindo o enraizamento inicial devido ao baixo requerimento de nitrogênio para a formação do sistema radicular (FOSSARD et al., 1978, LEMOS et al., 2002, THORPE et al., 2008).

O conteúdo de sacarose do meio de cultivo em concentrações mais altas, em canarana e outras espécies vegetais como bromélias, batata e cana-de-açúcar, não somente prejudicou o crescimento da parte aérea pelo potencial osmótico, mas também pela oxidação do meio e redução do enraizamento. Os teores de sacarose para o meio de cultivo devem ser recomendados intrinsecamente atrelados ao estado fisiológico do explante. Desta forma os valores sugeridos para canarana podem ser ajustados no decorrer das sucessivas repicagens. Também foi verificado que os teores de sacarose, quando em conjunto a outros estimuladores de crescimento, como neste caso aqui a citocinina exógena (Benzilaminapurina-BAP) pode ser prejudicial apresentando um efeito fitotóxico pelo seu excesso encurtando os entrenós e associado ao excesso de sais podem interferir na absorção de nutrientes (LANE, 1979; LESHEM et al., 1988; GRATTAPLAGIA e MACHADO, 1990; LEMOS et al., 2002; RUBIN et al., 2007; QUISEN E ANGELO 2008; THORPE et al.; 2008; ALCANTARA et al., 2014; LEMES et al., 2016)

Para a canarana, uma planta semi-aquática, no presente trabalho a diminuição da solidificação parece não afetar as taxas de brotação na diminuição e 30% da fitagel, haja vista que o meio, substrato para o tecido vegetal, deve apresentar condições propícias para a sustentação do explante a absorção das diversas substâncias nutritivas (GRATTAPLAGIA e MACHADO, 1990; QUISEN E ANGELO 2008; JAEGER et al., 2015).

Objetivando o enraizamento, meios de cultivo com altas concentrações de sais podem ser prejudiciais, inibindo o enraizamento inicial devido ao baixo requerimento de nitrogênio para a formação do sistema radicular, e desta forma devem ser substituídos por meios com baixas concentrações de sacarose e sais (FOSSARD et al., 1978; LEMOS et al., 2002; THORPE et al.; 2008).

As doses de BAP e sacarose interferiram no desenvolvimento e multiplicação do cultivo *in vitro* de canarana. Todavia outros ensaios adicionando outros reguladores de crescimento, como por exemplo, ácido naftalenoacético (ANA), poderá complementar informações para a multiplicação *in vitro* da espécie em estudo. Na Tabela 3 pode-se

visualizar as dosagens e componentes verificados até aqui e sugeridos para a introdução, multiplicação e enraizamento de *Echinochloa polystachya* Kunth Hitchc.

**Tabela 3: Componentes e dosagens sugeridos para a introdução, multiplicação e enraizamento de *Echinochloa polystachya***

<i>Cultivo in vitro</i> Fases	Componentes				
	Sacarose	Fitigel	Ágar	PPM	Carvão ativado
<i>Introdução MS-50</i>	30 g/L <sup>-1</sup>	2 g/L <sup>-1</sup>	6% (p/v)	2 ml.L <sup>-1</sup>	-
<i>Multiplicação MS-100</i>	45 a 60 g/L <sup>-1</sup>	2 g/L <sup>-1</sup>	6% (p/v)	1 ml.L <sup>-1</sup>	-
<i>Enraizamento MS 50</i>	20 g/L <sup>-1</sup>	2 g/L <sup>-1</sup>	6% (p/v)	1 ml.L <sup>-1</sup>	2,25 g.L <sup>-1</sup>
<i>pH ajustado</i>			5,8		

### Conclusão

Os resultados obtidos permitiram sugerir um protocolo inicial para a propagação in vitro de *Echinochloa Polystachya*, no entanto, novos estudos, com outras variações na composição do meio de cultura devem ser realizados para obter um protocolo de alta eficiência.

### Referências bibliográficas

ALCANTARA, G.B.; DIBAX, R.; OLIVEIRA, R.A.; FILHO, J.B.; DAROS, E. Plant regeneration and histological study of the somatic embryogenesis of sugarcane (*Saccharum* spp.) cultivars RB855156 and RB72454. *Acta Scientiarum. Agronomy* Maringá, v. 36, n. 1, p. 63-72, Jan. - Mar., 2014

BARBOSA, S. Micropropagação e duplicação cromossômica de híbridos triplóides de capim-elefante e milho. Lavras, UFLA, tese, 119p. 2004.

BARBOSA, K. M. DO N; PIEDADE, M.T.F; KICHNER, F.F. 2008. Estudo Temporal da vegetação da várzea da Amazônia central. *FLORESTA*, Curitiba PR. v. 38. n 1. p. 89-96. 2008. Jan-mar. 2008

BHERING, L. L. Rbio: A tool for biometric and statistical analysis using the R platform. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, Viçosa, v. 17, n. 2, p. 187-190, 2017.

Biazão, T. C. Utilização de *Echinochloa polystachya* (Kunth) Hitchc. (Poaceae) na fitorremediação de solo contaminado com petróleo. 61 f. Curitiba. 2012.

CABRAL, B.G., PIRES, M.V.V., LACERDA, A.L., CARNEIRO, V.T. de C. Introdução in vitro, micropropagação e conservação de plantas de *Brachiária* sp. EMBRAPA- RGB, Brasília, Comunicado técnico, 101. 4p, 2003

CAMARÃO, A. P., MATOS, A. O., BATISTA, H. A. M. Teores minerais do capim canarana erecta lisa (*Echinochloa pyramidalis*) em três idades. Belém: EMBRAPA-CPATU, p. 12. (EMBRAPA/CPATU, Circular técnica, 54). 1988.

CRUZ, C. D. Programa GENES: estatística experimental e matrizes. Viçosa: UFV. 2013

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagacao, 99-169. In: torres, A.C.; Caldas, L.S. (Eds.). Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília: Embrapa-CNPq. 1990.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J.A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. p. 183-260. Brasília: EMBRAPA/CBAB, 1998.

FARIAS, M.L; PIEDADE, M.T.F. Growth and biomass of *Echinochloa polystachya* (Poaceae) under nitrogen fertilization and different harvest treatments. German-Brazilian Workshop on neotropical ecosystems; Living Resources Management, p. 913-917. Hamburg 2000.

JAEGER PA, MCELFRISH C, WONG LR, IDEKER T. Beyond agar: gel substrates with improved optical clarity and drug efficiency and reduced autofluorescence for microbial growth experiments. *Appl Environ Microbiol* 81:5639 –5649. 2015.

LOPES, L.C.; MACHADO.S.I.; MAGOGA, E.C.; ANDRADE, J.G.; PENNA, H.C.; MORAES, E.F. Cultura de embrião e indução de brotos in vitro para micropropagação do pinhao-manso. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.47, n.7, p.900-905, jul. 2012

MALDANER, J, SCHWALBERT, R,SALDANHA, C.W, CONTERATO, I. F., STEFFEN, G.P.K. Procedimentos para cultivo in vitro de *Desmodium incanum*. ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.18; p. 2533, 2014.

MARTIN, L.C.T. Bovinos-Volumosos suplementares. P.143. São Paulo: Nobel, 1997.

MENGARDA, L.H.G.; POVOAS, L.; DEBIASI, C.; PESCADOR, R. Estado físico do meio de cultura na propagação in vitro de bromeliaceae. *Scientia Agraria, Curitiba*, v.10, n.6, p.469-474, Nov./Dec. 2009

OLIVEIRA, E.T. DE, GROTHGE, M.T. GONÇALVES, A.N., et. Al. Micropropagação de Pinus tropicais. In: CROCOMO, O.J., SHARP, W.R., MELO, M. eds. Biotecnologia para a produção vegetal. Piracicaba: CEBTEC/FEALQ. p. 355-370. 1991

PAIVA, H. N.e GOMES, J. M. Propagação vegetativa de espécies florestais. Viçosa, MG: UFV. 40 p. (Boletim, 322). 1995.

PAIVA, R, PAIVA. P.D.O., CULTURA DE TECIDOS. - Curso de Pós-Graduação "Lato Sensu" Especialização a Distância: Biotecnologia: Fundamentos Técnicos, Aplicações e Perspectivas. p. 97. UFUV – FAEPE. 2001

PASSOS, L.P.; KÖPP, M.M. Micropropagação e cultivo in vitro de gramíneas forrageiras tropicais. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 142.). p.20. 2010.

PENCE, V.C. Evaluating cost for the in vitro propagation and preservation of endangered plants. **In vitro Cellular & Developmental Biology** – Plant, Wallingford, v.47, n.1, p. 176-187, 2011.

PEREIRA, J.E.S.; FORTES, G.R.L. Protocolo para produção de material propagativo de batata em meio líquido. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v. 38, n. 9, p. 1035-1043, set. 2003

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*, v.42, n.7, jul, 2012.

PIEIDADE, M. T.F., *Biologia e Ecologia de Echinochloa Polystachya (H.B.K.) Hitchcok (Graminea=Poaceae), capim semi-aquático da várzea amazônica. Acta Limnológica Brasiliensia. v.1. p. 173-185.1993.*

PIERIK, R.L.M. Handicaps for the large scale commercial application of micropropagation. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.230, p.63-71, 1988

SILVA, J.P.G.S.; COSTA, T.P.D.; COSTA, M.K.C.; ARAÚJO, M.R.S.; ARAÚJO, K.S.; SILVA, A.C.M.; OLIVEIRA, P.C.; SAI, E.F. Efeito da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) sobre o estabelecimento in vitro de segmentos nodais de Rosa sp. *Agroecosistemas*, v. 9, n. 2, p. 370 – 380, 2017.

SIVA, M.M.DE A. Micropropagação de palma forrageira variedade miúda em meio simplificado. *Tec.& Ciência Agrop. João pessoa*, v11, n. 2, 25-29p, Junho 2017

Quisen R C e Angelo P C S 2008. Manual de procedimentos do laboratório de cultura de tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental. Embrapa Amazônia Ocidental, 61, 44 p. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/47132/1/Doc-61-A5.pdf>

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 5. ed. Artmed, p. 954. 2013.

TORRES, A. C.; DURVAL.F.D.; RIBEIRO. D.G.; BARROS, A.F.F; ARAGÃO, F.A.D. Efeito da sacarose, cinetina, isopentenil adenina no desenvolvimento de embriões de *Heliconia rostrata* in vitro. *Horticultura Brasileira*, Brasília, DF. v. 23. n. 5. p. 789-792. jul. 2005.

VIDIGAL, M.C., PASSOS, L.P., SILVA, J.L.O.da. Conservação in vitro do germoplasma de capim elefante por meio da micropropagação de gemas axilares. *Ciência Rural* v. 28, n.3, p. 379-385,1998.

ZANOTTI, R.F. et al. Germinação e indução da calogênese *in vitro* de copaíba. **Enciclopédia Biosfera**, v.8, n.15, p.987-991, 2012.

RUBIN, S.; MADRUGA, C.S.; BANDIRA, M.B; RIBEIRO, M.V.; BETNITZ, L.C.; PETERS, J. A.; BRAGA, E.J.B. Reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de *Thymus vulgaris* L. Nota científica. Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 480-482, jul. 2007

LANE, W.D. 1979. **Regeneration of pear plants from shoot meristem: tips.** Plant Science Letters, 16: 337-342.

LESHEM, B.; WERKER, E.; SHALER, D.P. 1988. The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. Anais of Botany. 62: 271-276.

VIDIGAL, M.C.; PASSOS, L.P.; SILVA, J.L.O. **Conservação in vitro do germoplasma de capim-elefante por meio da micropropagação de meristemas axilares.** Ciência Rural. v.28. n.3. p. 379-385. S. Maria, 1998.

FOSSARD, R. A. de; BENNETT, M. T.; GORST, J. R.; BOURNE, R. A. Tissue culture propagation of *Eucalyptus ficifolia* F. Muell. **Combined Proceedings of Annual Meetings of the International Plant Propagators' Society**, Seattle, v. 28, p. 427-435, 1978.

LEMOS, E.E.P.; FERREIRA, M.S.; ALENCAR, L.M.C.; NETO, C.E.R. Conservação in vitro de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa agropecuária brasileira..**, Brasília, v. 37, n. 10, p. 1359-1364, out. 2002.

LEMES, C.S.R.; SORGATO, J.C., SOARES, J.S.; ROSA, Y.B.C.J. Meios de cultivo e sacarose no crescimento inicial in vitro de *Miltonia flavescens*. **Ciência Rural**, v.46, n.3, mar, 2016.

MALDANER, J.; SCHWALBERT, R.; STEFFEN, P.K.; SALDANHA, C.W.; MORAIS, R.M. Efeito de concentrações de sacarose na morfogênese in vitro de *Desmodium incanum* DC. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.19; p.846. 2014

FROTA, M.H.; CARNEIRO, M.S.; ZÁRATE, R.M.L.; CAMPOS, F.A.P.; PEIXOTO, M.J.A. Efeitos do BAP e do AIA na indução e no crescimento in vitro de brotos de dez clones de palma forrageira. **Revista Ciência Agronômica**, vol. 35, Número Especial, out., 2004: 279 - 283

ISHIGAKI, G.; GONDO, T.; SUENAGA, K; AKASHI, R. Multiple shoot formation, somatic embryogenesis and plant regeneration from seed-derived shoot apical meristems in ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*). **Grassland Science**. v.55, n.1; p.46-51. 2009

NEIBAUR, I.; GALLO, M.; ALTPETER, F. The effect of auxin type and cytokinin concentration on callus induction and plant regeneration frequency from immature inflorescence segments of seashore paspalum (*Paspalum vaginatum* Swartz). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**. v.44, n.xx; p.xxx. December, 2008

SOMPORNPAILIN, K; KHUNCHUAY, C. Synergistic effects of BAP and kinetin media additives on regeneration of vetiver grass (*Vetiveria zizanioides* L. Nash). **Australian Journal of Crop Science**. V.10. n. 5 p. 726-731. 2016

THORPE, T. et al. The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotic and pH effects and support systems. In: GEORGE, E.F. et al. **Plant propagation by tissue culture**. 3.ed. Netherland: Springer, 2008. V.1, 501p.

## **CAPITULO II - Indução de ploidia em *Echinochloa polystachya* (Kunth) Hitchc**

### **Resumo**

A indução de poliploides pode ser um eficiente instrumento para programas de melhoramento genético visando obter variabilidade genética e genótipos superiores para o cultivo de espécies vegetais. O objetivo do presente trabalho foi utilizar colchicina para obter variabilidade genética em *Echinochloa polystachya* e sobrevivência e evolução dos mutantes. Explantes de propagação in vitro foram submetidos em diferentes concentrações de colchicina (0; 0,01; 0,025; 0,05; 0,075 e 0,01 ml/100 ml de água destilada) e tempo de exposição de 18 horas em experimento inteiramente casualizado com 6 tratamentos e três repetições, onde cada repetição foi constituída por 24 plantas, totalizando desta forma 144 explantes. Em seguida, os explantes foram transferidos para um novo meio de cultura de enraizamento. Ocorreu a mortalidade de 100% dos explantes devido a estes não resistirem aos tratamentos realizados. Assim segmentos nodais de uma única planta de canarana verdadeira foram coletados no município de Manaus e submetidas a diferentes concentrações de colchicina e tempos de exposição, em delineamento inteiramente casualizado em sistema fatorial 5x4. As concentrações de colchicina foram: 0; 0,01; 0,025; 0,05 e 0,1. Os tempos de exposição foram: 0; 12; 24 e 36 horas. O tempo 0 (zero) refere-se ao mergulho rápido dos segmentos nodais na colchicine, mergulho e retirada imediata. Estabeleceu assim 20 tratamentos com 3 repetições, onde cada repetição foi composta por 10 plantas, em um total de 600 segmentos nodais avaliados. Foi avaliado o tempo de emergência a partir do plantio. A avaliação da morfogênese e taxa de crescimento foi realizada pela técnica dos "afilhos marcados" (adaptado), cuja metodologia é detalhada por Carrère et al. (1997) e Davies (1993). A melhor germinação recebendo colchicina, foi de 50% em concentrações de 0,01 ml.L-1 e no tempo 0 (zero) de exposição. As porcentagens de mortalidade em pré emergência, foram afetadas pelas concentrações e tempo a que foram expostos, em que, na concentração 0,1 ml.L-1 e no tempo 36 horas foram de 85%. A maior sobrevivência, foram, nas concentrações 0,01 ml.L-1 e no tempo 0 (zero) de exposição, em uma taxa de sobrevivência de 33,1%. Verificou-se também que plantas anômalas não ocorreram nos tratamentos onde a concentração de colchicina foi 0 (zero). A indução de poliploidia provoca alterações no metabolismo, devido afetar as divisões celulares. Em termos gerais dos 600 segmentos nodais submetidos aos tratamentos, 172 sobreviveram, refletindo em

uma taxa de sobrevivência de 28%, em que 159 plantas expressaram suas características fenotípicas devido a exposição às concentrações e tempos originando assim supostos poliploides. Vinte plantas supostamente poliploides foram selecionadas para as mensurações em relação a densidade estomática e características morfométricas das células do limbo foliar. Observou-se modificações estruturais no limbo foliar relativa à densidade estomática, em que os limbos diferiam entre si, todavia não apresentando uma correlação entre os tratamentos impostos, indicando que as plantas afetadas a nível molecular expressam diferentes características e fenótipos. Verificou-se que os índices de clorofila por folha, apresentaram diferenças e entre as plantas em que a folha mais nova (completamente expandida próximo ao cartucho) pode expressar o maior teor de clorofila. Os segmentos nodais apresentaram modificações estruturais, cujas plantas sobreviventes, apresentaram diferentes características morfogenéticas, padrões de crescimento, e expansão de folha, refletindo nas variáveis morfométricas, como largura entre feixes e tamanhos e larguras da célula da epiderme foliar, indicando as potenciais plantas mutagênicas a serem investigadas para em trabalhos de melhoramento.

**Palavras-chave:** Canarana verdadeira, poliploidia, colchicina, Densidade estomática, características morfométricas.

### **Abstract**

Polyploid induction can be an efficient tool for breeding programs aiming at obtaining genetic variability and superior genotypes for the cultivation of plant species. The aim of the present study was to use colchicine to obtain genetic variability in *Echinochloa polystachya* and survival and evolution of mutants. In vitro propagation explants were submitted to different concentrations of colchicine (0; 0.01; 0.025; 0.05; 0.075 and 0.01 ml / 100 ml of distilled water) and an exposure time of 18 hours in a completely randomized experiment with 6 treatments and three repetitions, where each repetition consisted of 24 plants, thus totaling 144 explants. Then, the explants were transferred to a new rooting culture medium. There was a mortality of 100% of the explants because they did not resist the treatments performed. Thus nodal segments from a single true canarana plant were collected in the municipality of Manaus and subjected to different concentrations of colchicine and exposure times, in a completely randomized design in a 5x4 factorial system. The concentrations of colchicine were: 0; 0.01; 0.025; 0.05 and 0.1.

The exposure times were: 0; 12; 24 and 36 hours. Time 0 (zero) refers to the rapid plunge of nodal segments into the colchicine, plunge and immediate withdrawal. Thus, it established 20 treatments with 3 repetitions, where each repetition was composed of 10 plants, in a total of 600 nodal segments evaluated. The emergence time from planting was evaluated. The evaluation of morphogenesis and growth rate was performed using the technique of "marked tillers" (adapted), whose methodology is detailed by Carrère et al. (1997) and Davies (1993). The best germination receiving colchicine was 50% in concentrations of 0.01 mL.L<sup>-1</sup> and time 0 (zero) of exposure. The percentages of mortality in pre-emergence were affected by the concentrations and time to which they were exposed, in which, in the concentration 0.1 mL.L<sup>-1</sup> and at 36 hours were 85%, with the highest survival, at concentrations 0.01 mL.L<sup>-1</sup> and at time 0 (zero) of exposure, at a survival rate of 33.1%. It is also noted that anomalous plants did not occur in treatments where the concentration of colchicine was 0 (zero). Induction of polyploid causes changes in metabolism due to affecting cell divisions. In general terms of the 600 nodal segments submitted to treatments, 172 survived, reflecting at a survival rate of 28%, in which 159 plants expressed their phenotypic characteristics after exposure to concentrations and times thus giving rise to supposed polyploids. Twenty supposedly polyploid plants were selected for measurements in relation to stomatal density and leaf morphometric cell characteristics. Structural changes were observed in the leaf lamina relative to stomatal density, in which the limbs differed from each other, however showing no correlation between the treatments imposed, indicating that the plants affected at the molecular level express different characteristics and phenotypes. It was found that the chlorophyll indexes per leaf, showed differences and between plants in which the youngest leaf (completely expanded next to the cartridge) can express the highest chlorophyll content. The nodal segments showed structural modifications, whose surviving plants, presented different morphogenetic characteristics, growth patterns, and leaf expansion, reflecting in the morphometric variables, such as width between bundles and cell sizes and widths of the leaf epidermis, indicating the potential mutagenic plants to be investigated for improvement work.

**Keywords:** Real canarana, poliploidia, colchicine, Stomatal density, morphometric characteristics.

## **Introdução**

Poliploidia é a existência de mais do que dois genomas, em um mesmo núcleo celular. Devido à baixa frequência da poliploidização natural, o uso de técnicas de indução artificial tem crescido nos programas de melhoramento genético, levando a um aprimoramento das técnicas. As plantas podem ser induzidas a poliploidia via somática ou sexual. De maneira geral se induz a poliploidia através de um agente inibidor do fuso. As substâncias que induzem a poliploidia atuam sobre as fibras do fuso acromático durante a divisão celular, impedindo sua polimerização ou promovendo a sua fragmentação, e assim não permitem que ocorra a separação parcial e/ou total dos cromossomos (WITTMANN e DALL'AGNOL, 2003; DHOOGHE et al., 2010).

Dentre estes antimitóticos, o alcalóide colchicina é o mais conhecido e empregado. Extraída de sementes e bulbos de *Colchicum autumnale* L. (Liliaceae), a colchicina, é um alcalóide responsável por bloquear a divisão celular na metáfase e induzir a duplicação do número de cromossomos, gerando uma divisão celular incorreta que produz células com diferentes níveis de ploidia. Estas células podem ter seu número cromossômico multiplicado ou alterado, produzindo indivíduos com diferentes níveis de ploidia, que irão possivelmente apresentar características diferentes do material doador (EIGSTI e DUSTIN, 1955; DHOOGHE et al., 2010). O efeito da colchicina está relacionado a sua capacidade em ligar-se aos dímeros de tubulina, impedindo a formação dos microtúbulos e conseqüentemente das fibras do fuso, importantes para a migração dos cromossomos aos pólos da célula durante a mitose (DHOOGHE et al., 2010).

A aplicação pode ser feita, plântulas ou partes vegetativas com tecidos meristemáticos ativos, como filhos e estolhos. Dentre os métodos sugeridos de aplicação da colchicina sempre existe a necessidade de ajustes e padronizações. Ainda é citado que tempos de aplicação em que soluções aquosas em tecidos com altas taxas de divisão celular (tecidos meristemáticos) e próximas de 0,2% de concentração e tempos de exposição entre 1 a 16 horas são aquelas que apresentam os melhores resultados (WITTMANN e DALL'AGNOL, 2003).

A propagação vegetativa torna-se um importante e fundamental instrumento na indução a poliploidia, ao ser possível a produção de inúmeros propágulos de forma homogênea, para a imersão, ou aplicação dos indutores a poliploidia. Pode-se conceituar a propagação vegetativa *in vitro* ou micropropagação como um processo, no qual pequenos fragmentos vegetais são isolados dos organismos ou obtidas a partir destes,

cultivadas de maneira asséptica em um meio de cultura apropriado sob condições favoráveis. Para que haja o sucesso na propagação vegetativa, é fundamental que o, o explante (que é todo o tecido ou órgão vegetal), tenha a correta assepsia, o meio nutritivo e os fatores ambientais: luz, temperatura, dióxido de carbono e oxigênio. Esta técnica auxilia os programas de melhoramento uma vez que em um curto espaço de tempo um grande número de propágulos, podem ser obtidos (PAIVA e PAIVA, 2001).

Plantas submetidas ao tratamento com colchicina, se bem sucedido, apresentam um aumento no número cromossômico que, em geral, é refletido pela célula, através do aumento de seu volume que, por conseguinte, pode ser observado também com o crescimento de alguns órgãos da planta como tamanho das células dos estômatos, densidade de estômatos por área e diâmetro dos grãos de pólen são muito utilizados para identificar poliploides (GRANER, 1940; ARMSTRONG e ROBERTSON, 1960; SILVA et al., 2000; MORGAN et al., 2003), da mesma forma que o número de plastídios nas células dos estômatos (BINGHAM, 1968; BOAVENTURA et al., 1981).

Como a poliploidia causa nas plantas uma série de consequências fenotípicas como o aumento do número cromossômico, que normalmente repercute em aumento nas células, tecidos e órgãos vegetais e a análise estomática é uma metodologia fácil e simples, que possibilita a identificação de supostos poliploides e testemunhas diploides de um ensaio, através da contagem e medição comparativa de estômatos (VICHIAITTO et al., 2006) a caracterização do material pode ser realizada por comparações entre os estômatos dos poliploides com os de plantas diploides (normais). Portanto, a alteração no tamanho das células-guarda de estômatos de folhas de plantas tratadas com colchicina pode ser utilizada como característica indicativa da existência de poliploidia. Logo, diversos trabalhos de indução de poliploidia em vegetais utilizaram essa característica para selecionar putativos poliploides, como em *Manihot esculenta* (GRANER, 1942), *Cattleya intermedia* (SILVA et al., 2000), *Heliconia bihai* (CAVALCANTI-FILHO, 2011), *Centella asiática* (KAENSAKSIRI et al., 2011), *Gerbera jamesonii* (GANTAIT et al., 2011) e *Lagerstroemia indica* (WANG et al., 2012).

A densidade estomática (ou frequência estomática) de uma epiderme com estômatos pode variar muito dependendo da espécie, podendo chegar a 2 000 poros  $\text{mm}^{-2}$ , porém, a maioria das plantas possuem em torno de 40 a 350 poros  $\text{mm}^{-2}$ . Sua aferição é feita pela contagem do número de estômatos por área. Por meio da densidade estomática podemos calcular também o índice estomático, com a quantificação dos estômatos e das células epiteliais. Quando as células completam a sua diferenciação, o índice estomático

torna-se independente do tamanho da folha, por esta razão, as estimativas tanto de densidade estomática quanto do índice estomático, são realizadas com folhas maduras (completamente expandidas). Quando se determina a densidade e a média da área dos estômatos, então a área total dos poros estomáticos pode ser calculada como uma porcentagem da área foliar. Este valor situa-se geralmente entre os 0.3 a 2 % se o diâmetro médio do poro for cerca de 6 mm (WEYERS e MEIDNER, 1990).

Em plantas forrageiras, exemplos podem ser citados como os autotetraplóides de *Lolium perenne* e *Lolium multiflorum* e nos aloploiploides de *Lolium x Festuca* (CARNAHAN e HILL, 1961; EVANS, 1981). Estes e vários trabalhos demonstram que os poliploides podem ser extremamente produtivos, e em alguns casos, todavia a diminuição da fertilidade, refletida pela baixa produção de sementes, pode ser superada por seleção (WITTMANN e DALL'AGNOL, 2003). A descoberta de agentes poliploidizantes, como a colchicina, e da capacidade deste agente em provocar alterações em componentes envolvidos no ciclo celular e indiretamente no material genético de diversos indivíduos e por consequência, refletindo na morfologia, despertou o interesse de geneticistas e de agricultores, visando a sua utilização para o melhoramento vegetal (DIXON e MALDEN, 1908; EIGSTI, 1938). Seguindo esta vertente, vários processos de indução de mutações artificiais foram desenvolvidos, visando acelerar o processo de mutação nos organismos, e conseqüentemente aumentar a variabilidade genética e aprimorar o processo de melhoramento vegetal (VAN-HARTEN, 1998).

A poliploidia induzida pode ser um eficiente instrumento para programas de melhoramento genético e que pode ser empregada objetivando a poliploidia da própria espécie, como um modo de se tentar conseguir plantas maiores e melhores (DEWEY, 1980). A poliploidia, em plantas forrageiras de pastagens, torna-se uma estratégia muito interessante, uma vez que a produção da biomassa, o aumento das características de interesse agrônômico, tais como valor nutricional e produção de forragem, distribuição da produção de forragem de acordo com o ciclo vegetativo, resistência a pragas e doenças, tolerância a estresses abióticos são o foco principal (PEREIRA et al., 2012). Desta forma objetiva-se neste trabalho, realizar a indução a poliploidia em um genótipo de *E. polystachya* com diferentes níveis de colchicina e tempos de exposição para obter variabilidade genética.

## Material e métodos

Para indução de ploidia foram coletados colmos da parte submersa de uma única planta matriz (touceira) de canarana, no município do Careiro da Várzea, as margens do rio “Paraná do Careiro” (3°11'17.7"S 59°52'07.6"W). O material coletado foi levado ao laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus - AM. Na limpeza inicial dos colmos foram retiradas as raízes adventícias, o material senescente e realizada a lavagem em água corrente. Após a pré limpeza os colmos foram seccionados em segmentos nodulares de aproximadamente 2,0 cm entre os nós e selecionados 600 segmentos.

Para a indução à ploidia, os segmentos nodais foram submersos sob agitação em diferentes concentrações de colchicina e tempos de exposição, conforme especificado na Tabela 4. Foram avaliadas cinco concentrações de colchicina (0; 0,01; 0,025; 0,05 e 0,1 mL L<sup>-1</sup>) e quatro tempos de exposição (0; 12; 24 e 36 horas).

Para aplicação dos tratamentos os segmentos ficaram submersos na solução (em diferentes concentrações) de colchicina em beakers sob agitação em mesa agitadora orbital a 178 RPM e 26,6 °C, durante o tempo determinado pelo tratamento. Após a exposição aos tratamentos os segmentos nodais foram imediatamente plantados em bandejas contendo substrato commercial Vivatto®, composto de casca de pinus bioestabilizada, vermiculita, moinha de carvão vegetal, água e espuma fenólica, com pH=5,2 e macro minerais em mgdm<sup>-3</sup>: Ca = 440; Mg = 324; Na = 51; K = 211; P =11. As bandejas foram colocadas em casa de vegetação em ambiente controlado, onde permaneceram por 45 dias. Após o período em casa de vegetação as plantas sobreviventes foram transplantadas para vasos (de 3,8 litros) contendo terriço e mantidos em viveiro com irrigação por aspersão e sombrite (50%).

O experimento foi conduzido em arranjo fatorial 5 (doses de colchicina) x 4 (tempo de exposição), em delineamento experimental inteiramente casualizado, com 3 repetições e unidade experimental de 10 seguimentos.

Na terceira semana após o plantio em casa de vegetação detectou-se o aparecimento de amarelecimento em algumas plantas, por isso, aos vinte dias após o plantio foi realizada (semanalmente) adubação foliar com fertilizante NPK (06-06-08) nas dosagens de 1,5 ml L<sup>-1</sup> de calda. Também foi realizada (semanalmente) adubações com micronutrientes, em que as as bandejas foram mergulhadas em solução na

concentração de 1 ml L<sup>-1</sup> do produto comercial (hidropônica com micronutrientes de composição (em g.L<sup>-1</sup> em termos de níveis de garantia): N=.81,51;.P<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.=20,02; K<sub>2</sub>O=96,59; Ca=48,49; Mg=3,90; B=0,13; Cu=0,39; Fe=0,65; Mn=0,26; Mo=0,026 e Zn=0,13). Assim por por 10 segundos mergulhados esparava-se a saturação do substrato a sua capacidade de campo. Com as sucessivas adubações pode-se verificar que folhas novas emergentes das plantas sobreviventes apresentaram a coloração normal.

**Tabela 4: Tratamentos com diferentes concentrações de colchicina e tempos de exposição dos segmentos nodais de *Echinochloa polystachya* para exposição a diferentes soluções.**

TRAT	DOSES X	TEMPO (HORAS)	REPETIÇÕES	INDIVÍDUOS /REPETIÇÃO	TOTAL
T1	0	0	3	10	30
T2	0	12	3	10	30
T3	0	24	3	10	30
T4	0	36	3	10	30
T5	0,01	0	3	10	30
T6	0,01	12	3	10	30
T7	0,01	24	3	10	30
T8	0,01	36	3	10	30
T9	0,025	0	3	10	30
T10	0,025	12	3	10	30
T11	0,025	24	3	10	30
T12	0,025	36	3	10	30
T13	0,05	0	3	10	30
T14	0,05	12	3	10	30
T15	0,05	24	3	10	30
T16	0,05	36	3	10	30
T17	0,1	0	3	10	30
T18	0,1	12	3	10	30
T19	0,1	24	3	10	30
T20	0,1	36	3	10	30
<b>TOTAL</b>					<b>600</b>

### Morfogenese e taxa de crescimento

Em casa de vegetação foram avaliadas as características apresentadas no Quadro 1. A avaliação da morfogênese e taxa de crescimento foi realizada de acordo com a técnica dos “afilhos marcados” (adaptado) (Carrère et al., 1997). As folhas completamente expandidas foram medidas a partir de sua lígula e as folhas emergentes, a partir da penúltima lígula visível, conforme Davies (1993). A altura da planta foi medida a partir da altura do perfilho estendido. Também foram observadas as possíveis anomalias,

distúrbios fisiológicos e mortalidade de folhas e/ou plantas ocorridos durante o período de aproximadamente 30 dias e/ou quando por ocasião da terceira folha completamente expandida por afilho. Foram aferidos os diversos caracteres conforme Quadros 1.

**Quadro 1: Características avaliadas e calculadas a partir do plantio a 30 dias de acompanhamento dos diferentes tratamentos de *Echinochloa polystachya* submetidos à exposição em solução de colchicina in vivo.**

	Característica	Definição
DPE	Dias para Emergência	Tempo observado (em dias) para emergência por tratamento
TF1	Tempo para a expansão da folha 1	Tempo para a expansão da folha 1 (em dias) observadas por tratamento
TF2	Tempo para expansão da folha 2	Tempo para expansão da folha 2 (em dias) observadas por tratamento
TF3	Tempo de expansão de folha 3	Tempo de expansão de folha 3 (em dias) observadas por tratamento
NF	Número de folhas totais (por planta)	Número de folhas totais observadas por tratamento
PE	Porcentagem de emergência	$[(\text{núm. o de plântulas emergidas totalizadas por tratamento})/(\text{Núm. Total de segmentos nodais plantados por tratamento})]*100^{-1}$
PMPRE	Porcentagem de mortalidade em pré emergência	$[(\text{núm. o de plantas não emergidas totalizadas por tratamento})/(\text{Núm. Total de segmentos nodais plantados por tratamento})]*100^{-1}$
PPLANOM	Porcentagem de plântulas anômalas	$[(\text{núm. o de plântulas anômalas totalizadas por tratamento})/(\text{Núm. Total de segmentos nodais plantados por tratamento})]*100^{-1}$
PLEM	Porcentagem de plântulas emergentes e mortas	$[(\text{núm. o de plântulas emergentes e mortas totalizadas por tratamento no dia "n"})/(\text{Núm. Total de segmentos nodais plantados por tratamento})]*100^{-1}$
PLTOM	Porcentagem de plantas Tombadas e mortas	$[(\text{núm. o de plantas tombadas e mortas totalizadas por tratamento no dia "n"})/(\text{Núm. Total de segmentos nodais plantados por tratamento})]*100^{-1}$
PPLMPOS	Porcentagem de mortalidade em pós emergência	$PPLMPOS = PLEM + PLTOM$
PMTOT	Porcentagem da mortalidade total	$PMTOT = PPLMPOS + PMPRE$
ALPE	Altura do afilho estendido	Comprimento em centímetros do afilho estendido observado por tratamento
CF1	Comprimento de folha 1	Comprimento de folha 1 (em centímetros) observado por tratamento

LF1	Largura da folha 1	Largura da folha 1 (em centímetros) observado por tratamento
CF2	Comprimento de folha 2	Comprimento de folha 2 (em centímetros) observado por tratamento
LF2	Largura da folha 2	Largura da folha 2 (em centímetros) observado por tratamento
CF3	Comprimento de folha 3	Comprimento de folha 3 (em centímetros) observado por tratamento
LF3	Largura da folha 3	Largura da folha 3 (em centímetros) observado por tratamento
TXALPE	Taxa de crescimento da ALPE (cm/dia)	(média do comprimento do afilho estendido (em centímetros) no dia observado - Comprimento do afilho da leitura anterior)/média do intervalo de tempo (em dias) transcorrido entre as observações (por tratamento)
TXC1	Taxa de crescimento da folha 1 (cm/dia)	(média do comprimento da folha 1 (em centímetros) no dia observado - Comprimento da folha 1 da leitura anterior)/média do intervalo de tempo (em dias) transcorrido entre as observações (por tratamento)
TXC2	Taxa de crescimento da folha 2 (cm/dia)	(média do comprimento da folha 2 (em centímetros) no dia observado - Comprimento da folha 2 da leitura anterior)/média do intervalo de tempo (em dias) transcorrido entre as observações (por tratamento)
TXC3	Taxa de crescimento da folha 3 (cm/dia)	(média do comprimento da folha 3 (em centímetros) no dia observado - Comprimento da folha 3 da leitura anterior)/ média do intervalo de tempo (em dias) transcorrido entre as observações (por tratamento)
TXMC	Taxa média de crescimento da folha (cm/dia)	$TMC = (TXC1+TXC2+TXC3)/3$

### Análises citológicas e morfométricas

A partir das medidas de altura da planta e largura da folha 3 (completamente expandida) foram selecionados 20 potenciais plantas poliploides, aquelas com maior altura de plantas e largura de folha. As 20 plantas selecionadas foram analisadas para caracteres morfométricos e citológicos. Para verificar a existência de diferenças nas estruturas do limbo foliar, foram coletadas amostras de folhas completamente expandidas destas plantas, cujas folhas foram cortadas em pedaços de aproximadamente 2 cm e preparadas lâminas através da técnica adaptada de impressão da epiderme, conforme Segatto et al, 2004, que consistiu em colocar uma gota de adesivo instantâneo universal (éster de cianoacrilato) sobre uma lâmina de vidro. A região de interesse (abaxial e adaxial da folha) foi colocada sobre a gota de adesivo e levemente pressionada permitindo que a

gota do adesivo se espalhasse. Após a secagem (aproximadamente 10 minutos), foi destacado a folha para que houvesse a separação da lâmina, permitindo desta forma a “impressão” da epiderme da folha. As lâminas foram mantidas em condições ambientais para as avaliações.

Foram realizadas mensurações em  $\mu\text{m}$  (micrômetros) das células da epiderme foliar (comprimento e largura), das células dos feixes vasculares (comprimento e largura), também mensurada a distância média entre os feixes vasculares, o tamanho dos estômatos, das células guardas e a densidade estomática (DE = número de estômatos por unidade de área) da face adaxial dos genótipos (Quadro 2). Para as mensurações das distâncias e comprimentos dos parâmetros das células da epiderme foliar foi visualizado em microscópio eletrônico ZEISS (2012), com câmera de vídeo AXIO IMAGER. M2 60N-C 2/3” 0,63 x 426113.

**Quadro 2: Características avaliadas e calculadas do limbo foliar (os 60 dias após a germinação) dos 20 supostos poliploides de *Echinochloa polystachya* plantados em vasos em casa de vegetação.**

CARACTERÍSTICA		DEFINIÇÃO
LIF	Distância entre feixes	Distância em $\mu\text{m}$ entre os feixes vasculares
CCE	Comprimento das células da epiderme	A maior comprimento interno da célula da epiderme em $\mu\text{m}$
LCE	Largura das células da epiderme	A maior Largura interna da célula do da epidermer em $\mu\text{m}$
CCF	Comprimento das células dos feixes	O maior comprimento interno da célula do feixe vascular em $\mu\text{m}$
LCF	Largura das células dos feixes	A maior largura interna da célula do feixe vascular em $\mu\text{m}$

A DE foi analisada em microscópio ótico e aferidos sob objetiva de 40X, observando-se quinze campos de visão por amostra. Baseando-se em escala micrométrica para a ocular utilizada, a densidade estomática foi determinada segundo a equação:

$$DE = [\text{Número de estômatos} / \text{área (mm}^2\text{)}]$$

Onde: DE = Densidade estomática; Área = área do campo real visível da ocular de 40x (0,14 mm<sup>2</sup>).

### Índice de Clorofira

Para a determinação indireta do teor de clorofila nas folhas (ICC - índice de clorofila) nas folhas das plantas selecionadas foi utilizado a leitura através do equipamento SPAD (Soil Plant Analysis Development, Minolta, Japão). Para este procedimento foi feita 5 leituras por folha, nas três últimas folhas, sendo estas folhas completamente expandidas do perfilho, totalizando 15 leituras por planta. Desta forma a a partir do “cartucho”: folha 1: Primeira folha completamente expandida a partir do cartucho, Folha 2 e Folha 3 sequencialmente abaixo. A partir das leituras foram obtidas e analisadas as características apresentadas no Quadro 3.

**Quadro 3: Índice de clorofila do limbo foliar (Leitura SPAD) das folhas dos 20 supostos poliploides de *Echinochloa polystachya* plantados em vasos em casa de vegetação.**

CARACTERÍSTICA	DEFINIÇÃO
ICF1	Índice de clorofila da folha 1 - Leitura de 5 regiões da lâmina foliar através da leitura direta do aparelho
ICF2	Índice de clorofila da folha 2 - Leitura de 5 regiões da lâmina foliar através da leitura direta do aparelho
ICF3	Índice de clorofila da folha 3 - Leitura de 5 regiões da lâmina foliar através da leitura direta do aparelho
ICFM	Índice de clorofila médio das folhas - Leitura de 5 regiões da lâmina foliar através da leitura direta do aparelho

### Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas por meio do RBIO, um programa integrado ao ambiente R (BHERING, 2017). Os testes de análise de normalidade dos dados foram verificados com os testes de Shapiro-Wilk e de Lilliefers, utilizando o aplicativo computacional em genética e estatística, Programa GENES, versão 6.1, da Universidade Federal de Viçosa – UFV (CRUZ, 2013). Para a verificação da significância das variáveis respostas (morfogênese e taxas de crescimento) em função dos tratamentos, foi realizada análise de regressão e correlação, utilizando o programa estatístico RBIO.

## Resultados e discussões

### Indução de ploidia

Após a indução da ploidia *in vivo* e plantio dos tratamentos em casa de vegetação foi possível observar um rápido crescimento inicial das gemas dos segmentos nodais. Associados a este rápido crescimento inicial observou-se plantas com aspecto “variegada” diferente do genótipo matriz, outras com colorações amareladas entre as nervuras e/ou com as gemas apicais atrofiadas, sintomas estes parecidos com deficiências nutricionais apresentando sintomas visuais semelhantes as deficiências minerais, sendo mais proeminente os sintomas das gemas apicais, com as necrose e posterior morte dos pontos vegetativos, e, em parte, secamento dos ramos, de maneira descendente, mas foram observadas também plantas normais. Sintomas de carência de minerais são citados na literatura e diagnosticados conforme descrito por Salvador et al. (1999) que diagnosticando as alterações morfológicas decorrentes da falta de micronutrientes em particular para o boro folhas mais estreitas do que as consideradas normais e apresentaram leve clorose internerval, evoluindo do centro para os bordos da folha. No entanto, ressalta-se que a variabilidade de comportamento fenotípico inicial pode levar a hipótese inicial de indício de mutação, pois alterações gênicas podem levar plantas mutadas a ter maior dificuldade de absorver nutrientes.

A colchicina apresenta efeitos fitotóxicos conforme já descrito em literatura (VERHOEVEN, 1990; MOREJOHN, 1991). Devido as observações iniciais do desenvolvimento das plantas, aparecimento de amarelecimento em algumas plantas, vinte dias após o plantio foi aplicado semanalmente adubações foliar nitrogenada e com micronutrientes sucessivas verificando-se novas folhas emergentes das plantas sobreviventes e sempre com coloração normal.

A produção de forragem com maior valor nutritivo, maiores teores de proteína bruta e de composição de macro e micronutrientes em *Echinochloa polystachya* e em *Echinochloa pyramidalis*, apresentam maiores exigências nutricionais (ABREU, 2006). Este fato reporta que maiores taxas de crescimento e/ou plantas com maior estrutura apresentam então maiores exigências de minerais em detrimento a plantas de menor taxa de crescimento e/ou menor porte. A eficiência fotossintética das plantas está intimamente correlacionadas a síntese de pigmentos, como as clorofilas e este teor de clorofila está associado diretamente com a concentração do nitrogênio que estão presentes nos

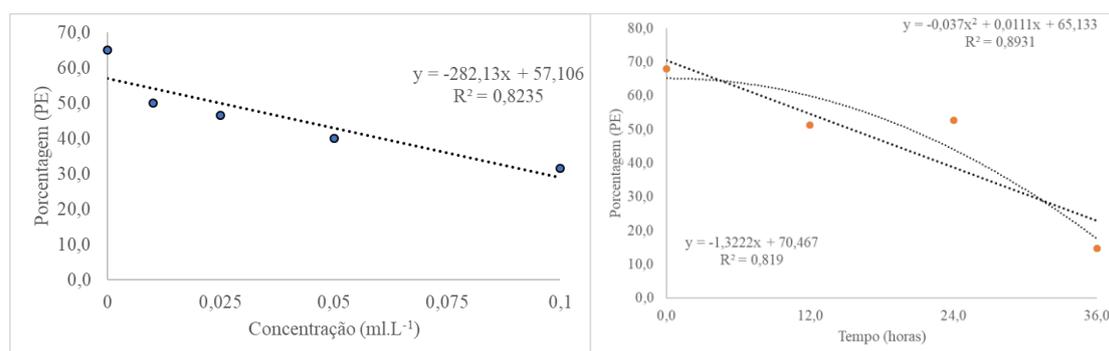
cloroplastos e que atuam na síntese da formação das moléculas de clorofila e consequentemente na síntese energética das plantas (TAIZ e ZEIGER, 2013).

As características analisadas apresentaram diferença estatística significativa para as diferentes concentrações e os diferentes tempos afetando diretamente as germinações e taxas de sobrevivência (Tabela 5), exceto para PPLMPOS, CF1, TXC1, TXC2 e TXC3. Contudo não foi verificado a interação entre os fatores: Concentração x Tempo para as variáveis expostas na Tabela 5. A partir das Figuras 7, 8 e 9 podem se visualizados na análise de regressão as características relativas à sobrevivência das plantas em função dos tratamentos. As porcentagens de emergência dos segmentos nodais em função do tempo e das concentrações (Figura 7). Verificou-se que para esta variável houve em função dos aumentos das concentrações e dos tempos de exposição tanto para os modelos lineares e quadráticos, aumentando a mortalidade com o aumento das concentrações e do tempo. Para as taxas de plantas tombadas e mortas (Figura 9) observadas pode se verificar que as respostas diminuem em função dos tratamentos, indicando que nas maiores concentrações não tenham influência sobre este evento observado. Contudo deve observar a grande resposta de segmentos nodais que não emergiram nos tratamentos de maiores concentrações para as variáveis: porcentagens de mortalidade em pré emergência (Figura 8) e porcentagem de mortalidade total (Figura 10) observou-se o aumento destas variáveis, podendo inferir que as maiores concentrações e tempos de exposição dos segmentos nodais prejudicaram as taxas de sobrevivência reafirmando o efeito deletério que a colchicina apresenta para as plantas em maiores concentrações e tempos de exposição.

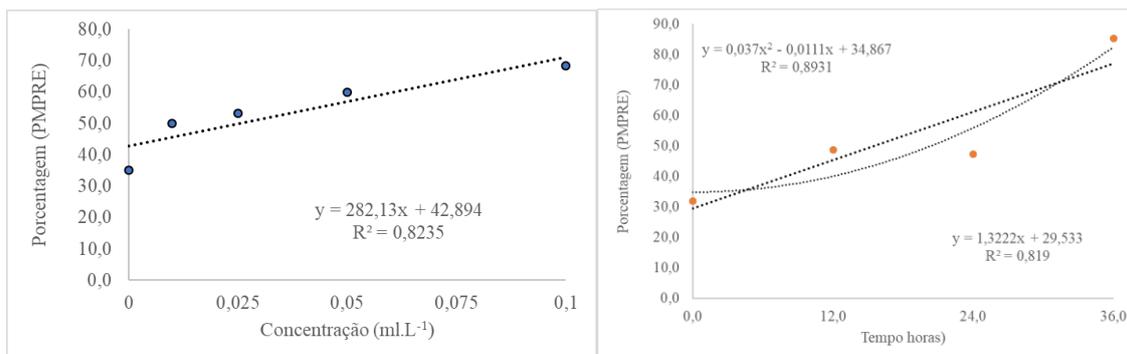
**Tabela 5: Probabilidades do teste F (Prob) e coeficientes de variação (CV%) das análises de variâncias de características da morfogênese e taxa de crescimento de segmentos nodais de *Echynochloa polystachya* avaliadas até aos 30 dias do plantio após serem submetidos a tratamento para indução de ploidia com colchicina. Manaus, 2019.**

CARACTERÍSTICAS	C	Prob	T	P-VALUE	CXT	Prob	CV%
PE	*	0,001536	*	0,00000	ns	0,18627	39,90
PMPRE	*	0,001536	*	0,00000	ns	0,18627	34,91
PLTOM	*	0,060180	*	0,00068	ns	0,57608	75,24
PPLMPOS	ns	0,343690	*	0,00343	ns	0,58565	72,46
PMTOT	*	0,004897	*	0,00001	ns	0,10327	23,12
ALPE	*	0,003440	ns	0,48104	ns	0,16494	31,62
TXALPE	*	0,028700	ns	0,69534	ns	0,28055	32,30
CF1	ns	0,067220	ns	0,51059	ns	0,91017	41,26
CF2	*	0,016240	ns	0,65625	ns	0,74963	30,85
CF3	*	0,004880	ns	0,66145	ns	0,19247	29,43
TXC1	ns	0,127340	ns	0,11099	ns	0,31867	46,59
TXC2	ns	0,356130	ns	0,43966	ns	0,71037	35,71
TXC3	ns	0,228350	ns	0,98662	ns	0,66002	50,41
TXMC	*	0,030670	ns	0,61181	ns	0,54004	34,78

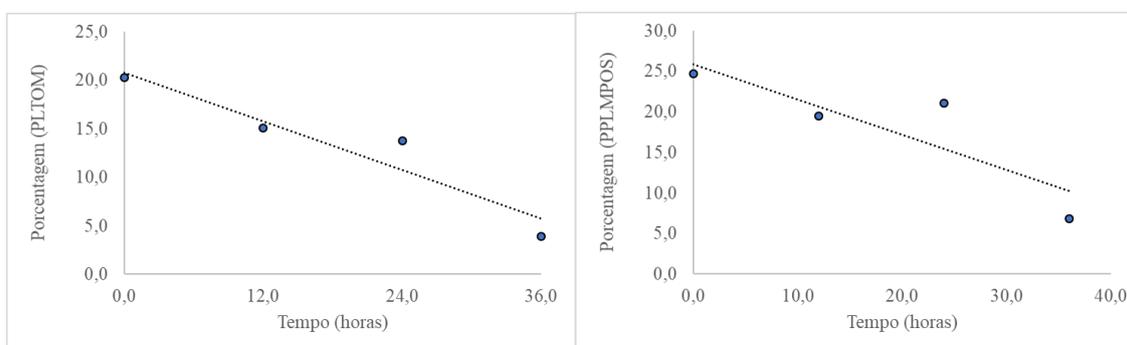
C= Concentração; T=Tempo; P = Probabilidade; CXT = Interação Concentração x Tempo; \* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste-F; <sup>ns</sup> Não Significativo a 5% de probabilidade pelo teste-F.



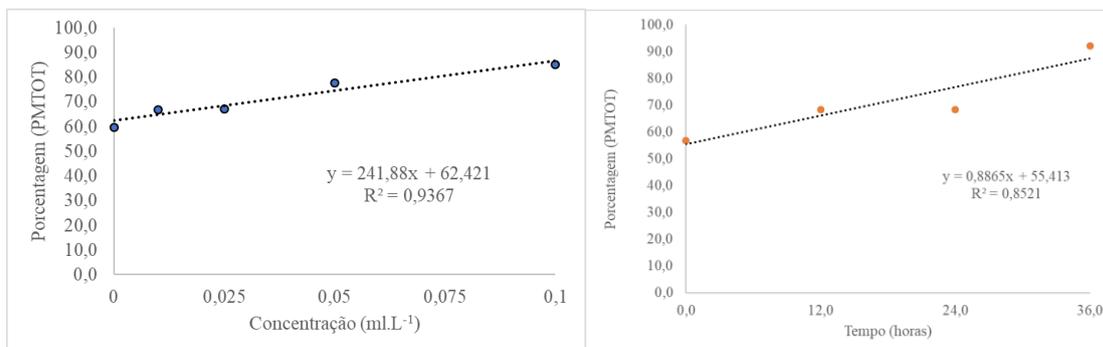
**Figura 7: Porcentagem de Emergência de segmentos nodais de *Echynochloa polystachya* em função das diferentes concentrações de colchicina após o plantio em casa de vegetação. - modelo linear: P-value = 0,00015/Porcentagem de emergência de segmentos nodais de *Echynochloa polystachya* em função dos diferentes tempos de exposição de colchicina após o plantio em casa de vegetação – modelo linear: P-value = 0,00000 e modelo quadrático P-value = 0,03224.**



**Figura 8: Porcentagem de mortalidade em pré emergência de segmentos nodais de *Echynoclhoa polystachya* em função das diferentes concentrações de colchicina após o plantio em casa de vegetação. - modelo linear: P-value = 0,00015/ Porcentagem de mortalidade em pré emergência de segmentos nodais de *Echynoclhoa polystachya* em função dos diferentes tempos de exposição de colchicina após o plantio em casa de vegetação modelo linear: P-value = 0,00000 e modelo quadrático P-value = 0,03224.**



**Figura 9: Porcentagem de Plântulas tombadas e mortas de *Echynoclhoa polystachya* em função das diferentes concentrações de colchicina após o plantio em casa de vegetação .- modelo linear: P-value = 0,0000 / Porcentagem de Plântulas tombadas e mortas de *Echynoclhoa polystachya* em função dos diferentes tempos de exposição de colchicina após o plantio em casa de vegetação- modelo linear: P-value = 0,00000.**



**Figura 10: Porcentagem de mortalidade total das plantas de *Echynoclhoa polystachya* em função das diferentes concentrações de colchicina após o plantio em casa de vegetação - modelo linear: P-value = 0,00022/ Porcentagem de mortalidade total das plantas de *Echynoclhoa polystachya* em função dos diferentes tempos de exposição de colchicina após o plantio em casa de vegetação - modelo linear: P-value = 0,0000.**

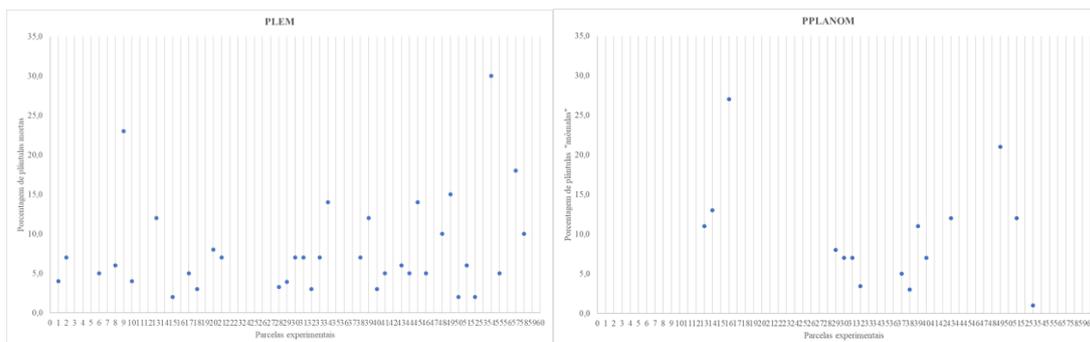
Fatos semelhantes as taxas de sobrevivência em *E. polystachya* são citados por são citados em outros trabalhos, a exemplo em *Centrocema virginianum* (L) que as diferentes concentrações de colchicina associadas a diferentes tempos apresentaram maiores taxas de ploidia em menores doses e tempos (BATTISTIN et al.; 1993). Para *C. virginianum*, o tratamento 0,3% de colchinha por 6 horas apresentou 4,7% de tetraploides e 4,7 % de hexaploides. Porém doses superiores de colchicina apresentaram alta sensibilidade ao antimitótico sendo observadas taxas de sobrevivência de apenas 5%, com várias alterações morfológicas e seus descendentes dos tratamentos com concentrações superiores a 0,15% não apresentaram a formação de sementes. Nos Tetraploides e hexaplóides dos trabalhos desses autores também foi observada polissomatia, encontradas nas ponta de raízes e as alterações morfológicas. Contudo doses de 0,00625% de colchicina entre 12 horas e 22 horas apresentaram maiores taxas de ploidia hexaploides e hexaploides 16% tetraploides e 12% hexaploides no período de 22 horas de exposição, plantas apresentaram taxas de sobrevivência maiores. Também estes tratamentos apresentaram maior taxa de germinação e crescimento inicial maior, comparado ao controle (BATTISTIN et al., 1993).

Silva (2014) encontrou dados semelhantes aos tratamentos efetuados em *E. polystachya*, em seus tratamentos sob agitação e reportou esta mortalidade de segmentos nodais que não receberam colchicina ao fato da possibilidade destas taxas de mortalidade estarem associada ao estresse mecânico.

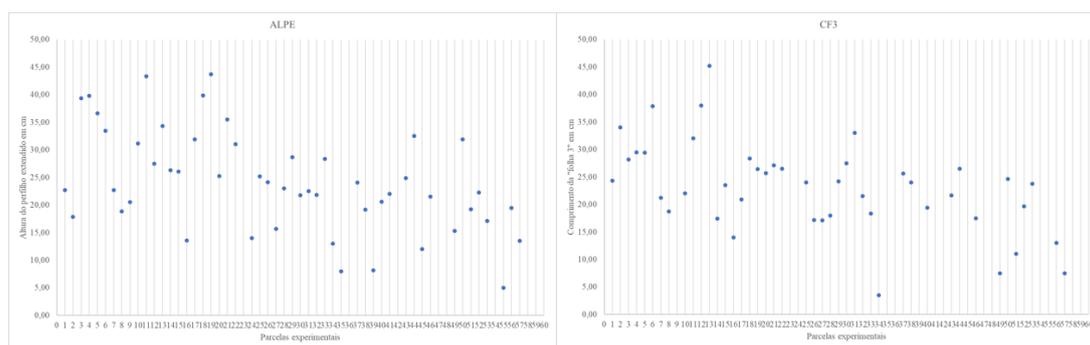
Para *Platanus acerifolia*, árvore de paisagismo urbano, foi aplicado colchicina em sementes e em meristemas apicais de mudas. O tratamento da semente não germinada foi

o método mais eficiente em comparação a aplicação diretamente no ponta apical de mudas em que foi observado o efeito nocivo onde o crescimento do caule foi temporariamente afetado, mas as plantas eventualmente se recuperaram-se (LIU et al., 2007). Nos tratamentos de *E. polystachya* foi verificado o efeito nocivo evidente nos tratamentos com maiores doses e com os maiores tempos de exposição. Uma característica fitotóxica evidente em todos os tratamentos de canarana, foram a presença de plântulas “anômalas” que apresentaram no início um rápido crescimento inicial, cujas folhas não se expandiram, se apresentando como um “charuto” e seu crescimento foi paralisado, com posterior senescência e enegrecimento e morte. No entanto, essas folhas também foram mensuradas. Para estas características não foi observado efeitos significativos pela análise de variância, cujas médias são apresentadas na Tabelas 5.

Em uma análise exploratória dos resultados, observa-se na Figura 11 as mensurações das variáveis PLEM e PPLANOM por parcela, mostrando a grande amplitude de variação dentro, salientado o fato da quase inexistência de germinação nos tratamentos e para a concentração 0,01 e tempo de exposição de 36 horas, não apresentaram germinação. As mesmas ponderações podem ser feitas para as mensurações realizadas por parcela para as variáveis ALPE E CF3. Observa-se na Figura 12 que as alturas dos perfilhos estendidos e do comprimento da folha 3, houveram apenas maiores mortalidades nos tratamentos em maiores concentrações e tempos de exposição, como também uma grande variação dentro das parcelas experimentais, indicando que o efeitos do antimitótico que em particular no tratamento 8 (concentração 0,01 e tempo de 36 horas) observou-se duas plantas emergidas e com alturas abaixo de 35 cm e apenas uma delas apresentou formação da “folha 3” nos primeiros 30 dias. No tratamento 12 (concentração 0,025 e tempo de 36 horas) apenas duas plantas emergiram e também apenas 1 apresentou a formação da folha 3. No tratamento 16 (concentração 0,05 e tempo de 36 horas) não houve a emergência de plantas, assim como para tratamento 20 (concentração 0,1 e tempo de 36 horas), também foi observado nenhuma planta emergida, sugerindo desta forma o efeito deletério formação dos tecidos.



**Figura 11: Amplitude de variação entre e dentro dos tratamentos de indução a poliploidia em *Echynocloha polystachya* considerando as mensurações das variáveis PLEM (Porcentagem de plântulas emergentes e mortas) e PPLANOM (Porcentagem de plântulas anômalas) por repetição.**



**Figura 12: Amplitude de variação entre e dentro dos tratamentos de indução a poliploidia em *Echynocloha polystachya* considerando as mensurações das variáveis ALPE (Altura do perfilho estendido em cm) e CF3 (Comprimento da folha 3 em cm) por repetição.**

Pelos modelos lineares expostos na Tabelas 6 pode se perceber que os tratamentos influenciaram as alturas e as taxas de crescimento dos perfilhos, bem como o comprimento das folhas 2 e 3. Também foi observado que os tratamentos aplicados influenciaram as taxas de crescimento das folhas e as taxas médias de comprimento de folhas. Desta forma, altas concentrações de colchinina produziram efeitos nas características da morfogênese da planta, em particular para a característica da expansão de folhas, todavia doses moderadas e menores tempos de exposição pode produzir efeitos mutagênicos e que podem ser vistos na figura 11, na qual os tratamentos de concentração mais baixos e tempos bem menores de exposição produziram indivíduos maiores.

**Tabela 06: Modelos de regressão, equação de regressão, R<sup>2</sup> e P-Value das diferentes variáveis observadas em relação a morfogênese e taxas de crescimento de *Echynochloa polystachya* do plantio até aos 30 dias de avaliação em relação ao fator (Tempo ou Concentração) verificadas pelo Teste-F, Manaus, 2019.**

Características	Fator	Regressão	Modelo	R2	P-value
PPLANOM	Tempo	-0,14x+5,26	Linear	0,98	0,00004
ALPE	Concentração	-120,27x+28,09	Linear	0,73	0,00064
TXALPE	Concentração	-4,86x+1,42	Linear	0,61	0,00936
CF2	Concentração	-39,83x+14,32	Linear	0,36	0,02979
		1607,01x <sup>2</sup> -197,17x+15,92	Quad	0,88	0,01013
CF3	Concentração	-119,71x+26,77	Linear	0,81	0,00054
TXMC	Concentração	-4,84x+1,22	Linear	0,75	0,00481

PPLANOM = Porcentagem de plântulas anômalas; ALPE = Altura do perfilho estendido; TXALPE = Taxa de crescimento (em cm) da altura do perfilho estendido; CF2 = Comprimento da folha 2 (em cm); CF3 = Comprimento da folha 3 (em cm); TXMC = Taxa média de crescimento de folha (em cm).

Pode ser observado nas tabelas 7 e 8 que independente das concentrações de colchicina e/ou do tempo de exposição não houve diferença estatística significativa entre as médias dos tratamentos dos caracteres em relação a morfogênese e taxas de crescimento.

**Tabela 7: Médias das porcentagens das avaliações da morfogênese, mortalidade, comprimento e taxas de crescimento de *Echynochloa polystachya* 30 dias após a exposição ao tratamento de indução de ploidia. Manaus, 2019.**

CARACTERÍSTICAS	CONCENTRAÇÃO DE COLCHICINA (ML L <sup>-1</sup> )				
	0	0,01	0,025	0,05	0,1
PLTOM	20,75ns	13,8ns	10,16ns	12,16ns	9,41ns
PPLMPOS	24,83ns	16,91ns	13,94ns	17,75ns	16,75ns
PLEM	4,08 ns	3,08 ns	3,77 ns	5,58 ns	7,33 ns
PPLANOM	0 ns	4,25 ns	2,08 ns	3,16 ns	3,58 ns
CF1	7,78 ns	5,72 ns	5,28 ns	5,45 ns	4,82 ns
TXC2	1,23 ns	1,21 ns	1,04 ns	0,93 ns	0,94 ns
TXC3	1,26 ns	1,82 ns	1,67 ns	1,05 ns	1,32ns

PLTOM = Porcentagem de plantas tombadas e mortas; PPLMPOS = Porcentagem de plantas mortas em pós emergência; PLEM = porcentagem de plântulas emergentes e mortas; PPLANOM = Porcentagem de plântulas anômalas; CF1 = Comprimento da folha 1 (em cm); TXC2 = Taxa de crescimento da folha 2 (em cm); TXC3 = Taxa de crescimento da folha 3 (em cm); \* Significativo a 5% de probabilidade pelo Teste-F; ns Não significativo a 5% de probabilidade pelo Teste-F.

**Tabela 8: Médias diferentes variáveis observadas em relação a morfogênese e taxas de crescimento de *Echynochloa polystachya* do plantio até aos 30 dias de avaliação em relação ao fator tempo verificadas pelo Teste-F, Manaus, 2019**

CARACTERÍSTICAS	0	12	24	36
PLEM	4,46 ns	4,48 ns	7,26 ns	2,86 ns
ALPE	23,39 ns	26,96 ns	23,11 ns	23,68 ns
TXALPE	1,17ns	1,34ns	1,22ns	1,31ns
CF1	6,24 ns	5,85 ns	5,08 ns	6,97 ns
CF2	13,15 ns	13,98 ns	12,49 ns	12,59 ns
CF3	23,11 ns	24,38 ns	21,72 ns	23,25 ns
TXC1	0,66 ns	0,75 ns	0,55 ns	0,96 ns
TXC2	0,98 ns	1,08 ns	1,18 ns	*
TXC3	1,41 ns	1,53 ns	1,44 ns	*
TXMC	1,03 ns	1,14 ns	0,98 ns	*

PLEM = porcentagem de plântulas emergentes e mortas; ALPE = Altura do perfilho estendido; TXALPE = Taxa de crescimento (em cm) da altura do perfilho estendido; CF1 = Comprimento da folha 1 (em cm); CF2= Comprimento da folha 2 (em cm); CF3 = Comprimento da folha 3 (em cm); TXC1= Taxa de crescimento da folha 1 (em cm); TXC2 = Taxa de crescimento da folha 2 (em cm); TXC3 =Taxa de crescimento da folha 3 (em cm); TXMC = Taxa média de crescimento de folha (em cm). \* Significativo a 5% de probabilidade pelo Teste-F; ns Não significativo a 5% de probabilidade pelo Teste-F.

Alterações em diversos caracteres como observado no presente trabalho para morfologia das plantas são citados em diversos outros trabalhos com este antimitótico, colchicina (BATTISTIN et al.,1993; RIDDLE et al., 2006; LAERE et al., 2011; RAMESH et al., 2011; Yan et al.; 2016). Battistin et al. (1993) em *Centrochloa virginianum* (L) BENTH descreveu que as diferentes concentrações de colchicina associadas a diferentes tempos apresentaram plantas maiores. Todavia quando estas eram transplantadas a campo, era possível observar as alterações das características morfológicas, tais como: coloração de folíolos albinos, a formação de poucas ramificações e não formação de touceiras. Ramesh et al. (2011) aplicaram colchicina em diferentes concentrações em gemas de amoreira e verificaram que a porcentagem de brotação, enraizamento e altura da planta diminuíram com um aumento linear na porcentagem de colchicina utilizada. A atuação da colchicina nas alterações das características morfogênicas no presente trabalho também foram fortemente afetadas como a altura da planta, comprimento de folha e porcentagem de emergência. Porém as plantas quando poliploides espera-se que os aspectos relacionados a fisiologia e consequentemente a produtividade sejam geneticamente e exemplos podem ser relacionados. Plantas tetraploides de *Spathiphyllum wallisii* são mais resistentes em aspectos relacionados a fisiologia, adaptação às mudanças ambientais, tais como resistências aos estresses hídrico comparado à plantas diploides submetidas a 15 dias de

estresse hídrico (LAERE et al., 2011). Para esses autores os diplóides apresentaram sintomas de murcha, enquanto os tetraplóides quase não apresentaram sintomas.

Apesar de alterações fenotípicas que comumente ocorrerem em resposta as mudanças no nível de ploidia, a extensão em que um poliploide específico as exibe, varia muito entre espécies e entre as cultivares, indicando que múltiplos fatores determinam as respostas morfológicas à mudança de ploidia, que no entanto quando induzida a ploidia esta pode agregar valor à espécie em questão (LAERE et al., 2011; RIDDLE et al., 2006).

Para Yan et al. (2016) as características foliares dos tetraplóides e octoplóides de *Pogostemon cablin*, induzidas por colchicina, foram comparadas e observaram a maior taxa de indução de octoplóides no tratamento com colchicina a 0,05% por 72 h. Os aspectos morfofisiológicos observados como tamanho de folhas e alterações nas densidades estomáticas dos poliploides puderam ser usados para a identificação, assim como no presente trabalho. A maioria das linhas de octoplóides exibiram maiores teores de álcool patchílico do que os controles após 6 meses de cultivo. Os resultados demonstraram que a indução de poliploidia pode ser benéfica na melhoria do valor medicinal de *P. cablin*. Neste sentido, para *E. polystachya*, espera-se que os estudos futuros evidenciem melhoria nos aspectos nutricionais nos poliploides desta forrageira.

Para verificar se houve alteração de ploidia foi realizada uma avaliação classificatória das plantas com base em tamanho da planta e largura da folha 3 em todas as plantas sobreviventes aos 45 dias após o plantio. A partir da classificação, foram selecionadas 20 plantas com suspeita de poliploidia por apresentar superioridade nos caracteres tamanho da planta e largura da folha 3. Na Tabela 9, pode-se identificar a porcentagem de plantas, o número de plantas (%) de *Echynoclhoa polystachya* induzidas a ploidia selecionadas mediante os referidos critérios e as respectivas correspondências aos tratamentos de colchicina e aos tempo de exposição. Verifica-se, portanto, após a seleção para os caracteres, porcentagens de plantas de diferentes tratamentos, sendo 10% de plantas controle (que não receberam colchicina) e outras de diferentes tratamentos, destacando-se os tratamentos 0,01 e 0,025 que apresentaram as maiores proporções na amostra.

**Tabela 9: Porcentagem de plantas (%), número de plantas (%) de *Echynoclhoa polystachya* induzidas a ploidia selecionadas mediante os critérios das maiores alturas e larguras da folha 3 e respectivas correspondências aos tratamentos de colchicina e aos tempos de exposição**

CONCENTRAÇÃO	TEMPO	%	NÚMERO DE PLANTAS
0,0	24,00	5,00	1
0,0	36,00	5,00	1
0,01	0,00	10,00	2
0,01	12,00	5,00	1
0,01	24,00	20,00	4
0,025	0,00	5,00	1
0,025	12,00	5,00	1
0,025	24,00	5,00	1
0,05	0,00	15,00	3
0,05	12,00	5,00	1
0,05	24,00	5,00	1
0,1	0,00	10,00	2
0,01	36,00	5,00	1
		<b>100,00</b>	<b>20</b>

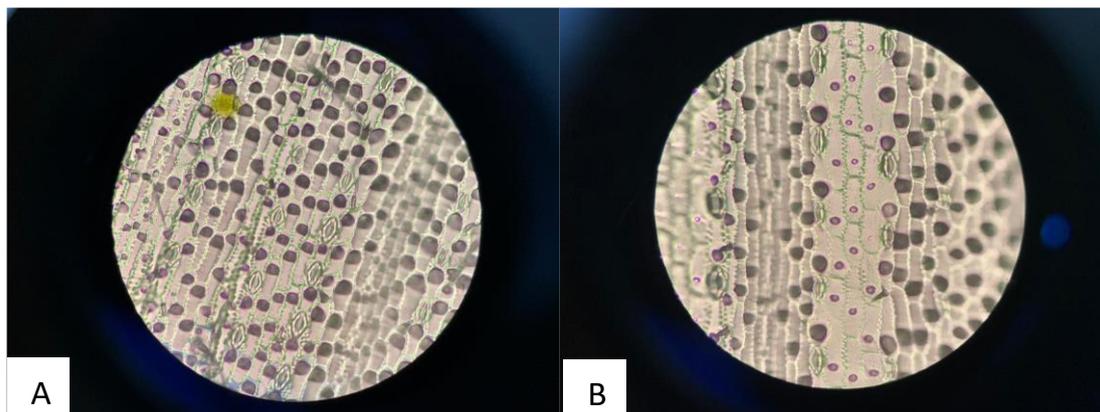
Os resultados da análise de variância das características morfométricas: DE, LIF, CCE, LCE, CCF, LCF, ICF1, ICF2, ICF3 e ICM são apresentadas na Tabela 10. Percebe-se que exceto para ICM (índice médio de clorofila), houve diferença estatística significativa dos tratamentos para todas as características analisadas.

**Tabela 10: Probabilidades e coeficientes de variação do resultado das análises de variâncias das características morfométricas observadas a partir do limbo foliar das plantas selecionadas de *Echynoclhoa polystachya*, analisadas pelo Teste-F, Manaus, 2019.**

CARACTERÍSTICAS		P-VALUE	CV%
DE	*	8,9478E-14	3,48
LIF	*	5,42070E-17	3,82
CCE	*	1,92140E-08	10,41
LCE	*	8,13930E-20	6,37
CCF	*	1,04920E-07	8,67
LCF	*	2,37190E-19	5,6
ICF1	*	1,28170E-14	6,04
ICF2	*	1,50170E-17	3,79
ICF3	*	4,97970E-09	5,13
ICM	ns	0,0959960	16,54

\* Significativo a 5% de probabilidade pelo Teste-F; ns Não significativo a 5% de probabilidade pelo Teste-F; (1) Dados transformados = 1/x.

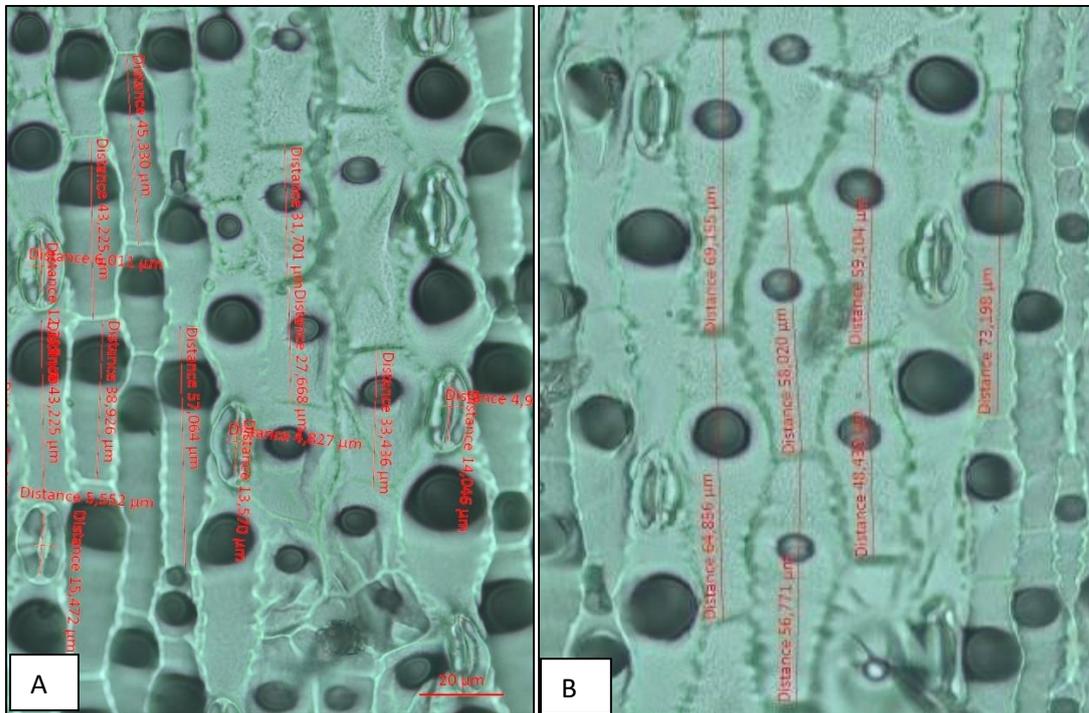
Cohen e Tel-Zur (2013) relatam que nem sempre a indução a poliploidia confere vantagem de condicionamento físico e que a magnitude das alterações morfofisiológicas obtidas, dependem do histórico genético do genótipo do doador. A poliploidia pode ter efeitos em diversos níveis da morfologia, viabilidade e fisiologia dos poliploides em comparação com os diploides. Quanto a morfologia, para *E. polystachya*, visualiza-se na Figura 13 o tecido do limbo foliar da planta original e planta 5, resultante da concentração 0,01 e tempo 0 de exposição (mergulho rápido). Pode perceber menores números de estômatos no campo de visão, assim como células da epiderme foliar maiores na planta 5 (Figura 13B) comparado a planta matriz (Figura 13A). Destaca-se para também para a planta 5, que as larguras das células da epiderme e os tamanhos das células dos feixes vasculares foram maiores quando comparados a planta original (matriz).



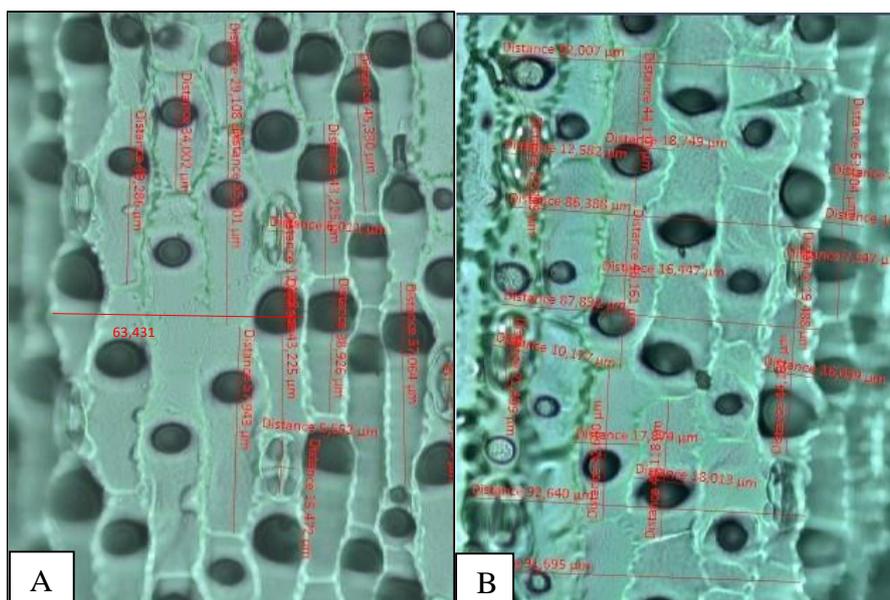
**Figura 13: Densidades estomáticas da planta matriz (A) e da Planta 5 de *Echynochloa polystachya* resultante da concentração 0,01 de colchicina e tempo 0 de exposição em colchicina (mergulho rápido). Visualização em microscópio ótico e aferidos sob objetiva de 40X.**

Nas Figuras 14 e 15 pode-se observar detalhes da epiderme da planta original (matriz) e de plantas resultantes da indução a ploidia. Na Figuras 14 apresenta a planta original (matriz) (A) e a planta 5 (B), resultado da concentração 0,01 e tempo 0 horas de exposição, mostrando maior tamanho de célula da epiderme da planta 5 comparativamente a planta matriz. Na figura 15 apresenta a planta original (matriz) (A) e a planta 7 (B), resultado da concentração 0,01 e tempo 24 horas de exposição, mostrando a maior distância entre os feixes vasculares da planta 7 comparativamente a planta matriz. Plantas submetidas ao tratamento com colchicina, podem apresentar um aumento no número cromossômico que, em geral, é refletido pela célula, através do aumento de seu volume que, por conseguinte, pode ser observado também com o crescimento de alguns órgãos da planta como tamanho das células dos estômatos, e menor densidade de estômatos por

área, distância entre os feixes vasculares, maior número de plastídios nas células dos estômatos, além de outras características fenotípicas, como diâmetro dos grãos de pólen, entre outros (ARMSTRONG e ROBERTSON, 1960; BOAVENTURA et al., 1981; SILVA et al., 2000; MORGAN et al., 2003).



**Figura 14: Mensurações morfométricas (Estômato e comprimento de células) da planta matriz (A) e da Planta 5 de *Echynochloa polystachya* resultante da concentração 0,01 de colchicina e tempo 0 de exposição em colchicina (mergulho rápido). Visualização em microscópio ótico e aferidos sob objetiva de 40X.**



**Figura 15: Mensurações morfométricas (Estômato e comprimento de células e largura entre os feixes vasculares) da planta matriz (A) e da Planta 7 de *Echynochloa polystachya* resultante da concentração 0,01 de colchicina e tempo 24 horas de exposição em colchicina (mergulho rápido). Visualização em microscópio ótico e aferidos sob objetiva de 40X.**

Para *E. polystachya*, a largura entre os feixes vasculares, o tamanho das células da epiderme, sua largura, o tamanho das células dos feixes vasculares foram os fatores que mais apresentaram diferenças em relação a planta original (Tabela 11). Em poliploides naturais de *Paspalum*, as características morfológicas foram distintas entre os níveis de ploidia, em particular, os acessos poliploides se diferenciaram nos dados quantitativos, muitas vezes com maior espessura, comprimento e largura das células e tecidos, destacando maiores valores para os acessos de  $2n=48$  e  $2n=52$  (VIEIRA, 2014).

Tabela 11: Características morfométricas do limbo foliar das plantas selecionadas (1-21) de *Echynochloa polystachya* para confirmação de ploidia e tratamentos a que foram submetidas.

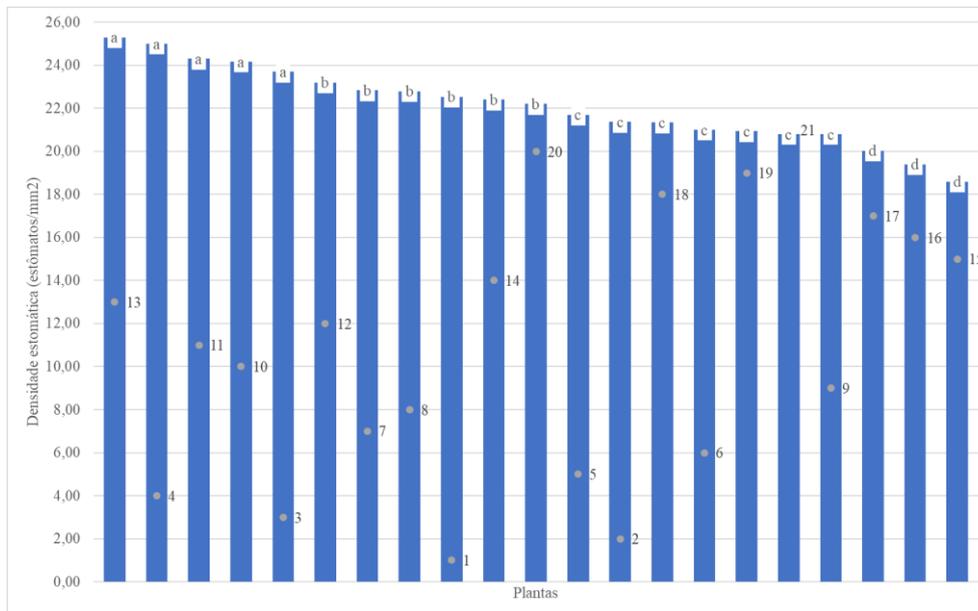
PL	C	T	LIF	CCE	LCE	CCF	LCF						
1		b	64,27	d	33,73	c	9,40	f	40,93	c	10,70	e	
2	0	24	a	65,59	d	33,50	c	11,50	f	48,26	c	10,10	e
3	0	36	c	63,60	d	34,23	c	12,60	e	45,33	c	11,23	e
4	0,01	0	a	75,34	b	44,20	b	13,90	e	55,60	b	11,10	e
5	0,01	0	c	81,34	a	55,80	a	20,96	a	66,80	a	11,93	d
6	0,01	12	c	83,81	a	34,53	c	11,66	f	54,40	b	6,93	g
7	0,01	24	b	90,41	a	44,30	b	19,40	b	62,73	a	10,90	e
8	0,01	24	b	84,06	a	32,80	c	11,90	f	55,90	b	12,03	d
9	0,01	24	c	69,21	c	42,93	b	13,50	e	50,13	c	8,76	f
10	0,01	24	a	65,03	d	47,10	b	10,60	f	45,80	c	10,80	e

11	0,025	0	a	66,24	d	42,20	b	10,86	f	60,50	b	12,73	c
12	0,025	12	b	83,80	b	47,26	b	16,23	c	65,80	a	12,53	c
13	0,025	24	a	75,41	b	42,50	b	11,66	f	67,96	a	10,60	e
14	0,05	0	b	72,24	c	48,43	b	15,50	d	61,30	a	15,00	b
15	0,05	0	d	70,04	c	47,76	b	17,10	c	59,03	b	10,50	e
16	0,05	0	d	77,66	b	35,50	c	10,80	f	50,50	c	10,90	e
17	0,05	12	d	80,83	b	45,10	b	14,96	d	59,10	b	10,66	e
18	0,05	24	c	84,53	b	54,23	a	13,70	e	61,86	a	16,40	a
19	0,1	0	c	82,89	b	42,63	b	14,63	d	57,20	b	9,10	f
20	0,1	0	b	67,87	c	53,73	a	14,36	d	57,86	b	14,23	b
21	0,1	36	c	79,07	b	48,56	b	15,90	c	57,533	b	10,80	e

PL = Plantas, C=Concentração; T = Tempo; LIF = Largura entre os feixes vasculares; CCE = Comprimento das células da epiderme; LCE = Largura das células da epiderme; CCF = Comprimento das células do feixe; LCF = Largura das células dos feixes. As médias seguidas pela mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott-Knot a 5% de probabilidade.

Apesar dos testes de médias promoverem um agrupamento das características, as plantas são diferentes entre si, não apresentando uma correlação entre os tamanhos de célula da epiderme e as células do feixe, bem como as larguras de célula, o que pode indicar um rearranjo das células do limbo foliar em função da consequente ploidia. Apesar disto, pode-se mensurar uma correlação moderada, linear e positiva ( $r = 0,6$ ), entre a largura entre feixes vasculares e o comprimento das células do feixe. Esta correlação foi mais forte quando comparada com as correlações entre a largura entre feixes vasculares e os Comprimento das células da epiderme ( $r = 0,50$ ), indicando a grande variação entre os comprimentos e larguras, podendo supor que o rearranjo das células da epiderme é menos padronizado que das células dos feixes. Verifica-se que as alterações citológicas foram identificadas e mensuradas, apontando plantas com diferentes larguras e comprimento de células da epiderme e diferentes distâncias e comprimentos dos feixes vasculares. No presente trabalho, destaca-se que maiores distâncias das células dos feixes vasculares indicam plantas com folhas mais largas.

As plantas supostamente poliploides descritas foram mensuradas em relação a densidade estomática (Figura 16). Observa-se pelos dados, as modificações estruturais no limbo foliar refletida pela densidade estomática, em que as plantas diferenciam entre si, indicando que as plantas afetadas a nível molecular pelo uso de colchicina expressam diferentes características e fenótipos.



**Figura 16: Distribuição e comparação de médias das densidades estomáticas (DE) observadas nas plantas de *Echynochloa polystachya*. As densidades estomáticas médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott-Knot a 5% de probabilidade.**

Diversos trabalhos associam as modificações no tamanho do estômato como um parâmetro que se pode diferenciar as plantas em níveis de ploidia. Conforme mencionado por Vichiatto et al. (2006) a caracterização comparativa dos supostos poliploides, podem ser realizadas, pela densidade ou frequência estomática. No presente trabalho com *E. polystachya*, a densidade estomática mostra que as plantas supostamente poliploides apresentaram menor densidade estomática. Ramesh et al. (2011) verificaram que as aplicações de colchicina em amoreira produziram poliploides e que estes apresentaram diminuição do número de estômatos por unidade de área ( $39,57 \text{ mm}^{-2}$ ) quando comparado ao controle ( $49,42 \text{ mm}^{-2}$ ). Mello et al. (2000) observaram medidas da área dos estômatos e da densidade estomática e utilizou estas mensurações como critérios para a distinção entre plantas diplóides e tetraploides com elevado grau de certeza através da densidade estomática. Os autores relatam que a densidade estomática pode ser uma ferramenta útil para pré-triagem rápida de tetraplóides.

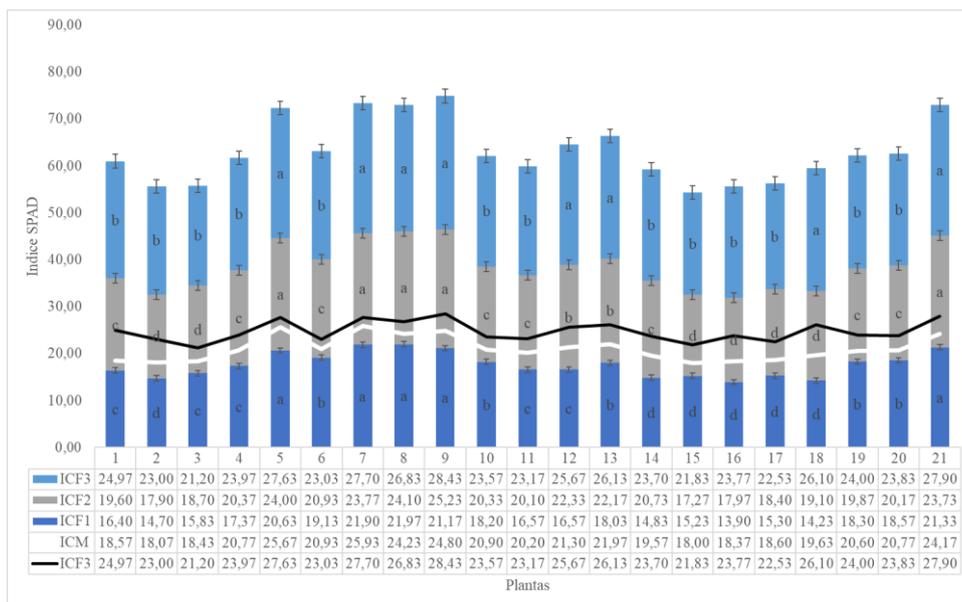
Apesar de diferenças na densidade estomática nas plantas triadas como poliploides, apresentados nas Figuras 14 e 15, não foi verificado uma forte correlação entre a densidade estomática e as variáveis morfométricas (Tabela 11). As relações entre as densidades estomáticas e tamanho dos estômatos poderiam ser melhor explicadas em

parâmetros fisiológicos quando se relacionam com o número total das células epidérmicas. A análise mostra que seria mais valioso para a discriminação da ploidia de *E. polystachya* calcular o “índice estomático” (IE), segundo Cutter (1986) [(IE) = NE/(CE + NE)], em que NE é o número de estômatos e CE o número de células epidérmicas]. A densidade estomática apresentou correlação negativa ao nível de ploidia, cujas observações corroboram ao reportado por outros autores em estudos a respeito da densidade estomática em outras espécies (LIU et al.; 2007; SHIGA et al., 2009). Santos et al, 2010 salienta que apesar de constatado em vários trabalhos que o aumento no nível de ploidia é diretamente proporcional ao tamanho dos estômatos, em alguns trabalhos porém apresentam que esta avaliação não tem sido reafirmada apresentando dados indiretos ao nível de ploidia, tendo então a análise estomática, não correspondendo a essa hipótese, levando em conta que diversos fatores ambientais estão envolvidos. Este autor salienta ainda que o método da identificação dos níveis de ploidia possibilita apenas a diferença dos indivíduos diploides dos poliploides, contudo, não classificando, em termos das quantidades cromossômicas, plantas como triploides ou tetraploides. Todavia esta “pré-seleção” torna-se importante em programas de melhoramento ao descartar um número considerável de plantas para serem analisadas citogeneticamente, tendo resultados mais rápidos e assim reduzindo os custos das análises (SANTOS et al., 2010).

A eficiência de métodos anatômicos para distinguir diferentes ploidias resultantes do cruzamento *Pennisetum purpureum* Shum e *Pennisetum glaucum* (E.) Leck mostrou que o número de células epidérmicas, em um genótipo tetraplóide destacou com a maior média entre os demais, em termos de células/mm<sup>2</sup> (SANTOS et al., 2010). Os efeitos morfológicos, anatômicos e fisiológicos da poliploidização em *Spathiphyllum wallisii*, mostraram vantagens interessantes dos poliploides na produção de plantas de interesse ornamental. Pelos efeitos da poliploidização, a densidade estomática de *S. wallisii* foi negativamente correlacionada com o aumento do nível de ploidia (LAERE et al., 2011)

Para se obter maiores informações morfofisiológicas foram mensurados os teores de clorofila, índices da medição indireta de clorofila (SPAD), das plantas triadas como poliploides (Figura 17). Observou-se que os teores médios de clorofila (ICM) não foram significativos para as plantas avaliadas. No entanto, quando se verifica os índices de clorofila por folha, houve diferença estatística significativa entre os índices de clorofila das folhas de uma mesma planta e entre folhas de diferentes plantas. Para a folha 3, a mais nova folha completamente expandida próximo ao cartucho, foi observado o maior

teor de clorofila. Os valores estão de acordo com a literatura, em que a mobilidade e a redistribuição de nitrogênio ocorrem das folhas mais velhas para as mais novas (TAIZ e ZEIGER, 2013). As plantas com tecidos maiores e com maiores atividades metabólicas apresentam maiores teores de clorofilas e assim as plantas poliploides podem ser beneficiadas com este aspecto morfofisiológico por apresentar maior quantidade de clorofila como verificados em plantas poliploides de amoreira, que apresentaram aumento do número de cloroplasto, 18 a 22, quando comparado ao controle 11 a 14 (índice SPAD) (RAMESH et al., 2011).



**Figura 17: Distribuição dos teores de clorofila das folhas 1, 2 e 3 (Índice SPAD, índices da medição indireta de clorofila) nas plantas triadas como poliploides de *Echinoclhoa polystachya*. Os teores de clorofila médios seguidos pela mesmas letra não apresentam diferença significativa pelo de Scott Knott a 5% de probabilidade. O Índice de Clorofila da Folha 3 (ICF3) é repetido na linha em negrito para salientar em escala real os valores mensurados para melhor avaliação.**

A avaliação do estado nutricional das plantas, em particular os teores de nitrogênio, podem ser preditas pelo teor de clorofila presente nas folhas, devido a correlação positiva do teor de N presente na planta com a quantidade deste pigmento. Para aferição do teor de clorofila podem ser usados métodos diretos e indiretos. Os métodos diretos, são métodos bioquímicos e analíticos, na extração e na quantificação dos pigmentos de clorofila através da utilização de reagentes e processos de digestão e titulação. Os métodos indiretos por utilizam feixes de luz que em determinados comprimentos de onda, podem captar o teor do pigmento de clorofila sem que haja

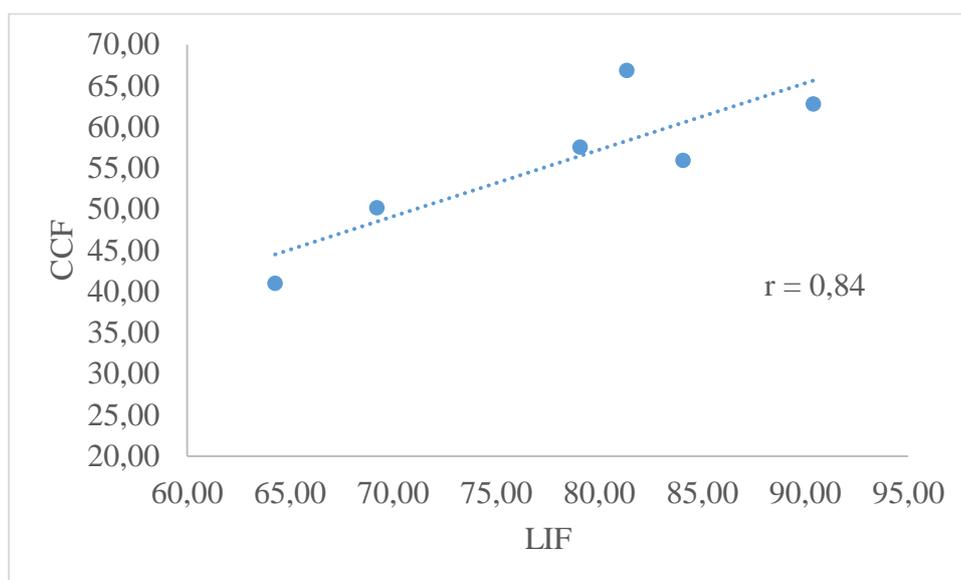
destruição do tecido foliar. Este método se apresenta fácil e prático para se estimar indiretamente os teores de clorofila (SILVA, 2016). O método indireto de leitura do teor de clorofila, a leitura SPAD, apresenta correlação linear e positiva ao estado nutricional da planta, uma vez que existe correlação positiva entre a leitura SPAD (determinação direta do teor de clorofila) e concentração de nitrogênio nas folhas de gramíneas (LIMA et al., 2007).

Em genótipos de *brachiária ssp.*, a concentração de N nos tecidos tecido foliares, correlaciona-se positivamente com os valores SPAD. Os valores de SPAD de genótipos adubados com nitrogênio, se correlacionaram diretamente aos níveis de adubação e situaram-se na faixa de 17,4 a 36,0 para H69, de 24,2 a 36,6 para H12, de 28,2 a 40,89 para o o genótipo Piatã e de 15,7 a 38,0 para o Marandu (LUCENA, 2010).

Por meio dos resultados do presente trabalho foi possível observar os efeitos que o antimetabólito, colchicina, causam quando plantas são expostas em diferentes concentrações e tempos. Para os segmentos nodais deste experimento, poder germinativo foi altamente afetado, onde a melhor germinação recebendo a colchicina pode ser observada em 50% com as concentrações de 0,01 ml.L<sup>-1</sup> e no tempo 0 (zero) de exposição. Também se verificamos que plantas anômalas não ocorreram nos tratamentos onde a concentração de colchicina foi 0 (zero), pode-se inferir que as plantas foram afetadas em seu metabolismo por alterações moleculares, não causando a mortalidade imediata, mas afetando as divisões celulares, levando as células e ao colapso. Em relação as plantas sobreviventes. As porcentagens de mortalidade em pré emergência, ou seja, plantas que não germinaram foram extremamente afetadas pelas concentrações e tempo a que foram expostos os segmentos nodais, em que na concentração 0,1 ml.L<sup>-1</sup> e no tempo 36 horas foram de 85%. Em termos de sobrevivência das plantas verificou-se maior sobrevivência, quando tratadas com colchicina, nas concentrações 0,01 ml.L<sup>-1</sup> e no tempo 0 (zero) de exposição, em uma taxa de sobrevivência de 33,1. Em termos gerais dos 600 segmentos nodais submetidos aos tratamentos 172 puderam sobreviver, refletindo em uma taxa de sobrevivência de 28%, em que 159 plantas puderam expressar suas características fenotípicas após a exposição as concentrações e tempos originando assim supostos poliploides.

Pode se visualizar pela Figura 18 que as correlações entre a largura entre os feixes vasculares (LIF) e o comprimento das células do feixe (CCF), das plantas com maiores índices de clorofila, apresentaram uma correlação maior ( $r = 0,84$ ) descritas na Tabela 12,

indicando assim um maior aporte de nitrogênio, que poderia supor uma maior produtividade a campo.



**Figura 18:** Correlação entre a largura dos feixes vasculares (LIF) e o comprimento das células dos feixes vasculares (CCF) das plantas de *Echynoclhoa polystachya*, 1, 5, 7, 8, 9 e 21, que apresentaram maior índice de clorofila.

**Tabela 12:** Características morfométricas do limbo foliar da planta matriz de *Echynoclhoa polystachya* e das plantas 5, 7, 8, 9 e 21 que se destacaram pelo teor de clorofila e tratamentos a que foram submetidos.

Plantas	C	T	LIF	CCE	CCF
P.O.	-	-	64,274 d	33,733 f	40,933 c
5	0,01	0	81,342 a	55,800 a	66,800 a
7	0,01	24	90,412 a	44,300 b	62,733 a
8	0,01	24	84,065 a	32,800 f	55,900 b
9	0,01	24	69,211 c	42,933 e	50,133 c
21	0,1	36	79,074 b	48,567 c	57,533 b

C = Concentração; T = Tempo; LIF = Largura entre os feixes vasculares; CCE = Comprimento das células da epiderme; CCF = Comprimento das células do feixe vascular.

## Conclusão

Segmentos nodais de *Echynoclhoa polystachya* expostos à diferentes tratamentos de colchicina apresentam plantas sobreviventes com variabilidade morfofisiológica, visualizada em modificações estruturais, que podem expressar diferentes padrões de crescimento, expansão de folha e variáveis morfométricas, tais como largura entre feixes vasculares e comprimentos e larguras da célula da epiderme foliar, indicando plantas mutagênicas potenciais para programas de melhoramento da espécie.

Para *Echynoclhoa polystachya* as maiores concentrações e tempos de exposição dos segmentos nodais prejudicaram as taxas de sobrevivência reafirmando o efeito deletério que a colchicina apresenta para as plantas em maiores concentrações e tempos de exposição.

## Referências bibliográficas

ABREU, E. M. A., FERNANDES, A. R., MARTINS, A. R.A., RODRIGUES, T. E. Produção de forragem e valor nutritivo de espécies forrageiras sob condições de pastejo, em solo de várzea baixa do rio Guamá. Acta amazônica, [s.l.], vol 36, n1, p. 11 – 18., mar. 2006.

ABREU, J. C. Mixoploidia em híbridos de capim-elefante x Milheto tratados com agentes antimitóticos. (Doutorado em Agronomia/Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras- MG. 2002. 72 p. tese

ARMSTRONG, J.M.; ROBERTSON, R.W. Studies of colchicine induced tetraploids of *Trifolium hybridum* L. II. Comparison of characters in tetraploid and diploid. Canadian Journal of Genetics and Cytology, Ottawa, v. 2, n. 4, p. 371-378, Jul. 1960.

BARBOSA, S. Micropropagação e duplicação cromossômica de híbridos triploides de capim elefante e milheto. Tese (Doutorado) –119p. UFLA, 2004

BATTISTIN, A. JAIOVITZKI, D.R., LEAL, Z.M.S. Transformações Citomorfológicas em plantas de *Centrocema virginianum* (L) BENTH. Pelo uso da colchicina. Ciência Rural, S. Maria, v. 23. N. 3. P.291-296, 1993.

BHERING, L. L. Rbio: A tool for biometric and statistical analysis using the R platform. Crop Breeding and Applied Biotechnology, Viçosa, v. 17, n. 2, p. 187-190, 2017.

BOAVENTURA, Y. M. S.; MEDINA, D.M.; VIEIRA, M.J.F.R. Número de cloroplastos e nível de ploidia em espécies de *Coffea*. Revista Brasileira de Botânica, Ribeirão Preto, v. 4. p. 15-21. 1981.

DAVIES, A. Tissue turnover in the sward. In: DAVIES, A.; BAKER, R.D.; GRANT, S.A. et al. (Eds.). Sward measurement handbook. London: British Grassland Society. p.183-216. 1993

CARRÈRE, P.; LOUAULT, F.; SOUSSANA, J.F. Tissue turnover within grass-clover mixed swards grazed by sheep. Methodology for calculating growth, senescence and intake fluxes. *Journal of Applied Ecology*, v.34, p.333-348, 1997.

CARNAHAN, H.L.; HILL, D.H. Cytology and genetics of forage grasses. *Botanical Review*, New York. v. 27. p. 1-162. 1961

CAVALCANTI FILHO, G. J. F. Indução de Poliploidia in vitro com aplicação de *Heliconia bihai*. Trabalho de conclusão de curso (Dissertação) – Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 64 f. Jan. 2011.

COHEN . BMC & TEL-ZUR N. Morphological, cytological and metabolic consequences of autopolyploidization in *Hylocereus* (Cactaceae) species Hagai. *Plant Biology* 2013, 13:173

CRUZ, C. D. Programa GENES: estatística experimental e matrizes. Viçosa: UFV. 2013

CUTTER, E. G. Anatomia vegetal. Parte I Células e tecidos. 2.ed. 304 p, São Paulo: Roca, 1986.

DEWEY, D.R. Some applications and misapplications of induced polyploidy to plant breeding. In: LEWIS, W.H. Polyploidy: biological relevance. p. 445-469. New York: Plenum. 1980

DHOOGHE, Van Laere, K; S; Eeckhaut; T. Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 104, p 359–373. mar.2011.

DIXON, W. E.; MALDEN, W. Colchicine with special reference to its mode of action and effect on bone marrow. *Journal of Physiology*, v. 37, p. 50-76, mai.1908.

EIGSTI, O. J. A Cytological study of colchicine effects in the induction of polyploidy in plants. *Proceedings of the National Academy of Science United States of America*, v. 24, n. 2, p. 56-63, Feb/1938.

EIGSTI, O. J.; DUSTIN, P. Jr. Colchicine in agriculture, medicine, biology and chemistry. Ames, Iowa, United States of America: The Iowa State College Press, 470 p. 1955.

EVANS, A. M. The production and identification of polyploids in red clover, white clover and lucerne. *The New Phytologist*, Oxford, v. 54, p. 149-162, 1955.

EVANS, G.M. Polyploidy and crop improvement. *Journal of the Agricultural Society of Wales*, Aberystwyth, v. 62, p. 93-116, 1981

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 Physiol Plant* (2011) 33:1149–1156

LIMA, E. do V.; SILVA, T. R. B. da; SORATTO, R. P.; CRUSCIOL, C. A. C. Relação da leitura do clorofilômetro com o N total na folha de painço (*Panicum miliaceum* L.) em função da adubação nitrogenada de cobertura. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v. 6, n. 2, p. 149-158, 2007.

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

LUCENA, M.A.C. Características agrônômicas e estruturais de *Brachiaria spp* submetidas a doses e fontes de nitrogênio em solo de cerrado. Dissertação (Mestrado) 101p - Instituto de Zootecnia. APTA/SAA. Nova Odessa - SP, 2010.

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*, Santa Maria, v. 30, n. 1, p. 105-111, 2000

MOREJOHN, L.C.; FOSKET, DE. The biochemistry of compounds with anti-microtubule activity in plant cells. *Pharmacology & Therapeutics*. Volume 51, Issue 3, Pages 377-40. 1991.

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. v. 31. p. 65- 68, fev. 2003.

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

PAIVA, R, PAIVA. P.D.O., CULTURA DE TECIDOS. - Curso de Pós-Graduação "Lato Sensu" Especialização a Distância: Biotecnologia: Fundamentos Técnicos, Aplicações e Perspectivas. p. 97. UFUV – FAEPE. 2001

PASSOS, L.P.; KÖPP, M.M. Micropropagação e cultivo in vitro de gramíneas forrageiras tropicais. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 142.). p.20. 2010.

PEREIRA, F. R. A. Caracterização morfoagronômica e molecular de meio irmãos de *Heliconia bihai* L., *H. chartacea* Lane ex Barreiros e *H. walgueriana* Petersen. 56 f. Trabalho de conclusão de curso (Dissertação) – Agronomia, Universidade Federal Rural do Pernambuco, Recife. fev. 2012.

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

RIDDLE N.C.; KATO, A.; BIRCHLER J.A. Genetic variation for the response to ploidy change in *Zea mays* L. *Theor Appl Genet*. p. 114:101–111. 2006

SANTOS, F. C.; SCARPA, A. L.; FREITAS, A.; DAVIDE L.; PEREIRA, A. Determinação indireta de ploidias em combinações genômicas entre *Pennisetum purpureum* Shum. e *Pennisetum glaucum* (E.) Leck . XXVIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 2010, Goiânia: Associação Brasileira de Milho e Sorgo. CD-Rom.

SALVADOR, J.O.; MOREIRA, A; MURAOKA, T. Sintomas visuais de deficiência e composição mineral de folhas em mudas de goiabeiras. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.34, n.9, p.1655-1662, set. 1999

SEGATTO, F.B.; BISOGNIN, D.A.; BENEDETTI, M.; COSTA, L.C.; RAMPELOTTO, M.V.; NICOLOSO, F.T. Técnica para o estudo da anatomia da epiderme foliar de batata. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.34, n.5, p.1597-1601, set-out, 2004 ISSN 0103-8478

SHIGA, I.; UNO, Y.; KANECHI, M.; INAGAKI, N. Identification of polyploidy of in vitro anther-derived shoots of *Asparagus officinalis* L. by flow cytometric analysis and measurement of stomatal length. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 78(1):103–108. 2009.

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*, Santa Maria, v. 30. p. 105-111. Jan-Mar. 2000.

SILVA, R.S.V. Uso de imagens multiespectrais de baixo custo para classificar níveis de N aplicados ao solo em agricultura de precisão – Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola. 56 f. 2016

SOORI, S.A.S.N.; KARIMZADEH, M.N.G.; SHIRKOOL, K.; NIAZIAN, M. Effect of colchicine-induced polyploidy on morphological characteristics and essential oil composition of ajowan (*Trachyspermum ammi* L.). *Plant Cell Tiss Organ Cult*.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 5. ed. Artmed, p. 954. 2013.

TEDESCO, S.B.; BATTISTIN, A.; VALLS, J.F.M. Diâmetro dos grãos de pólen e tamanho dos estômatos em acessos diploides e tetraploides de *Hemarthria altissima* (Poiret) Stapf & Hubbard (Gramineae). *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 29, n. 2, p. 273-276, 1999

VAN HARTEN, A. M. *Mutation breeding: theory and practical applications*. Ucraina: Cambridge University Press. p. 353. 1998.

VERHOEVEN, H.A.; RAMULU, K.S. & DIJKHUIS, P.A. comparison of the effects of various spindle toxins on metaphase arrest and formation of micronuclei in cell-suspension cultures of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Planta*, 182:408-411, 1990

VICHIATO, M. R. M.; et al. Análises estomática e morfométrica de folhas de plantas diplóides e tetraplóides de *Dendrobium nobile* Lindl. *Revista Ceres*. v. 53. n. 310. p. 541-548. nov-dez. 2006.

VIEIRA, J. P.S. Anatomia da lâmina foliar de acessos de *Paspalum stel latum* Humb. & Bonpl. ex Flüggé (Poaceae) com diferentes tipos de ploidia. Dissertação (mestrado) -70 p. Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Botânica, 2014.

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

WEYERS, J. D. B.; MEIDNER, H. *Methods in Stomatal Research*. Longman Scientific and Technical, Essex. p. 233. 1990.

WITTMANN, M. T. S, DALL´AGNOL, M. Indução de poliploidia no melhoramento de plantas. *Pesq. Agrop. Gaúcha*. v. 9. n. 1-2. p. 155-164. 2003

YAN, H.J.; ZHANG, H.Y.; HE, M.L. In vitro induction and morphological characteristics of octoploid plants in *Pogostemon cablin*. *Breeding Science* 66: 169–174 (2016).

### **CAPITULO III – Identificação e caracterização de ploidia em plantas de *Echinochloa polystachya* Kunth) induzidas por colchicina**

#### **Resumo**

A indução de mutação e ou ploidia em plantas forrageiras de pastagens é uma estratégia promissora para obtenção de variabilidade genética nessas espécies, que podem resultar em maior produção da biomassa e no aumento das características de interesse agrônomico. A pesquisa objetivou identificar e caracterizar níveis de ploidia em plantas de *Echinochloa polystachya* submetidas ao agente mutagênico colchicina por meio de análises citológicas, morfométricas e de citometria de fluxo. Para indução de ploidia, segmentos nodais de uma única planta de canarana verdadeira coletada no município de Manaus e submetidas a diferentes concentrações de colchicina e tempos de exposição em um delineamento inteiramente casualizado em sistema fatorial 5x4. As concentrações de colchicina foram: 0; 0,01; 0,025; 0,05 e 0,1 e os tempos de exposição foram: 0; 12; 24 e 36 horas. Estabeleceu assim 20 tratamentos com 3 repetições, onde cada repetição foi composta por 10 plantas, em um total de 600 segmentos nodais avaliados. Dos 600 segmentos nodais submetidos aos tratamentos, 172 sobreviveram, refletindo em uma taxa de sobrevivência de 28%, em que 159 plantas expressaram suas características fenotípicas após devido a exposição as concentrações e tempos originando assim possíveis poliploides. Vinte plantas foram selecionadas para caracterização de ploidia por meio de análises citológicas, morfométricas e de citometria de fluxo. Observou alterações nas densidades estomáticas, funcionalidade estomática, distância entre os feixes vasculares, comprimento e largura das células da epiderme e das células dos feixes vasculares. Nas diferentes plantas analisadas por citometria de fluxo houveram alterações tanto o aumento como a eliminação no conteúdo de DNA (pg). Estas alterações não apresentaram correlação entre os comprimentos e larguras das células da epiderme e as células do feixe, porém originaram plantas com diferentes níveis de ploidia e características morfométricas. Pode-se inferir que houve um “rearranjo” das células do limbo foliar em função das consequentes ploidias. Não foi observada a correlação entre as maiores distâncias entre os feixes vasculares a as maiores quantidades de conteúdo de DNA. Para as plantas cujos conteúdos de DNA foram maiores que a planta original (P5, P6, P7, P12, P14, P15 e 21), foi verificado um índice de correlação ( $r= 0,86$ ), entre o conteúdo de DNA

(pg) e as distâncias entre os feixes vasculares, sendo que diversos trabalhos mencionam que as maiores ploidies possuem os maiores tamanhos de tecidos e órgãos das plantas. As plantas que se destacaram em termos características morfométricas, quando comparado com a Planta P1, foram as plantas P5, P7, P8, P9 e P21. Destas, as plantas P8 e P9, apesaram conetúdos de DNA significativamente inferior e características morfométricas de interesse, superiores a planta matriz, P1. A concentrações e doses de colchicina aplicadas em *Echinochloa polystachya* em diferentes tempos influenciou diretamente nos eventos moleculares, resultando em plantas com diferentes níveis de ploidias e características morfométricas distintas.

**Palavras-chave:** Canarana verdadeira, ploidia, colchicina, funcionalidade estomática, Citometria de fluxo.

### **Abstract**

Mutation and or ploidy induction in pasture forage plants is a promising strategy for obtaining genetic variability in these species, which can result in greater biomass production and increased characteristics of agronomic interest. The research aimed to identify and characterize ploidy levels in *Echinochloa polystachya* plants submitted to the mutagenic agent colchicine through stomatal analysis and flow cytometry. For ploidy induction, nodal segments of a single true canarian plant collected in the city of Manaus and subjected to different concentrations of colchicine and exposure times in a completely randomized design in a 5x4 factorial system. The concentrations of colchicine were: 0; 0.01; 0.025; 0.05 and 0.1 and the exposure times were: 0; 12; 24 and 36 hours. Thus, it established 20 treatments with 3 repetitions, where each repetition was composed of 10 plants, in a total of 600 nodal segments evaluated. Of the 600 nodal segments submitted to the treatments, 172 survived, reflecting a 28% survival rate, in which 159 plants expressed their phenotypic characteristics after exposure to concentrations and times thus giving rise to possible polyploids. Twenty plants were selected to characterize ploidy through stomatal analysis and flow cytometry. He observed changes in stomatal densities, stomatal functionality, distance between vascular bundles, length and width of epidermal cells and cells of vascular bundles. In the different plants analyzed by flow cytometry there were changes both in the increase and in the elimination of the DNA content (pg). These changes did not show correlation between the lengths and widths of the cells of the

epidermis and the cells of the bundle, however they originated plants with different levels of ploidy and morphometric characteristics. It can be inferred that there was a “rearrangement” of the cells of the leaf blade due to the consequent ploidy. No correlation was observed between the greatest distances between the vascular bundles and the largest amounts of DNA content. For plants whose DNA content was higher than the original plant (P5, P6, P7, P12, P14, P15 and 21), a correlation index ( $r = 0.86$ ) was found between the DNA content (pg) and the distances between the vascular bundles, and several works mention that the largest ploidies have the largest sizes of tissues and plant organs. The plants that stood out in terms of morphometric characteristics, when compared to Plant P1, were plants P5, P7, P8, P9 and P21. Of these, the P8 and P9 plants weighed significantly less DNA content and morphometric characteristics of interest, higher than the matrix plant, P1. The concentrations and doses of colchicine applied in *Echinochloa polystachya* at different times directly influenced molecular events, resulting in plants with different levels of ploidy and different morphometric characteristics.

**Keywords:** Real canarana, ploidia, colchicine, stomatal functionality, flow cytometry.

## **Introdução**

Devido à baixa frequência da poliploidização natural, o uso de técnicas de indução artificial a ploidia tem crescido nos programas de melhoramento genético, levando a um aprimoramento das técnicas. De maneira geral se induz a poliploidia através de um agente inibidor do fuso, agentes químicos capazes de atuar em diferentes pontos do ciclo mitótico. Desta forma as estas substâncias que induzem a poliploidia atuam sobre as fibras do fuso acromático durante a divisão celular, impedindo sua polimerização ou promovendo a sua fragmentação, e assim não permitem que ocorra a separação parcial e/ou total dos cromossomos (WITTMANN e DALL’AGNOL, 2003; DHOOGHE et al., 2010).

Pode-se compreender melhor a atuação das substâncias antimitóticas na interferência dos processos fisiológicos na divisão celular observando os vários são os agentes antimitóticos estudados com comportamento similar, como é o caso de vários antimitóticos utilizados amplamente na agricultura. Entre estes agentes, os herbicidas, como amiprofós-metil e oryzalin, e trifuralin são amplamente estudados e citados em literatura pela sua capacidade de se de ser bioquimicamente mutagênicos e acarretando

alterações na molécula do DNA. Contudo estas alterações podem ser reparadas por mecanismos próprios da célula e que corrigidas de maneira errada, originam as mutações a nível de cromossomo e genes. As substâncias mutagênicas são capazes de produzir alterações em todas as fases do ciclo celular e que para se confirmar estas alterações é necessário de mecanismos de replicação tão logo ocorram as alterações do material genético. A colchicina, assim como outros herbicidas, interagem com o funcionamento incorreto da enzima topoisomerase II, impedindo a formação dos microtúbulos. Várias são as alterações detectadas por estas substâncias como as alterações cromossômicas numérica induzindo a poliploidia, alterações cromossômicas estruturais, acarretando a perda do material genético, acarretando erros e/ou inibição da divisão celular (CONNOR e FERGUSSON, 1993; PEÑA, 1996; FERNANDES, 2005).

Os efeitos da toxina colchicina em comparação a herbicidas oryzalin, APM (amiprophós-metil) foram evidenciados nas células em suspensão de *Nicotiana plumbaginifolia*, havendo inibição da formação dos fusos mitóticos e da formação de micronúcleos. A colchicina provoca menor frequência da formação micronúcleos das células em comparação a oryzalin e APM respectivamente (VERHOEVEN et al., 1990). Os micronúcleos, são porções de cromatina intracitoplasmática originadas pela quebra ou perdas de cromossomos inteiros, variando pela potencialidade da substância mutagênica e que podem estar envolvidos por enzimas que atuam no sistema de reparo celular das alterações cromossômicas. A colchicina apesar de sua afinidade pela tubulina vegetal ser inferior aos demais herbicidas antimitóticos e de provocar diversas alterações cromossômicas, ainda é considerada um dos agentes antimitóticos mais eficientes na inibição da polimerização dos microtúbulos, principalmente para gramíneas sendo este fator preponderante, para que comenta que a razão preferencial pela escolha desta substância para a poliploidização em gramíneas (HEDDLE et al., 1983; SHEAF et al. 1991; MOREJOHN, 1991, HANSEN e ANDERSEN, 1996; BINSFELD, 2000; BARBOSA, 2004 ).

Como a poliploidia causa nas plantas uma série de consequências fenotípicas como o aumento do número cromossômico, que normalmente repercute em aumento nas células, tecidos e órgãos vegetais e a análise estomática é uma metodologia fácil e simples, que possibilita a identificação de supostos poliploides e testemunhas diploides de um ensaio, através da contagem e medição comparativa de estômatos (VICHATTO et al., 2006) a caracterização do material pode ser realizada por comparações entre os estômatos dos poliploides com os de plantas diploides (normais). Portanto, a alteração no

tamanho das células-guarda de estômatos de folhas de plantas tratadas com colchicina pode ser utilizada como característica indicativa da existência de poliploidia. Logo, diversos trabalhos de indução de poliploidia em vegetais utilizaram essa característica para selecionar putativos poliploides, como em *Manihot esculenta* (GRANER, 1942), *Cattleya intermedia* (SILVA et al., 2000), *Heliconia bihai* (CAVALCANTI-FILHO, 2011), *Centella asiática* (KAENSAKSIRI et al., 2011), *Gerbera jamesonni* (GANTAIT et al., 2011) e *Lagerstroemia indica* (WANG et al., 2012).

A densidade estomática (ou frequência estomática) de uma epiderme com estômatos pode variar muito dependendo da espécie, podendo chegar a 2 000 poros  $\text{mm}^{-2}$ , porém, a maioria das plantas possuem em torno de 40 a 350 poros  $\text{mm}^{-2}$ . Sua aferição é feita pela contagem do número de estômatos por área. Por meio da densidade estomática podemos calcular também o índice estomático, com a quantificação dos estômatos e das células epiteliais. Quando as células completam a sua diferenciação, o índice estomático torna-se independente do tamanho da folha, por esta razão, as estimativas tanto de densidade estomática quanto do índice estomático, são realizadas com folhas maduras (completamente expandidas). Quando se determina a densidade e a média da área dos estômatos, então a área total dos poros estomáticos pode ser calculada como uma percentagem da área foliar. Este valor situa-se geralmente entre os 0,3 a 2 % se o diâmetro médio do poro for cerca de 6  $\mu\text{m}$  (WEYERS e MEIDNER, 1990).

A citometria de fluxo é uma técnica que envolve a análise das propriedades óticas (dispersão da luz e fluorescência) de partículas (células, núcleos, cromossomos, organelas) que fluem em uma suspensão líquida (DOLEZEL, 1997). Esse princípio pode ser usado, por exemplo, para medir a quantidade de DNA de uma célula (DOLEZEL e BARTOS, 2005). Em plantas, é possível obter milhões de núcleos em suspensão a partir de poucos gramas de tecido foliar em um procedimento simples que envolve a maceração desse tecido em uma solução tampão que mantém a integridade nuclear (GALBRAITH et al., 1983). A coloração dessa amostra com corantes específicos para o DNA (DAPI, iodeto de propídeo, brometo de etídeo) permite ao aparelho estimar a quantidade de DNA (DOLEZEL e BARTOS, 2005).

A citometria de fluxo é uma técnica utilizada para contar, examinar e classificar partículas microscópicas suspensas em meio líquido em fluxo. Permite a análise de vários parâmetros simultaneamente através de um aparelho de detecção óptico-eletrônico. São possíveis análises de características físicas e químicas de uma simples célula. Desta maneira, podem ser realizadas análises quantitativas de DNA e revelar a ploidia de células

em suspensão. A técnica de citometria de fluxo é uma poderosa ferramenta para o estudo de genomas vegetais e apresenta diversas aplicações. Espera-se que o número de aplicações práticas aumente e que a citometria de fluxo seja rotineiramente utilizada em estudos de melhoramento vegetal e taxonomia. A análise por citometria de fluxo do conteúdo em DNA nuclear em células em interfase é uma excelente alternativa aos métodos clássicos de coloração e contagem de cromossomos ao microscópio (LOUREIRO e SANTOS, 2005). A citometria de fluxo apresenta as vantagens: é mais conveniente (a preparação da amostra é fácil), rápida (processamento de dezenas de amostras num único dia), não necessita de células em divisão, é uma metodologia não destrutiva (uma amostra pode ser preparada a partir de 50 mg de tecido foliar) e é capaz de detectar mixoploidias (quimerismo) (DOLEZEL, 1997).

A despolimerização dos microtúbulos e a dinâmica da indução de micronúcleos indução se tornam uma ferramenta no melhoramento genético uma vez que não somente a poliploidia pode ser induzida, objetivando a poliploidia da própria espécie, ao tentar conseguir plantas maiores e melhores, como também se torna uma fonte para a produção de protoplastos quando pretende-se isolar micronúcleos em quantidade suficiente para fusão ou microinjeção com protoplastos receptores, usando-se a técnica dos micronúcleos, na transferência genômica parcial. Desta forma os processos de indução artificial de poliploidização podem ser realizados com esta técnica visando a junção de núcleos, através da fusão de protoplastos. Desta forma esta indução de micronúcleos, depende fundamentalmente, da eficiência da despolimerização dos microtúbulos da espécie que será usada, da eficácia do antimetabólico usado para despolimerizar os microtúbulos, e também da disponibilidade de uma cultura celular que esteja em crescimento ativo e sincronizado (DEWEY, 1980; BINSFIELD, 2000).

Assim a indução a mutação e ou poliploidia, em plantas forrageiras de pastagens, torna-se uma estratégia muito interessante, uma vez que a produção da biomassa, o aumento das características de interesse agrônomo, tais como valor nutricional e ou maior produção de matéria seca, a distribuição da produção de forragem de acordo com o ciclo vegetativo, resistência a pragas e doenças, tolerância a estresses abióticos são o foco principal da busca do melhoramento destas espécies (PEREIRA et al., 2012). Este trabalho objetivou identificar e detectar níveis de ploidia em plantas de *Echinochloa polystachya* submetidas ao agente mutagênico colchicina por meio de análises citológicas, morfométricas e de citometria de fluxo.

## **Material e métodos**

### **Material vegetal**

Vinte plantas selecionadas como potenciais poliplóides (Tabela 11, Capítulo 2) e a planta matriz foram caracterizadas por análises citológicas e morfométricas. As plantas utilizadas foram selecionadas pela classificação quanto as maiores alturas e em segunda classificação por maior largura da folha 3 completamente expandida. Informações detalhadas da obtenção das plantas com suspeita de variabilidade genética para ploidia podem ser encontradas no capítulo 2, no item “Índução a ploidia in vivo”.

### **Citometria de fluxo**

#### **Preparo da suspensão nuclear**

No Laboratório de Melhoramento Vegetal da Universidade de Lavras, foram realizadas análises de citometria de fluxo de amostras das plantas supostamente poliploides e do controle, P.O. (Planta original) com a finalidade de se obter o conteúdo de DNA de cada espécie e dos híbridos. Aproximadamente 50 mg de folha de cada planta, juntamente com a mesma quantidade de folha de *Vicia Faba* (padrão de referência interno - 26,90 pg de DNA) foram triturados em placa de Petri contendo 1 mL de tampão LB01 gelado para a liberação dos núcleos. A suspensão de núcleos será aspirada, com auxílio de pipeta plástica, e posteriormente filtrada através de malha de 50 µm. Os núcleos foram corados pela adição de 25 ml de solução de iodeto de propídeo, em cada amostra. As amostras foram analisadas imediatamente após o preparo.

#### **Análise em citômetro de fluxo**

Para cada amostra pelo menos 5 mil núcleos foram analisados quanto à emissão de fluorescência para quantificação de DNA, totalizando assim 10,000 núcleos por planta. O conteúdo de DNA nuclear (pg) das plantas de *E. Polystachya* foi estimado por comparação com a posição em relação ao pico G1 do padrão interno de referência (*P. sativum*). Para a análise de ploidia foi utilizado como padrão de referência a folha de *E. Polystachya* P.O. que não sofreu tratamento com o antimitótico, e a partir da posição do pico G1 formado no histograma foi possível estimar a ploidia do material analisado, pela aplicação da proporção de suas intensidades relativas de fluorescência.

Já a quantidade de DNA (pg) das plantas foi obtida por meio da equação: Quantidade de DNA (pg) = (posição do pico G1 da amostra/posição do pico G1 da *Vicia faba*) x 26,90.

Foi utilizado o Citômetro de Fluxo Facscalibur, 4 cores da Becton Dickinson. Os histogramas foram obtidos com o software CellQuest e analisados no software WinMDI 2.8.

### **Análises citológicas e morfométricas**

Para a identificação e caracterização dos níveis de ploidias das plantas triadas como suspeitas de ploidia, foram utilizados os resultados das análises citológicas e morfométricas da planta matriz e de 20 plantas investigadas para diferentes ploidias a partir dos resultados obtidos na metodologia do capítulo 2 para as características de densidade estomática.

A Densidade estomática da região adaxial (DEADA) e Densidade estomática da região abaxial (DEABA) foram analisadas em microscópio ótico e aferidos sob objetiva de 40X, observando-se quinze campos de visão por amostra. Baseando-se em escala micrométrica para a ocular utilizada, a densidade estomática foi determinada segundo a equação:

$$DE = [\text{Número de estômatos} / \text{área (mm}^2)]$$

Onde: DE = Densidade estomática; Área = área do campo real visível da ocular de 40x (0,14 mm<sup>2</sup>).

Para as análises do diâmetro polar dos estômatos (DP) e diâmetro equatorial dos estômatos (DQ), foram utilizadas para as mensurações, as lâminas obtidas conforme o material e métodos do capítulo 2 em “Análises citológicas e morfométricas”, cujas mensurações foram visualizado em microscópio eletrônico ZEISS (2012), com câmera de vídeo AXIO IMAGER. M2 60N-C 2/3” 0,63 x 426113. Foram observados quinze estômatos por lâmina das regiões adaxiais (DEADA) e foram baseadas em escala micrométrica para a ocular utilizada, sendo mensurado dos diâmetros polar e equatorial dos estômatos em micrômetros (µm).

A partir dos dados de DE e DQ foi calculada a funcionalidade estomática (FN) segundo Castro et al. (2009), pela seguinte fórmula:

$$FN = DP / DQ$$

Onde: FN = Funcionalidade estomática; DP = Diâmetro polar do estômato (em  $\mu\text{m}$ ); DQ = Diâmetro Equatorial do estômato.

### **Análises estatísticas**

Os dados referentes as densidades estomáticas das regiões adaxial (DEADA) e das regiões abaxial (DEABA) e Funcionalidade estomática (FN), foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas por meio do RBIO, um programa integrado ao ambiente R (BHERING, 2017). Os testes de análise de normalidade dos dados foram verificados de acordo com os testes de Shapiro-Wilk e pelo teste de Lilliefers, utilizando o aplicativo computacional em genética e estatística, Programa GENES, versão 6.1, da Universidade Federal de Viçosa – UFV (CRUZ, 2013). Para a verificação da significância das variáveis respostas (morfogênese e taxas de crescimento) em função dos tratamentos, foi realizado análise de regressão correlação, utilizando o programa estatístico RBIO.

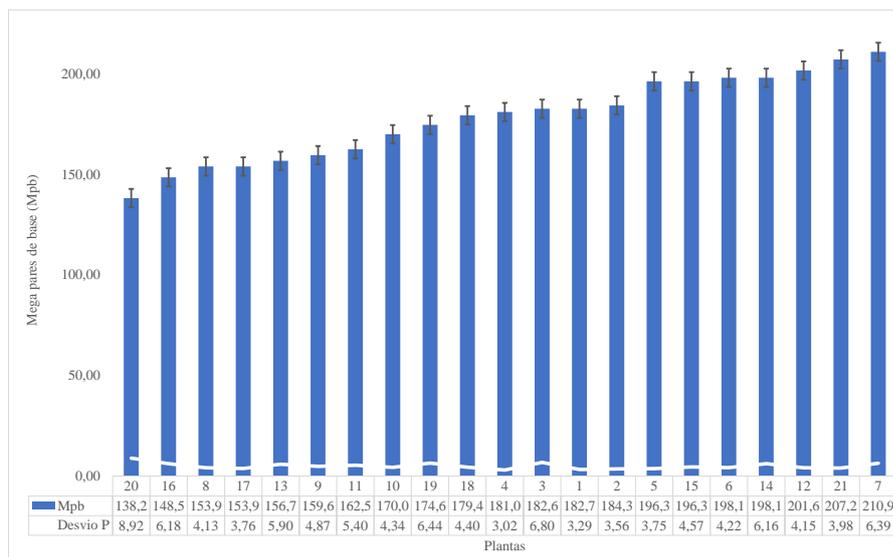
## Resultados e discussões

Os conteúdos de DNA em Mpb (Mega pares de base) e seu coeficiente de variação, desvio padrão e o conteúdo de DNA expresso em pg (picograma) comparadas ao padrão VF (*Vicia faba* sp.) podem ser observados na Tabela 13 e Figura 19. Para as plantas estudadas de E. poli os valores de conteúdo de DNA variaram de 138,24 Mpb (P20) a 210,97 Mpb (P7), ressaltando-se que a planta matriz apresentou 182,70 Mpb. Esses valores confirmam a eficiência do agente mutagênico para geração de variabilidade genética com relação à modificação da ploidia. Os conteúdos de DNA em Mpb das plantas deste experimento analisadas por citometria de fluxo, estão dentro de padrões aceitáveis para esta técnica, ressaltando os valores mais altos de CV= 4,16% para P16 e CV=6,45 para P20 (Figura 19). Loureiro Santos (2005) menciona para a grande maioria das plantas analisadas por citometria de fluxo, valores dos coeficientes de variação entre 1% a 10%, podem ser considerados padrões aceitáveis. Porém, alguns autores sugerem aceitar os resultados expressos para esta análise subdividindo o coeficiente de variação em classes de valores que variam de 1 e 2 % com “alta qualidade” e 3 % como um valor inferior, porém aceitável (DOLEZEL, 1991, MARIE BROWN, 1993). Porém atualmente coeficientes de variação menores do que 5% são citados como parâmetro de aceitação dos resultados expressos, todavia para um gama de plantas estes valores são ainda difíceis de se alcançar (GALBRAITH et al, 2002).

**Tabela 13: Conteúdo de DNA (pg) obtido por Citometria de fluxo das plantas de *Echinochloa polystachya* (1 a 21) submetidas a diferentes concentrações de colchicina comparadas a planta padrão VF (*Vicia faba sp.*).**

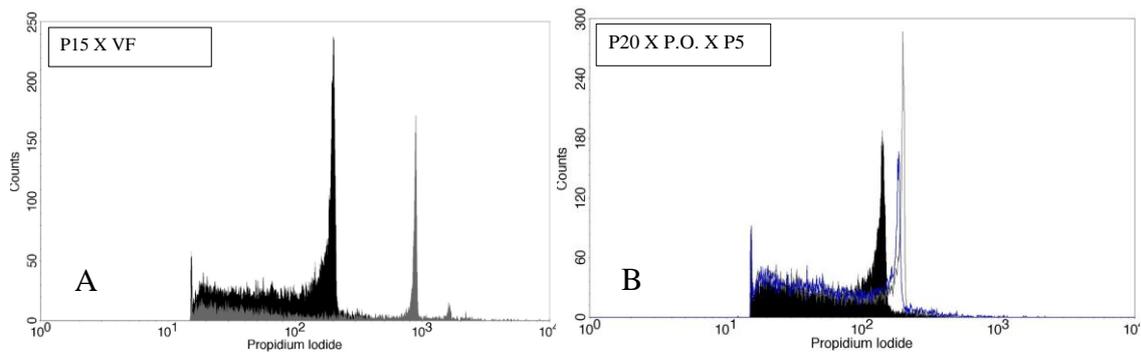
	C	T	Mpb	CV (%)	D. PAD	pg	D. PAD	ALTE (%)
		VF	858,21	0,00	0,00	26,90	0	0
1		P.O.	182,70	1,80	±3,29	5,73	±0,28	0,00
2	0,0	24	184,34	1,93	±3,56	5,78	±0,19	0,90
3	0,0	36	182,69	3,72	±6,80	5,73	±0,14	-0,12
4	0,01	0	181,06	1,67	±3,02	5,68	±0,13	-0,90
5	0,01	0	196,32	1,91	±3,75	6,15	±0,18	7,45
6	0,01	12	198,10	2,13	±4,22	6,21	±0,15	8,43
7	0,01	24	210,97	3,03	±6,39	6,61	±0,17	15,47
8	0,01	24	153,99	2,68	±4,13	4,83	±0,14	-15,66
9	0,01	24	159,63	3,05	±4,87	5,00	±0,20	-12,63
10	0,01	24	170,01	2,55	±4,34	5,33	±0,14	-6,95
11	0,025	0	162,53	3,32	±5,40	5,09	±0,09	-11,04
12	0,025	12	201,69	2,06	±4,15	6,32	±0,21	10,39
13	0,025	24	156,79	3,76	±5,90	4,91	±0,10	-14,18
14	0,05	0	198,10	3,11	±6,16	6,21	±0,11	8,43
15	0,05	0	196,32	2,33	±4,57	6,15	±0,12	7,45
16	0,05	0	148,55	4,16	±6,18	4,66	±0,14	-18,69
17	0,05	12	153,99	2,44	±3,76	4,83	±0,13	-15,31
18	0,05	24	179,43	2,45	±4,40	5,62	±0,19	-1,79
19	0,10	0	174,66	3,69	±6,44	5,47	±0,13	-4,40
20	0,10	0	138,24	6,45	±8,92	4,33	±0,12	-24,33
21	0,01	36	207,21	1,92	±3,98	6,49	±0,20	13,42

C = Concentração; T = Tempo = Mpb = Mega pares de base; D. Pad = desvio padrão; ALTE (%) = Alteração do conteúdo de DNA (%).



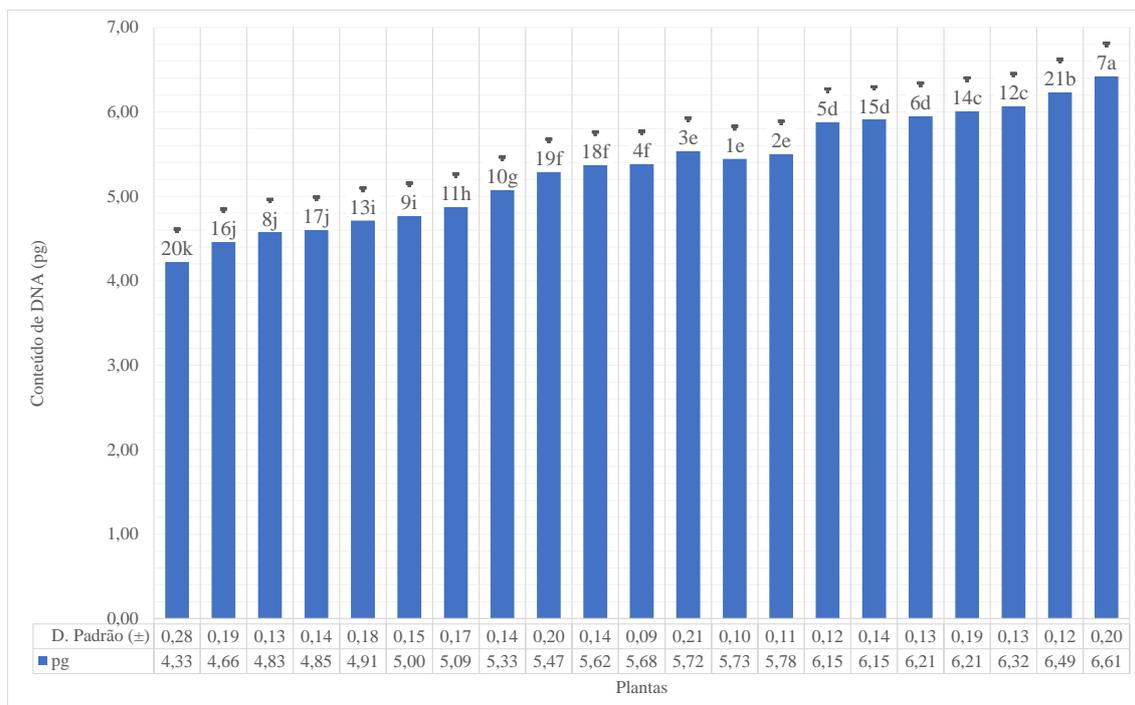
**Figura 19: Distribuição e comparação conteúdos de DNA (Mpb = Mega pares de bases) obtidos por citometria de fluxo e desvio padrão dessas medidas das plantas de 1 a 21 de *Echinochloa polystachya* submetidas a diferentes concentrações de colchicina comparadas a planta padrão VF (*Vicia faba* sp).**

Por meio de leituras computadorizadas das análises de citometria de fluxo, pode-se obter os diversos conteúdo de DNA expressos em picogramas (pg). Constatou-se que houve alterações a nível cromossômico, para a quase totalidade das 21 plantas analisadas. Na Figura 20 é visualizado a comparação da quantificação do conteúdo de DNA nos picogramas para planta 15 (P15) cujo tratamentos foi de concentração de colchicina em  $0,05 \text{ mL}^{-1}$  e tempo de 0 horas de exposição, comparada a *Vicia faba* (planta padrão de referência) juntamente com a comparação da planta 20 (P20) (picogramas na cor preta) cujo tratamentos foi de concentração de colchicine em  $0,1 \text{ mL}^{-1}$  e tempo 0 horas de exposição, comparadas com a a planta original (P.O.) e a planta 05, (P5) originada do tratamento de concentração  $0,01 \text{ mL}^{-1}$  e tempo 0 horas de exposição.



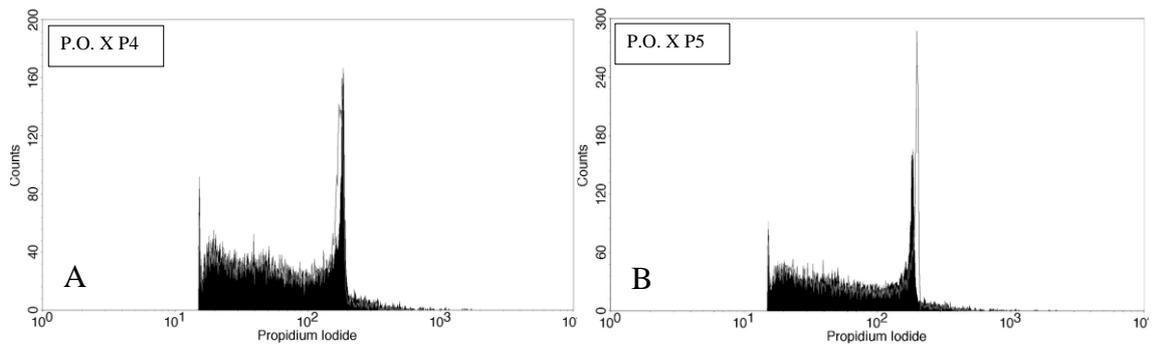
**Figura 20: Diferentes níveis de ploidia em *Echinochloa polystachya*, analisados por citometria de fluxo e expressos em picogramas (pg). Os conteúdos de DNA (Mpb - Megapares de base) são apresentados no eixo das abscissas e o número de núcleos lidos por fluorescência se encontram no eixo das ordenadas. Figura A: Planta 15 (P15 em preto - pico maior), originados dos tratamentos 0,05% de concentração de colchicina e tempo 0 horas de exposição, comparada a *Vicia faba* (planta padrão – pico menor); Figura B: Planta 20 (P20) (picogramas na cor preta) concentração 0,1% e tempo 0 de exposição, comparadas com a a planta original (P.O.) (Tracejada em azul) e a Planta 05, (P5) (em branco) concentração 0,01 e tempo 0 horas de exposição.**

Os conteúdos de DNA calculados com base nos resultados em Mpb conforme relação com a planta padrão se estabeleceu conteúdos de DNA expressos em picograma (pg) que são visualizados na Figura 21. De maneira semelhante para cada planta se estimou os desvios padrões dos valores da citometria de fluxo. Se utilizarmos os desvios padrões para como um critério de classificação das médias observadas em pictogramas pode-se agrupar as plantas em conteúdos similares de DNA, cujas médias se encontram entre os limites dos desvios. Desta forma pode se agrupar as plantas em 11 grupos “similares” em termos de conteúdo de DNA. A planta 7 (“a”), com valor estimado em 6,61pg, se sobressai como a planta de maior conteúdo, seguido pela planta 21 (“b”) com 6,49pg. As plantas 12 e 14 (“c”) com intervalos entre 6,21pg e 6,32pg, 5, 6 e 15 (“d”) com intervalos entre 6,15pg e 6,21pg, 1, 2 e 3 (“e”) com intervalos similares entre 5,72pg e 5,78pg, 4, 18 e 19 (“f”) com intervalos entre 5,47pg e 5,68pg, planta 8 (“g”) com 5,33pg, planta 11 (“h”) com 5,09pg, plantas 9 e 13 (“i”) com 5pg, Plantas 8, 16 e 17 (“j”) com valores entre os intervalos de 4,66g a 4,85pg e a planta 20 (k) com o menor conteúdo de DNA de 4,33pg.

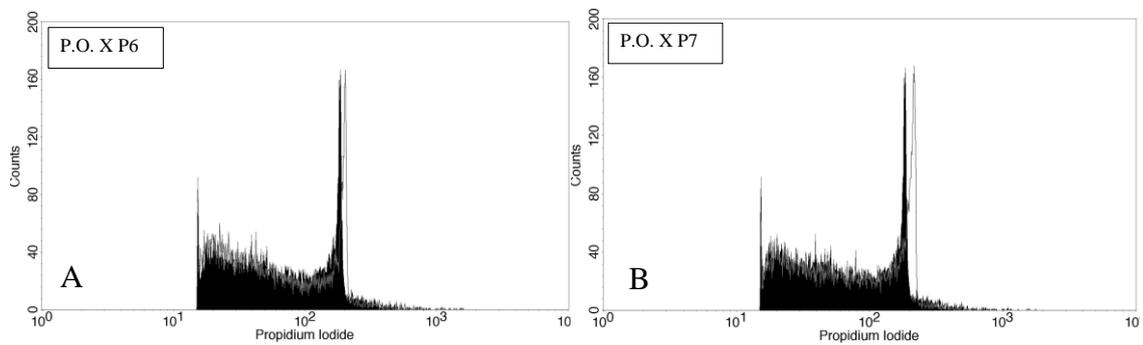


**Figura 21: Distribuição e comparação conteúdos de DNA em picograma (pg) e desvio padrão das plantas de 1 a 21 de *Echinochloa polystachya* submetidas a diferentes concentrações de colchicina, comparadas a planta padrão VF (*Vicia faba* sp) por citometria de fluxo. Os valores médios dos desvios padrões seguidos das mesmas letras não diferem nos conteúdos de DNA estimados.**

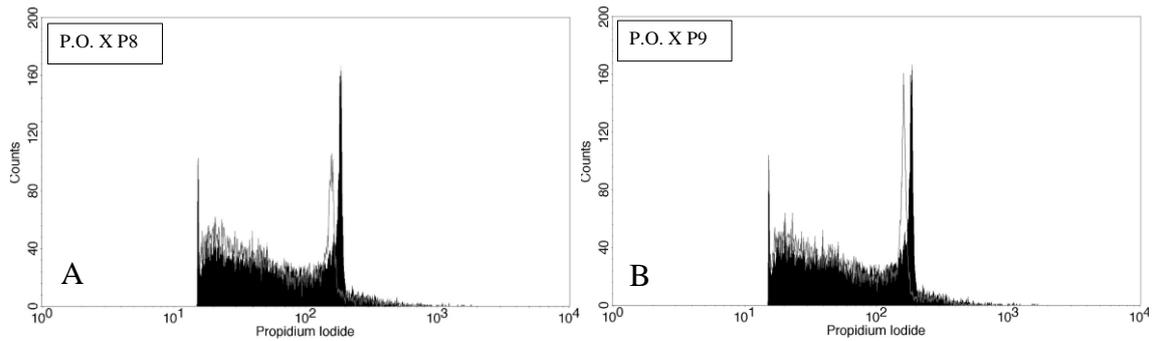
Nas Figuras 22 a 30 pode-se visualizar os resultados da citometria de fluxo das 20 plantas comparadas com a planta original, em que visualiza-se graficamente uma grande variação dos conteúdos de DNA das plantas analisadas por citometria de fluxo, indicando as alterações dos níveis de ploidia, tanto o aumento dos níveis cromossômicos como a diminuição do conteúdo de DNA, quando comparado com a planta original. Vários trabalhos, tais como, híbridos interespecíficos entre o cruzamento de capim elefante e milho (BARBOSA, 2004), paspalum (WEILER et al., 2015), capim elefante (ABREU, 2002) mostraram resultados originados por agentes antimitóticos objetivando a duplicação do material genômico com resultados altamente variáveis tanto na duplicação, adição e eliminação total ou parcial do conteúdo nuclear.



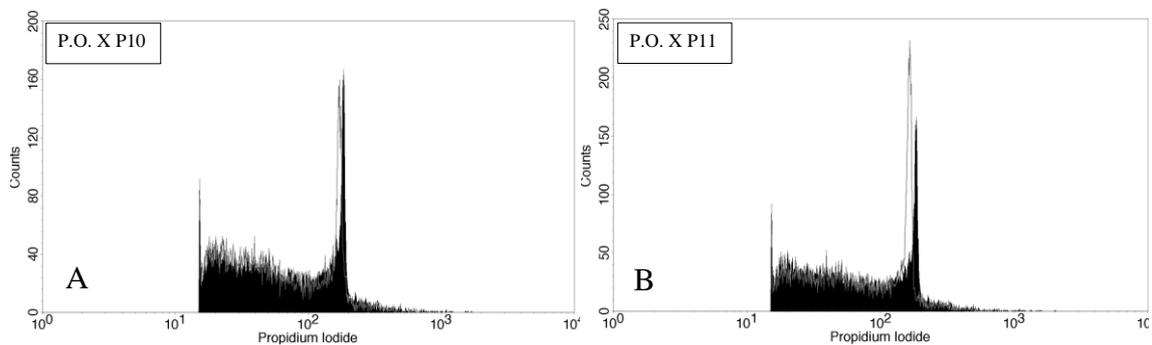
**Figura 22: Diferentes níveis de ploidia em *Echinochloa polystachya*, analisados por citometria de fluxo e expressos em picogramas (pg). Os conteúdos de DNA (Mpb - Megapares de base) são apresentados no eixo das abscissas e o número de núcleos lidos por fluorescência se encontram no eixo das ordenadas. Figura A: Planta original (P.O - picogramas na cor preta) comparada com a plantas 04 (P4 - em branco) concentração 0,01% e tempo 0 horas de exposição); Figura B: Planta original (P.O - picogramas na cor preta) comparada plantas 05 (P5 – cor branca) - concentração 0,01 e tempo 0 horas de exposição).**



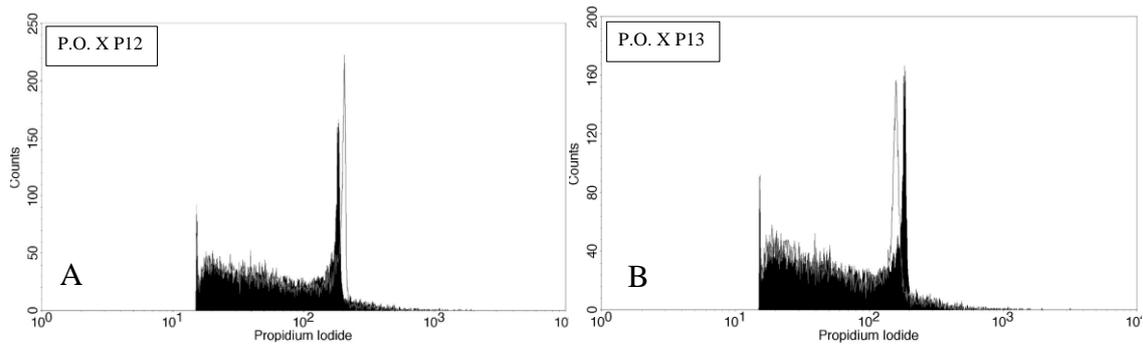
**Figura 23: Diferentes níveis de ploidia em *Echinochloa polystachya*, analisados por citometria de fluxo e expressos em picogramas (pg). Os conteúdos de DNA (Mpb - Megapares de base) são apresentados no eixo das abscissas e o número de núcleos lidos por fluorescência se encontram no eixo das ordenadas. Figura A: Planta original (P.O - picogramas na cor preta) comparada com a plantas 06 (P6 – cor branca) concentração 0,01 e tempo 12 horas de exposição); Figura B: Planta original (P.O - picogramas na cor preta) comparada plantas 07 (P7 -cor branca) concentração 0,01 e tempo 24 horas de exposição).**



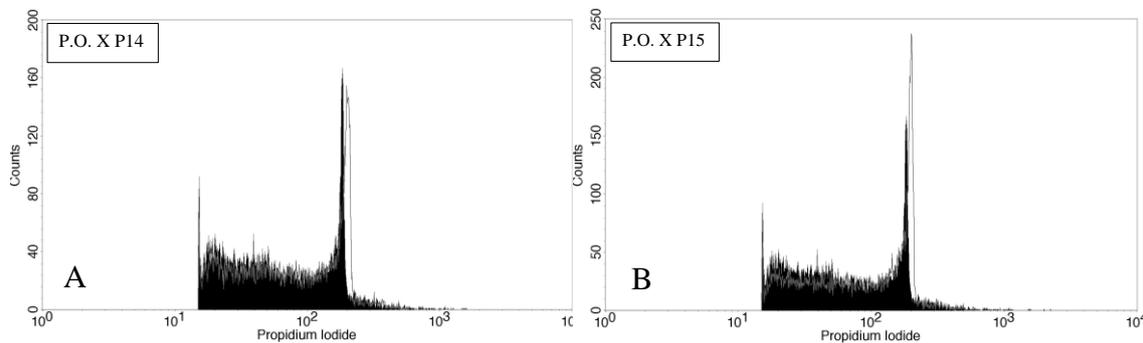
**Figura 24:** Diferentes níveis de ploidia em *Echinochloa polystachya*, analisados por citometria de fluxo e expressos em picogramas (pg). Os conteúdos de DNA (Mpb - Megapares de base) são apresentados no eixo das abscissas e o número de núcleos lidos por fluorescência se encontram no eixo das ordenadas. **Figura A:** Planta original (P.O - picogramas na cor preta) comparada com a plantas 08 (P8 - concentração 0,01 e tempo 24 horas de exposição); **Figura B:** Planta original (P.O - picogramas na cor preta) comparada plantas 09 (P9 – cor branca) concentração 0,01 e tempo 24 de exposição



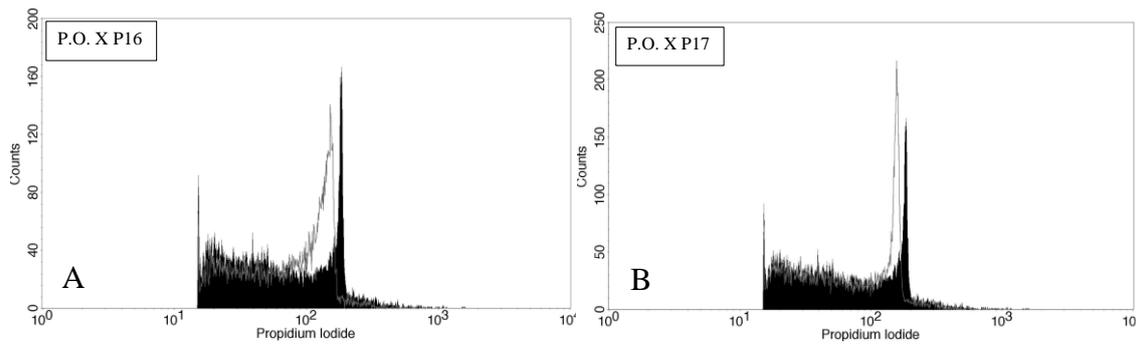
**Figura 25:** Diferentes níveis de ploidia em *Echinochloa polystachya*, analisados por citometria de fluxo e expressos em picogramas (pg). Os conteúdos de DNA (Mpb - Megapares de base) são apresentados no eixo das abscissas e o número de núcleos lidos por fluorescência se encontram no eixo das ordenadas. **Figura A:** Planta original (P.O - picogramas na cor preta) comparada com a plantas 10 (10 – cor branca) concentração 0,01 e tempo 24 horas de exposição; **Figura B:** Planta original (P.O - picogramas na cor preta) comparada plantas 11 (P11 – cor branca) concentração 0,025 e tempo 0 de exposição



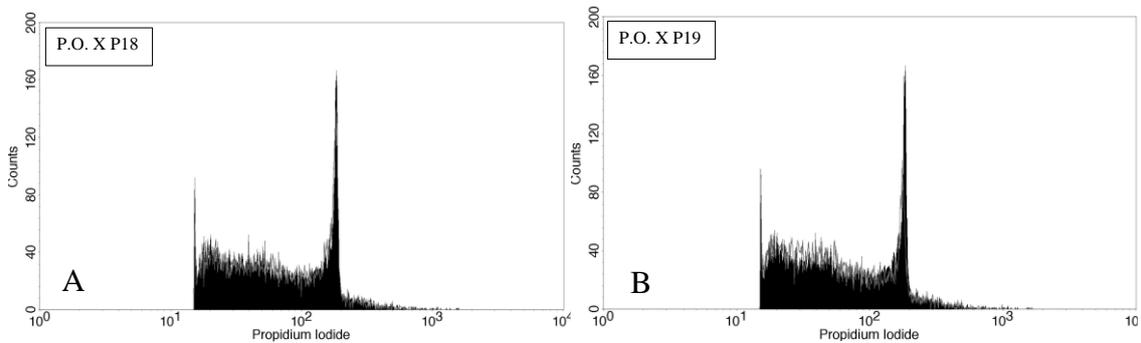
**Figura 26: Diferentes níveis de ploidia em *Echinochloa polystachya*, analisados por citometria de fluxo e expressos em picogramas (pg). Os conteúdos de DNA (Mpb - Megapares de base) são apresentados no eixo das abscissas e o número de núcleos lidos por fluorescência se encontram no eixo das ordenadas. Figura A: Planta original (P.O - picogramas na cor preta) comparada com a plantas 12 (12 – cor branca) concentração 0,025 e tempo 0 horas de exposição; Figura B: Planta original (P.O - picogramas na cor preta) comparada plantas 13 (P13 – cor branca) concentração 0,025 e tempo 0 horas de exposição.**



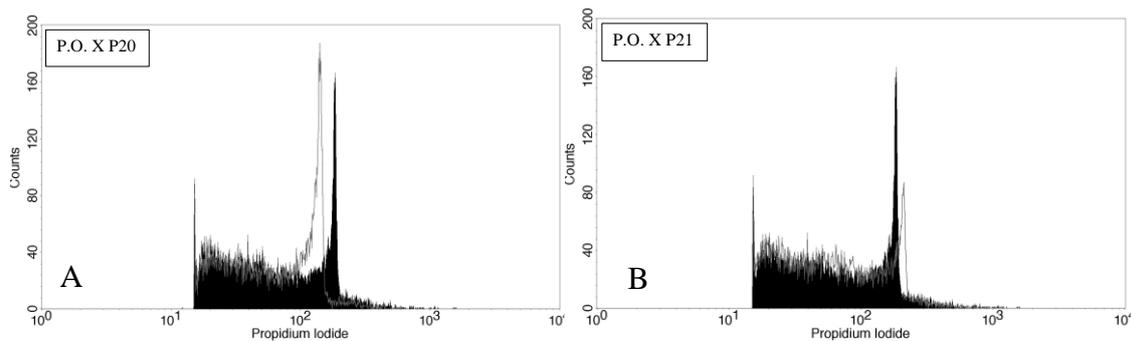
**Figura 27: Diferentes níveis de ploidia em *Echinochloa polystachya*, analisados por citometria de fluxo e expressos em picogramas (pg). Os conteúdos de DNA (Mpb - Megapares de base) são apresentados no eixo das abscissas e o número de núcleos lidos por fluorescência se encontram no eixo das ordenadas. Figura A: Planta original (P.O - picogramas na cor preta) comparada com a plantas 14 (P14 – cor branca) concentração 0,05 e tempo 0 horas de exposição; Figura B: Planta original (P.O - picogramas na cor preta) comparada plantas 15 (P15 – cor branca) concentração 0,05 e tempo 0 horas de exposição.**



**Figura 28:** Diferentes níveis de ploidia em *Echinochloa polystachya*, analisados por citometria de fluxo e expressos em picogramas (pg). Os conteúdos de DNA (Mpb - Megapares de base) são apresentados no eixo das abscissas e o número de núcleos lidos por fluorescência se encontram no eixo das ordenadas. **Figura A:** Planta original (P.O - picogramas na cor preta) comparada com a plantas 16 (P16 – cor branca) concentração 0,5 e tempo 0 horas de exposição; **Figura B:** Planta original (P.O - picogramas na cor preta) comparada plantas 17 (P17 – cor branca) concentração 0,5 e tempo 12 horas de exposição.

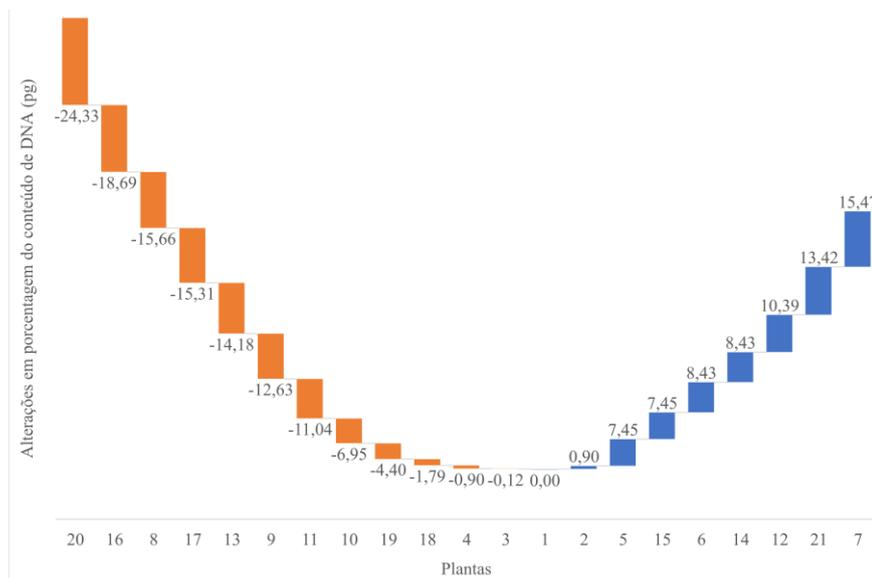


**Figura 29:** Diferentes níveis de ploidia em *Echinochloa polystachya*, analisados por citometria de fluxo e expressos em picogramas (pg). Os conteúdos de DNA (Mpb - Megapares de base) são apresentados no eixo das abscissas e o número de núcleos lidos por fluorescência se encontram no eixo das ordenadas. **Figura A:** Planta original (P.O - picogramas na cor preta) comparada com a plantas 18 (P18 – cor branca) concentração 0,05 e tempo 24 de exposição; **Figura B:** e na proxima figura a planta Planta original (P.O - picogramas na cor preta) comparada plantas 19 (P19 – cor branca) concentração 0,1 e tempo 0 de exposição.



**Figura 30: Diferentes níveis de ploidia em *Echinochloa polystachya*, analisados por citometria de fluxo e expressos em picogramas (pg). Os conteúdos de DNA (Mpb - Megapares de base) são apresentados no eixo das abscissas e o número de núcleos lidos por fluorescência se encontram no eixo das ordenadas. Figura A: Planta original (P.O - picogramas na cor preta) comparada com a plantas 04 (P4 – cor branca) concentração 0,1 e tempo 0 de exposição; Figura B: Planta original (P.O - picogramas na cor preta) comparada plantas 05 (P5 -cor branca) concentração 0,01 e tempo 36 horas de exposição.**

Na Figura 31 visualiza-se as quantidades expressas em porcentagem e percebe-se que 52,38 % das plantas analisadas (P4, P8, P9, P10, P11, P13 P16 P17 P18 P19 P20) tiveram a eliminação cromossômica comparado as demais, 47,61% das plantas (P5, P6, P7, P12, P14, P15 e 21) A planta 20 apresenta com a maior eliminação do conteúdo de DNA, uma perda de 24,33% em relação a planta original e a P7 com o maior aumento do conteúdo celular, 15,47% a mais em relação a planta original. Bustamante (2009) pode observar também na indução a ploidia de forrageiras (híbrido capim elefante x milheto) que os conteúdos analisados por citometria de fluxo houveram variação cromossômica. Entre os híbridos triploides induzidos a poliploidia, todos apresentaram mixoploidia em células meristemáticas e para muitos híbridos ocorreram a eliminação cromossômica. Em muitos trabalhos com a indução a ploidia por agente antimitóticos, podem ser verificados que a eliminação cromossômica é frequente, sendo esta eliminação parcial ou até total (ADAMWSKI et al., 1998; GIACOMELLI, 2000; CARVALHO, 2000; PAGLIARINI, 2001).



**Figura 31: Porcentagens das Alterações dos conteúdos de DNA (pg) das plantas de *Echinochloa polystachya*, analisados por citometria de fluxo comparadas à planta matriz – planta 1.**

As plantas P18 e P19, apesar das diminuições do conteúdo de DNA verificados e visualizados pela figura 29, percebe-se que os pictogramas apresentados em relação a planta original (Figura 22), se apresentam sobrepostos, aparente conteúdos nucleares semelhantes. Conforme a figura 21, observa-se que estas plantas se encontram em grupos de desvio padrão diferentes da planta original. Todavia, vale ressaltar que, apesar da diminuição do conteúdo de DNA, em muitas plantas ocorre o reparo do conteúdo nuclear por mecanismos de reparo das células podem ser revertidas ao estado original. Verifica-se que em muitos trabalhos, comumente é observado, que além das alterações dos conteúdos de DNA, em muitos casos ocorrem a “reversão” parcial e até mesmo total ao estado original da planta a que deu origem. Barbosa, 2004 observou em algumas plântulas in vitro de capim-elefante expostas aos tratamentos (0,05 e 0,1% em períodos de 12 e 24 horas), cujo complemento cromossômico foi duplicado apresentaram reversão a condição triploide em 80% das células meristemáticas de raízes. A reversão parcial ou total pode ser verificada no trabalho de Davide et al. (2003), cujo fenômeno ocorrido em que capim elefante em solução de colchicina por 24 horas de exposição, os mixaploides voltaram a condição diploide. A obtenção de mixaploides em diversos trabalhos são frequentemente observadas. Dias (2016) obteve alta porcentagem de mixaploides e em algumas tratamentos apenas mixaplóides foram garados.

A citometria de fluxo torna-se uma ferramenta interessante na medida que se pode conhecer os níveis de ploidia das plantas que se deseja trabalhar em um programa de

melhoramento genético, levando em consideração características agrônômicas de interesse. Em trabalhos de indução a ploidia que se objetiva o cruzamento dos poliploides para hibridização, torna-se importante a padronização de protocolos que associem os níveis observados de ploidia com as contagens somáticas de cromossomos e assim se estabelecer modelos que possam prever com maior acurácias os níveis de ploídias alcançados. Neste contexto, os níveis de ploidia no presente trabalho revelados pelas quantidades do conteúdo nuclear modificados em comparação a planta original, alcançou diferentes níveis, cujas quantidades genômicas poderiam estipuladas por contagem cromossômica, uma vez que as proporções dos pictogramas em relação a planta original e as quantidades alcançadas expressa em porcentagem mostram que a duplicação apresenta grande variação.

Na Tabela 14 podem ser visualizados as probabilidades dos testes de significância pelo teste-F da análise de variância realizada para as características morfométricas avaliados do limbo foliar. Verificou-se que as médias das densidades estomática entre as plantas tanto para a região adaxial, como para a região abaxial foram significativas. O diâmetro polar e diâmetro equatorial dos estômatos também foram diferentes entre os tratamentos. Em uma análise não paramétrica (devido a não normalidade das variáveis) a funcionalidade estomática também se mostrou significativa. As médias das variáveis por planta dos tratamentos a que foram submetidos (Concentração=C e Tempo T), pg (Conteúdo de DNA), Densidade estomática da região adaxial (DEADA), da região abaxial (DEABA), Diâmetro polar (DP), Diâmetro equatorial, (DQ) e Funcionalidade estomática (FN) são visualizadas na Tabela 15.

**Tabela 14: Probabilidades e coeficientes de variação e P-Value do resultado das análises de variâncias de características morfométricas do limbo foliar das plantas selecionadas de *Echynoclhoa polystachya*, Manaus, 2019**

Características		P-Value	CV%
DEADA	*	4,4876E-15	6,74
DEABA	*	3,9659E-10	6,32
DE	*	8,9478E-14	3,48
DP	*	7,8186E-14	3,46
DQ	*	2,4456E-10	3,75
FN	*(1)	1.79e-05	4,36

DEADA = Densidade estomática da região adaxial; DEABA = Densidade estomática da região abaxial; DE = Densidade estomática; DP = Diâmetro polar; DQ = Diâmetro equatorial; FN = Funcionalidade estomática. Significativo a 5% de probabilidade pelo Teste-F; ns Não significativo a 5% de probabilidade pelo Teste-F; (1) Dados transformados.

**Tabela 15: Conteúdo de DNA (pg) e Características estomáticas do limbo foliar das plantas 1 a 21 de *Echynochloa polystachya*. Manaus, 2019**

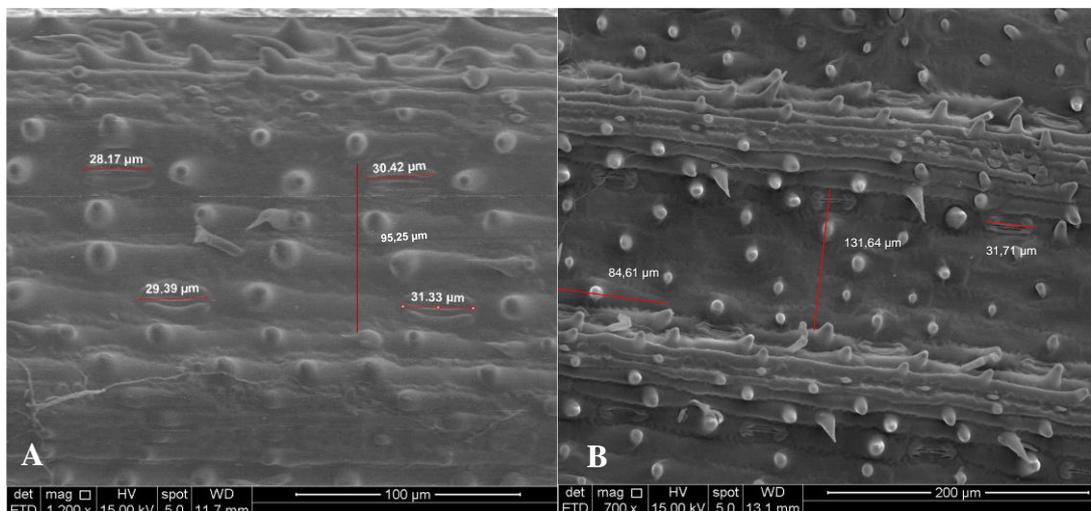
PL.	pg	DEADA	DEABA	DP	DQ	FN
1	5,73	22,510 a	13,980 c	22,560 b	9,600 c	2,36 a
2	5,78	18,020 c	17,090 b	21,370 c	9,380 c	2,28 ab
3	5,68	20,490 b	13,980 c	23,690 a	8,990 c	2,64 abc
4	5,73	16,360 d	17,420 b	25,030 a	10,820 a	2,33 abc
5	6,15	12,090 f	12,510 d	21,710 c	9,230 c	2,36 abc
6	6,21	15,380 d	13,930 c	20,990 c	11,080 a	1,90 abcd
7	6,61	11,160 f	12,220 d	22,820 b	9,500 c	2,40 abcde
8	4,83	14,950 d	15,580 b	22,800 b	10,140 b	2,26 bcdef
9	5,00	20,220 b	19,150 a	20,810 c	10,460 a	2,00 bcdefg
10	5,33	19,350 c	17,000 b	24,170 a	9,450 c	2,56 cdefg
11	5,09	15,450 d	14,730 c	24,270 a	10,030 b	2,45 cdefg
12	6,32	12,940 e	14,820 c	23,200 b	11,030 a	2,12 defgh
13	4,91	16,580 d	14,470 c	25,310 a	9,950 b	2,55 efghi
14	6,21	16,600 d	14,400 c	22,400 b	9,780 b	2,30 fghij
15	6,15	15,250 d	16,070 b	18,610 d	10,440 a	1,81 ghij
16	4,66	15,750 d	14,530 c	19,440 d	10,820 a	1,80 hijk
17	4,83	14,650 d	13,730 c	20,040 d	10,790 a	1,90 hijk
18	5,62	14,040 e	13,270 d	21,330 c	10,690 a	2,07 hijk
19	5,47	16,710 d	16,690 b	20,950 c	11,430 a	1,84 ijk
20	4,33	17,780 c	15,980 b	22,220 b	10,950 a	2,04 jk
21	6,49	17,180 d	14,840 c	20,790 c	10,700 a	1,95 k

DEADA = Densidade estomática da região adaxial; DEABA = Densidade estomática da região abaxial; DE = Densidade estomática; DP = Diâmetro polar; DQ = Diâmetro equatorial; FN = Funcionalidade estomática. As médias seguidas pela mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott-Knot a 5% de probabilidade.

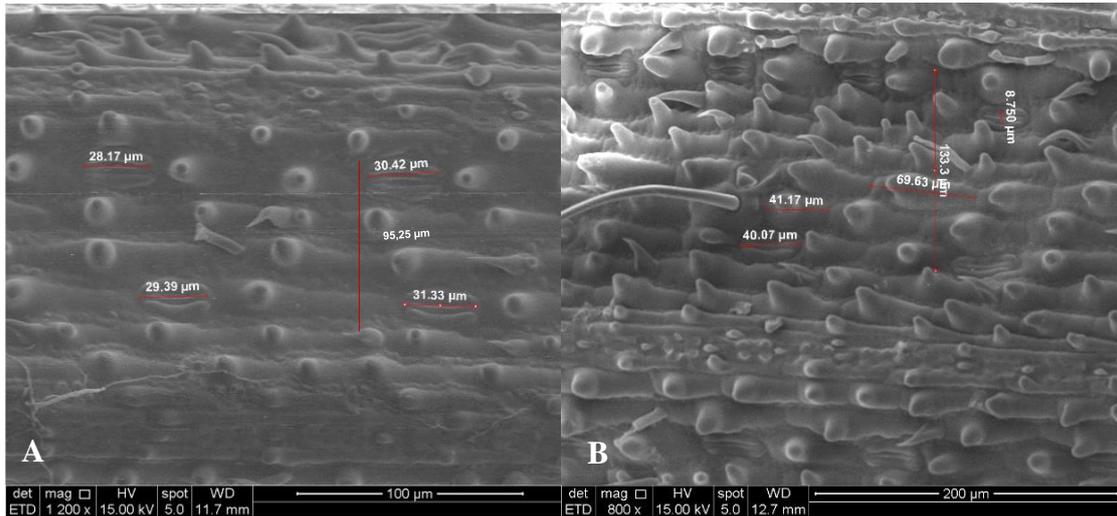
A poliploidia causa nas plantas uma série de consequências fenotípicas como o aumento do número cromossômico, que normalmente repercute em aumento nas células, tecidos e órgãos vegetais. Desta forma, constata-se que pela identificação da densidade estomática das plantas que estas confirmam que plantas supostamente poliploides apresentam densidade estomática menor quando comparada a planta diploide a que deu origem (VICHIAITTO et al., 2006; SANTOS et al., 2010; LAERE et al., 2011; RAMESH et al., 2011). Portanto tamanho de células, a alteração no tamanho das células-guarda de estômatos, medidas de diâmetro polar e equatorial, além de células e tecidos mais espessos e maiores, são parâmetro morfológicos que corroboram com esta afirmação. Logo, diversos trabalhos de indução de poliploidia em vegetais utilizaram a densidade estomática como a principal característica para identificar supostos poliploides, como em

*Manihot esculenta* (GRANER, 1942), *Cattleya intermedia* (SILVA et al., 2000), *Heliconia bihai* (CAVALCANTI-FILHO, 2011), *Centella asiática* (KAENSAKSIRI et al., 2011), *Gerbera jamesonni* (GANTAIT et al., 2011) e *Lagerstroemia indica* (WANG et al., 2012).

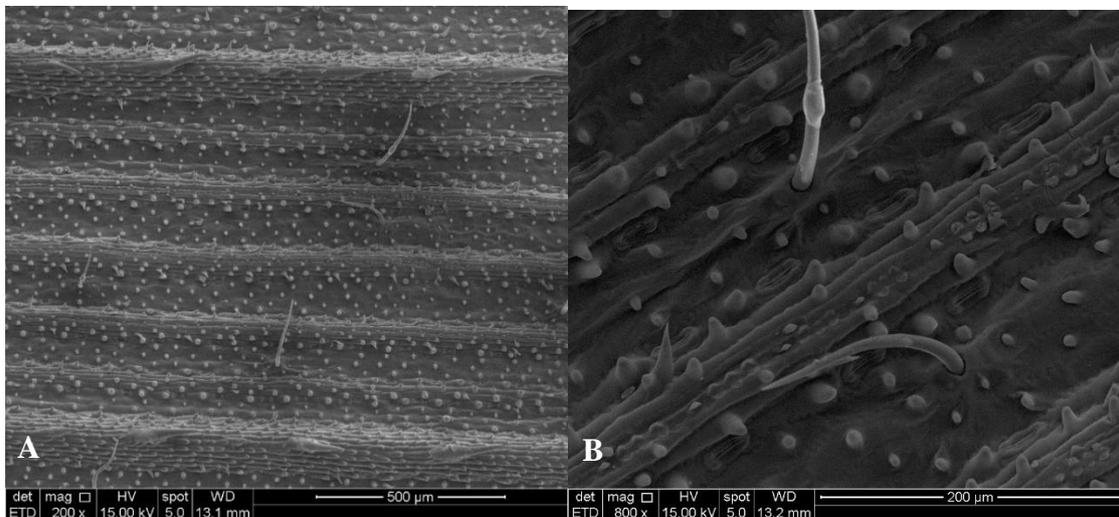
Por meio de microscopia de varredura realizada nos limbos foliares das plantas P1 (planta original), P5 e P7 pode ser visualizada com maior acurácia as diferenças morfométricas ocasionadas pelos diferentes níveis de ploidia alcançados Figura 32). Destaca-se assim, as Figuras 32 e 33, nas quais é possível visualizar as mensurações obtidas, onde a largura entre os feixes vasculares, o comprimento das células da epiderme, sua largura, o comprimento das células dos feixes vasculares foram os fatores que mais apresentaram diferenças em relação a planta original. Pelas observações constata-se então que as plantas avaliadas tratadas com colchicina, se diferenciaram da planta original, apresentando menor densidade estomática. Com esta medida espera-se conforme discutido um aumento das células guardas e aumento dos diâmetros polar e equatorial, o que seria esperado, resultaria em uma maior funcionalidade estomática para as plantas poliploides. As figuras 34, 35 e 36 ilustram o limbo foliar em particular da planta 5, em que mostra os detalhes citológicos dos feixes vasculares, estômatos e tricomas.



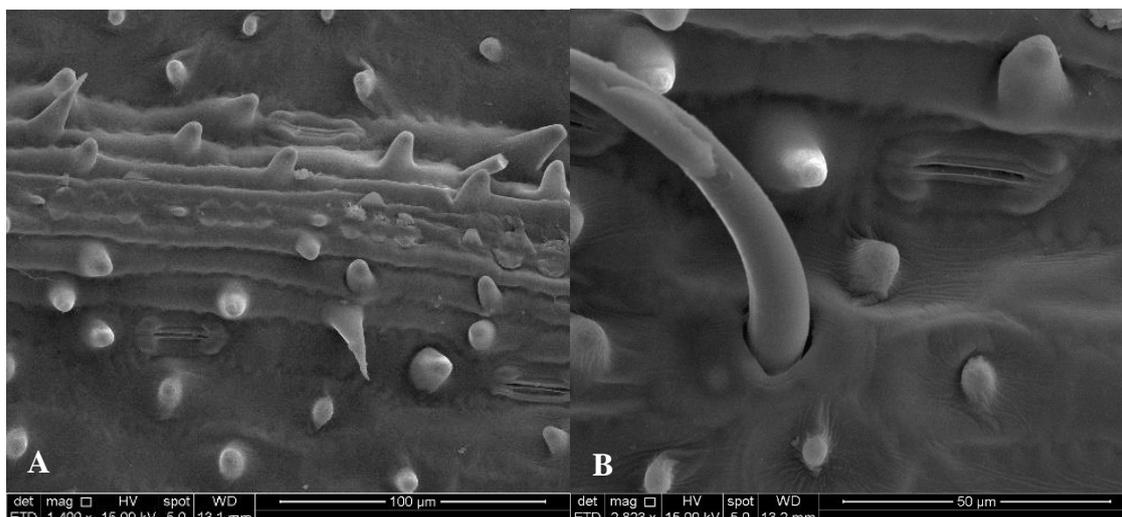
**Figura 32: Mensurações morfométricas (Estômato e comprimento de células) da planta matriz (A) (aproximação 1.200X) e da Planta 5 (B) de *Echinoclhoa polystachya* resultante da concentração 0,01 de colchicina e tempo 0 de exposição em colchicina (mergulho rápido) (aproximação 800X). Visualização em microscopia de varredura.**



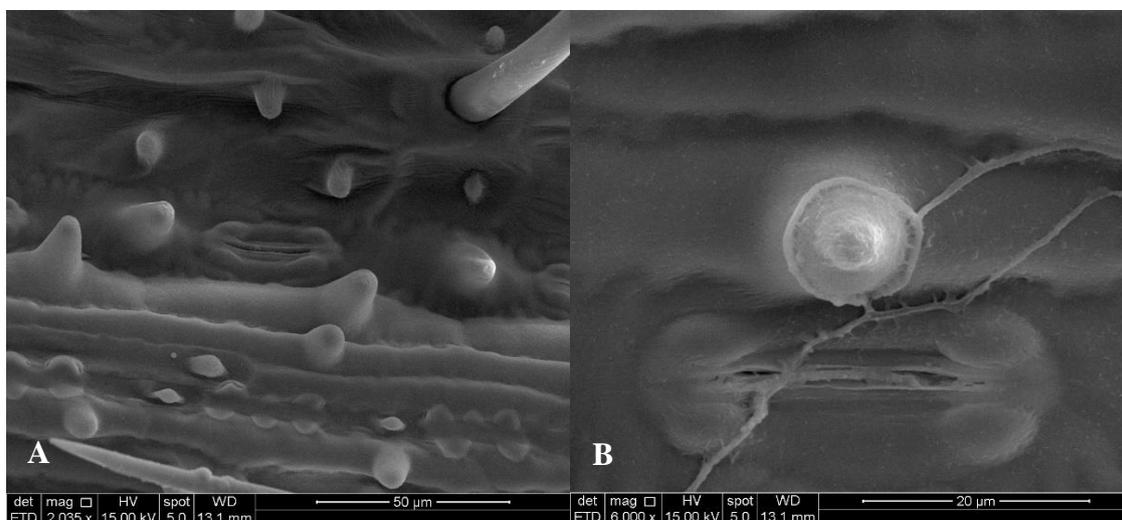
**Figura 33: Mensurações morfométricas (Estômato e comprimento de células) da planta matriz (A) (aproximação 1.200X) e da Planta 7 (B) de *Echinoclhoa polystachya* resultante da concentração 0,01 de colchicina e tempo 24 de exposição em colchicina. (aproximação 800X). Visualização em microscopia de varredura.**



**Figura 34: Visualização em microscopia de varredura do limbo foliar da Planta 5 de *Echinoclhoa polystachya* resultante da concentração 0,01 de colchicina e tempo 0 (Mergulho rápido). A: aproximação 200X; B: aproximação 800X.**



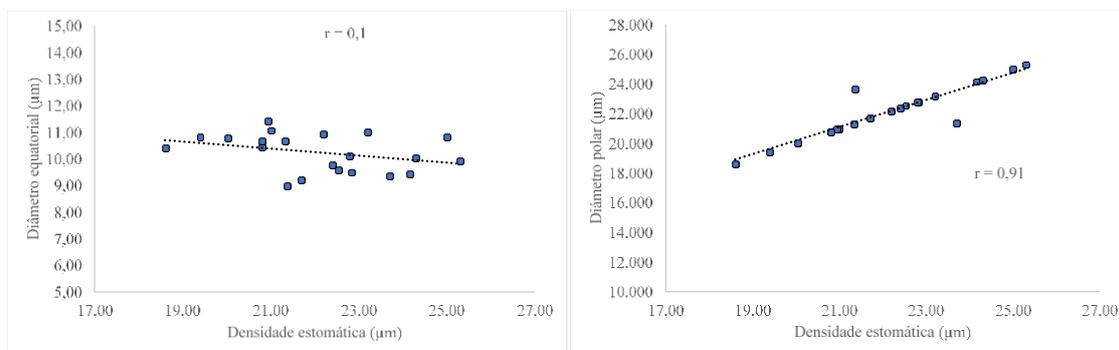
**Figura 35:** Visualização em microscopia de varredura do feixe vascular foliar da planta 5 de *Echynoclhoa polystachya* resultante da concentração 0,01 de colchicina e tempo 0 de exposição. A: aproximação de 1.400X; B: aproximação de 2.823X.



**Figura 36:** Visualização em microscopia de varredura do feixe vascular foliar e estômato adjacente da planta 5 de *Echynoclhoa polystachya* resultante da concentração 0,01 de colchicina e tempo 0 de exposição. A: aproximação de 2.035X; B: aproximação de 6.000X, presença de hifas de fungo envolvendo tricoma e estômatos fechados.

As plantas tratadas com colchicina tiveram sua funcionalidade estomática alterada quando comparada a planta original. Ao correlacionarmos os dados das variáveis da densidade estomática as variáveis da funcionalidade estomática, percebe-se uma baixa correlação. Desta forma pode-se associar que as densidades estomáticas para a Canarana verdadeira, no presente trabalho foram melhor correlacionadas as variáveis do diâmetro polar quando comparada ao diâmetro equatorial, haja vista a similaridade estatística observada para DQ indicando a não “esfericidade” dos estômatos identificados nas

diferentes plantas submetidas aos tratamentos conforme verificado pelos dados destas variáveis apresentados na Tabela 15. Na Figura 34 visualiza-se as correlações em que a densidade estomática com o diâmetro equatorial apresenta um índice de correlação de  $r=0,01$  e que para a associação entre a densidade estomática e o diâmetro polar é apresentado um índice de correlação de  $r=0,91$ .

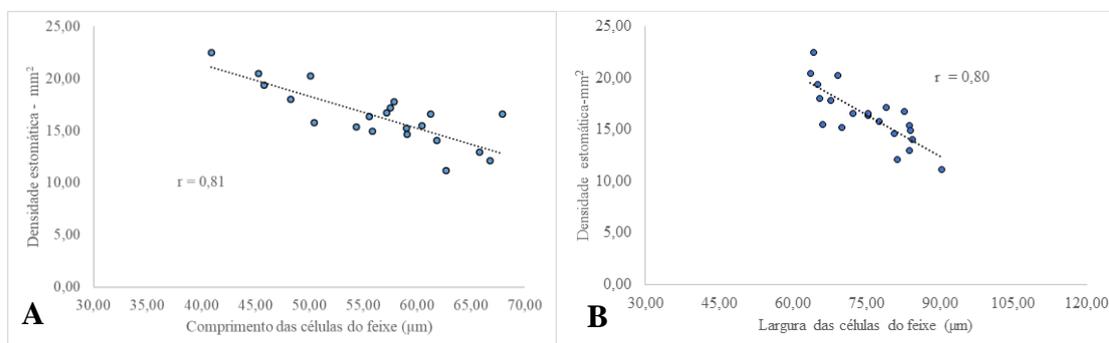


**Figura 37: Correlações das densidades estomáticas das plantas de 1 a 21 de *Echynochloa polystachya* em relação ao Diâmetro equatorial (DQ) e Diâmetro polar (DP) dos estômatos; Densidade estomática (µm) x Diâmetro equatorial - DQ (µm) ( $r=0,1$ )/ : Densidade estomática (µm) x diâmetro polar - DP (µm) ( $r=0,91$ ).**

Para Raizer (2017), as mensurações de DP e DQ em helicônias se mostraram significativas e afirma que o DQ é uma importante característica adaptativa das plantas em situação de estresses em relação aos seus estômatos. As alterações e formas como os estômatos se apresentam é um importante fator que afeta a funcionalidade. Desta forma em estômatos mais “esféricos” é comum a associação a baixas funcionalidades estomáticas. A razão entre o DP e DQ prediz uma funcionalidade estomática proporcional ao resultado desta divisão. Assim quanto maior a FN (funcionalidade estomática), menos “esférico” é o sistema estomático, maior o seu diâmetro polar e consequentemente mais eficiente se relacionando diretamente com as taxas respiratórias e mais eficiente, fotossinteticamente (KHAN et al., 2003; MIGLIORANZA e OLIVEIRA, 2013).

Na Figura 37 pode se verificar as correlações encontradas entre o comprimento das células dos feixes vasculares a densidade estomática da região adaxial ( $r=0,81$ ) e as correlações entre as larguras das células do feixe vasculares e as densidades estomáticas da região adaxial ( $r=0,8$ ). Quando se correlaciona as dimensões das células da epiderme verificadas, as correlações se mostraram baixas como já discutidas. Assim ao observar o

efeito dos tratamentos nas diferentes plantas analisadas por citometria de fluxo, tanto a diminuição como o aumento do conteúdo celular, também não apresentando uma correlação entre os comprimentos de célula da epiderme e as células do feixe, bem como entre as larguras das célula da epiderme pode-se inferir que houve um “rearranjo” das células do limbo foliar em função das conseqüentes ploidias.



**Figura 38: Correlação em *Echynoclhoa polystachya* dos caracteres avaliados: A: Comprimento das células dos feixes vasculares das plantas de 1 a 21 e da densidade estomática da região adaxial ( $r=0,81$ ); B: Correlação entre a largura das células dos feixes vasculares de *Echynoclhoa polystachya* e a densidade estomática ( $r=0,8$ ).**

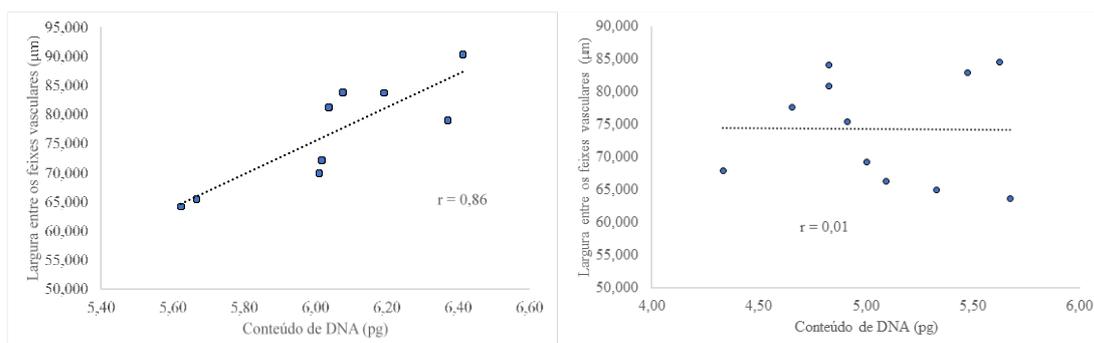
Ao mensurar com maiores detalhes, pode verificar que as plantas descritas na Tabela 16, quando comparadas com a planta original P1, apresentam padrões estruturais do limbo foliar peculiares. Ao verificar a distância entre os feixes vasculares nestas duas plantas foi constatado que entre os feixes vasculares as os indivíduos (plantas) apresentaram diferentes números de fileiras. A planta P5 apresentou 5 (cinco) fileiras de células epidérmicas entre os feixes vasculares, a planta P7, 7 (sete) fileiras, a planta P8 5 (cinco) fileiras, a Planta P9, 6 (seis) fileiras e a planta P21, 5 (cinco) fileiras, contra 4 (quatro) fileiras entre os feixes vasculares apresentada pela planta original. Desta forma nota-se por exemplo que planta P5, que apresentou uma media de 5 (cinco) fileiras entre os feixes vasculares, se apresentam com células da epiderme com maior largura, indicando desta forma as razões diferenças estruturais da planta conseqüências dos tratamentos impostos, que resultaram nas diferenças de densidade estomáticas observadas, que repercutem assim diretamente no “índice estomático”

**Tabela 16: Conteúdo de DNA (pg) e características morfométricas do limbo foliar da planta matriz de *Echynoclhoa polystachya* e das plantas 5, 7, 8, 9 e 21 com níveis de ploidias que se destacam por suas características morfogenéticas.**

PL	C	T	pg	LIF	CCE	CCF	DEADA	FN			
P.O.			5,73	64,274	d	33,733	f	40,933	c	22,51	2,36
5	0,01	0	6,15	81,342	a	55,800	a	66,800	a	12,09	2,36
7	0,01	24	6,61	90,412	a	44,300	b	62,733	a	11,16	2,40
8	0,01	24	4,83	84,065	a	32,800	f	55,900	b	14,95	2,26
9	0,01	24	5,00	69,211	c	42,933	e	50,133	c	20,22	2,00
21	0,1	36	6,49	79,074	b	48,567	c	57,533	b	17,18	1,95

PL = Plantas; C = Concentração; T = Tempo; pg = picograma; LIF = Largura entre os feixes vasculares; CCE = Comprimento das células da epiderme; CCF = Comprimento das células do feixe vascular; DEADA = Densidade estomática da região adaxial; FN = Funcionalidade estomática

No total das plantas analisadas por citometria de fluxo não foi observada a correlação entre as maiores larguras entre os feixes vasculares a as maiores quantidades de conteúdo de DNA, como revisado e discutido no presente trabalho (Figura 38). Porém partindo da premissa de que maiores larguras entre os feixes vasculares apresentam as maiores larguras de folha e se dividirmos as plantas analisadas por citometria de fluxo em dois grupos, aquelas em que ocorreram o aumento do conteúdo celular e daquelas que sofreram a eliminação, poderíamos co-relacionar os valores em picograma (pg) com a largura dos feixes vasculares (LIF), pode -se verificar que para as plantas cujos conteúdos de DNA foram maiores que a planta original (P5, P6, P7, P12, P14, P15 e 21), um índice de correlação de  $r=0,86$ , o que confirmaria diversos trabalhos que mencionam as maiores ploidias a maiores tamanho de tecidos e órgãos das plantas. Fato foi que para a canarana verdadeira, no presente trabalho, as plantas com a eliminação do conteúdo de DNA (P4, P8, P9, P10, P11, P13 P16 P17 P18 P19 P20) apresentaram baixa correlação com as larguras entre os feixes vasculares ( $r=0,1$ ), não corroborando com as conclusões dos diversos trabalhos revisados. Desta forma para as características morfométricas que se evidenciaram em maiores valores quando comparado co a Planta P1 (P.O) P5, P7, P8, P9 e P21, percebe-se que as plantas P8 e P9, que apesar dos conetúdos de DNA, significativamente inferior, apresentaram características morfométricas de interesse, superiores a planta original P1.



**Figura 39: Correlação em *Echynochloa polystachya* dos caracteres avaliados das plantas de 1 a 21: Figura A: o conteúdo de DNA (pg) e a largura dos feixes vasculares das plantas 7 = 6,61pg; 21 = 6,49pg; 12 = 6,32pg; 14 = 6,21pg; 15 = 6,15 pg; 5 = 6,15pg; 2 = 5,78pg; 1 = 5,73 pg; ( $r = 0,86$ ); Figura B: Correlação entre o conteúdo de DNA (pg) e a largura dos feixes vasculares das plantas 3 = 5,72pg; 4 = 5,68pg; 18 = 5,62pg; 19 = 5,47pg; 10 = 5,33pg; 11 = 5,09pg; 13 = 4,91pg; 17 = 4,85pg; 8 = 4,83pg; 16 = 4,66pg; 20 = 4,33 pg; ( $r = 0,01$ ).**

## Conclusão

A concentrações e doses de colchicina aplicadas em *Echinochloa polystachya* em diferentes tempos influenciou diretamente nos eventos moleculares da divisão celular;

Estes eventos moleculares e os mecanismos de reparo celular promoveram diferentes conteúdos de DNA expressos em pictogramas (pg), em que foram observados plantas em que houveram a eliminação do conteúdo de DNA e plantas com o aumento do conteúdo de DNA;

Desta forma foram verificadas o resultado de plantas com diferentes níveis de níveis de ploidias acarretando em características morfométricas distintas.

## Referências bibliográficas

ABREU, J. C. Mixoploidia em híbridos de capim-elefante x Milheto tratados com agentes antimitóticos. 2002. 72 p. tese (Doutorado em Agronomia/Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras- MG

ADAMOWSKI, E.V.; PAGLIARINI, M.S.; BATISTA, L.A.R. Chromosome elimination in *Paspalum subciliatum* (Notata group). Sex. Plant Reprod, v.11, p. 272-276, 1998.

BARBOSA, K. M. DO N; PIEDADE, M.T.F; KICHNER, F.F. 2008. Estudo Temporal da vegetação da várzea da Amazônia central. FLORESTA, Curitiba PR. v. 38. n 1. p. 89-96. 2008. Jan-mar. 2008

BARBOSA, S. Micropropagação e duplicação cromossômica de híbridos triploides de capim elefante e milho. Tese (Doutorado) –119p. UFLA, 2004

BATTISTIN, A. JAIOVITZKI, D.R., LEAL, Z.M.S. Transformações Citomorfológicas em plantas de *Centrocema virginianum* (L) BENTH. Pelo uso da colchicina. Ciência Rural, S. Maria, v. 23. N. 3. P.291-296, 1993.

BHERING, L. L. Rbio: A tool for biometric and statistical analysis using the R platform. Crop Breeding and Applied Biotechnology, Viçosa, v. 17, n. 2, p. 187-190, 2017.

BINSFELD, P.C.; PETERS, J. A.; SCHNABL, H. Efeito de herbicidas sobre a polimerização dos microtúbulos e micronúcleos em protoplastos de *Helianthus maximiliani*. R. Bras. Fisiol. Veg., 12(3):263-272, 2000

BUSTAMANTE, F. O. Variações cromossômicas associadas à poliploidização em híbridos de *pennisetum* spp: um estudo temporal e tecido específico. Dissertação (Mestrado) Universidade federal de lavras: UFLA, 53p.il. 2009.

CARVALHO, J.F.R.P. Análise cariotípica e indução in vitro de poliploidia em Urucum (*Bixa Orellana* L).174 p. (Tese de doutorado e, Genética e Melhoramento de plantas). Viçosa: UFV, 2000

CARVALHO, J.F.P.; CARVALHO, C.R.; OTONI, W.C. In vitro induction of polyploidy in annatto (*Bixa orellana* L.). Plant Cell Tiss Organ Cult. V.8. p. 69-75. 2005

CASTRO, E.M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. Histologia Vegetal: estrutura e função dos órgãos vegetativos. Lavras: UFLA, 234 p. 2009.

CAVALCANTI FILHO, G. J. F. Indução de Poliploidia in vitro com aplicação de *Heliconia bihai*. Trabalho de conclusão de curso (Dissertação) – Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 64 f. Jan. 2011.

CONNOR, J. A.; FERGUSON, M. A. Essential medical genetic. Smith Blackwell Scientific Publications, London, 1993, 260p.

CÔRTE-REAL, M.; SANSONETTY, F.; LUDOVICO, P.; PRUDÊNCIO, C.; RODRIGUES, F.; FORTUNA, M.; SOUSA, M.; SILVA, M. e LEÃO, C. 2002. Contributos da citologia analítica para estudos de biologia de leveduras. Boletim de Biotecnologia 71: 19-33

CRUZ, C. D. Programa GENES: estatística experimental e matrizes. Viçosa: UFV. 2013

CUTTER, E. G. Anatomia vegetal. Parte I Células e tecidos. 2.ed. 304 p, São Paulo: Roca, 1986.

- DAVIDE, L.C.; BARBOSA, S.; ASSIS, J.C.; PEDROSO, C.A.; PEREIRA, A. V. Obtenção de raça cromossômica a partir de mixoplóides de pennisetun. In: 49º Congresso Brasileiro de Genética, 2003, Águas de Lindóia. Anais. Águas de Lindóia, p. 690, 2003.
- DERMEN, H.; DILER, J.D. Colchicoidy of Chetnuts. *Forest Sci.* v.8 (1). p. 43-50. 1962.
- DEWEY, D.R. Some applications and misapplications of induced polyploidy to plant breeding. In: LEWIS, W.H. *Polyploidy: biological relevance.* p. 445-469. New York: Plenum. 1980
- DHOOGHE, Van Laere, K; S; Eeckhaut; T. Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 104, p 359–373. mar.2011.
- DIAS, R.Z. Poliploidização induzida in vitro, como estratégia biotecnológica para otimização da cultura do eucalipto. Dissertação (Mestrado). USP- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”.65p. Piracicaba, 2016.
- DOLEZEL, J. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. *Phytochemical Analysis* 2: 143-154. 1991
- DOLEZEL, J. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. *Journal of Applied Genetics*, Poznan, v. 38. n. 3. p. 285-302. 1997.
- DOLEZEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany*, Oxford: Oxford University Press. v. 95. p. 99-110. 2005.
- FERNANDES, T.C. C. Investigação dos efeitos tóxicos do herbicida trifluralina, utilizando *Allium cepa* E *Oreochromis niloticus* como sistemas-testes. TESE (Mestrado em Ciências Biológicas, Biologia celularv e molecular. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Rio Claro-SP. Junho, 2005.
- GALBRAITH, D.W.; et al. Rapid flow cytometric analysis of the cell-cycle in intact planttissues. *Science*, Washington ,v. 220, p. 1049-1051, jun. 1983.
- GALBRAITH, D.; LAMBERT, G.; MACAS, J. e DOLEZEL, J. 2002. Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants. *Current Protocols in cytometry*, Eds Robinson, J., Azmi, A. e Tutois, S. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- 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 Organ Culture*, v. 106 (3), p. 485–493. set. 2011.
- GIACOMELLI, F.R.B.; PAGLIARINI, M.S.; ALMEIDA, J.L. de. Elimination of micronuclei from microspore in Brazilian oat (*Avena sativa* L.0 variety. *Genetic Molecular biology*, v23, n. 3, 2000.
- GRANER, E.A. Notas sobre florescimento e frutificação da mandioca. *Bragantia*, Campinas, v.2, p.1-14, jan. 1942.

HANSEN, N.J.P.; ANDERSEN, S.B. Chromosome doubling potential of colchicines, oryzalin, trifuralin, and APM in *Brassica napus* microspore culture. *Euphytica*. V.88, n. 2, p. 159-164, 1996

HEDDLE, J. A.; HITE, M.; IRKHART, B.; MACGREGOR, J. T. E.; SALAMONE, M. F. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity a measure of the US environmental protection agency gene-tox program, *Mutation Research* 123 (1983) 61-118.

KAENSAKSIRI T.; SONTORNCHAINAKSENG P., SOONTHORNCHAREONNON N.; PRATHANTURARUNG S. In vitro induction of polyploidy in *Centella asiatica* (L.) Urban. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* v. 107, p. 187–194, nov.2011.

KHAN, P.S.; et al. Growth and water relations of *Paulownia fortunei* under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. *Biologia Plantarum*, Copenhagen, v. 46, n. 2, p. 161-166, Mar/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 Physiol Plant* (2011) 33:1149–1156

LOUREIRO, J.; SANTOS, C. Métodos em Biotecnologia - Citometria de Fluxo I. Aplicação da Citometria de Fluxo ao estudo do Genoma Vegetal. *Boletim de Biotecnologia*. Jan/2005. LUZ, P. B.; et al. Cultivo de flores tropicais. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte. v. 26. n. 227. p. 62-72. 2005.

MARIE, D.; BROWN, S. 1993. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. *Biology of the Cell* 78: 41-51.

MEDRI, M.E.; LLERS, E. Comparação anatômica entre folhas de um clone diploide (LAN 873) e dois clones poliploides (IAC 207, 222) de *Hevea brasiliensis* Mull. Arg. *Acta. Amaz.* V.11. (1). 35-47.p. 1981

MIGLIORANZA, E.; OLIVEIRA, E. C. Dimensões e densidade estomática em diferentes variedades de mandioca. *Cultivando o Saber*. Cascavel, v. 6, n. 4, p. 201 - 213, 2013.

MOREJOHN, L.C.; FOSKET, DE. The biochemistry of compounds with anti-microtubule activity in plant cells. *Pharmacology & Therapeutics*. Volume 51, Issue 3, Pages 377-40. 1991.

OBE G.; BEEK B. *Premature Chromosome Condensation in Micronuclei*. New York: Academic Press, 1982.

PAGLIARINI, M.S. Citogenética aplicada ao melhoramento. In. NASS, L. L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. Recursos genéticos e melhoramento. Rondonópolis: Fundação Mato Grosso, p. 871-910; 2001.

PEÑA, L. F. M. Uso do teste de micronúcleo em eritrócitos circulantes de peixes para monitorização de um local do rio Tibagi e avaliação da genotoxicidade de agrotóxicos em bioensaios. 1996. 199 f. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

PEREIRA, F. R. A. Caracterização morfoagronômica e molecular de meio irmãos de *Heliconia bihai* L., *H. chartacea* Lane ex Barreiros e *H. walgueriana* Petersen. 56 f. Trabalho de conclusão de curso (Dissertação) – Agronomia, Universidade Federal Rural do Pernambuco, Recife. fev. 2012.

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

PLANCHAIS, S. GLABB, D.I.; BERGOUNIOUXB, C. Chemical inhibitors: a tool for plant cell cycle studies. *FEBS Letters*. v. 476.p. 78 – 83. 2000.

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

RIZER, M.D.M. Identificação e caracterização de plantas poliploides de *Helicônia chartacea* var. *Sexy Pink*. Tese (Doutorado) – UFAM – 106.:il. 2017.

RODRIGUES, F.A.; SOARES, J.D.R. SANTOS, R.R.; PASQUAL, M.;SILVA, S.O. Colchicine and amiprofos-methyl (APM) in polyploidy induction in banana plant. *African Journal of Biotechnology* Vol. 10(62), pp. 13476-13481, 12 October, 2011.

SANTOS, F. C.; SCARPA, A. L.; FREITAS, A.; DAVIDE L.; PEREIRA, A Determinação indireta de ploidias em combinações genômicas entre *Pennisetum purpureum* Shum. e *Pennisetum glaucum* (E.) Leck . XXVIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 2010, Goiânia: Associação Brasileira de Milho e Sorgo. CD-Rom.

SCHIFINO, M.T. Estudos citogenéticos em *Trifolium riograndense* Burkart, *T. polymorfum* Poir. E *T. repens* L.: Indução de poliploidia, número cromossômico, cariótipo, comportamento meiótico. Porto Alegre – RS. 255p. Tese (Doutorado em Ciências) – Curso de Pós-graduação em Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1985.

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*, Santa Maria, v. 30. p. 105-111. Jan-Mar. 2000.

SILVA, P.A.K.X.M. Indução de poliploidia em mandioca. Tese (Doutorado) -Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”, 71 p. Piracicaba -2014

TEDESCO, S.B.; BATTISTIN, A.; VALLS, J.F.M. Diâmetro dos grãos de pólen e tamanho dos estômatos em acessos diploides e tetraploides de *Hemarthria altissima* (Poiret) Stapf & Hubbard (Gramineae). *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 29, n. 2, p. 273-276, 1999

TIMBO, A.L.O. Duplicação cromossômica e identificação do nível de ploidia utilizando citometria de fluxo em *Brachiaria* spp. Tese (doutorado) Universidade federal de lavras: UFLA, 100p.il. 2011.

VAN HARTEN, A. M. Mutation breeding: theory and practical applications. Ucraina: Cambridge University Press. p. 353. 1998.

VERHOEVEN, H.A.; RAMULU, K.S. & DIJKHUIS, P.A. comparison of the effects of various spindle toxins on metaphase arrest and formation of micronuclei in cell-suspension cultures of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Planta*, 182:408-411, 1990

VICHIATO, M. R. M.; et al. Análises estomática e morfométrica de folhas de plantas diplóides e tetraplóides de *Dendrobium nobile* Lindl. *Revista Ceres*. v. 53. n. 310. p. 541-548. nov-dez. 2006.

VIEIRA, J. P.S. Anatomia da lâmina foliar de acessos de *Paspalum stel latum* Humb. & Bonpl. ex Flüggé (Poaceae) com di ferentes tipos de ploidia. Dissertação (mestrado) -70 p. Uni versidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Botânica, 2014.

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

WEYERS, J. D. B.; MEIDNER, H. Methods in Stomatal Research. Longman Scientific and Technical, Essex. p. 233. 1990.

WITTMANN, M. T. S, DALL´AGNOL, M. Indução de poliploidia no melhoramento de plantas. *Pesq. Agrop. Gaúcha*. v. 9. n. 1-2. p. 155-164. 2003

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pode-se estabelecer um protocolo para a propagação in vitro para *Echinochloa Polystachya*; contudo, ao se constatar que no decorrer as sucessivas repicagens houve a diminuição dos internódios e a consequente perda do vigor, é necessário a continuação das pesquisas que tragam respostas em relação não somente dos fatores que promovem a diminuição do vigor nos explantes, ao conjunto de outros estimuladores de crescimento.

Por meio dos resultados do presente trabalho puderam-se observar os efeitos que o antimitóticos, colchicina causam quando plantas são expostas em diferentes concentrações e tempos. A taxa de sobrevivência foi afetada, mas foi possível obter diferentes níveis de ploidia para *Echinochloa Polystachya* no processo de indução. Também se verificamos que plantas anômalas não ocorreram nos tratamentos onde a

concentração de colchicina foi 0 (zero), pode-se inferir que as plantas foram afetadas em seu metabolismo por alterações moleculares, não causando a mortalidade imediata, mas afetando as divisões celulares, levando as células ao colapso.

Em relação as plantas sobreviventes à indução a poliploidia, as porcentagens de mortalidade em pré-emergência, ou seja, plantas que não germinaram foram extremamente afetadas pelas concentrações e tempo a que foram expostos os segmentos nodais, em que na concentração  $0,1 \text{ ml.L}^{-1}$  e no tempo 36 horas foram de 85%. Em termos de sobrevivência das plantas verificou-se maior sobrevivência, quando tratadas com colchicina, nas concentrações  $0,01 \text{ ml.L}^{-1}$  e no tempo 0 (zero) de exposição, em uma taxa de sobrevivência de 33,1. Em termos gerais dos 600 segmentos nodais submetidos aos tratamentos 172 puderam sobreviver, refletindo em uma taxa de sobrevivência de 28%, Destes 172 sobreviventes 159 dos 570 sobreviveram a exposição as diferentes concentrações, ou seja, 27,59% das plantas sobreviveram as concentrações.

Assim as plantas com ploidia diferente puderam ser confirmadas através da citometria de fluxo entre os genótipos a alteração a variabilidade genética repercutindo em um rearranjo estrutural dos componentes celulares, incrementando índices de clorofila que estão correlacionados diretamente a maiores níveis de nitrogênio na planta que pode ser verificado ao mensurar as variáveis morfométricas, como a maiores dimensões de células na epiderme foliar e na conseqüente largura de folha, expressa pela maior distância entre os feixes vasculares. No entanto, considera-se que a estabilidade da ploidia precisa ser avaliada ao longo de um período de multiplicação dos genótipos para verificar a estabilidade dos mesmos ao longo do tempo, uma vez que muitas destas plantas pode retornar ao estado diploide.

Pode se concluir que as concentrações e doses de colchicina em foram submetidos a espécie *Echinochloa polystachya* influenciou diretamente nos eventos moleculares, acarretando em plantas com diferentes níveis de ploídias e através destes parâmetros, foi observado que os segmentos nodais expostos aos tratamentos, apresentaram modificações estruturais, cujas plantas sobreviventes, e em particular as que se destacaram, puderam expressar diferentes características morfogenéticas, padrões de crescimento, e expansão de folha, refletindo nas variáveis morfométricas, de interesse forrageiro, indicando potenciais plantas mutagênicas que poderão entrar em um posterior trabalho de melhoramento, onde poderão ser aferidas suas reais performances a campo.