**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Indução de poliploidia em mandioca

Paulo Artur Konzen Xavier de Mello e Silva

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

**Piracicaba
2014**

Paulo Artur Konzen Xavier de Mello e Silva
Biólogo

Indução de poliploidia em mandioca

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:

Prof. Dr. **FRANCISCO DE ASSIS ALVES MOURÃO FILHO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

**Piracicaba
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Silva, Paulo Artur Konzen Xavier de Mello e
Indução de poliploidia em mandioca / Paulo Artur Konzen Xavier de Mello
e Silva.- - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - -
Piracicaba, 2014.
71 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. Citometria de fluxo 2. Colchicina 3. Estômato 4. *Manihot esculenta* L. Título

CDD 633.4
S586i

Ao meu Pai Júlio Xavier
À minha mãe Elaine (*in memoriam*)

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo Projeto de Doutorado Interinstitucional (Dinter) e pela concessão de bolsa de estudos para o desenvolvimento do meu estágio em Piracicaba.

À Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio Grande do Sul (FEPAGRO), na pessoa do pesquisador Zeferino Genésio Chielle, por disponibilizar as cultivares de mandioca, indispensáveis à pesquisa.

Aos meus professores pelos ensinamentos, em particular ao meu orientador, Dr. Francisco de Assis Alves Mourão Filho e ao Professor Dr. Mateus Mondin.

Ao Dr. Rodrigo Rocha Latado pela cooperação na análise das plantas em citômetro de fluxo no Laboratório de Biotecnologia do Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Citros “Sylvio Moreira”.

Ao coordenador do programa Dinter no Instituto Federal Farroupilha: Jean Karlo Acosta Mendonça pelo profissionalismo e prontidão em atender as minhas demandas.

À secretária da Pós-Graduação Luciane Aparecida Lopes Toledo por toda gentileza e solicitude em qualquer momento.

À Liliane Stipp (Lili), técnica do Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas, pela dedicação e auxílio em todos os momentos que precisei.

À Silvia Cristina Menuzzo Molina, técnica do Laboratório de Citogenética Molecular de Plantas pela cooperação e atenciosa ajuda na análise citológica.

À bolsista Thais Peixoto do Laboratório de Biotecnologia do Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Citros “Sylvio Moreira” pela paciência e dedicação ao ajudar na análise das plantas do experimento no citômetro de fluxo.

A todos os meus familiares, em especial ao meu pai Júlio Xavier, à minha esposa Bárbara Alves e ao meu filho Ígor Xavier pelo apoio e compreensão.

Aos meus colegas Adriano Michel, Fernando Machado dos Santos, João Flávio Carvalho, Jorge Alex Willes, Lisandra Della Flora, Luiz Alberto Cadoná, Rosemari Kerbes Aires, Cláudio Renato Schlessner, Marcelo Rodrigues e Wolmar Trevisol pelo companheirismo e solidariedade.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas: Luzia Yuriko Miyata, Lísia Borges Atílio, Tatiana Souza Moraes, Nathália Ansante, Tatiane Silva, Perla Oliveira e Filipi Augusto Coelho Rodrigues.

Aos amigos que deixei em Piracicaba, em especial ao Chefe Edison Luiz Benato, Chefe Gimirson Moura e ao Sensei Roney Rodrigues por transformar a minha estada em Piracicaba muito agradável.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	15
LISTA DE ABREVIATURAS.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1 O melhoramento de mandioca.....	23
2.2 Cultura de tecidos vegetais	25
2.3 A poliploidia como ferramenta no melhoramento genético	27
2.4 Citometria de fluxo.....	31
2.5 Análise citogenética.....	32
2.6 Análise de estômatos	33
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 Obtenção dos acessos	35
3.2 Desinfestação.....	37
3.3 Estabelecimento do cultivo in vitro.....	37
3.4 Embriogênese somática	39
3.5 Indução da poliploidia	40
3.6 Citometria de fluxo.....	42
3.7 Análise citogenética.....	42
3.8 Análise de estômatos	43
3.9 Aclimatização das plantas regeneradas	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5 CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS.....	59

ANEXOS69

RESUMO

Indução de poliploidia em mandioca

A poliploidia teve importante papel no melhoramento de muitas espécies de plantas, principalmente nos cereais, incluindo híbridos intergenéricos. O processo de poliploidização, geralmente, produz novos e desejáveis fenótipos ou fornece suporte para cruzamentos de plantas em programas de melhoramento. Esse trabalho apresenta o resultado da indução de poliploidia em duas cultivares de mandioca ('Porquinho' e 'Vassourinha') que foram tratadas com diferentes concentrações de colchicina (0,05%, 0,10% e 0,15%), em meio de cultura, durante 48 e 96 horas. As plantas regeneradas foram analisadas citologicamente por citometria de fluxo e pela contagem do número de cromossomos. Adicionalmente, análises do tamanho e da frequência dos estômatos foram realizadas e o resultado comprovou que podem ser utilizadas como *screening* das plantas tratadas. O tratamento com 0,1% de colchicina, em meio de cultura, durante 96 horas apresentou maior número de plantas tetraplóides produzidas sobre o número de plantas regeneradas nas duas cultivares avaliadas. Não há diferenças entre as doses de colchicina e tempos de exposição a droga no número de tetraplóides encontrados em cada tratamento. Entretanto, foi possível verificar que existe diferença significativa na produção de tetraplóides entre as cultivares analisadas, indicando que pode haver uma resposta genética à indução da duplicação dos cromossomos com colchicina.

Palavras-chave: Citometria de fluxo; Colchicina; Estômato; *Manihot esculenta*; Mixoplóide; Tetraplóide

ABSTRACT

The induction of polyploidy in cassava

The polyploidy played an important role in the improvement of many species of plants, especially in cereals including intergeneric hybrids. The process of polyploidy usually produces new and desirable phenotypes or provides support for crosses of plants in breeding programs. This research work reports the result of polyploidy induction in two cassava cultivars ('Porquinho' and 'Vassourinha') by different colchicine concentrations (0.05 %, 0.10 % and 0.15 %) in culture medium exposed for 48 or 96 hours. Regenerated plants were examined cytologically by flow cytometry and chromosome counting. Additionally, analysis of the size and frequency of stomata were performed and the results showed that can be used for screening of the treated plants. Treatment with 0.1% colchicine in the culture medium for 96 hours showed a higher number of tetraploid plants produced about the number of regenerated plants in both cultivars evaluated. No significant differences among colchicine doses and duration times treatment were found in the number of tetraploids found in each treatment. However, we observed a significant difference in tetraploid production between the cultivars analyzed, indicating that there may be a genetic response to induction of chromosome doubling with colchicine.

Keywords: Flow cytometry; Colchicine; Stomata; *Manihot esculenta*; Mixoploid; Tetraploid

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Cultivares avaliadas no experimento: (A) ‘Porquinho’ (detalhe para a coloração vermelho claro dos pecíolos); (B) ‘Vassourinha’ (detalhe para os lóbulos longos e estreitos)..... 36
- Figura 2 – Mandioca cultivada em casa de vegetação: (A) Toletes recém plantados em bandejas plásticas; (B) Cultivar ‘Porquinho’, em brotação aos 30 dias de cultivo..... 37
- Figura 3 – Segmentos caulinares nodais de mandioca da cultivar ‘Vassourinha’ com brotação após sete dias de cultivo *in vitro* após o isolamento. 39
- Figura 4 – Folhas em meio de cultura M3 (A) e calo embriogênico em meio de maturação CMM (B)..... 40
- Figura 5 – Haste de mandioca cultivar ‘Porquinho’ proveniente da cultura de tecidos: (A) Haste inteira; (B) Haste seccionada em segmentos caulinares nodais utilizados no experimento. 41
- Figura 6 – Mandioca cultivar ‘Porquinho’ sendo aclimatizada em substrato comercial: (A) Início da aclimatização com saco plástico encaixado sobre o vaso; (B) Planta de mandioca aclimatizada. 44
- Figura 7 – Histogramas do conteúdo de DNA nuclear (2C e 4C) revelados pela análise de folhas das plantas em citômetro de fluxo: (A) Planta diplóide ($2n = 2x = 36$) (média 79,51 e CV 7,1); (B) Planta mixoplóide ($2x + 4x$) (média 76,32 e CV 5,8/média 146,22 e CV 4,9); (C) Planta tetraplóide ($2n = 4x = 72$) (média 141,48 e CV 4,5)..... 47
- Figura 8 – Histogramas do conteúdo de DNA nuclear (2C e 4C) revelado pela análise de folhas de plantas mixoplóides em citômetro de fluxo: (A) Planta mixoplóide (média 78,06 e CV 5,5/média 147,83 e CV 5,1) com maior população de células diplóides que a de tetraplóides; (B) Planta mixoplóide (média 77,43 e CV 7,0/média 147,98 e CV 5,4) com populações de células diplóides e tetraplóides equivalentes; (C) Planta mixoplóide (média 76,56 e CV 11,5/média 146,43 e CV 5,3) com maior população de células tetraplóides que a de diplóides..... 47
- Figura 9 – Hastes caulinares da cultivar ‘Porquinho’ em meio de cultura para enraizamento: (A) Planta diplóide com folha em detalhe; (B) Planta tetraplóide com folha em detalhe..... 49

- Figura 10 – Distribuição do percentual do número de tetraplóides produzidos sobre o número de plantas regeneradas em cada tratamento (concentração percentual de colchicina 0,05; 0,10 e 0,15%). (A) Distribuição do percentual de plantas tetraplóides das duas cultivares no tratamento de 48 horas de exposição à colchicina; (B) Distribuição do percentual de plantas tetraplóides das duas cultivares no tratamento de 96 horas de exposição à colchicina.50
- Figura 11 – Moldes da impressão de estômatos da face abaxial das folhas de plantas de mandioca cultivar ‘Porquinho’ em filme de nitrocelulose e suas respectivas medidas de comprimento (μm), em aumento de 400X: (A) Diplóide; (B) Tetraplóide.....53
- Figura 12 – Moldes da impressão de estômatos da face abaxial das folhas de plantas mixoplóides cultivar ‘Vassourinha’ em filme de nitrocelulose e suas respectivas medidas de comprimento (μm), em aumento de 400X. (A) e (B) Diferentes plantas analisadas apresentando estômatos de variados e extremos tamanhos reunidos em um mesmo campo de observação.54
- Figura 13 – Cromossomos de mandioca cultivar ‘Vassourinha’ em aumento de 1000X. (A) Diplóide ($2n = 2x = 36$); (B) Tetraplóide ($2n = 4x = 72$)55

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Número de segmentos caulinares com gemas tratados, mortalidade, número de plantas mixoplóides e tetraplóides produzidas e a eficiência dos tratamentos, em função de três concentrações de colchicina aplicadas em meio de cultura durante dois períodos de tempo (48 e 96 horas) em duas cultivares de mandioca (‘Vassourinha’ e ‘Porquinho’), após seis meses de cultivo..... 46
- Tabela 2 – Resultado da análise de variância (ANOVA) a três fatores. Dados transformados da variável dependente (logaritmo natural da razão entre as plantas tetraplóides produzidas e o total de plantas regeneradas no experimento, somado a 0,1). Apresentação dos resultados: soma dos quadrados (SQ), graus de liberdade (GL), quadrado médio (QM), razão entre o modelo e o erro (F) e valor-p..... 51
- Tabela 3 – Comparação das características de estômatos em folhas de plantas diplóides e tetraplóides provenientes do experimento. Valores médios de comprimento, largura e frequência de estômatos por mm^2 , acompanhados de seus respectivos erros padrão. 53

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D – Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

ANA – Ácido Naftalenoacético

BAP – Benzilaminopurina

CIAT – Centro Internacional de Agricultura Tropical

CGIAR – *Consultative Group on International Agricultural Research*

DAPI – 4',6-Diamidino-2-Phenylindole

DNA – Ácido Desoxiribonucléico

ESALQ – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

FEPAGRO – Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio Grande do Sul

GA3 – Ácido Giberélico

IAC – Instituto Agronômico de Campinas

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IITA – Instituto Internacional para a Agricultura Tropical

MS – Meio de cultura de Murashige e Skoog (1962)

PDB – Paradiclorobenzeno

1 INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), espécie da família *Euforbiaceae*, é uma planta arbustiva, perene, caducifólia com raiz tuberosa comestível de origem sul-americana, mais especificamente do sudoeste da Amazônia (CREPALDI, 1992), cultivada em grande parte do território brasileiro e em diversos países ao redor do mundo. A cultura está tradicionalmente associada à pequena propriedade rural em função do baixo custo de produção, facilidade de propagação, pouca exigência de insumos no cultivo, colheita em qualquer época do ano, grande variedade de produtos dela obtida e sua fácil adaptação aos mais variados climas e tipos de solo. Suas raízes são órgãos de reserva de amido e podem ser destinados ao consumo humano na forma *in natura*, após simples processamento doméstico, ou industrializadas na forma de fécula (polvilho) e farinha de mesa. A planta inteira, principalmente a parte aérea, pode ser utilizada na alimentação animal, inclusive substituindo o milho na ração dos ruminantes. Além de seus tradicionais derivados (*chips*, farinha e fécula), atualmente, a mandioca é muito utilizada na produção de xaropes, papel, colas especiais, aditivos alimentares orgânicos, cerveja, rações e etanol (SOUZA, 2013).

Um dos fatores que determinam a forma de aproveitamento das raízes de mandioca é o conteúdo de ácido cianídrico (HCN), variável nas diferentes cultivares. Consequentemente, as variedades cultivadas que apresentam baixos teores desse ácido nas raízes, popularmente denominadas “mansas” podem ser consumidas *in natura* e as com alto teor, chamadas de mandiocas “bravas”, somente podem ser consumidas após serem submetidas a algum processo de destoxificação, sendo utilizadas, principalmente, para a forragem e produção de farinha e fécula (MEZETTE, 2007).

Devido à alta concentração de amido na mandioca é possível, por meio de via ácida ou enzimática, a produção de etanol. Segundo Ordoñez Camacho (2013), a mandioca possui melhor desempenho, em produtividade por tonelada, que a cana-de-açúcar na fabricação de etanol, enquanto uma tonelada de cana-de-açúcar produz 85 litros de álcool combustível (etanol), uma tonelada de mandioca, com rendimento médio de 25% de amido e 2% de açúcares, produz 170 litros de etanol.

A mandioca se destaca como potencial cultura produtora de etanol não só pela elevada concentração de amido, mas também na possibilidade de colheita o ano inteiro. Entretanto, a obtenção de etanol no Brasil se desenvolveu com base na cadeia produtiva da cana-de-açúcar,

tornando-se muito competitiva. Portanto, atualmente, a mandioca não tem condições de concorrer contra o *lobby* do setor da cana-de-açúcar, mas estrategicamente é um produto renovável, podendo ocupar, no futuro, lugar de destaque na matriz energética do País.

A planta não é muito exigente, sendo cultivada durante todo o ano, em solos de pouca fertilidade e climas adversos, como em ambientes com escassez de água. Sua rusticidade é explorada, especialmente pelos agricultores de subsistência e comunidades carentes. No Brasil, a mandioca é muito apreciada e faz parte, principalmente, da cultura culinária da região nordeste, onde existem solos pobres e estiagens prolongadas. No mundo, os países africanos lideram a produção de mandioca e a maior parte (90%) é destinada ao consumo humano.

A produção mundial de mandioca está concentrada nos continentes africano, americano e asiático, em função do clima mais favorável ao seu desenvolvimento na faixa tropical e subtropical (ALVES, 2012). De acordo com Souza (2013), embora a produção mundial oscile um pouco, em virtude das estiagens locais, as colheitas médias atingem cerca de 250 milhões de toneladas por ano e os principais países produtores são a Nigéria, o Brasil e a Tailândia. Destaque para os países africanos que, em conjunto, respondem por mais da metade da produção mundial. No Brasil, a mandioca é bastante utilizada, tanto para o consumo humano quanto animal. Entretanto, a demanda é orientada, principalmente, pela indústria de farinha e de amido (fécula). Segundo Farias et al. (2005 apud ALVES, 2012), estima-se que 80% da mandioca produzida no Brasil é destinada a fabricação de farinha.

A produção africana de mandioca lidera o *ranking* mundial pela extensão de área cultivada e quantidade de raiz produzida, porém sem ganhos significativos em produtividade (entre 10 e 11 t ha⁻¹). Enquanto que nos países asiáticos, com menores áreas cultivadas, os níveis de produtividade são consideravelmente maiores (na faixa de 16 a 23 t ha⁻¹). Neste cenário, o Brasil, apesar da tradição e de estar entre os principais produtores, está estagnado, sem expansão das áreas de cultivo e apresentando reduzidos ganhos em produtividade (média de 14 t ha⁻¹, considerando todas as regiões produtivas brasileiras).

O Brasil continua entre os principais países produtores de mandioca ocupando a 4^a colocação no *ranking* mundial com cerca de 23 milhões de toneladas por ano (FAO, 2012). Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística mostraram que a produção brasileira em 2013 totalizou 21.199.305 toneladas com variação negativa de 9,5% quando comparada a

2012. A área total decresceu 13,0% e a área colhida reduziu 10,5%. Contudo, a estimativa da produção para safra 2014 é de aumento de 8,0% em relação a 2013, alcançando cerca de 23 toneladas por ano (IBGE, 2013).

O pequeno aumento da produção se deve ao esforço conjunto das adequadas técnicas de cultivo e a utilização de cultivares mais resistentes e adaptadas as condições ecológicas das áreas de plantio. Nesse sentido, reveste-se de importância os estudos da variabilidade encontrada nas dezenas de cultivares conservadas em coleções pelo mundo e as ferramentas biotecnológicas utilizadas para trabalhar o melhoramento da mandioca.

O programa de melhoramento genético de mandioca do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) é o mais antigo do Brasil. Começou na década de 1930, como objetivo de obter novas cultivares com maiores teores de matéria-seca e maior produtividade voltadas à indústria. No início do programa, o IAC caracterizou as principais cultivares plantadas, orientando os produtores para utilização das mais produtivas. Posteriormente, houve a preocupação em identificar as cultivares que possuíam maiores teores de matéria-seca (indicativo de maiores teores de amidos e, consequentemente, maior rendimento industrial) e com maior tolerância à bacteriose, principal doença da cultura (BAZZO, 2007).

Segundo Souza et al.(2006), os principais métodos utilizados no melhoramento genético da mandioca são: a introdução e seleção de cultivares, a hibridação intraespecífica e interespecífica e a indução de poliplóides. A indução de poliplóides é um método baseado na premissa de que o aumento no número de cromossomos contribui de maneira benéfica com certas características da planta, como o vigor, a facilidade em se adaptar a condições adversas do ambiente e o aumento da resistência a pragas e doenças.

O cruzamento de espécies silvestres de mandioca e a cultivada têm sido frequentemente utilizado como método de aumentar a diversidade genética na cultura em programas de melhoramento. Nassar (2000) revela que a condução de cruzamentos interespecíficos de mandioca também constitui-se de ferramenta eficaz na produção de híbridos triplóides mais produtivos. Provavelmente, esse resultado é consequência do aumento da ploidia, pois a herança no controle da produtividade em mandioca, assim como em muitas culturas, é poligênica de ação aditiva.

A indução de poliploidia em cultivares de mandioca, por técnicas que utilizam a colchicina como agente antimitótico, pode contribuir sobremaneira em programas de

melhoramento, uma vez que as plantas produzidas podem possuir características fenotípicas desejáveis, como o aumento da produtividade de raízes em cultivares comerciais já selecionadas pela intervenção humana.

Segundo Hashimoto (2009), a poliploidia pode ter efeitos sobre a anatomia caular apresentando aumento de órgãos devido ao incremento do número e tamanho de suas células, podendo estar relacionado à tolerância ao déficit hídrico da cultivar poliplóide UnB 530.

As ferramentas biotecnológicas atuais, como a cultura de tecidos, podem auxiliar o trabalho do melhorista na produção de novas cultivares mais produtivas, resistentes a pragas e doenças e adaptadas às condições edafoclimáticas mais extremas. Nesse sentido, diversas técnicas de micropropagação já foram testadas com sucesso em mandioca, tornando-se úteis em programas de melhoramento genético (MATSUMOTO et al., 1991, OLIVEIRA et al., 2000; SOUZA et al., 2009; VAEZ, 2007; VIDAL, 2009).

A grande variabilidade encontrada em mandioca oferece muitas possibilidades de aproveitamento de seus genes em hibridações interespecíficas. Entretanto, os cultivares de mandioca mostram-se deficientes em algumas características de valor econômico, como a baixa resistência ao estresse hídrico e o baixo conteúdo protéico (HASHIMOTO, 2009). Dessa forma, a poliploidia pode conferir características que por hibridação dificilmente são obtidas.

Considerando os diversos fatores envolvidos, existe a pressuposição de que o ajuste da técnica de micropropagação de segmentos caulinares nodais, associada à introdução de colchicina no meio de cultura, possibilite a produção de grande número de plantas inteiramente tetraplóides. Portanto, o objetivo desse trabalho foi de estabelecer um protocolo de obtenção de plantas de mandioca tetraplóides a partir de segmentos caulinares nodais tratados com colchicina em meio de cultura, analisando as plantas sobreviventes pelas técnicas de citometria de fluxo, contagem cromossômica e características estomáticas nas folhas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O melhoramento de mandioca

As cultivares de mandioca, assim como outras espécies agrícolas cultivadas, têm um tempo de vida útil, após o qual necessitam ser substituídas. A principal razão para essa substituição é a quebra da resistência a doenças, pois cultivares inicialmente resistentes à bacteriose, causada por *Xanthomonas axopodis* pv.*manihotis*, tornam-se cada vez mais suscetíveis, até o ponto de não poderem mais ser cultivadas. Por conseguinte, existe necessidade de programas contínuos de melhoramento e limpeza de matrizes valiosas para manter a produtividade e a qualidade das cultivares de mandioca.

As demandas de produção, processamento e mercado da mandioca, em cada país, direcionam os programas de melhoramento genético da mandioca. Entretanto, muitos objetivos dos trabalhos de melhoramento são comuns, principalmente, no que se refere ao aumento da produtividade e a resistência a pragas e doenças. Em mandioca, dificilmente os objetivos têm se limitado ao melhoramento de um único caráter, pois as evidências mostraram que a maioria das características de interesse agrônômico é controlada por vários genes com efeitos aditivos (SOUZA et al., 2006).

Independentemente do número de caracteres, os objetivos do melhoramento genético da mandioca levam em consideração: o ecossistema e a finalidade de exploração do cultivo. Apesar de adaptar-se a diferentes ecossistemas, a mandioca apresenta alta interação dos genótipos com o ambiente, indicando que um mesmo genótipo dificilmente comporta-se da mesma maneira em todas as regiões ecológicas. Uma das causas fundamentais disso é o grande número de pragas e doenças que afeta o cultivo, cuja incidência e a gravidade estão limitadas a condições específicas, restritas a determinados ecossistemas. Além disso, a mandioca é afetada por inúmeros estresses ambientais que limitam ou inviabilizam o desenvolvimento de uma única variedade em diferentes ecossistemas. Em consequência, a adaptação, a estabilidade de produção e a resistência a pragas e doenças são os objetivos básicos dos programas de melhoramento da mandioca (FUKUDA; IGLESIAS, 2006).

A mandioca pode ser multiplicada por sementes (pela via sexuada), porém, não é a maneira utilizada pelo agricultor, visto o alto nível de segregação que as sementes podem apresentar. A propagação usual é a vegetativa, a partir de manivas (estacas) que limita a produção pela ocorrência e acúmulo de muitas moléstias, como viroses, a bacteriose causada

por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* e as fúngicas (*Colletotrichum* spp., *Phytophthora* sp. e *Fusarium* sp.) que podem ser transmitidas por sucessivas gerações (FUKUDA, 1993).

De acordo com Fukuda et al. (1999), a biodiversidade da mandioca existente nas coleções e bancos de germoplasma apresenta suficiente variabilidade (base genética) para programas de melhoramento com a cultura, por concentrar genes que conferem resistência às principais pragas e doenças, além de adaptação aos diferentes ecossistemas. Essa diversidade em *Manihot esculenta*, para maioria dos caracteres de interesse econômico, já foi caracterizada, incluindo aqueles de natureza morfológica, agrônômica e de resistência a patógenos que afetam a cultura no Brasil (FUKUDA; SILVA; MENDES, 1996).

Importantes programas de melhoramento convencional de mandioca vêm sendo realizados a nível internacional, como no Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) na Colômbia, e no Instituto Internacional para a Agricultura Tropical (IITA) na Nigéria, e em dois centros do *Consultative Group on International Agricultural Research* (CGIAR). Há que se destacar o sucesso desses programas, no desenvolvimento e distribuição de cultivares da mandioca com resistência a algumas doenças e pragas, melhores índices da matéria seca e melhores qualidades de processamento das suas raízes, na África, Ásia e nas Américas (JENNINGS; IGLESIAS, 2002 apud LARA et al., 2008). Entretanto, já se prevê que somente o melhoramento convencional não trará ao produtor materiais mais produtivos e resistentes em pouco tempo, como se espera. Segundo Taylor et al. (2002), a ampla diversidade genética da mandioca espalhada pelo mundo levará muito tempo para ser trabalhada pelo melhoramento convencional, e é nesse aspecto que se valida o uso das ferramentas biotecnológicas como auxiliares ao melhoramento genético.

Modernas metodologias da engenharia genética estão sendo utilizadas pelos pesquisadores para produzir plantas resistentes a pragas, enfermidades, herbicidas e estresses abióticos (PUONTI KAERLAS et al., 1999; RAEMAKERS et al., 1996; VAEZ, 2007; ZHANG et al., 2005). Para que novas cultivares possam ser obtidas em laboratório, um dos pré-requisitos é que existam sistemas *in vitro* que possibilitem a regeneração das plantas mediante a organogênese e embriogênese somática (MATSUMOTO et al., 1991; MEDINA; FALOCI; MROGINSKI, 2001; TAKAHASHI; KOBAYASHI; VIEIRA, 2000; VIDAL, 2009).

Segundo Battistin et al.(2007), existem diversas técnicas auxiliares ao melhoramento genético disponíveis para aplicação imediata, trazendo diversos benefícios e novas

perspectivas tecnológicas. Algumas delas são específicas para programas envolvendo biotecnologia, aplicadas ao melhoramento genético, tais como hibridação somática e transformação genética em mandioca. O êxito dessas e de outras técnicas, como a indução de poliploidia se reflete na produção de plantas com capacidade de expressar bom desenvolvimento em diferentes ambientes, criando, desta forma, indivíduos mais adaptados e produtivos.

2.2 Cultura de tecidos vegetais

A regeneração de plantas a partir de sistemas de cultura de células e tecidos é ainda uma limitação na aplicação de várias ferramentas biotecnológicas. Matsumoto et al. (1991) afirmam que a regeneração de plantas, via embriogênese somática, é altamente desejável por se tratar de um processo com elevadas taxas de multiplicação, resultando em numerosos embriões individualizados que se desenvolvem diretamente em plantas.

Em mandioca, embriões somáticos têm sido induzidos a partir de cotilédones, ápices caulinares e folhas jovens clonadas *in vitro* (FEITOSA et al., 2007; MATSUMOTO et al., 1991; MEDINA; FALOCI; MROGINSKI, 2001; STAMP; HENSHAW 1987; SZABADOS et al., 1987; TAKAHASHI; KOBAYASHI; VIEIRA, 2000; VIDAL, 2009). Entretanto, os protocolos de embriogênese somática em mandioca ainda não estão bem estabelecidos.

A regeneração por organogênese pode ser direta ou indireta (MANTELL; MATTHEWS; McKEE, 1994). Na direta, também chamada de adventícia, o órgão vegetal é induzido e se desenvolve diretamente, a partir de um explante, sem passar pela fase de calo. Na indireta, há formação inicial e crescimento de células calosas, seguido por indução de brotos ou raízes e, por fim, desenvolvimento da planta.

Neste contexto, a micropropagação de plantas é a técnica de organogênese direta mais importante da cultura de tecidos. Consiste na produção de novas plantas a partir de pequenos explantes (partes da planta) inoculados em meio nutritivo sob condições assépticas (PIZA; PINHO, 2002 apud FREITAS et al., 2009). Algumas técnicas possibilitam a limpeza clonal de materiais sob cultivo de explantes isentos de patógenos, fornecem material para a transformação e produzem grande quantidade de mudas, em curto espaço de tempo e em reduzido espaço físico (OLIVEIRA; GOMES; VILARINHOS, 2000). Além disso, possibilita trabalhos de melhoramento, em qualquer época do ano, e tem como resultado a produção de mudas uniformes e de alta qualidade. As plantas de mandioca propagadas em laboratório têm

apresentado maior vigor por até quatro ciclos de cultura, principalmente, por estarem isentas de patógenos (MABANZA et al., 1994).

Sendo assim, a via de regeneração, por meio de micropropagação, que emprega explantes meristemáticos é a mais utilizada, visto que as plantas regeneram-se diretamente do tecido organizado sem a necessidade do estágio de calo. Desse modo, obtém-se economia de tempo e elimina-se a ocorrência de variação somaclonal associada a longos períodos de cultura de calos (ANDRADE, 2002). A variação somaclonal é uma modificação genética espontânea (mutação) de plantas regeneradas *in vitro*, geralmente com manifestação fenotípica indesejável.

As possibilidades de alterações na genética do germoplasma estão associadas ao estágio de diferenciação do tecido em cultivo (SOUZA et al., 2009). Elevada estabilidade está relacionada com a cultura de tecidos organizados, que são menos propícios aos riscos do surgimento de variações somaclonais, enquanto que explantes considerados desorganizados são normalmente sujeitos a uma instabilidade genética mais elevada. Entre as estruturas organizadas, destacam-se os meristemas, os ápices caulinares e as gemas laterais, seguidas pelos embriões somáticos e gemas adventícias. Já os cultivos de células, protoplastos e calos são considerados sistemas de cultura de tecidos de maior instabilidade genética, sendo estruturas que frequentemente produzem variação somaclonal. De modo geral, segundo Giacometti e Goes (1986), os meristemas apicais são os explantes, particularmente, apropriados para manter a identidade do germoplasma, considerando o processo ordenado de replicação cromossômica que apresentam.

Segundo Smith, Biggs e Scott (1986) existem cultivares de mandioca que são pouco responsivas à micropropagação e, portanto, deve-se ajustar a composição do meio de cultura conforme o cultivar a ser avaliado. Corroborando a afirmação, Broomese Lacon (1994 apud OLIVEIRA; GOMES; VILARINHOS, 2000) recomendam que sejam testadas modificações nas concentrações de sacarose, nitrogênio e reguladores de crescimento para otimizar os protocolos de meios de cultura destinados à mandioca. Mapayi et al. (2013), propõem alternativas de composição de meio nutritivos para genótipos de mandioca menos responsivos (recalcitrantes).

2.3 A poliploidia como ferramenta no melhoramento genético

A poliploidia, processo que origina um poliplóide (célula, tecido ou organismo com número cromossômico correspondente a um múltiplo superior a dois genomas haplóides), é considerada um dos processos evolutivos mais importantes na especiação de plantas superiores. Muitas espécies silvestres e cultivadas são poliplóides, tendo surgido na natureza através de gametas não reduzidos ou duplicação espontânea do zigoto na primeira divisão celular que permanecem na população, vencendo a seleção natural, por apresentarem maior potencial adaptativo no ambiente. As espécies poliplóides, ao contrário do anteriormente aceito, são, em sua maioria, de origem múltipla, e que o processo de poliploidização, além de ser um evento dinâmico e recorrente, foi acompanhado de mudanças genéticas e epigenéticas, levando a uma extensa reestruturação em todos os níveis do genoma, como repadronização cromossômica, silenciamento gênico, novos padrões de expressão gênica, ação de transposons, invasão intergenômica e evolução coordenada (SCHIFINO-WITTMANN, 2004).

Os poliplóides são classificados, basicamente, em autopoliplóides e alopoliplóides de acordo com a origem (STEBBINS, 1950 apud DHOOGHE et al., 2011). Os primeiros são originados pela duplicação de um mesmo genoma, e se espera alta frequência de multivalentes na meiose e herança polissômica. Os alopoliplóides são formados em híbridos, pela duplicação de diferentes genomas. O pareamento cromossômico ocorre apenas entre os cromossomos do mesmo genoma, e se espera que apresentem herança dissômica. Os alopoliplóides segmentares representam um tipo intermediário, formados pela duplicação dos genomas de espécies aparentadas, que ainda mantêm homologia suficiente entre seus cromossomos para permitir um pareamento parcial, e que podem exibir formas variadas e intermediárias de herança, ou seja, dissômica para algumas características e polissômica para outras (STEBBINS, 1971 apud SCHIFINO-WITTMANN; DALL'AGNOL, 2003). Essa classificação didática dos poliplóides é, muitas vezes, obscurecida pelas diferenças nas relações filogenéticas, e pela diferenciação cromossômica, que pode ter ocorrido ao longo da evolução entre as espécies genitoras (no caso dos alopoliplóides), e pelo processo de diploidização que tende a ocorrer após a formação dos poliplóides, ou seja, estes passam a se comportar, tanto cromossômica como geneticamente, como diplóides (SCHIFINO-WITTMANN; DALL'AGNOL, 2003).

A poliploidização é um dos principais fatores na especiação e evolução das plantas, sendo que o consequente aumento da norma de reação na ocupação dos ambientes parece ser

um dos elementos preponderantes do processo. Segundo, Soltis e Soltis (1995), os poliplóides representam cerca de 53% das espécies de briófitas, de acordo com Grant (1981 apud SONG et al., 2012), pode ser maior que 95% nas pteridófitas. Em gimnospermas, os poliplóides representam mais de 38% das espécies existentes (AHUJA; NEALE, 2005), sendo que a *Sequoia sempervirens* é a única conífera hexaplóide natural ($2n=6x=66$).

A poliploidia teve importante papel no melhoramento de muitas espécies de plantas, principalmente cereais, incluindo híbridos intergenéricos. Cerca de 80% das angiospermas (LEITCH; BENNET, 1997 apud SIMIONI, 2004) e 40% das espécies cultivadas (SIMMONDS, 1980 apud SCHIFINO-WITTMANN; DALL'AGNOL, 2003) são poliplóides, como alfafa, batata, fumo, algodão, aveia, trigo e morango.

Geralmente, o aumento do número cromossômico é acompanhado por um aumento de volume nuclear, que se reflete em um acréscimo do volume celular e de vários órgãos (CAVALIER-SMITH, 1985). Em vista disso, a planta poliplóide é, geralmente, maior que a correspondente diplóide.

Segundo Simioni (2004), é esperado que plantas poliplóides sejam superiores às plantas diplóides numa série de características. A razão para tal fato é que, as características adaptativas são controladas por numerosos genes, distribuídos em vários cromossomos. No processo de evolução dos poliplóides, o efeito da poliploidia em mutações individuais pode ter pequenas consequências, mas coletivamente, pode gerar características diferentes que estão sob controle de múltiplos genes. Além disso, o aumento da ploidia pode garantir vantagem adaptativa, pois pode mascarar os efeitos de mutações deletérias, já que os poliplóides, em geral, apresentam um efeito tamponante sobre estas mutações, que seriam silenciadas devido ao maior número de cópias gênicas (SILVA JR., 2008).

A poliploidia leva à duplicação genômica e, conseqüentemente, à duplicação gênica. Segundo Adams e Wendel (2005), a duplicação gênica pode ter as seguintes consequências evolutivas: (a) genes adquirindo novas funções; (b) “silenciamento” de uma ou das duas cópias duplicadas; (c) retenção da função original ou similar, persistindo a expressão gênica duplicada, que pode favorecer casos em que mutações de uma cópia gênica podem conduzir a interações negativas com os produtos de outros genes essenciais; (d) interação entre genes duplicados (efeito de dose = quanto mais alelos, mais produto). Estudos envolvendo várias plantas poliplóides revelaram um complexo padrão de evolução dinâmica e contribuíram para

o conhecimento sobre a relação entre a composição genômica e a função dos genes (YANG et al., 2011).

Segundo Nassar (2006) existem evidências de que a duplicação cromossômica aumenta a taxa de apomixia, em especial, em híbridos de *Manihot*. A confirmação dessa relação pode ser instrumento de grande valor no desenvolvimento de híbridos de mandioca, pois, representa a solução para a infertilidade de híbridos de qualidade, tanto pela restauração da fertilidade, quanto pelo aproveitamento do vigor híbrido, já que a apomixia pode perpetuar os caracteres que se encontram na planta materna, como resistência a pragas e doenças (HASHIMOTO, 2009).

De acordo com Chen (2007), os poliplóides podem sobreviver melhor do que os seus genitores diplóides em ambientes adversos, como o encontrado nas altas altitudes e latitudes e climas frios, pois a condição poliplóide permite, com o tempo, que esses organismos melhorem sua aptidão para entrar em novos nichos. As evidências, segundo Otto e Whitton (2000), sugerem que a poliploidização pode ocasionar mudanças nos sistemas genéticos e produzir fenótipos com potencial de aumentar a diversificação evolutiva.

Em geral, a produção de poliplóides, através de meios artificiais, é vantajosa tanto do ponto de vista genético quanto do evolutivo, uma vez que a poliploidia produz um efeito de heterose vigoroso nas plantas geradas e fornece ampliação das combinações gênicas, permitindo maior variabilidade genética (número maior de combinações alélicas disponíveis para a seleção).

Os poliplóides podem ser induzidos artificialmente com uso de antimitóticos, tais como a colchicina, a orizalina e o ácido nitroso. Geralmente, a poliploidização é induzida para contornar a esterilidade cromossômica dos híbridos interespecíficos. Entretanto, ela também pode ser utilizada para induzir a esterilidade e eliminar as sementes, como por exemplo, em banana (VANDUREN et al., 1996), uva (PARK; HIRAMATSU; WAKANA, 1999; WAKANA et al., 2000) e melancia (MEDINA et al., 1958; SOUZA; QUEIRÓZ; DIAS, 1999).

A substância mais utilizada como indutor de poliploidia é a colchicina ($C_{22}H_{25}O_6N$), alcaloide extraído de sementes e bulbos de uma liliácea (*Colchicum autumnale*), que atua no final da prófase mitótica, inibindo a formação do fuso mitótico ou levando a formação de um fuso abortivo pela precipitação das proteínas constituintes das fibras do mesmo (DHOOGHE

et al., 2011). O alcaloide colchicina é considerado o mais difundido e bem sucedido agente indutor de poliploidia, principalmente, por sua facilidade de aplicação e eficiência. Desde sua descoberta, por Blakeslee e Avery em 1937 (DERMEN, 1940), como poderoso agente indutor de poliploidia em plantas, a colchicina vem sendo utilizada pelos pesquisadores para duplicação cromossômica.

O tratamento com a introdução da droga no meio de cultura é considerado mais eficiente do que a forma que é usualmente utilizada (a droga diluída em água), tendo elevado a taxa de duplicação cromossômica de 63 para 72% em *Dendrobium* (VAJRABHAYA, 1983). Segundo o autor, este aumento na percentagem pode ser explicado pela disponibilidade de nutrientes durante o tratamento, o que intensificaria o efeito da colchicina pelo simples fato de não haver falta de energia necessária para o movimento dos cromossomos durante a divisão celular.

A poliploidia induzida por colchicina é caracterizada pelas baixas taxas de indução e uma elevada frequência de quimeras, além disso, em elevadas concentrações ou tratamentos muito prolongados, dependendo do tipo de explante e penetrabilidade do tecido, torna-se tóxica para os vegetais (ALLUM et al., 2007 apud THOMPSON; ANDERSON; VAN STADEN, 2010). Assim, a concentração apropriada e o tempo de exposição ao alcaloide devem ser determinados para cada espécie de planta e tipo de material a ser tratado.

À procura de alternativas para solucionar os problemas decorrentes da utilização de colchicina, Morejohn et al. (1987) propuseram o uso da orizalina (herbicida dinitroanilina) como agente indutor de poliploidia em plantas. A orizalina foi testada com sucesso por vários autores, que constataram uma menor citotoxicidade e uma maior eficiência em comparação a colchicina, já que a droga aumenta o número de plantas inteiramente tetraplóides, reduzindo o problema do mosaicismo (TOSCA et al., 1995; VANDUREN et al., 1996). Kermani et al. (2003) preferem o uso de orizalina, porque acreditam que a colchicina causa aberrações cromossômicas nos tecidos vegetais. Contudo, em algumas espécies, como a mandioca (*Manihot esculenta*), a colchicina ainda apresenta melhores resultados do que a orizalina (AWOLEYE et al., 1994).

Segundo Nassar (2006), a produção de cultivares poliplóides (com número de cromossomos superior ao número básico da espécie), também parece ser promissora para aumentar a produtividade da mandioca em condições menos adequadas de cultura. Uma das

mais produtivas cultivares indianas – ‘Sree Hansha’ – é triplóide, ou seja, tem três cópias de cada cromossomo. No Brasil, o clone de mandioca mais resistente ao déficit hídrico é um triplóide natural chamado ‘Manebeba Branca’. Considerando esses fatos, um plano mais eficiente de melhoramento da mandioca no Brasil pode ser baseado em três medidas: a exploração dos recursos genéticos silvestres, a produção de híbridos poliplóides e o desenvolvimento da apomixia.

Atualmente, os produtores de mandioca utilizam com sucesso cultivares triplóides e tetraplóides (com quatro cópias do número básico de cromossomos) em culturas com multiplicação vegetativa (por estacas). Desde o início dos anos 60, os cientistas tentam aumentar o número de cópias dos cromossomos nessa espécie com o uso da colchicina. Porém, segundo Nassar (2006), essas tentativas não têm resultado em cultivares poliplóides, provavelmente, por causa da instabilidade da variação produzida.

De acordo com Yanget al.(2006), é possível obter poliplóides e evitar o quimerismo, utilizando células isoladas (protoplastos) em colchicina, ou pelo tratamento de explantes multicelulares, seguido de regeneração direta a partir de uma ou poucas células do explante. Latado et al. (2007) relataram ter cultivado *in vitro* segmentos de epicótilo de laranja ‘Pêra-de-abril’ e tangor ‘Murcote’ na presença de colchicina, seguido da indução de regeneração de brotações adventícias, via organogênese, e obtiveram como resultado várias plantas autotetraplóides não-quiméricas.

Portanto, o aprimoramento da técnica de indução de poliploidia em mandioca permitirá explorar a possibilidade de obtenção de novos e desejáveis fenótipos ou fornecer suporte para cruzamentos de plantas em programas de melhoramento.

2.4 Citometria de fluxo

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. Segundo Loureiro e Santos (2005), é de esperar 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. 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). Por estas razões, a citometria de fluxo é uma metodologia utilizada em diferentes áreas que vão desde a investigação básica até ao melhoramento de plantas e indústria (DOLEŽEL, 1997 apud LOUREIRO; SANTOS, 2005).

2.5 Análise citogenética

O gênero *Manihot* ($2n = 36$) possui, aproximadamente, 98 espécies, das quais a maior parte é encontrada no Brasil (CARRASCO, 2012). Colombo et al. (2000) usando apenas marcadores moleculares, foram capazes de demonstrar a relação genética entre as subespécies *M. esculenta* (Crantz) e outras cinco espécies que ocorrem naturalmente no gênero, cada uma representada por um genótipo, revelando maior semelhança entre *M. flabellifolia* / *M. peruviana* e a mandioca cultivada do que entre *M. esculenta* e as outras espécies selvagens. Análises de SNPs (polimorfismos de nucleotídeo único) e SSR (sequência de simples repetição) realizadas por Olsen (2004) sugerem que *M. flabellifolia* seja o único progenitor da mandioca selvagem.

Léotard et al. (2009) utilizaram o gene Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (G3pdh) para examinar diversas espécies silvestres e encontraram resultados que apoiam a conclusão de Olsen (2004), indicando que a mandioca teria sido domesticada a partir de *M. esculenta ssp. flabellifolia* (Pohl), sendo que essa domesticação teria ocorrido nos estados do Brasil, no norte de Mato Grosso, Rondônia e Acre, e na área da fronteira com a Bolívia.

Citologicamente, segundo Carvalho e Guerra (2002), todas as espécies analisadas do gênero *Manihot* possuem 18 pares de cromossomos pequenos e muito semelhantes. Segundo

Fregene et al. (1997), diversas evidências como a ocorrência de dois conjuntos de regiões organizadoras de nucléolo desiguais, a repetição de tipos de cromossomos no genoma e a comparação do número cromossômico de diversos gêneros de euforbiáceas, que variam de 6 a 11, sugerem que o gênero *Manihot* seja um alotetraplóide segmental derivado de um número básico de cromossomos $x = 9$. Diferentes pesquisadores acreditam que as espécies do gênero tenham sido diploidizadas (ocorrência de duplicação cromossômica espontânea de um híbrido interespecífico que se comporta como diplóide) ao longo do processo evolutivo (CARVALHO et al., 2009; CARVALHO; GUERRA, 2002; SCHIFINO-WITTMANN et al., 2004). De acordo com Soltis e Soltis (1995), esse mecanismo pode ter ocorrido dentro das espécies poliplóides conhecidas de forma recorrente, envolvendo ancestrais variados. Portanto, a diploidização no gênero *Manihot* teria origens múltiplas, aumentando a variabilidade elevando a uma estabilidade cariotípica observada entre suas espécies. Os resultados de Battistin et al. (2004) reforçam a teoria, pois, realizando caracterização molecular e citogenética em 14 acessos de mandioca, selecionados com base em características de interesse agrônomo, detectaram a existência de variabilidade genética (polimorfismo) entre os acessos.

As hibridações interespecíficas, com produção de híbridos férteis podem ocorrer, naturalmente ou artificialmente, com a quebra de barreiras de isolamento reprodutivo (CARVALHO et al., 2009; CARVALHO; GUERRA, 2002; NASSAR, 2000).

Carvalho e Guerra (2002) observaram bastante similaridade em 39 cultivares de *Manihot esculenta* quanto à morfologia, tamanho e número de cromossomos. Apesar disso, Nassar, Silva e Vieira (1986), em trabalhos envolvendo hibridação interespecífica entre mandioca e espécies silvestres de *Manihot* mostraram que, embora em todas as espécies o número haplóide seja o mesmo (18 cromossomos), existe incompatibilidade de várias espécies com a *Manihot esculenta*. Provavelmente, a incompatibilidade seja resultado do processo que originou as espécies do gênero.

2.6 Análise de estômatos

A poliploidia causa nas plantas uma série de conseqüências fenotípicas. O aumento do número cromossômico, normalmente, repercute em aumento nas células, tecidos e órgãos vegetais. Esse aumento é revelado em comparações entre certas estruturas vegetais dos poliplóides com as de plantas diplóides (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 poliplóides, como em mandioca (GRANER, 1942), *Cattleya intermedia* (SILVA; CALLEGARI-JACQUES; BODANESE-ZANETTINI, 2000), *Centella asiatica* (KAENSAKSIRI et al., 2011), *Gerbera jamesonni* (GANTAIT et al., 2011) e *Lagerstroemia indica* (WANG et al., 2012).

Segundo Graner (1942), o tamanho de estômato pode ser tomado como índice da poliploidia em mandioca devendo-se, porém, levar em consideração o cuidado nas averiguações de plantas quiméricas. Em geral, os mixoplóides (quimeras) apresentam duas populações de células e, conseqüentemente, dois tipos de estômatos nas folhas. Dessa forma, o valor médio das medidas das características estomáticas pode resultar em índice que conduzirá a separação equivocada de plantas.

Silva, Callegari-Jacques e Bodanese-Zanettini (2000) encontraram diferenças significativas, no tamanho dos estômatos e na densidade (número de estruturas por área). Observaram que existe uma correlação inversamente proporcional do tamanho dos estômatos e a quantidade em que eles ocorrem na folha.

A técnica do molde em nitrocelulose (HAMILL; SMITH; DODD, 1992) da face abaxial da folha possui algumas vantagens sobre outros métodos utilizados para análise de estômatos: trata-se de uma forma rápida de separação de putativos poliplóides, mantém a integridade do tecido vegetal (não destrutiva) e o molde (em filme de nitrocelulose sobre lâmina de vidro) pode ser guardado por longo período de tempo, sem perder suas propriedades.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos acessos

As plantas para estudo foram cedidas da coleção de cultivares de mandioca da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio Grande do Sul - FEPAGRO. Os trabalhos de pesquisa foram desenvolvidos no Laboratório de Cultura de Tecidos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul - Câmpus Porto Alegre e no Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas da USP/ESALQ em Piracicaba - SP.

O experimento iniciou com seis cultivares de mandioca, três mansas ou de mesa ('Apronta mesa', 'Vassourinha' e 'Frita') e três bravas ('Paraguaia', 'RS-13' e 'Porquinho'). Entretanto, foram elencadas apenas duas para serem avaliadas: 'Porquinho' e 'Vassourinha'. A escolha das cultivares para estudo levou em consideração, principalmente, dois fatores: a boa resposta das plantas *in vitro*, observada em diversos experimentos realizados preliminarmente e a grande distância evolutiva que as separam, analisando o dendrograma para as distâncias genéticas apresentado por Battistin et al. (2007).

A cultivar 'Porquinho' é facilmente identificada a campo por apresentar pecíolos de cor vermelho claro (Figura 1A). Considerada mandioca brava de pequeno porte (cerca de um metro e meio de altura) quando comparada com outras cultivares. Apesar disso, produz excelente massa de raízes (em média 28 t ha⁻¹) e teor de amido (28,6%) sendo muito resistente a bacteriose e outras doenças relacionadas à cultura (CHIELLE et al., 2009).

A cultivar 'Vassourinha' apresenta folhas segmentadas em lóbulos longos e estreitos que a caracteriza e diferencia de outras cultivares (Figura 1B). Classificada como mandioca de mesa (mansa) muito cultivada, principalmente no interior de São Paulo, onde é chamada de 'Vassourinha paulista'. A planta possui pequeno porte, entretanto é a cultivar que mais produz hastes (2,46 hastes por planta) e alcança produtividade maior que 30 t ha⁻¹ (CHIELLE et al., 2009).

Figura 1 – Cultivares avaliadas no experimento: (A) ‘Porquinho’ (detalhe para a coloração vermelho claro dos pecíolos); (B) ‘Vassourinha’ (detalhe para os lóbulos longos e estreitos).

As manivas (ramas) foram retiradas de plantas em crescimento no campo (6 meses após o plantio), desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio (1%) por um minuto, lavadas em água corrente e cortadas em toletes, os quais foram colocados para germinar em bandejas plásticas (30 x 40 cm) com substrato formado por terra e vermiculita na proporção de 4:1. O tamanho do tolete e o número de gemas estão relacionados ao vigor das plantas obtidas. Portanto, as ramas foram cortadas em toletes de cerca de 10 cm, com cinco a sete gemas, para garantir a qualidade das plantas produzidas (Figura 2A). Após 30 dias, com o crescimento da brotação (Figura 2B), as plantas foram cortadas (2/3 superior) e conduzidas para o laboratório.

Figura 2 – Mandioca cultivada em casa de vegetação: (A) Toletes recém plantados em bandejas plásticas; (B) Cultivar ‘Porquinho’, em brotação aos 30 dias de cultivo.

3.2 Desinfestação

A parte aérea das plantas (hastes), provenientes do desenvolvimento das gemas dos toletes de mandioca após 30 dias, foram desinfestadas com solução de etanol (50%), por um minuto e, em seguida, com solução de hipoclorito de sódio (0,25%), acrescida de uma gota de detergente (Tween 20), por 15 minutos. Em câmara de fluxo laminar, as hastes foram lavadas três vezes (um minuto cada lavagem) com água destilada estéril. Segundo Souza et al. (2009), o álcool na concentração de 50%, não provoca uma desidratação rápida nos tecidos e, além de atuar como germicida, tem a propriedade de ser surfactante, quebrando a tensão superficial do tecido e, conseqüentemente, facilitando a ação do agente desinfestante sobre o explante. Testes foram realizados com diferentes tempos de desinfestação com hipoclorito de sódio, rejeitando o protocolo de Souza et al. (2009) que expõem o material por apenas três minutos, pois a desinfestação durante esse intervalo de tempo era deficiente e os explantes apresentavam contaminação no meio de cultura.

3.3 Estabelecimento do cultivo *in vitro*

Para a determinação do meio de cultura mais adequado para o estabelecimento dos cultivos foram testados dois meios de cultura: o primeiro, utilizado na propagação de mandioca nos laboratórios da FEPAGRO, consiste na metade da concentração dos sais do meio de Murashige e Skoog (1962), inclusive com suas vitaminas, acrescido de $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$

de ácido naftalenoacético (ANA), $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de benzilaminopurina (BAP), $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de ácido giberélico (GA_3) e 30 mL.L^{-1} de água de côco. E o segundo, o meio de estabelecimento de Souza et al. (2009) que utiliza a composição integral dos sais do meio de MS, suplementado com Tiamina (1 mg.L^{-1}) e Inositol (100 mg.L^{-1}), acrescido de ANA ($0,02 \text{ mg.L}^{-1}$), BAP ($0,04 \text{ mg.L}^{-1}$) e GA_3 ($0,05 \text{ mg.L}^{-1}$). Os explantes (hastes) que foram inoculados no meio de estabelecimento de Souza et al. (2009) foram os que apresentaram as melhores respostas de crescimento e vigor.

A composição dos meios para mandioca em diversos trabalhos utilizam em sua composição $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de sulfato cuproso pentahidratado (FEITOSA et al., 2007; LI et al., 1998; MATHEWS et al., 1993; VAEZ, 2007; VIDAL; COSTA; SOUZA, 2009). Após alguns testes, o sulfato foi incorporado ao meio de cultura que proporcionou melhores resultados na propagação de segmentos caulinares de mandioca.

O sulfato cuproso adicionado ao meio de cultivo fornece o íon cobre que está envolvido em uma série de reações metabólicas onde ele é constituinte e ativador de enzimas envolvidas no transporte de elétrons e na biossíntese de proteínas e carboidratos (PEROTTI et al., 2010). O excesso ou a ausência de cobre inibem o crescimento da planta e prejudicam importantes processos celulares, como a fotossíntese, a síntese de pigmentos e o transporte de elétrons, reações redox nas mitocôndrias, cloroplastos, parede celular e citoplasma (NASSAR, 2004).

Portanto, o meio de Souza et al. (2009) modificado pelo acréscimo de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de sulfato cuproso pentahidratado (composição do meio de cultura em Anexos) foi adotado para a realização dos experimentos com mandioca.

As hastes das plantas desinfestadas foram cortadas em segmentos caulinares nodais com cerca de 10 a 15 mm de comprimento e colocados em meio de estabelecimento proposto por Souza et al. (2009). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5.8 e autoclavado a 121°C , $1.05 \text{ kg f cm}^{-2}$ por 20 min.

Os segmentos caulinares nodais permaneceram em tubos de ensaio em sala de cultivo com fotoperíodo de 16 horas de luz e a temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e repicadas a cada 30 dias (Figura 3) por até três subcultivos e depois estavam aptas a serem tratadas com colchicina em meio de cultura.

Figura 3 – Segmentos caulinares nodais de mandioca da cultivar ‘Vassourinha’ com brotação após sete dias de cultivo *in vitro* após o isolamento.

3.4 Embriogênese somática

Folhas imaturas de 1 a 2 cm de comprimento, provenientes do cultivo dos segmentos caulinares nodais foram excisadas e inoculadas em três diferentes meios de cultura, baseados no trabalho de Matsumoto et al. (1991) e de Feitosa et al. (2007), no intuito de provocar a formação de calo e, posteriormente, embriogênese: M1 – meio de Souza et al. (2009) modificado, acrescido de $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ de ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D), BAP ($0,1 \text{ mg.L}^{-1}$) e GA_3 (1 mg.L^{-1}); M2 - meio de Souza et al. (2009) modificado, acrescido de BAP (1 mg.L^{-1}) e GA_3 (1 mg.L^{-1}); M3 - meio de Souza et al. (2009) modificado, acrescido de 2,4-D ($0,1 \text{ mg.L}^{-1}$) e GA_3 (1 mg.L^{-1}).

O meio M3 foi o que apresentou melhor resultado na indução de calos em folhas imaturas de mandioca (Figura 4). Posteriormente, o meio M3 com 2,4-D ($0,01 \text{ mg.L}^{-1}$) foi comparado com outro meio de cultura que utiliza o Picloram (8 mg.L^{-1}) como auxina forte. Todas as folhas inoculadas responderam melhor na indução de calo embriogênico no meio com Picloram (CIM – indução).

Figura 4 – Folhas em meio de cultura M3 (A) e calo embriogênico em meio de maturação CMM (B).

Na formação e desenvolvimento dos embriões somáticos sobre os calos embriogênicos foram testados três meios de cultura: CMM (maturação) – meio de Souza et al. (2009) modificado, acrescido de BAP ($0,1 \text{ mg.L}^{-1}$); CEM (alongamento) - meio de Souza et al. (2009) modificado, acrescido de GA_3 ($0,4 \text{ mg.L}^{-1}$); COM (organogênese) - meio de Souza et al. (2009) modificado, acrescido de BAP ($1,6 \text{ mg.L}^{-1}$) e $1,6 \text{ mg.L}^{-1}$ de Ácido Indolilacético (AIB).

Todos os meios testados após a indução (CIM) e formação dos calos embriogênicos não resultaram em regeneração de plantas. Foram quatro experimentos com cerca de 30 explantes de cada cultivar sem obter sucesso. As tentativas falharam em regenerar plantas a partir dos embriões somáticos formados. Portanto, a intenção de promover poliploidia em embriões somáticos foi abandonada.

3.5 Indução da poliploidia

O desenvolvimento das gemas dos segmentos caulinares produziu novas hastes. Após três subcultivos (90 dias), as hastes obtidas da cultura *in vitro* foram seccionadas em novos segmentos caulinares (cerca de 10 a 15 mm) com gema (Figura 5) e introduzidos em quatro diferentes meios de cultura líquidos (meio de estabelecimento de SOUZA et al., 2009): três contendo colchicina (0,05%; 0,10%; 0,15%) e um sem colchicina (controle), por 48 e 96 horas, no escuro, a temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ em *shaker* horizontal sob agitação de 90 rpm. Os cultivos permaneceram no escuro para evitar a oxidação dos explantes, manifestação muito comum em tecidos injuriados. A solução de colchicina foi elaborada utilizando o reagente em pó dissolvido em água destilada estéril. Para evitar a degradação da colchicina pela

autoclavagem, a solução foi filtrada em filtro de seringa (0,22 μm de poro). A concentração percentual de colchicina, em meio de cultura, foi obtida adicionando a solução filtrada, após a autoclavagem do meio de cultura.

Ao final dos períodos de tratamento, os segmentos caulinares foram transferidos para o meio de cultura líquido ordinário (sem colchicina) e mantidos sob agitação em *shaker* (90 rpm), no escuro, por 24 horas, para promover a remoção residual do antimitótico (SILVA; CALLEGARI-JACQUES; BODANESE-ZANETTINI, 2000). Por fim, os segmentos caulinares nodais foram transferidos para o meio semi-sólido de estabelecimento e mantidos em sala de cultivo para iniciarem a organogênese.

Foram utilizados 1400 segmentos caulinares com gema no experimento (50 segmentos por tratamento, exceto nos controles, onde foram colocados apenas 25 segmentos), em duas repetições (duas cultivares x quatro doses x dois tempos x duas repetições).

Figura 5 – Haste de mandioca cultivar ‘Porquinho’ proveniente da cultura de tecidos: (A) Haste inteira; (B) Haste seccionada em segmentos caulinares nodais utilizados no experimento.

As plantas regeneradas foram contabilizadas em virtude da grande mortalidade provocada pela toxicidade do agente antimitótico administrado, a colchicina. O percentual de mortalidade foi determinado de acordo com o número de plantas regeneradas (sobreviventes) dos segmentos caulinares nodais expostos aos tratamentos, de forma a ser comparável a outros experimentos de indução de poliploidia.

O resultado do número de plantas tetraplóides obtidas, levando em consideração o número de plantas regeneradas, em cada tratamento foi analisado estatisticamente por meio de análise de variância a três fatores (*software* SPSS versão 18).

3.6 Citometria de fluxo

A técnica de análise de citometria de fluxo foi realizada no Laboratório de Biotecnologia do Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Citros “Sylvio Moreira” (IAC) em Cordeirópolis – SP. Foi utilizado o método desenvolvido por Galbraith et al.(1983). Após sessenta dias de cultivo, foram retiradas folhas das plantas regeneradas, das quais utilizou-se 50 mg de tecido foliar cortado (*chopped*) 30 vezes por lâmina de barbear em uma placa de Petri contendo 100 µL de tampão de lise (solução tampão hipotônica com detergente não iônico – DAPI – 4',6-Diamidino-2-Phenylindole). Em seguida, foi adicionado 400 µL de corante (iodeto de propídio) e 600 µL de água estéril. A solução resultante, com os fragmentos de folha, foi filtrada em filtro de nylon (30 µm de malha) e analisada em citômetro de fluxo (CyFlow®Ploidy Analyzer da Partec, GmbH, Alemanha), com lâmpada UV-LED (emissão de comprimento de onda de 365 nm), regulado para um parâmetro óptico de detecção de fluorescência com Gain = 597 e Low Level (LL) = 0,64. O DNA nuclear detectado pelo aparelho foi aferido pelo *software* CyView da Partec, GmbH, Alemanha.

3.7 Análise citogenética

As plantas regeneradas, após 45 dias, foram cuidadosamente cortadas e a parte aérea, proveniente da gema tratada, foi colocada em novo meio de cultura para enraizar, garantindo que a análise das raízes fosse compatível com o resultado da análise da parte aérea (folhas) em citômetro de fluxo.

O material utilizado para análise citogenética foi extraído de pontas de raiz em crescimento (1 – 1,5 mm) das plantas repicadas, já que existe a necessidade de analisar células em mitose. A análise foi realizada segundo o protocolo descrito por Mondin e Aguiar-Perecin (2009).

Antes de executar o protocolo três pré-tratamentos foram testados: utilizando solução saturada de Paradiclorobenzeno (PDB), durante duas horas à temperatura entre 15 e 20°C; água gelada durante 24 h; solução 0,002 M de 8-hidroxiquinoleína (8HQ), durante quatro horas à 18°C. Após os testes preliminares, o pré-tratamento com 8HQ foi o que apresentou as melhores condições dos cromossomos das células observadas.

Portanto, as raízes foram retiradas das plantas em crescimento *in vitro*, pré-tratadas em solução 0,002M de 8-hidroxiquinoleína e fixadas em solução de Carnoy (3:1 – etanol e ácido acético) por 24 horas à temperatura ambiente. Após a fixação, as raízes foram mantidas na solução de Carnoy no *freezer*, à -7°C .

Para análise citogenética, as raízes foram lavadas em água destilada por 5 minutos (2 repetições), hidrolisadas em ácido clorídrico 1 M, à 60°C , por 8 minutos e, novamente, lavadas em água destilada por 5 minutos (2 repetições). O material foi então submetido à coloração com reativo de Schiff (reação de Feulgen) por 45 minutos, no escuro, à temperatura ambiente. As raízes coradas foram lavadas em água destilada por 5 minutos (2 repetições), submersas em buffer citrato a 0,01 M, à temperatura ambiente, por 5 minutos (2 repetições) e tratadas em enzima (celulase e pectinase) à 35°C , por 15 minutos. Terminado o tempo em estufa, as raízes foram submersas em buffer citrato a 0,01 M resfriado, por 5 minutos (2 repetições) e mantidas sobre placas de gelo (4°C), interrompendo a ação enzimática. Para produção das lâminas, as raízes foram colocadas em solução de ácido acético a 45% por 2 minutos e, em seguida, preparadas para o esmagamento em carmim propiônico. As lâminas prontas foram submersas em solução de ácido acético a 20% até a lamínula soltar da lâmina. A lâmina e lamínula foram colocadas para secar ao ar e, quando secas, montadas com Entellan. Na análise de cada lâmina foram registrados os números cromossômicos observados nas células em metáfase.

3.8 Análise de estômatos

Os estômatos foram analisados a partir de moldes obtidos por meio da aplicação de esmalte de nitrocelulose sobre a face abaxial das folhas maduras das plantas regeneradas, deixando secar e removendo, para água destilada, o filme plástico formado e, em seguida, para uma lâmina de vidro (técnica desenvolvida por HAMILL; SMITH; DODD, 1992). A análise foi realizada em microscópio Zeiss Axiophot (aumento de 400X) equipado com câmara de vídeo a cores AVT-Horn conectada a computador. As aferições foram realizadas em *software* ToupView 3.7 que permite inserir linhas de comprimento conhecido (em micrômetros), de acordo com o aumento utilizado no microscópio. Foram medidos 25 estômatos por folha (cinco estômatos em cinco campos aleatórios), no sentido do maior diâmetro, longitudinalmente ao ostíolo (comprimento), do menor diâmetro, perpendicularmente ao ostíolo (largura) e o número de estômatos por área foliar (frequência de estômatos por mm^2). As características estomáticas avaliadas foram analisadas

estatisticamente pelo teste não paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitneyem *software* SPSS versão 18.

3.9 Aclimatização das plantas regeneradas

As plantas retiradas dos tubos de vidro foram transferidas, individualmente, para vasos com substrato comercial (Multiplant 1075) autoclavado e, cuidadosamente, aclimatizadas colocando sacos plásticos sobre os vasos (Figura 6A), até serem transferidas para a estufa (Figura 6B). Os saquinhos plásticos ficam encaixados sobre o vaso formando uma pequena cúpula que serve de microestufa, mantendo a umidade necessária para a planta se adaptar ao ambiente fora do tubo de ensaio (*ex vitro*).

Figura 6 – Mandioca cultivar ‘Porquinho’ sendo aclimatizada em substrato comercial: (A) Início da aclimatização com saco plástico encaixado sobre o vaso; (B) Planta de mandioca aclimatizada.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O experimento de indução de poliploidia de mandioca *in vitro* teve percentual máximo de mortalidade de 86% no tratamento da cultivar ‘Porquinho’ com 0,15% de colchicina, em meio de cultura, por 48 horas (Tabela 1). O resultado foi um pouco mais elevado que Awoleye et al.(1994) obtiveram induzindo poliploidia também em mandioca (76% de mortalidade no tratamento com 10 mM de colchicina em meio de cultura, durante 48 horas, na cultivar ‘Colombia 22’). Contudo, a colchicina é um alcalóide tóxico e, em elevadas concentrações ou utilizado em exposição por tempo prolongado, pode levar as plantas à morte (CARVALHO; DOTTO; POSSAMAI, 1977; CHEN; GOEDEN-KALLEMEYN, 1979; DHOOGHE et al., 2011; HAMILL; SMITH; DODD, 1992; RUIZ; VÁZQUEZ, 1982).

Diversos trabalhos de indução de poliploidia utilizando colchicina em diferentes espécies vegetais apresentaram grau de mortalidade superior ao observado no experimento. Rêgo et al. (2011) tratando maracujá registraram 93% de mortalidade (10 sobreviventes em 150 plantas tratadas) utilizando 25; 250 e 1,25 μ M de colchicina, em meio de cultura, durante 15 dias; Trojak-Goluch e Skomra (2013) utilizando gemas apicais de *Humulus lupulus* L. ‘Sybilla’ observaram taxa de mortalidade entre 72,2 e 94,4% em tratamentos com 0,01; 0,05 e 0,1% de colchicina, em meio de cultura, durante 24, 48 e 72 horas; Kaensaksiriet al. (2011) tratando *Centella asiática* obtiveram 97% de mortalidade (27 sobreviventes em 810 plantas tratadas) utilizando 0,025; 0,05; 0,1; 0,2 e 0,4% de colchicina, em meio de cultura, durante 12, 24 e 36 horas.

Em elevadas concentrações de colchicina, a mortalidade das plantas tratadas pode chegar a 100%, como foi publicado nos trabalhos de Gantait et al. (2011) utilizando 1% de solução de colchicina em *Gerbera jamesonii*, durante quatro e oito horas; Costa et al. (2011) utilizando 3,75 mmol.L⁻¹ de colchicina, em meio de cultura, com *Musa acuminata*, durante 48 horas e Wang et al. (2012) utilizando 0,8% de colchicina, em meio de cultura, com *Lagerstroemia indica*, durante 24 horas.

O maior percentual de plantas tetraplóides sobre o total de plantas regeneradas (47,37%) foi encontrado na cultivar ‘Vassourinha’ no tratamento com 0,1% de colchicina, em meio de cultura, durante 96 horas (Tabela 1). Esse percentual de eficiência é maior que o obtido por Awoleye et al. (1994) em trabalho semelhante, cerca de 42% de tetraplóides no tratamento com 5,0 mM de colchicina, em meio de cultura, durante 48 horas.

O tratamento utilizando 0,1% de colchicina, durante 96 horas, também apresentou alto percentual de eficiência na cultivar ‘Porquinho’ (36,84%), sugerindo que os tratamentos a que foram submetidas as cultivares avaliadas foram adequados para indução de poliploidia.

O sucesso da indução química da poliploidia está no limiar entre toxicidade e eficácia de duplicação do genoma. Segundo Dhooghe et al. (2011), em sua revisão dos trabalhos desenvolvidos na indução artificial de poliploidia em plantas, encontraram taxas de sucesso (eficiência do tratamento) que variam entre 15 e 55%. Este intervalo é amplo devido às diferentes formas de avaliação da taxa de sucesso. Enquanto alguns grupos de pesquisa calculam a taxa baseado no número de plantas tratadas, outros consideram o número de plantas sobreviventes. Outro fator de confundimento no cálculo das percentagens de poliploidização é a inclusão dos mixoplóides por alguns grupos, enquanto que outros consideram os mixoplóides uma categoria a parte.

Tabela 1 – Número de segmentos caulinares com gemas tratados, mortalidade, número de plantas mixoplóides e tetraplóides produzidas e a eficiência dos tratamentos, em função de três concentrações de colchicina aplicadas em meio de cultura durante dois períodos de tempo (48 e 96 horas) em duas cultivares de mandioca (‘Vassourinha’ e ‘Porquinho’), após seis meses de cultivo.

Cultivar	Concentração de colchicina (%)	Tempo de tratamento (h)	Nº de segmentos tratados	Mortalidade* (%)	Nº de plantas mixoplóides	Nº de plantas tetraplóides	Eficiência dos tratamentos** (%)
Vassourinha	0,00	48	50	24	0	0	0
		96	50	22	0	0	0
	0,05	48	100	86	6	1	7,14
		96	100	80	12	7	35,0
	0,10	48	100	84	9	2	12,5
		96	100	81	5	9	47,37
	0,15	48	100	74	7	5	19,23
		96	100	83	8	2	11,76
Porquinho	0,00	48	50	24	0	0	0
		96	50	36	0	0	0
	0,05	48	100	83	4	3	17,65
		96	100	75	13	1	4,0
	0,10	48	100	78	9	2	9,09
		96	100	81	7	7	36,84
	0,15	48	100	86	3	0	0
		96	100	85	7	0	0
Subtotais			1400		90	39	

* Número de segmentos tratados – número de plantas regeneradas/número de segmentos tratados x 100

**Número de plantas tetraplóides/número de plantas regeneradas x 100

A técnica de citometria de fluxo foi um método rápido e eficiente na separação preliminar das plantas regeneradas em diplóides, mixoplóides e tetraplóides (Figura 7). Dhooghe et al. (2011) relataram em sua revisão que a citometria de fluxo foi utilizada em 63% dos trabalhos publicados de indução de poliploidia em plantas até 2010, mostrando que existe uma tendência pela utilização da técnica.

Figura 7 – Histogramas do conteúdo de DNA nuclear (2C e 4C) revelados pela análise de folhas das plantas em citômetro de fluxo: (A) Planta diplóide ($2n = 2x = 36$) (média 79,51 e CV 7,1); (B) Planta mixoplóide ($2x + 4x$) (média 76,32 e CV 5,8/média 146,22 e CV 4,9); (C) Planta tetraplóide ($2n = 4x = 72$) (média 141,48 e CV 4,5).

O experimento produziu grande quantidade de plantas mixoplóides (Tabela 1). Já se sabe que o uso da colchicina como agente indutor de poliploidia produz grande quantidade de plantas quiméricas, provavelmente resultado da fraca afinidade que a molécula possui pelas tubulinas da célula (BAJER; MOLEBAJER, 1986 apud DHOOGHE et al., 2009).

Os mixoplóides selecionados por meio da análise de citometria de fluxo apresentaram diferentes proporções entre as células diplóides e tetraplóides. Em menor frequência (27%) foram observadas plantas mixoplóides com um número equilibrado (1:1) de células diplóides e tetraplóides. Os mixoplóides apresentaram uma tendência, ou seja, a maioria dos indivíduos apresentava uma população maior de células diplóides que a de tetraplóides (47%) enquanto que, também em menor número (26%) apresentaram o inverso, uma população maior de células tetraplóides que a de diplóides (Figura 8).

Figura 8 – Histogramas do conteúdo de DNA nuclear (2C e 4C) revelado pela análise de folhas de plantas mixoplóides em citômetro de fluxo: (A) Planta mixoplóide (média 78,06 e CV 5,5/média 147,83 e CV 5,1) com maior população de células diplóides que a de tetraplóides; (B) Planta mixoplóide (média 77,43 e CV 7,0/média 147,98 e CV 5,4) com populações de células diplóides e tetraplóides

equivalentes; (C) Planta mixoplóide (média 76,56 e CV 11,5/média 146,43 e CV 5,3) com maior população de células tetraplóides que a de diplóides.

Normalmente, em experimentos desse tipo, diferentes mixoplóides são esperados, visto que as gemas tratadas com colchicina são pluricelulares e que cada célula, que constitui o tecido meristemático, é afetada de maneira diversa, conforme a exposição ao alcalóide. Essas plantas, com distintas populações de células, requerem acompanhamento ao longo de seu desenvolvimento para verificar a permanência da proporção dessas populações celulares. Segundo Nassar (2006), devido à instabilidade da variação produzida (a planta tem tecidos tetraplóides e diplóides, mas como esses últimos crescem mais rápido) as extremidades do cultivar logo, tornam-se apenas diplóides. Por conseguinte, a manutenção desses mixoplóides torna-se difícil, visto que a propagação preferencial da cultura é vegetativa, realizada pelo agricultor através de estacas (manivas).

O comportamento das plantas mixoplóides é objeto de estudo de muitos grupos de pesquisa que tentam desenvolver protocolos de regeneração, utilizando diferentes técnicas da cultura de tecidos vegetais, para obter sólidos tetraplóides a partir de plantas quiméricas (ALEZA et al., 2009 apud DHOOGHE et al., 2011; ROUX et al., 2001).

Muitas plantas, comprovadamente diplóides, tratadas com doses menores de colchicina, apresentaram fenótipo semelhante ao das plantas tetraplóides e mixoplóides, sugerindo possível efeito epigenético nas plantas regeneradas. Esse efeito é definido como modificações herdáveis no genoma, mas que não envolvem mudança nos pares de bases nucleotídicas na molécula de DNA (MULLER; PRADO, 2008). Essas modificações alteram a expressão e regulação gênicas de forma a interferir no crescimento e desenvolvimento normal das células. O efeito epigenético pode ter consequências morfológicas, fisiológicas e ecológicas, já que é hereditário, evidenciando sua importância na evolução (RAPP; WENDEL, 2005).

A poliploidização implica em modificação na expressão gênica devido a diversos fatores de efeito epigenético (MADLUNG; WENDEL, 2013; SONG et al., 2012). Portanto, provavelmente, não é só a mudança estrutural e o maior número de genes atuando que contribuíram para o sucesso evolutivo de numerosas espécies poliplóides, pois, a mudança genômica durante e após a formação dos poliplóides afeta também a expressão dos genes.

As plantas tetraplóides produzidas no experimento apresentaram características facilmente visualizadas, como maior diâmetro do caule e de pecíolo, bem como a cor verde mais intensa das folhas, quando comparadas com as diplóides (Figura 9).

Provavelmente, a coloração das folhas seja proporcional a quantidade de cloroplastos, sendo que diversos trabalhos de pesquisa utilizaram essa característica, verificada em células-guarda de estômatos, para diferenciar plantas poliplóides das diplóides (COMPTON; GRAY; ELMSTROM, 1996; HE et al., 2012; RÊGO et al., 2011; SOUZA; QUEIRÓZ; DIAS, 1999).

Figura 9 – Hastes caulinares da cultivar ‘Porquinho’ em meio de cultura para enraizamento: (A) Planta diplóide com folha em detalhe; (B) Planta tetraplóide com folha em detalhe.

A duplicação cromossômica pode resultar em modificações anatômicas e morfológicas nas plantas como aumento na espessura das folhas, coloração verde mais escura e flores maiores (DHOOGHE et al., 2011; REGO et al., 2011; THOMPSON; ANDERSON; VAN STADEN, 2010). Além de alterações na morfologia e anatomia, os poliplóides também podem apresentar novos aspectos fisiológicos, como por exemplo, resistência a doenças ou ao estresse hídrico e características de manejo agrícola, como a floração e qualidade pós-colheita que agregam valor comercial as cultivares (DHOOGHE et al., 2011). Trojak-Goluch e Skomra (2013) acrescentam que a poliploidização do genoma também afeta significativamente as propriedades químicas das plantas tratadas, já que os tetraplóides de

lúpulo obtidos em seu experimento produziram óleos essenciais de melhor qualidade. Com o intuito de aumentar a produção de fitoquímicos, trabalhos de indução de poliploidia são conduzidos com plantas medicinais, que apresentam importantes princípios ativos utilizados na indústria farmacêutica, como no caso do hormônio esteróide natural, diosgenina, produzido pela *Dioscorea zingiberensis* (HUANG et al, 2010).

Os resultados do número de tetraplóides em cada tratamento não apresentam uma distribuição normal e a variância calculada é dependente das médias, o que dificulta a análise estatística dos dados (Figura 10).

Figura 10 – Distribuição do percentual do número de tetraplóides produzidos sobre o número de plantas regeneradas em cada tratamento (concentração percentual de colchicina 0,05; 0,10 e 0,15%). (A) Distribuição do percentual de plantas tetraplóides das duas cultivares no tratamento de 48 horas de exposição à colchicina; (B) Distribuição do percentual de plantas tetraplóides das duas cultivares no tratamento de 96 horas de exposição à colchicina.

Diversas transformações matemáticas foram testadas no número de plantas tetraplóides produzidas em cada tratamento (função logarítmica, exponencial inversa e raiz quadrada). Finalmente, optou-se por realizar uma transformação aplicado o logaritmo natural nos resultados da razão entre as plantas tetraplóides e o número de plantas regeneradas, em cada tratamento, somado a 0,1. Foi necessário somar 0,1 a todos os valores, pois não existe logaritmo de zero e, em alguns casos, o resultado da razão foi zero.

Após a transformação, ainda assim, a distribuição não ficou adequada, mas as variâncias ficaram menos dependentes das médias e tornaram-se mais homogêneas entre as diferentes condições de tratamento (Teste de homogeneidade de variâncias: $p = 0,162$).

Examinando estatisticamente os dados (Tabela 2), utilizando análise de variância (ANOVA) a três fatores (cultivar, tempo e concentração), conclui-se que existe diferença significativa entre as cultivares ($p = 0,039$). Esse resultado reflete o percentual do número

total de plantas tetraplóides produzidas em relação ao número total de plantas regeneradas em cada cultivar: 23,2% na cultivar ‘Vassourinha’ e 11,6% na ‘Porquinho’, o que já era esperado, pois tratando-se de resposta ao cultivo *in vitro*, já foi provado que diferentes cultivares (genótipos) respondem de maneira diversa ao tratamento. Silva, Callegari-Jacques e Bodanese-Zanettini (2000), utilizando clones de orquídeas, observaram diferentes respostas a tratamentos idênticos com colchicina, mostrando que existem cultivares menos sensíveis à colchicina e que respondem melhor ao cultivo *in vitro*. Khosraviet al. (2008), induzindo poliploidia em Rosa, afirmaram que o sucesso da duplicação cromossômica é dependente do genótipo das plantas tratadas. Chauvin, Label e Kermarrec (2005) trabalhando com o antimitótico orizalina, observaram efeito genotípico na regeneração de tulipa.

A análise estatística revelou também que a diferença de resposta entre concentrações na indução de tetraplóides independe da cultivar ($p = 0,505$). Portanto, não há interação entre as diferentes concentrações de colchicina aplicadas no experimento e as cultivares analisadas.

Tabela 2 – Resultado da análise de variância (ANOVA) a três fatores. Dados transformados da variável dependente (logaritmo natural da razão entre as plantas tetraplóides produzidas e o total de plantas regeneradas no experimento, somado a 0,1). Apresentação dos resultados: soma dos quadrados (SQ), graus de liberdade (GL), quadrado médio (QM), razão entre o modelo e o erro (F) e valor-p

Fonte	SQ	GL	QM	F	p
Modelo corrigido	5,624 ^a	9	0,625	2,328	0,076
Intercepto	60,210	1	60,210	224,268	0,000
Tempo	0,589	1	0,589	2,192	0,161
Concentração	1,788	2	0,894	3,329	0,066
Cultivar	1,395	1	1,395	5,197	0,039
Concentração x Cultivar	0,386	2	0,193	0,719	0,505
Tempo x Cultivar	0,082	1	0,082	0,307	0,588
Tempo x Concentração	1,384	2	0,692	2,578	0,111
Erro	3,759	14	0,268		
Total	69,593	24			
Total corrigido	9,383	23			

a. $R^2 = 0,599$ (R^2 ajustado = 0,342)

Observando o resultado estatístico encontrado na diferença entre as concentrações utilizadas no experimento ($p = 0,066$) percebe-se que ela ficou próxima do nível de significância (0,05%).

Através da análise estatística não foi possível revelar o melhor tratamento para induzir poliploidia em mandioca nas cultivares ‘Porquinho’ e ‘Vassourinha’. Entretanto, observando o percentual de eficiência (Tabela 1) é possível ter um indicativo da duração do tratamento e a concentração de colchicina (96 h e 0,1% de colchicina) que deve ser utilizada para futuros experimentos de indução de poliploidia em mandioca.

A análise das características estomáticas pode ser realizada por meio de diversas técnicas que permitem a visualização dos estômatos da região abaxial das folhas. Algumas análises são mais trabalhosas e submetem pequenas porções foliares a reagentes químicos e corantes, como o iodeto de potássio (WANG; LEI, 2012), aceto-orceína (KAENSAKSIRI et al., 2011) ou safranina (GANTAIT et al., 2011). A técnica mais precisa na análise de estômatos utiliza microscópio eletrônico de varredura (COSTA et al., 2004). Entretanto, a disponibilidade do equipamento limita o seu uso em determinados grupos de pesquisa. Portanto, a técnica de impressão de estômatos em membrana plástica, de baixo custo, fácil aplicação e rápido resultado, é muito difundida e utilizada (HAMILL; SMITH; DODD, 1992; RÊGO et al., 2011; SILVA; CALLEGARI-JACQUES; BODANESE-ZANETTINI, 2000; WANG et al., 2012).

O tamanho e o número de estômatos por área foliar (frequência) também podem ser utilizados como critérios indicativos do nível de ploidia nas cultivares de mandioca. Segundo Silva, Callegari-Jacques e Bodanese-Zanettini (2000), as células-guarda de estômatos de plantas poliplóides são significativamente maiores que as suas correspondentes diplóides e a densidade de estômatos é menor nas folhas dos tetraplóides de *Cattleya intermedia* L. Nas análises dos moldes de impressão de estômatos de folhas de mandioca (Figura 11) também foi verificado o mesmo efeito.

De acordo com Dhooghe et al. (2011), 81% dos trabalhos de indução de poliploidia até 2010 utilizaram análise de características de estômatos combinada com a técnica de citometria de fluxo ou contagem cromossômica para confirmar a ploidia, demonstrando a importância da análise de estômatos na separação preliminar das plantas.

Figura 11 – Moldes da impressão de estômatos da face abaxial das folhas de plantas de mandioca cultivar ‘Porquinho’ em filme de nitrocelulose e suas respectivas medidas de comprimento (μm), em aumento de 400X: (A) Diplóide; (B) Tetraplóide.

A análise estatística utilizando o teste não paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney revelou que existem diferenças significativas ($p < 0,001$) tanto no comprimento (medida do diâmetro maior), na largura (medida do diâmetro menor), quanto na frequência de estômatos por área (mm^2) entre folhas de plantas diplóides e tetraplóides (Tabela 3). Portanto, as plantas de mandioca tetraplóides possuem estômatos mais largos e compridos, entretanto, apresentam menor frequência dessas estruturas por área foliar, quando comparadas com as diplóides.

Grupos de pesquisa analisando estômatos de folhas das plantas, provenientes de tratamento de indução de poliploidia, obtiveram resultados semelhantes ao encontrado em mandioca. Apresentaram grandes estômatos, e em menor frequência, as plantas poliplóides de *Cattleya intermédia* (SILVA; CALLEGARI-JACQUES; BODANESE-ZANETTINI, 2000), Maracujá (RÊGO et al., 2011), *Gerbera jamesonii* (GANTAIT et al., 2011), *Lagerstroemia indica* (WANG et al., 2012), *Dioscorea zingiberensis* (HUANG et al., 2010) e *Clivia miniata* (WANG; LEI, 2012).

Tabela 3 – Comparação das características de estômatos em folhas de plantas diplóides e tetraplóides provenientes do experimento. Valores médios de comprimento, largura e frequência de estômatos por mm^2 , acompanhados de seus respectivos erros padrão.

Plantas regeneradas	Número de plantas	Comprimento de estômatos (μm)	Largura de estômatos (μm)	Frequência de estômatos por mm^2
Diplóide	10	$18,2292 \pm 0,27$	$12,0995 \pm 0,25$	$579,5763 \pm 44,24$
Tetraplóide	29	$24,8797 \pm 0,49$	$16,1139 \pm 0,26$	$281,1021 \pm 10,42$

As folhas de plantas mixoplóides não foram analisadas estatisticamente, pois se tratando de quimeras, apresentam os dois tipos de células e, consequentemente, tamanhos

variáveis de estômatos (Figura 12), resultando em valor médio de tamanho estomático que pode conduzir a erro na separação das plantas.

Figura 12 – Moldes da impressão de estômatos da face abaxial das folhas de plantas mixoplóides cultivar ‘Vassourinha’ em filme de nitrocelulose e suas respectivas medidas de comprimento (µm), em aumento de 400X. (A) e (B) Diferentes plantas analisadas apresentando estômatos de variados e extremos tamanhos reunidos em um mesmo campo de observação.

Nenhuma planta com ploidia superior a tetraplóide foi encontrada, mesmo nos tratamentos com maior concentração e duração de tempo de exposição à colchicina. No entanto, Awoleye et al. (1994), após tratamento com colchicina (2,5; 5,0 e 10mM, durante 48 horas) em mandioca, encontraram plantas octoplóides e diversos tipos de mixoplóides com população de células octoplóides combinadas com outras populações de células ($8x + 2x$; $8x + 4x$; $8x + 4x + 2x$).

Por meio da técnica de Feulgen (MONDIN; AGUIAR-PERECIN, 2009) foi possível revelar o número cromossômico de todos os putativos tetraplóides (Figura 13). Usualmente, a técnica de Feulgen é utilizada para análise citogenética de plantas induzidas à poliploidia com colchicina (HEPING et al., 2008; KAENSAKSIRI et al., 2011; SIMIONI, 2004).

A contagem cromossômica é o método mais preciso na análise de plantas produzidas pela indução de poliploidia. Entretanto, é um método muito trabalhoso, envolvendo corantes e tratamentos enzimáticos específicos, além de exaustiva análise microscópica que demanda longos períodos de tempo. Como resultado, apenas um número limitado de células pode ser analisado e os erros são mais facilmente cometidos ao contar muitos pequenos cromossomos.

Figura 13 – Cromossomos de mandioca cultivar ‘Vassourinha’ em aumento de 1000X. (A) Diplóide ($2n = 2x = 36$); (B) Tetraplóide ($2n = 4x = 72$)

5 CONCLUSÕES

A partir de segmentos caulinares nodais, tratados com colchicina em meio de cultura líquido, foi possível produzir plantas inteiramente tetraplóides das duas cultivares de mandioca avaliadas ('Porquinho' e 'Vassourinha').

A análise dos moldes de impressão de estômatos em nitrocelulose pode ser utilizada como ferramenta adicional na separação de plantas potencialmente poliplóides, após tratamento com colchicina em mandioca.

Apesar do elevado grau de mortalidade, a eficiência na produção de tetraplóides, considerando o número de plantas regeneradas, atingiu grande percentual na cultivar 'Vassourinha'.

O tratamento que mais produziu tetraplóides nas duas cultivares avaliadas ('Vassourinha' 47,37% e 'Porquinho' 36,84%) foi o que apresentava 0,1% de colchicina, em meio de cultura, durante 96 horas.

Na cultivar 'Vassourinha' o percentual do número total de plantas tetraplóides produzidas em relação ao número total de plantas regeneradas foi de 23,2%, sendo que na cultivar 'Porquinho' foi de apenas 11,6%.

Há diferença significativa entre as cultivares quanto à produção de tetraplóides.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, K.L.; WENDEL, J. Novel patterns of gene expression in polyploid plants. **Trends in Genetics**, Massachusetts, v.21, n.10, p.539-543, Oct. 2005.
- AHUJA, M.R.; NEALE, D.B. Evolution of genome size in conifers. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v.54, n.3, p.126-137, 2005.
- ALVES, B.A. **Análise do desempenho de cadeias produtivas agroindustriais da mandioca**: estudo de casos nas principais regiões de produção do Brasil. 2012. 159 p. Dissertação (Mestrado em Agronegócios) – Centro de Estudos e Pesquisas em Agronegócios, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.
- ANDRADE, S.R.M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002. 16p.
- AWOLEYE, F.; VANDUREN, M.; DOLEZEL, J.; NOVAK, F.J. Nuclear DNA content and *in vitro* induced somatic polyploidization cassava (*Manihot esculenta* Crantz) breeding. **Euphytica**, New York, v.76, p.195-202, 1994.
- BATTISTIN, A.; SILVEIRA, J.R.P.; GONÇALVES, R.S.; FERMINO, M.H. **Caracterização citogenética e molecular em acessos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**. Porto Alegre: FEPAGRO, 2007. Disponível em: <http://www.cpact.embrapa.br/publicacoes/livros/agroenergia-2007/trabalhos/Outras%20culturas_11_OK/Battistin_1.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2013.
- BATTISTIN, A.; SILVEIRA, J.R.P.; OLIVEIRA, A.M.R.; FERMINO, M.H. Caracterização genética em acessos de mandioca (*Manihot esculenta*) Crantz. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 50., 2004, Florianópolis. **Resumos...** Florianópolis, 2004.1CD-ROM.
- BAZZO, R. **IAC colhe bons resultados no melhoramento de mandioca**. 2007. Disponível em: <www.mandioca.agr.br/portal/index.php?option=content&task=view&id=3547&Itemid=59>. Acesso em: 20 jun. 2013.
- CARRASCO, N.F. **Diversidade genética de variedades tradicionais de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) cultivada em comunidades da Baixada Cuiabana em Mato Grosso por meio de microssatélites**. 2012. 87p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.
- CARVALHO, F.I.F.; DOTTO, S.R.; POSSAMAI, J.C. Induction of polyploidy using colchicine. **Ciência e Cultura**, Campinas, v.29, n.3, p. 284-293, 1977.
- CARVALHO, R.; SILVA, K.V.P.; OLIVEIRA, I.F.; ALVES, A.A.C. Citogenética como ferramenta para o melhoramento genético vegetal: análise mitótica e meiótica em espécies de *Manihot*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, 13., 2009, Botucatu. **Anais...** Botucatu, 2009. p.645-650.

- CARVALHO R.D.; GUERRA, M. Cytogenetics of *Manihot esculenta* Crantz (cassava) and eight related species. **Hereditas**, Lund, v. 36, p. 159-163, 2002.
- CAVALIER-SMITH, T. **The evolution of genome size**. London: Wiley-Interscience, 1985.420 p.
- CHAUVIN, J.E.; LABEL, A.; KERMARREC, M.P. *In vitro* chromosome doubling in tulip (*Tulipa gesneriana* L.). **The Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford Kent, v.80, p.693–698, 2005.
- CHEN, C.H.; GOEDEN-KALLEMEYN, Y.C. *In vitro* induction of banana autotetraploids by colchicine treatment of micropropagated diploids. **Australian Journal of Botany**, Collingwood, v.40, p.887-897, 1979.
- CHEN, Z.J. Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v.58, p.377-406, 2007.
- CHIELLE, Z.G.; MORALES, C.F.G.; DORNELLES, M.A.; TEIXEIRA, C.D.; BECKER, L. Desempenho agrônomo de cultivares e seleções de mandioca em Rio Pardo, Rio Grande do Sul, Brasil. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v.15, n.1, p.53-56, 2009.
- COLOMBO, M.R.; SECOND, G.; CHARRIER, A. Genetic relatedness between cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and *M. flabellifolia* and *M. peruviana* based on both RAPD and AFLP markers. **Genetic Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.23 n.2, p.417-423, 2000.
- COMPTON, M.E.; GRAY, D.J.; ELMSTROM, G.W. Identification of tetraploid regenerants from cotyledons of diploid watermelon cultured *in vitro*. **Euphytica**, Amsterdam, v.87, p.165-172, 1996.
- COSTA, F.H.S.; PAQUAL, M.; SILVA, S.O.; SILVA NETO, H.P.; AMORIM, E.P.; SANTOS-SEREJO, J.A. Poliploidização em ápices caulinares de bananeira e seus efeitos morfofisiológicos *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.46, n.8, p.805-813, ago. 2011.
- COSTA, M.A.P.C.; ALMEIDA, W.A.B.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J.; RODRIGUEZ, A.P.M. Stomatal analysis of citrus somatic hybrids obtained by protoplast fusion. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.3, p.297-300, mar. 2004.
- CREPALDI, I.C. Origem, evolução e geografia da mandioca: uma revisão. **Sitientibus**, Feira de Santana, n.10, p.89-94, jul./dez. 1992.
- DERMEN, H. Colchicine polyploidy and technique. **Botanical Review**, New York, v.6, p.599-635, 1940.
- DHOOGHE, E.; DENIS, S.; EECKHAUT, T.; REHEUL, D.; VAN LABEKE, M.C. *In vitro* induction of tetraploids in ornamental *Ranunculus*. **Euphytica**, Amsterdam, v.168, p.33–40, 2009.

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

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. 2012. Roma, Itália. Disponível em:

<<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>. Acesso em: 20 jun 2013.

FEITOSA, T.; BASTOS, J.L.P.; PONTE, L.F.A.; JUCÁ, T.L.; CAMPOS, F.A.P. Somatic embryogenesis in cassava genotypes from the northeast of Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.50, n.2, p.201-206, Mar. 2007.

FREGENE, M.A.; ANGEL, F.; GOMEZ, R.; RODRIGUEZ, F.; CHAVARRIAGA, P.; ROCA, W.; TOHME, J.; BONIERBALE, M. A molecular genetic map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, n.95, p.431-441, 1997.

FREITAS, E.O.; SILVA, T.L.; CARVALHO, L.J.C.B.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. **Multiplicação *in vitro* de genótipos de mandioca açucarada**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, 13., 2009. Botucatu. Disponível em:

<<http://energia.fca.unesp.br/index.php/rat/article/view/1436/755>>. Acesso em: 20 set. 2010.

FUKUDA, C. Doenças da mandioca. In: EMBRAPA. Centro Nacional de Mandioca e Fruticultura. **Instruções básicas para o cultivo da mandioca**. Cruz das Almas, 1993. p.53-56.

FUKUDA, W.M.G.; IGLESIAS, C. Recursos genéticos. In: SOUZA, L.S.; FARIAS, A.R.N.; MATTOS, P.L.P. de; FUKUDA, W.M.G. (Ed.). **Aspectos socioeconômicos e agronômicos da mandioca**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. cap. 12, p.301-323.

FUKUDA, W.M.G.; SILVA, S.O.; MENDES, R.A. Caracterização morfológica e agrônômica do banco ativo de germoplasma de mandioca do Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura Tropical. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE RAÍZES TROPICAIS, 1.; CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, 9., 1996. São Pedro. **Resumos...** São Pedro, 1996. Resumo 107.

FUKUDA, W.M.G.; CAVALCANTI, J.; FUKUDA, C.; COSTA, I.R.S. Variabilidade genética e melhoramento da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). In: QUEIRÓZ, M.A. de; GOEDERT, C.O.; RAMOS, S.R.R. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o nordeste Brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido; Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. Disponível em: <<http://www.cpatia.embrapa.br:8080/catalogo/livroorg/mandioca.pdf>>. Acesso em: 20 set. 2010.

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

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**, Amsterdam, v.106, p.485–493, 2011.

GIACOMETTI, D.C.; GOES, M. de. Conservação de germoplasma de espécies frutíferas pelo uso da biotecnologia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.8, n.3, p.39-46, 1986.

GRANER, E.A. Tratamento de mandioca pela colchicina. **Boletim Técnico da Divisão de Experimentação e Pesquisas do Instituto Agrônomo**, Campinas, v.2, n.2, p. 23-54, 1942.

HAMILL, S.D.; SMITH, M.K.; DODD, W.A. *In vitro* Induction of banana autotetraploids by colchicine treatment of micro-propagated diploids. **Australian Journal of Botany**, Collingwood, v.40, p.887-896, 1992.

HASHIMOTO, D.Y.C. **Estudo comparative entre híbridos diplóides e tetraplóides de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz): citogenética, apomixia e anatomia caulinar**. 2009. 74p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

HE, L.Y.; DING, Z.; JIANG, F.; JIN, B.; LI, W.; DING, X.; SUN, J.; LV, G. Induction and identification of hexadecaploid of *Pinellia ternate*. **Euphytica**, Amsterdam, v.186, n.2, p.479-488, 2012.

HEPING, H.; SHANLIN, G.; LANLAN, C.; XIAOKE, J. *In vitro* induction and identification of autotetraploids of *Dioscorea zingiberensis*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Heidelberg, v.44, p.448–455, 2008.

HERSHEY, C.H. Cassava germplasm resources. In: _____. **Cassava breeding: a multi-disciplinary review**. Cali: CIAT, 1985. p.1-24.

HUANG, H.P.; GAO, S.L.; CHEN, L.L.; WEI, K.H. **Pharmacognosy Magazine**, Mumbai, v.6, n.21, p.51–56, Jan./Mar.2010.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Indicadores IBGE: estatística da produção agrícola**. 2013. Disponível em: <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_\[mensal\]/Comentarios/lspa_201401comentarios.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Comentarios/lspa_201401comentarios.pdf)>. Acesso em: 14 jan. 2014.

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

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

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

LARA, A.C.C.; BICUDO, S.J.; BRACHTVOGEL, E.L.; ABREU, M.L.; CURCELLI, F. Melhoramento genético da cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, Botucatu, v.4, p.55-65, 2008.

LATADO, R.R.; CRISTOFANI-YALY, M.; CARVALHO, C.R.; MACHADO, M.A. Plantas autotetraplóides de citrus sob tratamento *in vitro* com colchicina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.10, p.1429-1435, 2007.

LÉOTARD, G.; DUPUTIÉ, A.; KJELLBERG, F.; DOUZERY, E.J.P.; DEBAIN, C.; GRANVILLE, J.J.; MCKEY, D. Phylogeography and the origin of cassava: new insights from the northern rim of the Amazonian basin. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Michigan, v.53, n.1, p.329-334, 2009.

LI, H.Q.; GUO, J.Y.; HUANG, Y.W.; LIANG, C.Y.; LIU, H.X.; POTRYKUS, I.; PUONTI-KAERLAS, J. Regeneration of cassava plants via shoot organogenesis. **Plant Cell Reports**, Berlim, v.17, p.410–414, 1998.

LOUREIRO, J.; SANTOS, C. Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal. **Boletim de Biotecnologia**, 2005. Disponível em: <<http://cfe.uc.pt/files/Artigo.pdf>>. Acesso: 10 maio 2011.

MABANZA, J.; RODRIGUEZ-ANDRIYAMASI, A.V.; MAHOUKA, J.; BOUMBA, B. Evaluation of cleaned cassava varieties in Congo. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING ON CASSAVA BIOTECHNOLOGY NETWORK, 2., 1994, Bogor. **Proceedings...** Bogor: Cassava Biotechnology Network, 1994.p.194-201.

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

MANTELL, S.H.; MATTHEWS, J.A.; MCKEE, R.A. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994.333p.

MAPAYI, E.F.; OJO, D.K.; ODUWAYE, O.A.; PORBENI, J.B.O. Optimization of *in-vitro* propagation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) genotypes. **Journal of Agricultural Science**, Toronto, v.5, n.3, p.261-269, 2013.

MATHEWS, H.; SCHOPKE, C.; CARCAMO, R.; CHAVARRIAGA, P.; FAUQUET, C.; BEACHY, R.N. Improvement of somatic embryogenesis and plant recovery in cassava. **Plant Cell Reports**, Berlim, v.12, p.328-333, 1993.

MATSUMOTO, K.; CABRAL, G.B.; TEIXEIRA, J.B.; RECH, E.L. Embriogênese somática a partir de folhas imaturas de mandioca *in vitro*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v.3, n.2, p.107-110, 1991.

MEDINA, D.M.; PRADO, O.T.; MENDES, A.J.T.; ROESSING, C. A poliploidia artificial na obtenção de melancia sem semente. **Bragantia**, Campinas, v.17, n.5, p.81-103, 1958.

MEDINA, R.D.; FALOCI, M.M.; MROGINSKI, L.A. **Efecto del genotipo y de diferentes auxinas en la obtención de embriones somáticos primarios de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**. Corrientes, 2001. Disponível em: <<http://www1.unne.edu.ar/cyt/2001/5-Agrarias/A-029.pdf>>. Acesso: 10 maio 2011.

MEZETTE, T.F. **Seleção de variedades de mandioca de mesa (*Manihot esculenta* Crantz) com altos teores de carotenóides e vitamina A**. 2007. 60p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, 2007.

MONDIN, M.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R. **Coloração pelo método de Feulgen**. 2009. Disponível em: <<http://www.genetica.esalq.usp.br/citogenetica/protocolos/Feulgen.pdf>>. Acesso: 20 set. 2010.

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

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

NASSAR, A.H. Effect of some copper compounds on rhizogenesis of micropropagated banana shoots. **International Journal of Agriculture & Biology**, Pakistan, v. 6, n. 3, p. 552-556, 2004.

NASSAR, N.M. Mandioca: opção contra a fome: estudos e lições no Brasil e no mundo. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v.39, n.231, p.30-39, out. 2006.

NASSAR, N.M.A. Wild cassava, *Manihot* spp.: biology and potentialities for genetic improvement. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 1, p. 201-212, 2000.

NASSAR, N.M.A.; SILVA, J.R.D.; VIEIRA, C. Hibridação interespecífica entre mandioca e espécies silvestres de *Manihot*. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.38, p.1050-1053, 1986.

OLIVEIRA, R.P.; GOMES, T.S.; VILARINHOS A.D. Avaliação de um sistema de micropropagação massal de variedades de mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.12, p.2329-2334, dez. 2000.

OLSEN, K.M. SNPs, SSRs and inferences on cassava's origin. **Plant Mol. Biol.** Zurich, v. 56, n.4, p.517-526, 2004.

ORDOÑEZ CAMACHO, I.A. **Produção de resíduos sólidos de matérias-primas amiláceas na fabricação de bioetanol para análise de segurança em alimentação de ratos wistar**. 2013. 81 p. Tese (Doutorado em Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2013.

OTTO, S.P.; WHITTON, J. Polyploid incidence and evolution. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v.34, p.401-437, 2000.

PARK, S.M.; HIRAMATSU, M.; WAKANA, A. Aneuploid plants derived from crosses with triploid grapes through immature seed culture and subsequent embryo culture. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, Amsterdam, v.59, p.125-133, 1999.

PEROTTI, J.C.; RODRIGUES I.C.S.; KLEINOWSK, A.M.; RIBEIRO, M.V.; EINHARDT, A.M.; PETERS, J.A.; BACARIN, M.A.; BRAGA, E.J.B. Produção de betacianina em erva-de-jacaré cultivada in vitro com diferentes concentrações de sulfato de cobre. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.9, p.1874-1880, set. 2010.

PUONTI-KAERLAS, J.; KLÖTI, A.; POTRYKUS, I. Biotechnological contributions to food security with cassava and rice. **Plant Biotechnology**, Oxford, v.16, n.1, p.39-48, 1999.

RAEMAKERS, C.J.J.M.; SOFIARI, E.; TAYLOR, N.; HENSHAW, G.; JACOBSEN, E.; VISSER, R.G.F. Production of transgenic cassava (*Manihot esculenta* Crantz) plants by particle bombardment using luciferase activity as selection marker. **Molecular Breeding**, Amsterdam, v.2, n.4, p.339-349, Dec. 1996.

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

ROUX, N.; DOLEZEL, J.; SWENNEN, R.; ZAPATA-ARIAS, F.J. Effectiveness of three micropropagation techniques to dissociate cytochimera in *Musa spp.* **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, Amsterdam, v.66, p.189-197, 2001.

RUIZ, M.L.; VÁZQUEZ, A.M. Colchicine effect on the chromosome number of barley embryos cultured *in vitro*. **Protoplasma**, Vienna, v.113, p.237-240, 1982.

SANTOS, E.F.; CARVALHO, F.S.; SILVA, J.C.G.; REZENDE, A.A.; MIYAJI, M. Agroindústria da mandioca: o caminho para a sustentabilidade econômica dos beneficiadores do bairro campinhos em Vitória da Conquista, BA. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 47., 2009, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre, 2009. Disponível em: <<http://www.sober.org.br/palestra/13/948.pdf>> Acesso: 20 set. 2010.

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

SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; DALL'AGNOL, M. Indução de poliploidia no melhoramento de plantas. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v.9, n.1/2, p. 155-164, 2003.

SILVA JR., A. da. **Obtenção de plantas autotetraplóides de variedades de porta-enxerto de citrus**. 2008. 98p. Dissertação (Mestrado em Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/64/64133/tde-01062009-160048/>>. Acesso em: 20 set. 2010.

SILVA, P.A.K.X.M.; CALLEGARI-JACQUES, S.; BODANESE-ZANETTINI, H. Induction and identification of polyploids in *Cattleya intermédia* Lindl.(orchidaceae) by *in vitro* techniques. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, n.1, p.105-111, 2000.

SIMIONI, C. **Seleção para aumento da produção de gametas não reduzidos e poliploidização sexual em trevo vermelho (*Trifolium pratense* L.)**. 2004. 211p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

SMITH, M.K.; BIGGS, B.J.; SCOTT, K.J. *In vitro* propagation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v.6, p.221-228, 1986.

SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S. The dynamic nature of polyploid genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.92, p.8089-8091, Aug. 1995.

SONG, C.; LIU, S.J.; XIAO, J.; HE, W.G.; ZHOU, Y.Q.Q.; ZHANG, C.; LIU, Y. Polyploid organisms. **Science China Life Sciences**, Heidelberg, v.55, p.301-311, 2012.

SOUZA, A.S.; SOUZA, F.V.D.; SANTOS-SEREJO, J.A.; JUNGHANS, T.G.; PAZ, O.P.; MONTARROYOS, A.V.V.; SANTOS, V.S.; MORAIS, L.S. **Preservação de germoplasma vegetal, com ênfase na conservação *in vitro* de variedades de mandioca**. Cruz das almas: EMBRAPA, 2009. 24p. (Circular Técnica, 90).

SOUZA, C.C. Evolução da produção e suprimento mundial de mandioca. **Agrolink**, 2013. Disponível em: <<http://www.agrolink.com.br/colunistas/ColunaDetalhe.aspx?CodColuna=4830>>. Acesso em: 13 nov. 2013.

SOUZA, F.F.; QUEIRÓZ, M.A.; DIAS, R.C.S. Desenvolvimento e avaliação de híbridos experimentais de melancia. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Brasília, v.2, n.9, p.90-95, jul./ago. 1999.

SOUZA, L.S.; FARIAS, A.R.N.; MATTOS, P.L.P.; FUKUDA, W.M.G. (Ed.). **Aspectos socioeconômicos e agronômicos da mandioca**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. 817p.

STAMP, J.A.; HENSHAW, G.G. Secondary somatic embryogenesis and plant regeneration in cassava. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, New York, v.10, p.227-233, 1987.

SZABADOS, L.; HOYOS, R.; ROCHA, W. *In vitro* somatic embryogenesis and plant regeneration of cassava. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.6, p.248-251, 1987.

TAKAHASHI, E.K.; KOBAYASHI, A.K.; VIEIRA, L.G.E. Induction of cassava somatic embryogenesis in liquid medium associated to floating membrane rafts. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.43, n.1, 2000.

- TAYLOR, N.J.; MASONA, M.V.; SCHOPKE, C.; FAUQUET, C.M. Transgenic cassava for food security and economic development. In: KHACHATOURIANS, G.G.; McHUGHEN, A.; SCORZA, R.; NIP, W.K.; HUI, Y.H (Ed.). **Transgenic plants and crops**. New York: Marcel-Dekker, 2002. p.523–546.
- THOMPSON, D.I.; ANDERSON, N.O.; VAN STADEN, J. Colchicine-induced somatic polyploids from in vitro-germinated seeds of South African *Watsonia* species. **Hortscience**. Alexandria, v.45, n.9, p.1398-1402, 2010.
- TOSCA, A.; PANDOLFI, R.; CITTERIO, S.; FASOLI, A.; SGORBATI, S. Determination by flow cytometry of the chromosome doubling capacity of colchicine and oryzalin in gynogenetic haploids of *Gerbera*. **Plant Cell Report**, Berlin, v.14, p.455-458, 1995.
- TROJAK-GOLUCH, A.; SKOMRA, U. Artificially induced polyploidization in *L.* and its effect on morphological and chemical traits. **Breeding Science**, Kioto, v.63, n.4, p.393–399, Dec. 2013.
- VAEZ, J.R. **Avaliação de fatores associados à regeneração *in vitro* e transformação genética de cinco cultivares de mandioca**. 2007. 119p. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.
- VAJRABHAYA, T. Variations in clonal propagation. In: ARDITTI, J. (Ed.). **Orchid biology: reviews and perspectives**. Ithaca: Comstock Publ. p.176-201, 1983.
- VANDUREN, M.; MORPURGO, R.; DOLEZEL, J.; AFZA, R. Induction and verification of autotetraploids in diploid banana (*Musa acuminata*) by *in vitro* techniques. **Euphytica**, Amsterdam, v.88, p.25-34, 1996.
- VIDAL, A.M. **Micropropagação e embriogênese somática em variedades cultivadas de mandioca**. 2009. 59p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas, 2009.
- VIDAL, A.M.; COSTA, M.A.P.C.; SOUZA, F.V.D. Embriogênese somática em explantes oriundos de plantas de mandioca cultivadas *in vitro*. In: VIDAL, A.M. **Micropropagação e embriogênese somática em variedades cultivadas de mandioca**. 2009. 59p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas, 2009.
- WAKANA, A.; FUKUDOME, I.; HANADA, N.; HIRAMATSU, M. ‘Bea-Kei’, a new triploid seedless grape cultivar derived from a ‘Muscat Bailey A’ x ‘Kyoho’ cross. **Journal of the Faculty Agriculture**, Fukuoka, v.53, n.2, p.423-427, 2008.
- WANG, C.; LEI, J. *In vitro* induction of tetraploids from immature embryos through colchicine treatments in *Clivia miniata* Regel. **African Journal of Agricultural Research**, Nigeria, v.7, n.25, p.3712-3718, July 2012.
- WANG, X-J.; WANG, X-F.; CAI, M.; HE, D.; PAN, H-T.; ZHANG, Q-X. *In vitro* chromosome doubling and tetraploid identification in *Lagerstroemia indica*. **International Journal of Food, Agriculture & Environment**, Helsinki, v.10, n.3/4, p. 1364–1367, 2012.

YANG, X.; YE, C-Y.; CHENG, Z-M.; TSCHAPLINSKI, T.J.; WULLSCHLEGER, S.D.; YIN, W.; XIA, X.; TUSKAN, G.A. Genomic aspects of research involving polyploid plants. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, Amsterdam, v.104, p.387–397, 2011.

YANG, X.M.; CAO, Z.Y.; NA, L.Z.; WANG, Y.M.; FANG, X.W. In vitro tetraploid induction via colchicine treatment from diploid somatic embryos in grapevine (*Vitis vinifera* L.). **Euphytica**, Amsterdam, v.152, n.2, p.217-224, Nov. 2006.

ZHANG, P.; VANDERSCHUREN, H.; FÜTTERER, J.; GRUISSEM, W. Resistance to cassava mosaic disease in transgenic cassava expressing antisense RNAs targeting virus replication genes. **Plant Biotechnology**, Oxford, v.3, n.4, p.385-397, July 2005.

ANEXOS

ANEXO A – Composição do meio de Murashige e Skoog (1962) modificado por SOUZA et al. (2009)

Solução estoque (código)	Componentes	Concentração (mg.L⁻¹)
Macronutrientes		
A	Nitrato de amônio	1650
B	Nitrato de potássio	1900
C	Cloreto de cálcio dihidratado	440
D	Sulfato de magnésio heptahidratado	370
E	Fosfato monobásico de potássio	170
Micronutrientes		
F	Sulfato de manganês tetrahidratado	22,30
	Ácido bórico	6,20
	Sulfato de zinco heptahidratado	8,60
	Iodeto de potássio	0,83
	Molibdato de sódio dihidratado	0,25
	Sulfato cuproso pentahidratado	0,025
	Cloreto de cobalto hexahidratado	0,025
FeEDTA		
G	EDTA dihidratado	37,3
	Sulfato ferroso heptahidratado	27,8
Mistura orgânica		
H	Tiamina.HCl	1
	Mio-Inositol	100,0
Reguladores		
	ANA	0,02
	BAP	0,04
	GA3	0,05
Aditivo		
	Sulfato cuproso pentahidratado	0,5
Açúcar (g)		
	Sacarose	20
Gelificante (g)		
	Phytigel	1,8

Obs. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8