

INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA DE ITACOATIARA – ICET
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA PARA
RECURSOS AMAZÔNICOS -PPGCTRA

LAIANE LIMA AZEVEDO

INDUÇÃO À PLOIDIA EM *Ananas comosus* var. *erectifolius* (L. B. Smith) Coppens & Leal,
NA AMAZÔNIA OCIDENTAL

Itacoatiara – AM
2022

LAIANE LIMA AZEVEDO

INDUÇÃO À PLOIDIA EM *Ananas comosus* var. *erectifolius* (L. B. Smith) Coppens & Leal, NA AMAZÔNIA OCIDENTAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos, do Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

ORIENTADOR: PROF. DR. SANTIAGO LINORIO FERREYRA RAMOS

Itacoatiara – AM
2022

Ficha Catalográfica

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

A994i Azevedo, Laiane Lima
Indução à ploidia em *Ananas comosus* var. *erectifolius* (L. B. Smith) Coppens & Leal, na Amazônia Ocidental / Laiane Lima Azevedo . 2022
61 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Santiago Linorio Ferreyra Ramos
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Colchicina. 2. Indução de poliploidia. 3. Caracteres morfométricos. 4. Planta produtora de fibra. I. Ramos, Santiago Linorio Ferreyra. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título



Ministério da Educação
Universidade Federal do Amazonas
Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos

LAIANE LIMA AZEVEDO

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

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos da Universidade Federal do Amazonas, como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos, área de concentração Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Recursos Amazônicos.

Aprovada em 23.12.22.

BANCA EXAMINADORA

Professor Dr. Santiago Linorio Ferreryra Ramos

Professora Dra. Isabel Reis Guesdon

Professora Dra. Maria Teresa Gomes Lopes



Documento assinado eletronicamente por **Santiago Linório Ferreyra Ramos, Professor do Magistério Superior**, em 23/12/2022, às 16:16, conforme horário oficial de Manaus, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Isabel Reis Guesdon, Professor do Magistério Superior**, em 23/12/2022, às 16:21, conforme horário oficial de Manaus, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Teresa Gomes Lopes, Professor do Magistério Superior**, em 23/12/2022, às 16:22, conforme horário oficial de Manaus, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufam.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1294694** e o código CRC **3C02B02E**.

Rua Nossa Senhora do Rosário - Bairro Tiradentes nº 3863 - Telefone: (92) (92) 992718661
CEP 69103-128 Itacoatiara/AM - ppgctra@ufam.edu.br

Referência: Processo nº 23105.008786/2022-54

SEI nº 1294694

Dedico, primeiramente a Deus, pois sem Ele, nada seria possível, a minha avó Sra. Nazaré por seu amor incondicional, ao meu avô Raimundo por seus sábios conselhos e ensinamentos, à minha mãe Sra. Neiva Rilda, pelo esforço e dedicação e a todos meus irmãos e amigos pelo apoio que carinhosamente, me dispensaram.

AGRADECIMENTOS

A Jesus Cristo, amigo sempre presente, sem o qual nada teria feito;

Ao Prof. Dr. Santiago Linorio Ferreyra Ramos, pela orientação, apoio, paciência, incentivo e, especialmente, por ter acreditado em mim para realizar este trabalho;

A Dra. Maria Tereza Gomes Lopes, a Dra. Isabel Reis Guesdon, ao Dr. Geraldo José Nascimento de Vasconcelos e ao Dr. Marcelo Martins Raizer pelo apoio, esforço e tempo que disponibilizaram durante toda a realização do projeto.

À Universidade Federal do Amazonas e ao Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia (ICET), incluindo os professores e funcionários, pelos conhecimentos adquiridos e pela oportunidade de realização deste trabalho;

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Amazônia Ocidental, por ter apoiado e disponibilizado sua estrutura para a realização dos processos experimentais;

A FAPEAM, por ter concedido a bolsa de pesquisa, ajudando no desenvolvimento do projeto;

Aos meus familiares pelo incentivo e credibilidade que depositaram em mim, especialmente minha mãe Neiva Rilda, por estar sempre ao meu lado, incentivando e consolando. Aos meus irmãos por toda contribuição necessária em vários momentos do desenvolvimento do trabalho;

Aos meus avós, Nazaré Leal “Naca” e Raimundo Costa “Pepê” pelo amor, carinho e incentivo, por sempre estarem presente nos momentos importantes da minha vida. Amo muito vocês.

Um agradecimento mais do que especial aos meus amigos Heleyda Rodrigues de Oliveira, Dannyela Rodrigues de Oliveira Lemos, Raimundo Silas Melo, Rafaelle Batista Aoki, João Clebér Cavalcante Ferreira por todo apoio intelectual, braçal e incentivo nas horas difíceis;

A todos que, de uma forma ou de outra, colaboraram para realização deste trabalho, o meu reconhecimento e minha gratidão.

Faça, porque se você não fizer, em breve, o resto será silêncio.

Leandro Karnal

RESUMO

A proteção dos ecossistemas da floresta amazônica permite a conservação da biodiversidade tropical e a oportunidade de realizar o manejo sustentável de produtos florestais não madeireiros, principalmente em regiões pobres, como uma alternativa de desenvolvimento social e econômico para populações locais e comunidades ribeirinhas. Nesta biodiversidade amazônica, no campo das fibras vegetais têm-se uma planta que apresenta potencial para produção de fibras lignocelulósicas, *Ananas comosus* var. *erectifolius*, conhecido popularmente como curauá. Devido ao seu potencial produtivo com a fibra, é necessário procurar um maior conhecimento de conservação e manejo desta espécie e, iniciar pesquisas que visem o seu melhoramento genético. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de indução de ploidia em *Ananas comosus* var. *erectifolius* em amostras coletadas na Amazônia Ocidental, visando o incremento da variabilidade genética a fins de melhoramento vegetal dessa planta fibrosa. Para indução de ploidia de *A. comosus* var. *erectifolius*, foram adquiridos rizomas. Estes foram coletados na área de produção da fazenda experimental da UFAM. Os rizomas foram imersos em solução de água e hipoclorito de sódio na proporção de 95:5. Após a limpeza dos rizomas, foi feito o procedimento de indução à ploidia. Os rizomas foram submersos sob agitação em diferentes concentrações de colchicina (0; 0,05; 0,10 e 0,20%) e tempos de exposição (2; 4 e 6 horas). Após a exposição, os tratamentos foram imediatamente plantados em 4 bandejas contendo substrato comercial. O experimento foi conduzido em arranjo fatorial de 4 (doses de colchicina) x 3 (tempo de exposição), em delineamento experimental inteiramente casualizado. Cada tratamento foi composto por 15 rizomas. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de *Scott Knott* a 5% de probabilidade. A colchicina demonstrou ser tóxica aos rizomas de curauá, ocasionando reduções significativas no número médio de brotações e aumento na porcentagem de plantas não emergidas, em comparação com o controle, em diversas concentrações de colchicina e tempos de cultivos testados.

Palavras-chave: Colchicina, Indução de poliploidia, Caracteres morfométricos, Planta produtora de fibra.

ABSTRACT

The protection of the Amazon rainforest ecosystems allows the conservation of tropical biodiversity and the opportunity to carry out the sustainable management of non-timber forest products, mainly in poor regions, as an alternative for social and economic development for local populations and riverside communities. In this Amazonian biodiversity, in the field of vegetable fibers, there is a plant that presents potential for the production of lignocellulosic fibers, *Ananas comosus* var. *erectifolius*, popularly known as curaua. Due to its productive potential with fiber, it is necessary to seek greater knowledge of conservation and management of this species and to initiate research aimed at its genetic improvement. In this sense, the objective of this work was to establish a ploidy induction protocol in *Ananas comosus* var. *erectifolius* in samples collected in the Western Amazon, aiming at increasing the genetic variability for the purpose of plant improvement of this fibrous plant. For ploidy induction of *A. comosus* var. *erectifolius*, rhizomes were acquired. These were collected in the production area of the UFAM experimental farm. The rhizomes were immersed in a solution of water and sodium hypochlorite in a 95:5 ratio. After cleaning the rhizomes, the ploidy induction procedure was performed. The rhizomes were submerged under agitation in different colchicine concentrations (0; 0.05; 0.10 and 0.20%) and exposure times (2; 4 and 6 hours). After exposure, treatments were immediately planted in 4 trays containing commercial substrate. The experiment was conducted in a factorial arrangement of 4 (colchicine doses) x 3 (exposure time), in a completely randomized experimental design. Each treatment consisted of 15 rhizomes. Data were subjected to analysis of variance and means compared using the Scott Knott test at 5% probability. Colchicine proved to be toxic to curauá rhizomes, causing significant reductions in the average number of shoots and an increase in the percentage of non-emerged plants, compared to the control, at different colchicine concentrations and times of cultivations tested.

Keywords: Colchicine, Polyploidy induction, Morphometric characters, Fiber producing plant.

Lista de Figuras

- Figura 1.** Procedimento profilático dos rizomas da planta de curauá. Limpeza do rizoma (A). Lavagem em água corrente para retirada de resíduos (B). Corte do rizoma em quatro partes (C). Rizomas colocados em becker, submersos na substância colchicina para indução à ploidia (D). Fonte: Azevedo, 2021..... 30
- Figura 2.** Distribuição em casa de vegetação dos tratamentos nas bandejas plásticas contendo substrato comercial. Fonte: Azevedo, 2021. 31
- Figura 3.** Procedimento de coleta de material vegetativo para análise dos caracteres estomáticos. A= Coleta de material; B= fragmento da parte mediana da planta; C= Fragmentos submersos em solução de hipoclorito a 20%. Fonte: Azevedo, 2022. 33
- Figura 4.** Disposição dos estômatos entre as linhas de fibras em *A. comosus* var. *erectifolius*. Fonte: Azevedo, 2022..... 41
- Figura 5.** Histogramas obtidos pela análise de citometria de fluxo para determinação do conteúdo de DNA em picogramas (pg). A: controle; B: 0,05% e tempo de 2 horas; C: 0,10% e tempo de 2 horas e D: 0,20% e tempo de 4 horas de exposição. Itacoatiara, AM. 2022. 45

Lista de Tabelas

Tabela 01 - Características avaliadas e calculadas a partir do plantio a 40 dias de acompanhamento dos diferentes tratamentos de <i>Ananas comosus</i> var. <i>erectifolius</i> submetidos à exposição em solução de colchicina in vivo.....	31
Tabela 02 - Características avaliadas e calculadas do limbo foliar (os 160 dias após a germinação) dos supostos poliploides de <i>Ananas comosus</i> var. <i>erectifolius</i> plantados em vasos em casa de vegetação.....	33
Tabela 03 - Médias, valores mínimos, máximos, desvio padrão e variância dos seis caracteres morfoagronômicos avaliados na planta de curauá (<i>A. comosus</i> var. <i>erectifolius</i>), Itacoatiara – AM.....	36
Tabela 04 - Análises de variância para as variáveis altura total da planta, comprimento da folha, largura da folha, número de folhas, porcentagem de emergência e porcentagem de sobrevivência das plantas de curauá (<i>A. comosus</i> var. <i>erectifolius</i>) com quatro doses de colchicina e três tempos de imersão. Itacoatiara, AM. 2022.....	38
Tabela 05 - Média das variáveis altura da planta, comprimento da folha, largura da folha, número de folhas, porcentagem de emergência e porcentagem de sobrevivência das plantas de curauá (<i>A. comosus</i> var. <i>erectifolius</i>) com quatro doses de colchicina e três tempos de imersão. Itacoatiara, AM. 2022.....	39
Tabela 06 - Correlação dos fatores e média das variáveis altura da planta, comprimento da folha, largura da folha, número de folhas, porcentagem de emergência e porcentagem de sobrevivência das plantas de curauá (<i>A. comosus</i> var. <i>erectifolius</i>) com quatro doses de colchicina e três tempos de imersão. Itacoatiara – AM.....	40
Tabela 07 - Quadrados médios referentes ao comprimento, largura e densidade estomática dos estômatos, avaliados em 10 tratamentos de <i>A. comosus</i> var. <i>erectifolius</i> . Itacoatiara, AM. 2022.....	41
Tabela 08 - Médias estimadas do comprimento dos estômatos, largura dos estômatos e densidade estomática (DE), avaliadas em 10 tratamentos de <i>A. comosus</i> var. <i>erectifolius</i> na região abaxial da folha. Itacoatiara, AM. 2022.	42
Tabela 09 - Conteúdo de DNA estimado por citometria de fluxo em genótipos de <i>A. comosus</i> var. <i>erectifolius</i> induzidos à poliploidia utilizando o tratamento 1 – controle (T1), tratamento 2 – 0,05% de colchicina (T2), tratamento 3 – 0,10% de colchicina (T3) e tratamento 4 – 0,20% de colchicina (T4), Itacoatiara, AM. 2022.....	44
Tabela 10 - Coeficiente de Variação estimado por citometria de fluxo de rizomas induzidos à poliploidia de <i>A. comosus</i> var. <i>erectifolius</i> . Itacoatiara, AM. 2022.	46

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Curauá.....	18
2.2 Propagação.....	19
2.3 Indução e identificação de variabilidade genética em plantas	20
2.4 Poliploidia via processos indutores artificiais	22
2.5 Poliploidia como ferramenta para o melhoramento genético	23
2.5.1 Parâmetros genéticos	23
2.5.2 Divergência genética em recursos vegetais	23
2.6 Análise Multivariada.....	24
2.7 Caracterização dos estômatos	25
2.7.1 A estrutura dos estômatos	25
2.7.2 Densidade estomática.....	26
2.8 Citometria de fluxo	27
3 OBJETIVOS.....	28
Objetivo geral	28
Objetivos específicos	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	35
5.1 Caracterização morfológica	35
5.2 Caracterização estomática.....	40
5.3 Citometria de fluxo	44
6 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	49

INTRODUÇÃO

A Amazônia é importante por ser um dos centros mundiais de biodiversidade, e para a agricultura mundial, pela domesticação de espécies como a mandioca, abacaxi, cacau, borracha e pupunha (CLEMENT et al., 2012). Desta maneira, a proteção dos ecossistemas da floresta amazônica permite a conservação da biodiversidade tropical e a oportunidade de realizar o manejo sustentável de produtos florestais não madeireiros, principalmente em regiões pobres, como uma alternativa de desenvolvimento social e econômico para populações locais e comunidades ribeirinhas (RAMOS et al., 2018).

Nesta biodiversidade amazônica, o campo das fibras vegetais apresenta um grande potencial de aplicação na indústria automobilística, construção civil e têxtil (MOTHÉ; ARAÚJO, 2004). Neste cenário, o curauá (*Ananas erectifolius* L. B. Smith) mostra-se como sucedâneo para o aproveitamento de fibras lignocelulósicas.

O curauá (*Ananas comosus* (L.) Merr. var. *erectifolius* L. B. Smith) Coppens & F. Leal., é uma planta fibrosa, monocotiledônea, herbácea, perene, nativa da Amazônia, pertencente à família bromeliaceae, gênero *Ananas* e espécie *Ananas comosus* (L.) Merr. var. *erectifolius* (L. B. Smith) (COPPENS; LEAL, 2003). Apresenta rizomas, com sistema radicular fasciculado, superficial, pouco exigente e tem boa adaptabilidade a diferentes tipos de solos e à mudança climática, típica das regiões tropicais (OLIVEIRA et al., 2010). A folha em média apresenta 1,5 m de comprimento, com peso médio de 83 gramas. A frutificação ocorre após um ano de idade. O pedúnculo do fruto tem a forma de haste cilíndrica, com média de 20 cm de altura. Rebentos são observados ao redor da base do fruto e em torno de sua coroa, assim como entre as bainhas das folhas ou diretamente dos rizomas (LEDO, 1929).

No curauá, o fruto é comestível, entretanto, ele se destaca pelas fibras lignocelulósicas que são relativamente macias e com elevada resistência mecânica, que são extraídas de suas folhas (ERENO, 2004). Nas comunidades ribeirinhas e indígenas, sua importância estava na fabricação de redes de dormir, cordas e linhas de pesca. Atualmente, as fibras de curauá estão sendo misturadas com sobras de cobertores e tapetes descartadas pela indústria têxtil para reforçar matriz de polipropileno em partes de compósitos utilizados no teto e na parte interna do compartimento de bagagem de automóveis como o Fox da Volkswagen do Brasil (ERENO, 2004).

É uma planta que está sendo submetida a frequentes pesquisas no Brasil e no exterior devido suas fibras, apresentando bons resultados que a credenciam por possuir a fibra mais promissora entre as produzidas no Brasil (SILVA; TAMBOURGI, 2011). Quando o curauá é

utilizado em associação com outras fibras naturais, como açaí, coco, miriti entre outras, é fabricado papel reciclável (CUNHA, 1998).

Atualmente, o curauá é mais cultivado no Estado do Pará, concentrando sua produção na região de Santarém, contribuindo para torná-la a maior produtora de fibra seca de curauá (IBGE, 2020). As fibras vegetais ainda são pouco cultivadas racionalmente, pelo possível desconhecimento técnico agrônomo sobre as espécies fibrosas, falta da otimização nos processos de beneficiamento das fibras, falta de incentivo à pesquisa e desenvolvimento de tecnologias apropriadas às outras plantas fibrosas, além das já existentes no mercado e à falta de estímulo na produção contínua, causando a incapacidade de estabelecer uma tradição no mercado (SILVA, 2006).

Dessa forma, o curauá é uma planta que possui uso na obtenção de uma fibra de alta qualidade. Porém, é importante o investimento em pesquisas que envolvam estudos sobre manejo, consórcios agrofloretais, aproveitamento dos subprodutos, beneficiamento, bem como estudos referentes à qualidade das fibras. Assim, seu cultivo será de fundamental importância socioeconômica para o Estado do Amazonas, por estar diretamente ligado ao interesse de desenvolvimento sustentável no meio rural para a agricultura familiar. Brindando políticas públicas para o fortalecimento e sustentabilidade do sistema de produção dessa planta fibrosa é necessária.

Também é importante e necessário iniciar pesquisas que visem estudos sobre métodos de cultivo, consórcios agrofloretais, aproveitamento dos subprodutos, beneficiamento, bem como estudos referentes à qualidade das fibras e seu melhoramento genético. Uma das técnicas de melhoramento genético em espécies nativas é, o processo de poliploidização. Na evolução das plantas, a poliploidização é um dos processos mais importantes da natureza, criando variabilidade genética e fenotípica. Assim, estas informações de poliploides pode ser explorado no melhoramento vegetal, permitindo principalmente obter plantas com características mais interessantes do ponto de vista comercial.

A poliploidia define-se como a existência de três ou mais conjuntos completos de cromossomos no mesmo núcleo. Pode estar presente em células de um tecido, em partes de um organismo ou em organismos inteiros e representa uma característica importante na evolução de muitos eucariotas (RAMSEY; SCHEMSHE, 1998; COMAI, 2005; OTTO, 2007; SONG et al., 2012). Pode ocorrer na natureza em decorrência de um erro meiótico, gerado a partir da não redução do número cromossômico e produção de gametas com números cromossômicos de células somáticas ou pela endomitose ocorrida em células precursoras da meiose

(WITTMANN; DALL'AGNOL, 2003). Neste último caso, células com genoma duplicado entram na fase de mitose, que ocorre de forma incompleta, não havendo o rompimento da carioteca, nem a divisão celular, o que produzirá células poliploides as quais, passarão ao processo de meiose (LEE et al., 2008).

As plantas poliploides, normalmente apresentam características superiores às plantas matrizes e desta forma geram grande interesse sobre o material produzido, podem ocupar habitats pioneiros aos quais os progenitores diplóides não se mostram adaptados (WITTMANN; DALL'AGNOL, 2003). Devido à baixa frequência da poliploidização natural, o uso de técnicas de indução artificial tem crescido nos programas de melhoramento genético, levando a um aprimoramento das técnicas (DHOOGHE et al., 2010). Um dos processos de indução artificial de poliploidização pode ser realizado visando uso de agentes químicos capazes de atuar em diferentes pontos do ciclo mitótico.

Estes agentes químicos agem sobre as plantas, induzindo a poliploidia via somática ou sexual. Dessa maneira, a poliploidia é induzida através de um agente inibidor do fuso acromático durante a divisão celular, impedindo sua polimerização ou promovendo a sua fragmentação, e assim não permitem que ocorra a separação dos cromossomos. Sendo assim, células iniciam o ciclo celular seguinte com a mesma quantidade de DNA duplicado. Dentre estes antimitóticos, o alcalóide colchicina é o mais conhecido e empregado. A aplicação pode ser feita em plântulas ou partes vegetativas com tecidos meristemáticos ativos. Dentre os métodos sugeridos de aplicação da colchicina sempre existe a necessidade de ajustes e padronizações (WITTMANN; DALL'AGNOL, 2003).

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

Plantas submetidas ao tratamento com colchicina, se bem sucedido, apresentam um aumento no número cromossômico que, em geral, é refletido pela célula, através do aumento de seu volume que, por conseguinte, pode ser observado também com o crescimento de alguns órgãos da planta como tamanho das células dos estômatos, densidade de estômatos por área e diâmetro dos grãos de pólen são muito utilizados para identificar poliploides (GRANER, 1942; ARMSTRONG; ROBERTSON, 1960; SILVA et al., 2000; MORGAN et al., 2003), da mesma

forma que o número de plastídios nas células dos estômatos (BINGHAM, 1968; BOAVENTURA et al., 1981).

Desta forma, a poliploidia induzida pode ser um eficiente instrumento para programas de melhoramento genético e que pode ser empregada objetivando a poliploidia de *A. comosus* var. *erectifolius*, como um modo de se tentar conseguir plantas com fibras melhores (DEWEY, 1980). Em particular a poliploidia, torna-se uma estratégia muito interessante, pelo aumento das características de interesse agrônomo, tais como valor nutricional, resistência a pragas e doenças, tolerância a estresses abióticos (PEREIRA, 2012).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Cada cadeia produtiva do agronegócio tem suas peculiaridades e essas se expressam quando são analisadas. Uma das cadeias produtivas de relevante característica, entre outros fatores, pelo seu uso intensivo de tecnologia e pela elevada capacidade de agregação de valor são as fibras naturais (ABRAPA, 2017). As fibras naturais, conhecidas também como fibras lignocelulósicas ou vegetais, morfológicamente são células esclerenquimatosas de forma tipicamente prosenquimatosas, ou seja, o comprimento é particularmente igual à largura (MEDINA, 1959).

Segundo Neto e Pardini (2006), as fibras vegetais possuem baixa massa específica, maciez e abrasividade reduzida, são recicláveis, não tóxicas e biodegradáveis, são de baixo custo, estimulam empregos na zona rural, são econômicas, já que sua produção requer baixo consumo de energia e produção.

O cultivo de plantas fibrosas, assim como a utilização de suas fibras, data de 6000 a.C. Com o passar dos tempos, houve uma crescente substituição por fibras sintéticas como acrílico, náilon, poliéster e polipropileno e esse processo causou um impacto negativo na vida das pessoas que dependem da produção e processamento das fibras naturais. Todavia, vários pesquisadores vêm incentivando o cultivo de plantas fibrosas devido à sua multiplicidade de aplicação, principalmente como matéria-prima artesanal e industrial, extração de fármacos e de aditivos alimentares, floricultura de corte e paisagismo. Do ponto de vista tecnológico, o seu emprego na produção de compósitos poliméricos contribui para evitar problemas de poluição ambiental, uma vez que a mistura de fibras naturais com plásticos reciclados pós-consumo representa uma alternativa menos agressiva ao meio ambiente, sendo aplicável em diversos setores industriais (CARASCHI; LEÃO, 2000).

No Brasil, especialmente, a produção de fibras de coco, sisal e curauá são feitas por agricultores familiares de comunidades nos estados do Norte e Nordeste. Devido a ampla disponibilidade dos recursos naturais no país, grandes áreas para plantio e variadas espécies de plantas, o Brasil pode assumir a liderança no desenvolvimento de fibras naturais. Existem diversos projetos em andamento na região amazônica que cultivam plantas fibrosas, levando em consideração a sustentabilidade ambiental e econômica (BALZER et al., 2007; MARINELLI et al., 2008; MATTOSO et al., 1999).

No Brasil e no exterior, a fibra de curauá é uma espécie promissora produzida na Amazônia brasileira (CORDEIRO et al., 2016) e podendo contribuir com a necessidade de diminuir os problemas ambientais, através do uso correto de materiais desenvolvidos de maneira ecológica e da adequação dos processos produtivos.

A maior utilização de fibras naturais deu-se principalmente, devido ao aumento da preocupação mundial com a preservação do meio ambiente e sobretudo com o uso de matéria-prima renovável. As matérias-primas de origens renováveis, recicláveis e biodegradáveis são uma das alternativas para a produção de manufaturados ecologicamente corretos, em consequência do acúmulo nos descartes de materiais não biodegradáveis, os quais tendem a aumentar com o crescimento populacional nos centros urbanos. A substituição de materiais derivados do petróleo, na produção de compostos elastoméricos, por matéria-prima renovável vai ao encontro desses ideais. A fibra do curauá apresenta alta resistência, maciez e peso reduzido. Verifica-se então, um grande interesse na busca por fibras naturais que possam substituir adequadamente as fibras sintéticas como, por exemplo, a fibra de vidro (SILVA et al., 2008).

Há quem preveja a gradual substituição de aditivos sintéticos tradicionais, particularmente fibras de vidro, por esses materiais, abrindo respeitáveis perspectivas de mercado para países de vocação agrícola (NOTHENBERG, 1996).

2.1 Curauá

De origem Amazônica, o curauá (*Ananas comosus* (L.) Merr. var. *erectifolius* (L. B. Smith) Coppens & F. Leal., pertence à família Bromeliaceae, é uma planta monocotiledônea, cuja principal utilização no agronegócio é a produção de fibras naturais que são empregadas em diversos setores como automobilísticos, manufaturados (cordas, sacos e capacetes), papelaria (papéis, agendas, blocos, luminárias, etc.), indústria têxtil (sucédânea do linho),

construção civil (caixas d'água, tanques, telhas e divisórias), e demais usos agrocomerciais (ARAÚJO, 2003).

Apesar de ser uma espécie nativa e rústica, o curauá é ainda pouco conhecido e estudado. O centro de origem desta espécie é a Amazônia oriental, sendo seu habitat natural caracterizado por ser um solo arenoso e pouco fértil (RENDEIRO, 2007). Conformeledo (1967) e Coppens; Leal, (2003) há dois tipos distintos de curauá: roxo e branco. O curauá roxo distingue-se do branco por apresentar coloração das folhas roxo-avermelhadas e por apresentar maior desenvolvimento.

É uma planta terrestre herbácea, rizomatosa, de sistema radicular fasciculado, superficial, pouco exigente e que se adapta a diferentes tipos de solo e a mudanças climáticas. As folhas são coriáceas, com comprimento médio de 1,5 m, largura de 5 cm e espessura de 5 mm, são os órgãos de interesse comercial (REIS et al., 2007; CORDEIRO, 2007).

O plantio de curauá é feito através de mudas. Após um ano do plantio começa a produzir folhas maduras que são colhidas manualmente e processadas para produção da fibra natural do curauá. A folha é constituída de 6% de fibra e 94% de mucilagem que pode ser aproveitada como ração animal, adubo orgânico ou elaboração de anestésico (RENDEIRO, 2007; CORDEIRO, 2007).

A planta, quando adulta, pode atingir de 1,0 m a 1,5 m de altura, sendo que cada planta é capaz de produzir de 12 a 15 folhas, onde são extraídos cerca de 2 quilos de fibra (RAMALHO, 2005). O beneficiamento das fibras é feito pela mesma máquina que faz o desfibramento do sisal.

As flores são hermafroditas, trímeras, actino ou zigomorfas, heteroclamídeas, com sépalas coriáceas e pétalas vivamente coloridas. Ovário súpero ou ínfero, trilocular e multiovulado. Inflorescências com brácteas coloridas. A planta é monóica com flores hermafroditas e a inflorescência é composta por várias flores individuais que nascem formando inflorescência compacta em forma de espiga sobre um talo axial curto e robusto (CORDEIRO, 2007).

2.2 Propagação

O curauá pode ser propagado tanto sexuadamente via semente quanto assexuadamente através de brotações laterais. No processo de reprodução assexuada, formam-se brotos a partir da planta mãe, que podem sair da base da planta por estolhos ou rizomas, ou do interior da

própria roseta. No entanto, essas brotações surgem geralmente durante ou após a floração, e ao atingirem aproximadamente um terço do tamanho da planta mãe, poderão ser usadas como mudas (PAULA; SILVA, 2001).

Já o processo sexual envolve a formação de sementes, das quais podem ser obtidas grandes quantidades de plantas, considerado de grande importância na conservação de germoplasma de bromélias ameaçadas de extinção, já que assegura a variabilidade natural e a diversidade genética dessas espécies. No entanto, essa forma de propagação é demorada, pois, a depender da espécie, a maturação das sementes pode levar até um ano após a polinização (RAUH, 1979; RECH FILHO, 2004).

Esta propagação sexuada leva à grande desuniformidade no desenvolvimento das plantas, tem dificultado o plantio comercial (PAULA, 2000). Plantas epífitas, como as da família Bromeliaceae, na propagação sexuada, por apresentarem crescimento lento, exigem para seu desenvolvimento substratos de baixa densidade, alta permeabilidade e aeração e que promovam boa velocidade e uniformidade na germinação, isso tudo aliado à temperatura e a boas condições fisiológicas da semente (CAMPOS, 1997).

Devido aos problemas encontrados com os métodos tradicionais, a propagação por culturas de meristemas é a forma mais adotada na multiplicação de plantas em larga escala, para fins comerciais atualmente. Neste tipo de multiplicação, também conhecida por micropropagação, clonagem ou cultura de tecidos, as novas plantas são obtidas a partir de um grupo de células (meristema) (MERCIER; KERBAUY, 1995; TAMAKI et al., 2011).

A principal vantagem desse tipo de propagação é a obtenção de mudas uniformes, com alta qualidade, em grande quantidade, num tempo relativamente curto e total ou parcialmente livre de doenças. Possibilitando a obtenção de plantas em quantidade e qualidade, de maneira a atender um mercado consumidor crescente e, cada vez mais exigente (PAULA, 2000).

2.3 Indução e identificação de variabilidade genética em plantas

As variações dos genes entre indivíduos de uma população referem-se à variabilidade genética, e essa variabilidade determina o conjunto de características morfológicas e fisiológicas, tornando os indivíduos capazes de se adaptarem às mudanças ambientais. Sua origem deu-se através de mutações e recombinações gênicas, sendo a matéria-prima sobre a qual a seleção natural atua e corresponde a qualquer alteração no material genético de um organismo, uma vez que uma maior variabilidade acarretaria, numa maior capacidade de

adaptação e de possíveis alterações morfológicas nos indivíduos em questão (RAIZER, 2017). Assim, as mutações agem junto ao nucleotídeo dos genes provocando alterações herdáveis junto aos mesmos, dando origem na maioria das vezes a um novo fenótipo (RAMALHO et al., 2012).

A ocorrência das mutações em condições naturais é de baixa frequência, mesmo que esta ocorra de forma espontânea e seja considerada o principal fator responsável pela modificação e evolução dos genótipos. Diante disso, a indução de mutação torna-se uma ferramenta importante para aumentar as chances de encontrar genótipos com mutações de interesse.

Para Allard (1971), a indução de mutações é a única forma dos melhoristas de plantas não dependerem somente da natureza. A diversidade genética e o nível de diferenciação existente entre populações são essenciais para definição dos estoques genéticos, apresentando-se em associação com a capacidade natural das mesmas em responder a mudanças climáticas associadas a estresses bióticos e abióticos (CRUZ, 2005).

Uma maneira de medir a variabilidade de uma população em relação a um caráter qualquer é através da utilização da variância. Dessa forma, as diferenças genéticas são representadas pela variância genética, e o efeito do ambiente mais a segregação e recombinação dos genes representam a variância fenotípica (CARVALHO et al., 2001).

É necessário determinar o nível de ploidia para que possa se ter a caracterização e confirmação da variabilidade genética em indivíduos submetidos a algum processo de duplicação cromossômica, podendo ser utilizados métodos diretos, como a contagem do número de cromossomos em células mitóticas e meióticas (GUERRA, 1989; VILLA, 1995).

Entretanto, essas análises são demoradas e seu procedimento é laborioso, exige muita técnica e conhecimento, tornando-se praticamente inviável quando se possui um grande número de amostras a serem quantificadas (VILLA, 1995; MAGALLANES et al., 1996; SARI et al., 1999). Desta forma, têm-se os métodos indiretos que podem ser utilizados para identificação do nível de ploidia, que possibilitam o estudo das alterações estruturais, como tamanho e densidade dos estômatos foliares.

Outro método usado para a identificação do nível de ploidia, é a caracterização citoanatômica e morfológica, ou seja, a avaliação de determinadas características da planta, como aspectos morfológicos, diâmetro do grão de pólen, número de cloroplastos por par de células-guardas, tamanho e densidade dos estômatos foliares. A análise estomática é a mais citada na literatura dentro dos métodos indiretos, usado para inferir o número de ploidia em

plantas submetidas a indução de poliploidia (VANDENHOUT et al., 1995; MAGALLANES et al., 1996; SOUZA; QUEIROZ, 2004).

Em contrapartida, vários autores enfatizam que os métodos indiretos podem ser influenciados pelo ambiente e a análise individual de algumas variáveis poderá ocasionar a classificação equivocada de determinados genótipos quando se trata do nível de ploidia sendo necessário análises complementares (MAGALLANES et al., 1996; SARI et al., 1999; SOUZA; QUEIROZ, 2004).

2.4 Poliploidia via processos indutores artificiais

Devido ao interesse em plantas com características mais robustas, de grande importância evolutiva e potencial agrônômico, as plantas poliplóides, vem demonstrando interesse em pesquisas nos últimos tempos, sendo frequentemente produzidas artificialmente (STEBBINS, 1971).

Os organismos poliploides ocorrem de forma natural resultante de um erro meiótico, gerado a partir da não redução do número cromossômico e produção de gametas com números cromossômicos de células somáticas ou pela endomitose ocorrida em células precursoras da meiose que ocorrem de forma lenta e em menor frequência na natureza. Por outro lado, o processo via indutores artificiais apresenta-se promissor visando acelerar o processo de mutação dos organismos resultando no aumento da variabilidade genética e desenvolvendo o melhoramento genético de espécies de interesse (LEE et al., 2008).

Por meio de indutores artificiais a poliploidia pode ser submetida em plantas por métodos físicos que envolvem tratamentos com choques de temperatura envolvendo frio e calor, pelo tratamento biotecnológicos tem-se empregado os sistemas *in vitro* cultivando massas celulares de calos pelo surgimento de células variantes (PHILLIPS et al., 1994; RANDOLPH, 1932), e em tratamentos químicos têm sido utilizado a colchicina e os herbicidas orizalina e trifluralina, como indutores químicos que impedem a formação dos microtúbulos durante a divisão celular (LEHRER et al., 2008; SILVA, 2016).

Os agentes químicos utilizados para induzir poliploidia são denominados de antimitóticos. Dentre estes antimitóticos, o alcalóide colchicina é o mais conhecido e empregado. Esse é responsável por estimular erros no ciclo mitótico da célula, bloqueando a divisão celular que produz células com diferentes níveis de ploidia. Estas células podem apresentar o seu número de cromossomo multiplicado, que conseqüentemente produzirá

indivíduos poliploides, que possivelmente apresentarão características distintas do material doador (EIGSTI, 1938; DHOOGHE et al., 2011). A aplicação pode ser feita em plântulas ou partes vegetativas com tecidos meristemáticos ativos, como afillhos e estolhos.

Dentre os métodos sugeridos de aplicação, sempre existe a necessidade de ajustes e padronizações. Para que experimentos na indução à poliploidia tenham resultados satisfatórios, existe a necessidade de testes para adequações a espécie de interesse e condições experimentais disponíveis, onde os resultados podem variar em função do antimitótico usado, do tipo de tecido vegetal. Sendo assim, entende-se que para a produção artificial de poliploides não há um protocolo estabelecido, principalmente se tratando de espécies pela primeira vez, sendo necessária a realização de testes até que se encontre um tratamento com bons resultados.

2.5 Poliploidia como ferramenta para o melhoramento genético

2.5.1 Parâmetros genéticos

A existência de variabilidade genética em uma população é condição básica para o sucesso em um programa de melhoramento (FERRÃO et al., 2011). Estudos prévios a respeito da diversidade genética e estimativas de parâmetros genéticos da população em estudo, são de grande importância pois, auxiliam nas tomadas de decisões relacionadas a escolha do método mais apropriado e permitem também determinar os caracteres que devem ser selecionados nas etapas iniciais e avançadas em um programa de melhoramento e o peso que deve ser atribuído a cada caráter, separadamente ou em conjunto (ROSSMAN, 2001).

Os parâmetros genéticos são estimados por meio dos dados de uma determinada população, sendo, portanto, caracterizada por esses parâmetros. Podem-se estimar as variâncias genéticas, ambientais e fenotípicas, correlação genética, ambiental e fenotípica, coeficiente de variação genético e ambiental, bem como a razão entre eles, herdabilidades, ganhos por seleção, entre outros parâmetros genéticos, que refletem a natureza do material genético e a ação do ambiente, permitindo assim, a predição dos ganhos decorrentes da seleção e a definição das estratégias de melhoramento que devem ser adotadas (HEIKO, 2001; CRUZ, 2010).

2.5.2 Divergência genética em recursos vegetais

No melhoramento genético, o conhecimento da variabilidade genômica em vegetais e como ela se apresenta, é de fundamental importância pois contribui para o uso racional e

sustentável dos recursos genéticos nativos e/ou naturalizados (NASS, 2007). As estimativas de divergência entre genótipos de plantas ou populações que são utilizadas para quantificar a variabilidade em germoplasmas, além de fomentar o conhecimento das relações filogenéticas, permitem identificar, caracterizar e avaliar o nível de dissimilaridade entre diversos indivíduos (RAIZER, 2017).

O estudo da diversidade genética disponibiliza informações fundamentais, em relação à caracterização, conservação e utilização dos recursos genéticos disponíveis. Outro aspecto é que a avaliação vegetal também é uma etapa fundamental no processo de criação de novos genótipos pelo melhoramento genético vegetal. Em que os descritores bem definidos, podem garantir características hereditárias próprias da nova variedade e podem fornecer os elementos para manutenção da pureza vegetal (SILVA, 2014; CAMPELO et al., 2021).

Quando se realiza trabalhos com plantas que apresentam potencial econômico como o *Ananas comosus* var. *erectifolius*, a quantificação da similaridade genética torna-se um importante parâmetro a ser utilizado para conservação e aprimoramento dessas plantas. Este parâmetro pode ser embasado em uma série de particularidades, provenientes de dados moleculares, morfoagronômicos, biométricos e sobre o desempenho produtivo em uma determinada região. Esta abordagem de estudo que considera a combinação de várias características, tem-se mostrado mais eficiente na identificação e seleção de materiais mais promissores (CLEMENT, 2012; BLIND, 2016).

Estudos sobre diversidade genética têm sido utilizados em várias culturas de grande importância econômica, como guaraná (NASCIMENTO FILHO et al., 2001), café (FONSECA et al., 2006), feijão (RODRIGUES et al., 2002), mandioca (VIEIRA et al., 2008), entre outras.

2.6 Análise Multivariada

A estatística multivariada corresponde a um conjunto de métodos e técnicas estatísticas que utilizam, simultaneamente, todas as informações dos caracteres, na interpretação teórica do conjunto de dados obtidos, levando em consideração as correlações existentes entre as mesmas (CRUZ, 1990; HAIR et al., 2009). Os métodos de análise de dados multivariados permitem um estudo global dos caracteres avaliados, evidenciando as ligações, semelhanças ou diferenças entre elas, com menor perda possível de informação (HAIR et al., 2009).

A escolha do método mais adaptado à determinada cultura depende, sobretudo, da precisão experimental desejada, como também da facilidade de análise e pela forma de obtenção

dos dados (BLIND, 2016). O conhecimento sobre o desempenho produtivo, como a análise de variáveis quantitativas sob determinadas condições ambientais, constitui-se em fator importante a considerar para a compreensão varietal e como ela interage com o ambiente (QUEIROZ, 2011).

A técnica de análise multivariada tem sido muito utilizada, pois proporciona maior oportunidade de escolha de genótipos potenciais e permite aferir existência de correlação positiva ou negativa entre múltiplas variáveis avaliadas. Dentre as mais empregadas citam-se as técnicas de bioinformática, análise por componentes principais, e pelos métodos de agrupamento por algum método de otimização e que dependem de medidas de dissimilaridade (CRUZ, 1990).

A análise multivariada pode ser dividida em dois grupos. O primeiro, consiste em técnicas exploratórias de sintetização da estrutura de variabilidade dos dados. Por sua vez, o segundo, consiste em técnicas de inferência estatística. Destacam-se no primeiro grupo, métodos como a análise de componentes principais, análise fatorial, análise de correlações canônicas, análise de agrupamento, análise discriminante e análise de correspondência. No segundo grupo, métodos de estimação de parâmetros, testes de hipóteses, análise de variância, covariância e regressão multivariada (MINGOTI, 2007).

A utilização de técnicas multivariadas para estimar a divergência genética tem sido empregada em vários trabalhos e em diversas culturas, tais como: arroz (BENITEZ et al., 2011); milho (COIMBRA et al., 2010); girassol (VOGT; BALBINOT JUNIOR; SOUZA, 2010); eucalipto (CASTRO et al., 2013), soja (SANTOS et al., 2013), entre outras. Portanto, as técnicas multivariadas podem ser de grande importância no estudo da diversidade genética e na seleção de genótipos superiores nas gerações segregantes por serem capazes de unir informações de um conjunto de diversos caracteres de interesse.

2. 7 Caracterização dos estômatos

2.7.1 A estrutura dos estômatos

A troca gasosa entre a atmosfera e o interior da folha ocorre através de pequenas aberturas da folha da superfície foliar, denominada de estômatos. Os estômatos são pequenos orifícios localizados principalmente na superfície das folhas com relação direta com a entrada de CO₂ e a perda de água via transpiração, sendo o principal mecanismo regulador destes processos (LAWSON et al., 2014; BUSSIS et al., 2006).

A palavra estômato tem origem do grego (stoma) e significa boca, o nome se dá pelo fato de que suas estruturas, vistas ao microscópio, assemelham-se a pequenas bocas. É constituído pelo ostíolo, abertura responsável pelas trocas gasosas, por um par de células chamadas de células-guarda e um conjunto de células adjacentes às células-guarda, que se diferem ou não das demais células da epiderme (METCALFE; CHALK, 1950; ESAU, 1960; CARPENTER, 2005).

A abertura dos estômatos é oriunda das mudanças na forma de um par de células, as células-guarda (HUANG et al., 2018) que podem ser encontradas em folhas de todas as plantas vasculares (TAIZ; ZAIGER, 2009). Quando ocorre uma mudança na forma dessas células, como consequência da absorção e perda de água, leva a alterações no tamanho da abertura estomática. Quando estão turgidas, os estômatos encontram-se abertos, e, quando flácidas, os estômatos se encontram fechados (PIMENTA, 2008; MORI; MURATA, 2011).

As mesmas são circundadas por células diferenciadas das células da epiderme foliar, as células subsidiárias, que auxiliam no controle da abertura estomática (PIMENTA, 2008; CUTTER, 2002). A abertura estomática é formada entre duas células-guarda, que são células especializadas da epiderme. No que tange à forma, estas células podem ser de dois tipos: reniforme (elípticas – comum na maioria das dicotiledôneas), e em forma de halter (mais comum em monocotiledôneas).

Como a poliploidia causa nas plantas uma série de consequências fenotípicas como o aumento do número cromossômico, que normalmente repercute em aumento nas células, tecidos e órgãos vegetais e a análise estomática é uma metodologia fácil e simples, que possibilita a identificação de supostos poliploides e testemunhas diploides de um ensaio, através da contagem e medição comparativa de estômatos (VICHIAITTO et al., 2006) a caracterização do material pode ser realizada por comparações entre os estômatos dos poliploides com os de plantas diploides (normais).

2.7.2 Densidade estomática

O número de estômatos presentes em uma folha expressa em unidade a frequência ou densidade estomática. Podendo variar acentuadamente dentro de uma única folha, entre plantas e indivíduos de uma única espécie. A densidade estomática também pode ser afetada por fatores ambientais, como temperatura, CO₂, intensidade de luz, disponibilidade de água, etc. (KERBAUY, 2008; MCAINSH; TAYLOR, 2017).

A densidade estomática de uma epiderme com estômatos pode variar muito dependendo da espécie, podendo chegar a 2000 estômatos.mm⁻², porém, a maioria das plantas possui em torno de 40 a 350 estômatos.mm⁻². Por meio da densidade estomática podemos calcular também o índice estomático, com a quantificação dos estômatos e das células epiteliais. Quando as células completam a sua diferenciação, o índice estomático torna-se independente do tamanho da folha, por esta razão, as estimativas tanto de densidade estomática quanto do índice estomático, são realizadas com folhas maduras (completamente expandidas) (RAIZER, 2017).

Quando se determina a densidade e a média da área dos estômatos, então a área total da abertura estomática pode ser calculada como uma percentagem da área foliar. Este valor situa-se geralmente entre os 0,3 a 2 % se o diâmetro médio da abertura estomática for cerca de 6 mm (WEYERS; MEIDNER, 1990). Poulos et al. (2007) sugerem que uma folha com muitos estômatos pequenos podem reduzir a condutância e aumentar a eficiência no uso da água. Entretanto quando comparado com o comprimento do estômato a densidade estomática é um tanto plástica (RICHARDSON et al. 2001) e potencialmente adaptativa as mudanças ambientais (LAKE; WOODWARD, 2008).

2.8 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica que envolve a análise das propriedades óticas (dispersão da luz e fluorescência) de partículas (células, núcleos, cromossomos, organelas) que fluem em uma suspensão líquida. Esse princípio pode ser usado, por exemplo, para medir a quantidade de DNA de uma célula ((DOLEZEL, 1997; DOLEZEL; BARTOS, 2005).

Esta técnica é 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 (RAIZER, 2017). Desta maneira, podem ser realizadas análises quantitativas de DNA e revelar a ploidia de células em suspensão. É uma poderosa ferramenta para o estudo de genomas vegetais e apresenta diversas aplicações (SILVEIRA, 2020).

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 (LOUREIRO; SANTOS, 2005).

Comparativamente, a citometria de fluxo apresenta as seguintes vantagens: é mais conveniente (a preparação da amostra é fácil), rápida (processamento de dezenas de amostras num único dia), não necessita de células em divisão, é uma metodologia não destrutiva (uma amostra pode ser preparada a partir de 50 mg de tecido foliar) e é capaz de detectar mixoploidias (quimerismo). 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 uso industrial (DOLEZEL, 1997; LOUREIRO; SANTOS, 2005).

3 OBJETIVOS

Objetivo geral

Estabelecer um protocolo inicial de indução de ploidia em *Ananas comosus* var. *erectifolius* em amostras coletadas na Amazônia Ocidental.

Objetivos específicos

Avaliar diferentes concentrações de colchicina mais promissoras na indução de ploidia em rizomas de curauá;

Avaliar diferentes tempos de imersão favoráveis para indução de ploidia em rizomas de curauá;

Caracterizar alterações morfológicas em rizomas germinados e induzidos a mutação de curauá.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Recepção e preparação do material

Para indução a ploidia de *Ananas comosus* var. *erectifolius* foram adquiridos rizomas da fazenda experimental da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), localizada na Rodovia BR-174, Km 38. A utilização do material coletado está dentro das normas do SisGen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado, Decreto nº 8.772, de 11 de maio de 2016, que regulamenta a Lei nº 13.123, de 20 de maio de 2015).

O material coletado foi enviado ao Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas pertencente à Embrapa Amazônia Ocidental, localizado no município de Manaus, Amazonas. No laboratório foi feita a limpeza manual dos rizomas de curauá, fazendo a retirada das folhas e raízes (FIGURA 1a). Os rizomas foram imersos em solução de água e hipoclorito de sódio numa proporção 95:5 por 20 minutos, logo após foram lavados em água corrente (FIGURA 1b). Depois de lavados, cada rizoma foi cortado em quatro pedaços menores (FIGURA 1c). Posteriormente, foram colocados para secar em temperatura ambiente, para então terem sido utilizados na indução a ploidia.

Para indução a ploidia, as soluções foram distribuídas em quatro beakers de 2.000 mL (FIGURA 1d), onde os rizomas foram submersos e ficaram sob agitação em mesa agitadora orbital (Incubadora Shaker) a 250 rpm e temperatura ambiente, em diferentes concentrações de colchicina e tempos de exposição. Foram avaliadas quatro concentrações de colchicina (0; 0,05; 0,10; 0,20%) e três tempos de exposição (2; 4 e 6 horas).

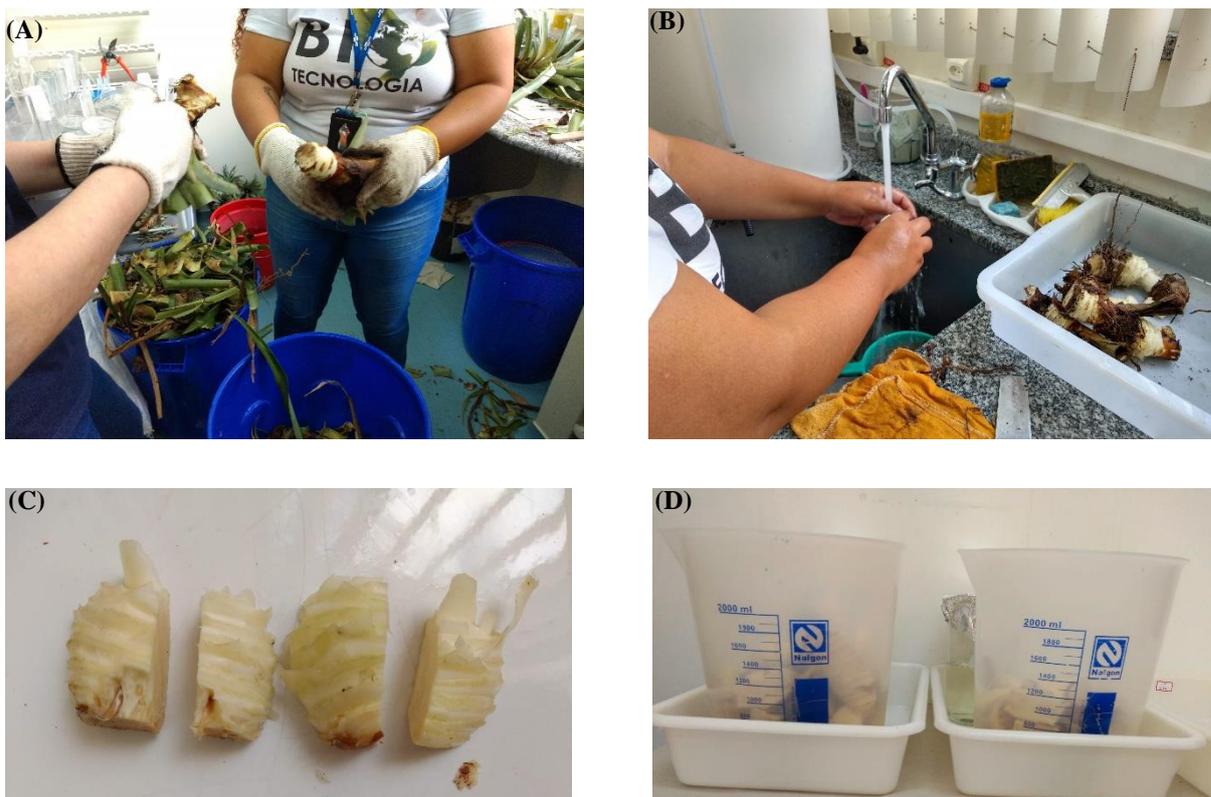


Figura 1. Procedimento profilático dos rizomas da planta de curauá. Limpeza do rizoma (A). Lavagem em água corrente para retirada de resíduos (B). Corte do rizoma em quatro partes (C). Rizomas colocados em becker, submersos na substância colchicina para indução à ploidia (D). Fonte: Azevedo, 2021.

Após o tratamento com colchicina, os rizomas foram imediatamente plantados em quatro bandejas contendo substrato comercial Slim Plus Vivatto, para o acompanhamento do crescimento inicial das plântulas de *A. comosus* var. *erectifolius* (FIGURA 2).

As bandejas foram colocadas em viveiro com sombrite e com sistema de irrigação por aspersão automática, sistema ligado uma vez por dia no início da manhã. A plantas permaneceram em processo de aclimação em casa de vegetação por 160 dias, conforme sugerido por Correia et al. (2011).

Caracterização morfológica

Foram estimadas as seguintes variáveis quantitativas: porcentagem de emergência, porcentagem de sobrevivência, altura total, largura total e número de folhas, conforme Barros et al. (2005). As avaliações das variáveis quantitativas foram realizadas mensalmente, tendo início 40 dias após a semeadura. A coleta dos dados foi realizada a cada 30 dias após a primeira avaliação, as medidas foram realizadas com auxílio de paquímetro digital e de régua.

Foi feito o controle manual de pragas, doenças e de plantas infestantes que acometeram as plantas. O controle manual foi realizado de acordo com as necessidades (EMBRAPA, 2014).

O experimento foi conduzido em arranjo fatorial de 4 (doses de colchicina) x 3 (tempo de exposição), em delineamento experimental inteiramente casualizado. Cada tratamento foi composto por 3 repetições, cada repetição continha 5 rizomas (unidades experimentais).



Figura 2. Distribuição em casa de vegetação dos tratamentos nas bandejas plásticas contendo substrato comercial. Fonte: Azevedo, 2021.

Morfogênese e taxa de crescimento

Em casa de vegetação foram avaliadas as características apresentadas na Tabela 01. Para a avaliação da morfogênese e da taxa de crescimento foi utilizada a técnica dos “afilhos marcados” (adaptado) conforme Carrère et al. (1997). As mensurações foram feitas em folhas completamente expandidas a partir da sua lígula, como sugerido por Daves (1993). A altura da planta foi medida a partir da altura do perfilho estendido. Foi observada também a mortalidade de plantas ocorrido durante o tempo de aproximadamente 40 dias.

Tabela 01 - Características avaliadas e calculadas a partir do plantio a 40 dias de acompanhamento dos diferentes tratamentos de *Ananas comosus* var. *erectifolius* submetidos à exposição em solução de colchicina *in vivo*.

	Característica	Definição
DPE	Dias para Emergência	Tempo observado (em dias) para emergência por tratamento
TF1	Tempo para formação da folha 1 em cada segmento	Tempo para a formação da folha 1 (em dias) observadas por tratamento

NF	Número de folhas totais (por rizoma)	Número de folhas totais observadas por tratamento
PE	Porcentagem de emergência	$[(\text{núm. o de plântulas emergidas totalizadas por tratamento})/(\text{Núm. Total de rizomas plantados por tratamento})]*100^{-1}$
PMPRE	Porcentagem de mortalidade em pré-emergência	$[(\text{núm. o de plantas não emergidas totalizadas por tratamento})/(\text{Núm. Total de segmentos nodais plantados por tratamento})]*100^{-1}$
PLEM	Porcentagem de plântulas emergentes e mortas	$[(\text{núm. o de plântulas emergentes e mortas totalizadas por tratamento no dia "n"})/(\text{Núm. Total de sementes plantados por tratamento})]*100^{-1}$
CF1	Comprimento de folha 1	Comprimento de folha 1 (em centímetros) observado por tratamento
LF1	Largura da folha 1	Largura da folha 1 (em centímetros) observado por tratamento
TXC1	Taxa de crescimento da folha 1 (cm/dia)	(média do comprimento da folha 1 (em centímetros) no dia observado - Comprimento da folha 1 da leitura anterior)/média do intervalo de tempo (em dias) transcorrido entre as observações (por tratamento)

Análise anatômica

Para verificar a existência de diferenças nas estruturas do limbo foliar, foi selecionada uma planta por tratamento, coletando uma folha completamente expandida (maior folha) e da parte mediana de cada folha foi feito corte à mão livre, retirando com auxílio de lâmina de barbear um fragmento de aproximadamente 2 cm de comprimento. Cada fragmento de folha foi colocado em placa de Petri devidamente identificada por tratamento e foram imersos em solução de hipoclorito comercial (20%) até a completa despigmentação (24-72h) (FIGURA 3). Após a completa despigmentação foi feita a montagem das lâminas e os fragmentos das folhas ficaram conservados em álcool 70%. As lâminas semipermanentes foram montadas em água:glicerina (1:1).

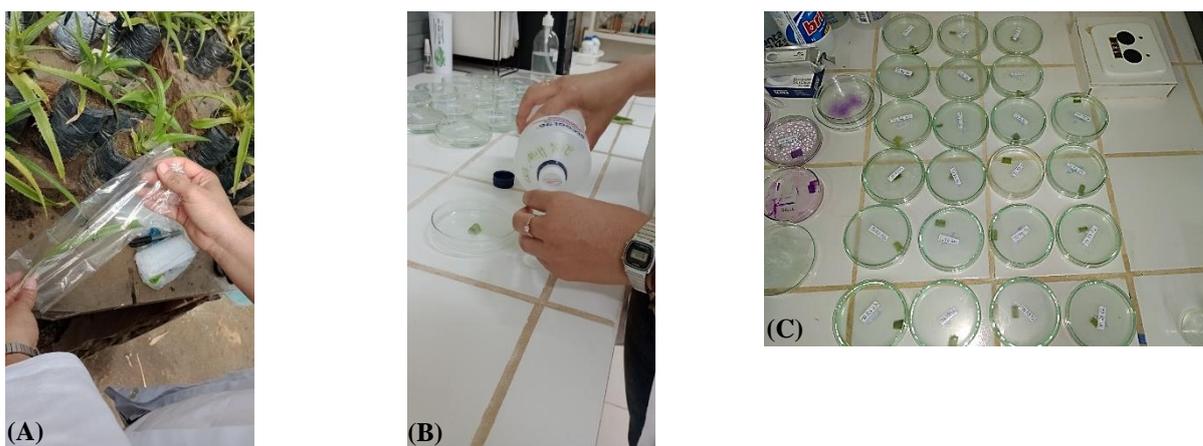


Figura 3. Procedimento de coleta de material vegetativo para análise dos caracteres estomáticos. A= Coleta de material; B= fragmento da parte mediana da planta; C= Fragmentos submersos em solução de hipoclorito a 20%. Fonte: Azevedo, 2022.

Para cada lâmina foram avaliados, aleatoriamente, 05 campos de visão e 10 medidas de estômatos por planta, conforme sugerido por Speckmann et al. (1965). Foram realizadas mensurações em μm (micrômetro) do tamanho dos estômatos (comprimento e largura), e a densidade estomática ($DE = \text{número de estômatos por unidade de área}$) da face abaxial dos genótipos, como descrito na Tabela 02. As mensurações dos parâmetros do tamanho dos estômatos foram visualizadas em microscópio OPTICAM Microscopy Technology, modelo 0400S, com câmera de vídeo OPTICAM HD 14.3MP, resolução 3072x2048.

Tabela 02 - Características avaliadas e calculadas do limbo foliar (os 160 dias após a germinação) dos supostos poliploides de *Ananas comosus* var. *erectifolius* plantados em vasos em casa de vegetação.

CARACTERÍSTICA		DEFINIÇÃO
CCE	Comprimento das células dos estômatos	O maior comprimento interno da célula do estômato em μm
LCE	Largura das células dos estômatos	A maior largura interna da célula do estômato em μm

O tamanho dos estômatos e a densidade ($DE = \text{número de estômatos por unidade de área}$) da parte abaxial dos genótipos, foram analisados em microscópio ótico e aferidos sob objetiva de 20x, observando-se 10 campos de visão por amostra. Baseando em escala micrométrica para a ocular utilizada, a densidade estomática foi determinada segundo a equação:

$$DE = \text{Número de estômatos} / \text{área}$$

Onde: DE = Densidade estomática; Área = área do campo real visível da objetiva de 20x (0,22 mm²).

O número total de estômatos de uma folha pode ser calculado a partir do produto da densidade pela área foliar, embora a densidade não seja uniforme em toda a superfície da folha.

As lâminas para a observação do diâmetro polar dos estômatos (DP) e diâmetro equatorial dos estômatos (DQ), foram preparadas em água:glicerina (1:1).

Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de *Scott Knott* ao nível de 5% de probabilidade para avaliar a diferença entre as médias dos tratamentos.

Todas as análises estatísticas foram realizadas na plataforma R (R Core Team, 2022).

Citometria de fluxo

O preparo das amostras e as análises em citometria de fluxo foram realizadas no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Agricultura da Universidade de Lavras, MG.

De cada uma das amostras foi retirado aproximadamente 50 mg de tecido foliar de curauá, estas foram fragmentadas com auxílio de bisturi em placa de Petri contendo 1 mL de tampão de extração de núcleos LB01 gelado para obtenção de suspensão nuclear (DOLEZEL, 1997).

O tecido triturado em suspensão nuclear foi aspirado com o auxílio de uma pipeta e posteriormente filtrado em uma tela de náilon de 50 µm de diâmetro de poro em tubo. Em seguida, a suspensão foi corada com 25 µL de solução de iodeto de propídio (1 mg/mL) e analisada em citômetro de fluxo BD FACSCalibur 4 cores (Becton Dickinson). Em cada amostra foram analisados ao menos 5 mil núcleos quanto à emissão de fluorescência.

Posteriormente, os histogramas foram obtidos e analisados no software Cell Quest. A leitura das amostras foi realizada em triplicata. O padrão de referência utilizado foi da espécie *Vicia faba* cv. Inovec, a qual contém 26,90 pg. O conteúdo de DNA nuclear (pg) foi estimado por meio da equação: conteúdo de DNA (pg) = (posição do pico G1 da amostra/posição do pico G1 de *V. faba*) x 26,90.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Caracterização morfológica

As plantas apresentaram variação nas variáveis avaliadas, como na variável altura da planta, fato que pode ter sido acarretado devido ao uso do agente antimitótico colchicina. Ocorreram interferências também nas variáveis emergência, ocasionando uma redução significativa no número de brotações adventícias em comparação com o controle.

Vakili (1967) utilizou a colchicina para induzir a poliploidia em plantas de bananeira e observou que o agente antimitótico aumentou a taxa de mortalidade e retardou o crescimento das plantas, mas induziu a duplicação do número de cromossomos. Segundo o autor, as plantas tetraploides eram mais altas e mais robustas do que as plantas diploides, mas cresciam mais lentamente com folhas mais inclinadas e sistema radicular menos desenvolvido.

Os resultados das médias dos descritores morfológicos analisados são mostrados na Tabela 03. A caracterização por meio de descritores morfológicos é requisito importante para analisar e quantificar a variabilidade genética da planta. Vários trabalhos já foram e continuam a serem estudados, com o objetivo de identificação de genótipos superiores ou seleções que atendam aos interesses dos produtores (MARTINS et al., 2012; RÊGO et al., 2011; SILVA et al., 2006; BLANK et al., 2004; MARTINELLO et al., 2002; DAROS et al., 2002; VEIGA et al., 2001).

A média variável da altura das plantas foi de 3,95 cm, variando de um mínimo de 0,00 a um valor máximo de 18,90 cm. Para comprimento da folha a média foi de 3,36 cm, com valor mínimo de 0,00 a um valor máximo de 16,32 cm. As plantas apresentaram média de 0,40 cm para a variável largura da folha, com valor máximo de 1,28 cm. A média para a variável número de folhas foi de 4 folhas, com valor máximo de 16 folhas por planta. Ramalho (2005) em estudo com a mesma espécie, obteve resultados de 12 a 15 folhas, das quais foram extraídos 2 quilos de fibra.

Com relação à parte vegetativa da planta, o melhoramento tem interesse no número de folhas ativas, comprimento da folha mais larga e largura máxima da folha mais larga. Segundo Galvani et al. (2000) estas características são importantes porque a produção tem relação direta com o aproveitamento da energia solar que é transformada em energia química durante o processo de fotossíntese e as folhas são as principais responsáveis por essa conversão.

Para a variável emergência e sobrevivência apresentaram valores de média de 0,24 e 0,25% respectivamente, variando de um valor mínimo de 0,00 a um valor máximo de 0,80% para as duas variáveis. Os dados das variáveis emergência e sobrevivência das plantas demonstraram que ocorreu perda do material devido ao uso da substância colchicina. A colchicina demonstrou ser tóxica aos rizomas de curauá, ocasionando reduções significativas no número médio de brotações obtidas e aumento na porcentagem de plantas não emergidas, em comparação com o controle, em diferentes concentrações de colchicina e tempos de cultivos.

Após 160 dias de emergência das plantas de curauá, foi observada a sobrevivência. O tratamento controle apresentou o melhor percentual de sobrevivência. O menos eficiente foi o tratamento que continha a maior concentração de colchicina. Os efeitos nocivos do tratamento de células e tecidos vegetais com colchicina foram relatados por vários autores. Gmitter et al. (1991), Gmitter e Ling (1991) e Wu e Mooney (2002) observaram reduções na capacidade de regeneração e até a mortalidade de calos e de óvulos imaturos de várias espécies de citros em meio de colchicina. Mesmo sem utilizar cultura de tecidos, Wakana et al. (2005) observaram reduções no desenvolvimento de ramos e na taxa de pegamento de enxertos de três espécies de Citrus, cujas estacas foram tratadas com solução contendo 0,8% de colchicina.

Tabela 03 - Médias, valores mínimos, máximos, desvio padrão e variância dos seis caracteres morfoagronômicos avaliados na planta de curauá (*A. comosus* var. *erectifolius*), Itacoatiara – AM.

Caracteres avaliados	Média	V. Mínimo	V. Máximo	DP	Variância
Altura da planta (cm)	3,95	0,00	18,90	4,45	19,76
Comprimento da folha (cm)	3,36	0,00	16,32	3,86	14,91
Largura da folha (cm)	0,40	0,00	1,28	0,41	0,17
Número de folhas	4,00	0,00	16,00	3,86	14,88
Emergência (%)	0,24	0,00	0,80	0,24	0,06
Sobrevivência (%)	0,25	0,00	0,80	0,24	0,06

Os resultados relacionados ao comprimento da folha apresentaram interação entre a dose e o tempo de imersão estudados (Tabela 04). O fato de D:T ser significativo para o comprimento da folha indica que há diferenças significativas, ou seja, a quantidade de dose usada e o tempo de imersão afetam diretamente no comprimento da folha.

Os resultados das médias das variáveis altura da planta, comprimento da folha, largura da folha, número de folhas, porcentagem de emergência e porcentagem de sobrevivência das

plantas de curauá (Tabela 05), demonstram que os tratamentos que receberam doses de colchicina não conseguiram ser superiores ao tratamento controle.

Observa-se nos resultados que à medida que aumenta a concentração de colchicina, diminuiu a emissão de brotos, indicando que houve uma inibição, e que em concentrações menores ocorreu maior emissão de brotos.

O crescimento e desenvolvimento das plantas variou de uma para outra em todos os tratamentos, formando aglomerados de plantas, com tamanhos variados, nos quais a maioria das plantas se encontrava com altura abaixo de 13,88 cm. Isso contribuiu para haver maior amplitude entre os valores dos demais caracteres avaliados, justificando os altos coeficientes de variação.

Vichiato et al. (2006), obtiveram redução no comprimento, largura das folhas e na altura e diâmetro do pseudobulbo em plantas tetraplóides de *Dendrobium nobile*, as quais apresentaram também, crescimento lento e pouco vigoroso, e, apresentaram raízes reduzidas. Takamura e Miyajima (1996) citam que essas características são, provavelmente, conseqüentes da dosagem gênica dobrada, exigindo maior gasto energético durante a divisão celular, causando retardamento no meio mitótico, que se expressa em menor produção de biomassa por unidade de tempo.

Tabela 04 - Análises de variância para as variáveis altura total da planta, comprimento da folha, largura da folha, número de folhas, porcentagem de emergência e porcentagem de sobrevivência das plantas de curauá (*A. comosus* var. *erectifolius*) com quatro doses de colchicina e três tempos de imersão. Itacoatiara, AM. 2022.

Tratamentos	GL	Quadrados Médios											
		Altura total da planta		Comprimento da folha		Largura da folha		Número de folhas		Emergência		Sobrevivência	
Tratamentos	11	47,26	***	35,31	***	0,40	***	34,49	***	0,13	***	0,14	***
Dose	3	103,31	***	77,18	***	0,77	***	74,28	***	0,27	***	0,25	***
Tempo	2	53,51	**	36,26	**	0,63	***	41,61	**	0,22	***	0,25	***
D:T	6	17,16	ns	14,06	*	0,14	ns	12,21	ns	0,03	ns	0,04	ns
Resíduo	24	7,16		5,55		0,06		5,90		0,02		0,02	

***Probabilidade de 0,1%; **Probabilidade de 1%; *Probabilidade de 5%

Tabela 05 - Média das variáveis altura da planta, comprimento da folha, largura da folha, número de folhas, porcentagem de emergência e porcentagem de sobrevivência das plantas de curauá (*A. comosus* var. *erectifolius*) com quatro doses de colchicina e três tempos de imersão. Itacoatiara, AM. 2022.

Tratamentos	Altura da planta	Comprimento da folha	Largura da folha	Número de folhas	Emergência	Sobrevivência
T1	7,62 b	6,14 b	0,77 b	6,47 b	0,47 b	0,47 b
T2	13,88 a	12,03 a	1,24 a	12,20 a	0,73 a	0,73 a
T3	5,22 c	4,67 b	0,45 c	4,47 b	0,27 c	0,27 c
T4	6,50 b	5,78 b	0,69 b	5,27 b	0,33 c	0,40 b
T5	2,74 c	2,34 c	0,31 c	3,27 b	0,27 c	0,27 c
T6	0,85 c	0,72 c	0,10 c	1,20 b	0,07 d	0,07 c
T7	4,22 c	3,33 c	0,53 c	3,87 b	0,27 c	0,33 b
T8	1,45 c	1,16 c	0,11 c	1,20 b	0,07 d	0,07 c
T9	0,00 c	0,00 c	0,00 c	0,00 b	0,00 d	0,00 c
T10	2,79 c	2,23 c	0,29 c	2,13 b	0,20 c	0,20 c
T11	2,16 c	1,86 c	0,30 c	2,60 b	0,20 c	0,20 c
T12	0,00 c	0,00 c	0,00 c	2,60 b	0,00 d	0,00 c
Média	3,95	3,36	0,40	3,77	0,24	0,25
CV (%)	67,67	70,20	63,99	68,32	62,41	58,12

¹Médias seguidas de mesma letra em cada coluna, pertencem a um mesmo grupo de acordo com o critério de agrupamento de Scott e Knott, a 5% de probabilidade; ²Coefficiente de variação experimental.

Na tabela 06 é possível observar a influência das concentrações de colchicina e o tempo nos caracteres avaliados. Nota-se que as maiores concentrações influenciaram diretamente nos resultados obtidos, e o tempo foi um fator determinante, afetando principalmente na sobrevivência das plantas.

Tabela 06 - Correlação dos fatores e média das variáveis altura da planta, comprimento da folha, largura da folha, número de folhas, porcentagem de emergência e porcentagem de sobrevivência das plantas de curauá (*A. comosus* var. *erectifolius*) com quatro doses de colchicina e três tempos de imersão. Itacoatiara – AM.

Fatores	Altura da planta	Comprimento da folha	Largura da folha	Número de folhas	Emergência	Sobrevivência
Doses (ml/l)						
0,0	8,91 a	7,62 a	0,82 a	7,71 a	0,49 a	0,49 a
0,05	3,36 b	2,95 b	0,36 b	3,24 b	0,22 b	0,24 b
0,10	1,89 b	1,49 b	0,21 b	1,69 b	0,13 b	0,13 b
0,20	1,65 b	1,36 b	0,19 b	1,58 b	0,11 b	0,13 b
Tempo (h)						
2	5,28 a	4,37 a	0,57 a	4,82 a	0,32 a	0,35 a
4	5,06 a	4,34 a	0,49 a	4,43 a	0,32 a	0,32 a
6	1,52 b	1,35 b	0,14 b	1,42 b	0,08 b	0,08 b

Médias seguidas de mesma letra em cada coluna, pertencem a um mesmo grupo de acordo com o critério de agrupamento de Scott e Knott, a 5% de probabilidade.

Embora a caracterização morfoagronômica seja vista como uma medida indireta da variabilidade total dos caracteres, não é possível estabelecer se ocorreu ploidia, sendo necessário as análises dos caracteres estomáticos e da citometria de fluxo.

5.2 Caracterização estomática

É importante conhecer os valores dos parâmetros genéticos para os caracteres estomáticos, os quais poderão contribuir futuramente com programas de melhoramento genético em curauá.

A planta de curauá apresenta folhas hipoestomáticas, dessa forma foi possível observar estômatos apenas na parte abaxial das folhas completamente expandidas. Os estômatos fecham-se um pouco acima do nível das células epidérmicas, característica adquirida provavelmente, ao ambiente de cultivo, com água em abundância.

Os estômatos ficam dispostos na parte inferior das linhas de fibra (FIGURA 4). As mensurações de comprimento e largura dos estômatos não se mostraram significativas (Tabela 07). Porém, é possível observar que alguns tratamentos apresentaram médias superiores ao tratamento controle para os caracteres avaliados.

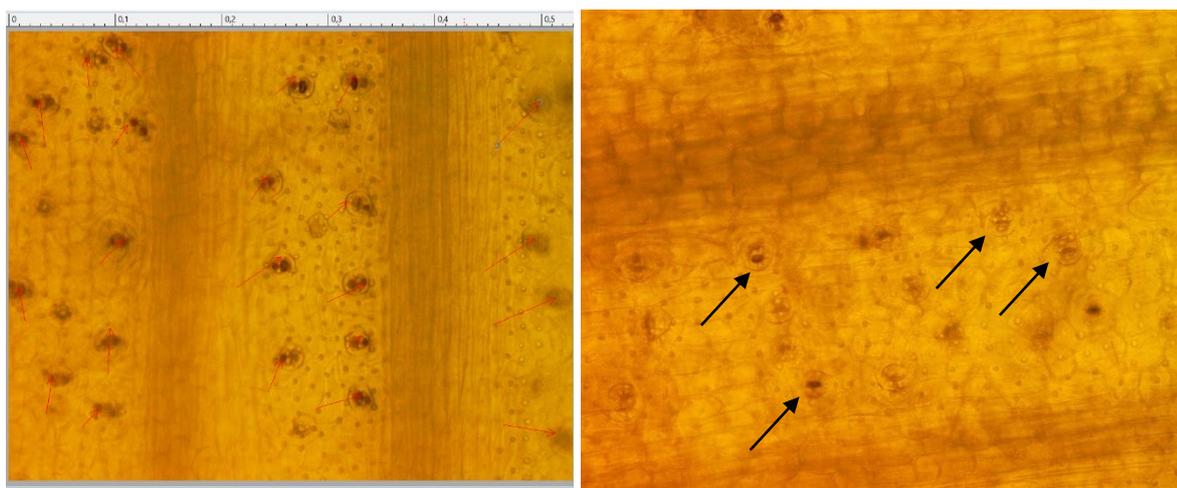


Figura 4. Disposição dos estômatos entre as linhas de fibras em *A. comosus* var. *erectifolius*. Fonte: Azevedo, 2022.

Tabela 07 - Quadrados médios referentes ao comprimento, largura e densidade estomática dos estômatos, avaliados em 10 tratamentos de *A. comosus* var. *erectifolius*. Itacoatiara, AM. 2022.

Fonte de Variação	GL	Quadrados médios		
		Comprimento	Largura	Densidade
Tratamento	9	1,19 ^{ns}	0,31 ^{ns}	11,77 ^{ns}
Resíduo	12	0,99 ^{ns}	0,49 ^{ns}	27,57 ^{ns}
CV ¹		4,77%	2,97%	29,16%

^{ns} não significativo, $p < 0,05$ pelo teste F. ¹Coeficiente de variação.

A largura dos estômatos é uma importante característica adaptativa das plantas em situação de estresses em relação aos estômatos, essa característica interfere nas funcionalidades dos mesmos. Segundo Khan et al. (2003), as alterações nas formas dos estômatos afetam diretamente sua funcionalidade, sendo que a forma mais elíptica é característica de estômatos funcionais, enquanto que a forma mais esférica está mais frequentemente, associada a estômatos com baixa funcionalidade e de igual maneira, ambas formas são obtidas de acordo com a maior ou menor largura respectivamente.

Yukawa et al. (1992) observaram em seus estudos as diferenças na largura de estômatos do gênero *Dendrobium*, e observaram variações entre diferentes indivíduos bem como entre os indivíduos da mesma espécie. Para estes autores o diâmetro equatorial pode ser vantajoso como marcador taxonômico de espécies. Yordanova et al. (2005) também observaram alterações na largura dos estômatos de cevada (*Hordeum vulgare*) em situação de alagamento, todavia, Striker et al. (2005), não identificaram mudanças na quantidade e no tamanho de estômatos em legumes de regiões alagadas. É possível destacar então, que ocorrem modificações estomáticas

e que estas variam de espécie para espécie conforme a alteração ambiental, e que estudar essas alterações anatômicas dos estômatos pode contribuir tanto na caracterização de diferentes materiais cultivados quanto sua adaptabilidade em condições adversas (RAIZER, 2017).

Os estômatos da planta de curauá não apresentaram alterações significativas, porém, em alguns tratamentos é possível observar uma pequena diferença na quantidade de estômatos por área (densidade), além do tamanho maior que os estômatos apresentados pelo tratamento controle.

As maiores DE foram observadas nos tratamentos T7 e T9. O tratamento que apresentou menor valor de DE foi o T4 e apresentou um menor valor também para o caractere largura de estômato (22,92 μm e 13,73 estômatos por milímetro quadrado) respectivamente (Tabela 08).

Tabela 08 - Médias estimadas do comprimento dos estômatos, largura dos estômatos e densidade estomática (DE), avaliadas em 10 tratamentos de *A. comosus* var. *erectifolius* na região abaxial da folha. Itacoatiara, AM. 2022.

Tratamentos	Região da folha					
	Abaxial					
	Comprimento (μm)		Largura (μm)		DE	
T1	21,09	A	23,66	A	19,47	A
T2	20,09	A	23,13	A	17,67	A
T3	20,26	A	23,92	A	16,60	A
T4	20,61	A	22,96	A	13,73	A
T5	21,36	A	23,82	A	17,30	A
T6	20,98	A	23,24	A	19,40	A
T7	21,49	A	23,87	A	20,10	A
T8	23,38	A	23,87	A	16,70	A
T9	20,63	A	23,83	A	21,00	A
T10	20,61	A	23,31	A	18,25	A

Médias seguidas de mesma letra, em cada coluna, pertencem a um mesmo grupo de acordo com o critério de agrupamento de Scott e Knott, a 5% de probabilidade.

Castro et al. (2009) relatam que uma maior quantidade de estômatos por unidade de área foliar pode conferir a espécie em estudo, uma alta adaptabilidade a ambientes secos ou de pouca disponibilidade de água. Dessa forma, a maior DE pode permitir uma abertura estomática maior em um espaço de tempo menor, permitindo uma captação adequada de CO_2 e reduzindo o tempo em que esses estômatos ficam abertos, diminuindo, então a transpiração, permitindo uma melhor adaptação das plantas às condições de pouca disponibilidade de água (MIGLIORANZA; OLIVEIRA, 2013).

Vichiato et al. (2006) observaram que não houve diferença significativa entre a densidade estomática de *Dendrobium nobile* diplóides e tetraplóides. Lea et al. (1977) também observaram que o índice estomático não variou em três níveis de ploidia da forrageira *Bromus*

inermis, concluindo que o tamanho da célula epidérmica era o principal fator determinante da frequência estomática.

Outro fator determinante para avaliação dos caracteres estomáticos está relacionado as folhas, se esta foi analisada quando estava completamente expandida. Tichá (1982), observou que, dentro de uma espécie, quando as células completam a sua diferenciação, a densidade estomática torna-se independente do tamanho da folha. Dessa forma, a seleção de folhas completamente expandidas para análise estomática é importante porque a diferenciação dos meristemóides precursores das células-guardas e das demais células epidérmicas prossegue até que a folha alcance de 10 a 50% de seu tamanho final, quando a maior parte das células epidérmicas já completou sua atividade mitótica (TICHÁ, 1982; YANG; SACK, 1995).

Apesar dos valores dos caracteres não apresentaram significância, os tratamentos que apresentaram menores DE podem ter uma adaptabilidade menor conforme as alterações ambientais, afetando também a absorção de CO₂. A redução no tamanho dos estômatos é um evento reconhecidamente importante na regulação das trocas gasosas, uma vez que folhas com estômatos menores apresentam maior eficiência no uso da água por apresentarem um menor tamanho do ostíolo, condicionando assim uma menor perda de água por transpiração (BOEGER, WISNIEWSKI, 2003; NEJAD, VAN MEETEREN, 2005; PEARCE et., 2006).

Ainda assim, as alterações no comportamento estomático, associados aos aspectos de dimensão e densidade, são características muito variáveis em plantas em função do ambiente (MELO et al., 2004), da constituição genética da espécie (ALVES et al., 2001; CAMARGO, MARENCO, 2011), e frequentemente em plantas submetidas a diferentes condições de estresses (CASTRO et al., 2005).

Diversos autores citam que, o aumento no nível de ploidia é diferente proporcional ao tamanho dos estômatos, mas, de acordo com Magallanes et al. (1996), Motonobu et al. (1997), Kim e Kim (2003) e Souza e Queiroz (2004) a avaliação indireta do nível de ploidia, como a análise estomática, pode não corresponder a essa hipótese, uma vez que os fatores ambientais também estão envolvidos.

Motonobu et al. (1997), observaram que o número de estômatos em folhas de crisântemo foi diretamente proporcional ao aumento dos cromossomos, mas o tamanho dos estômatos não variou entre as plantas de diferentes níveis de ploidia. Resultado semelhante ao evidenciado neste estudo, onde não ocorreram diferenças significativas entre os caracteres estomáticos.

Kim e Kim (2003), utilizaram a colchicina para duplicação cromossômica *in vitro* em *Cymbidium* sp. (Orchidaceae), chegaram às mesmas conclusões que Motonobu et al. (1997),

isto é, o número de estômatos aumentou com os crescentes níveis de ploidia, porém não ocorreu variação no seu tamanho.

5.3 Citometria de fluxo

O conteúdo de DNA de 8 tratamentos de *A. comosus* var. *erectifolius* está representado na Tabela 09. Os dados mostram que não houve diferenças significativas entre os genótipos avaliados.

Tabela 09 - Conteúdo de DNA estimado por citometria de fluxo em genótipos de *A. comosus* var. *erectifolius* induzidos à poliploidia utilizando o tratamento 1 – controle (T1), tratamento 2 – 0,05% de colchicina (T2), tratamento 3 – 0,10% de colchicina (T3) e tratamento 4 – 0,20% de colchicina (T4), Itacoatiara, AM. 2022.

Tratamentos	Tempo (horas)	Dose	cDNA (pg)	Nível de ploidia
T1	2	0,00	0,81	Diplóide
T1	4	0,00	0,74	Diplóide
T1	6	0,00	0,66	Diplóide
T2	2	0,05	0,80	Diplóide
T2	4	0,05	0,81	Diplóide
T3	2	0,10	0,80	Diplóide
T4	2	0,20	0,81	Diplóide
T4	4	0,20	-	-

Os resultados obtidos de conteúdo de DNA mostram que não ocorreu ploidia em nenhum dos tratamentos que foram induzidos. Porém, algumas plantas diplóides apresentam conteúdo de DNA indefinidos. Observa-se que teve um princípio de indução nos tratamentos que receberam maior concentração de colchicina, contudo a indução à ploidia não foi suficiente para duplicar o conteúdo de DNA.

A FIGURA 5 mostra um resumo dos histogramas obtidos da citometria de fluxo. O conteúdo de DNA foi comparado com o padrão de referência da espécie *Vicia faba* cv. Inovec, a qual contém 26,90 pg. O pico G1 que está sendo apresentado na figura, refere-se ao conteúdo de DNA das plantas diplóides de curauá. O conteúdo de DNA de *Vicia faba* cv. Inovec está sendo representado no pico G2.

Observa-se que com o aumento das concentrações de colchicina, as células de DNA não conseguiram duplicar seu conteúdo de DNA. Porém, na Figura 5 (D) é observado que o tratamento com concentração de colchicina de 0,20% e tempo de 4 horas de exposição, têm

possíveis alterações no conteúdo de DNA, contudo não foi possível estabelecer o valor em picogramas do conteúdo de DNA devido a perda da amostra. Diversos trabalhos com gramíneas, tais como, híbridos interespecíficos entre o cruzamento de capim elefante e milheto (BARBOSA, 2004), capim elefante (ABREU, 2002), mostraram resultados originados por agentes antimitóticos objetivando a duplicação do material genômico com resultados altamente variáveis tanto na duplicação, adição e eliminação total ou parcial do conteúdo nuclear.

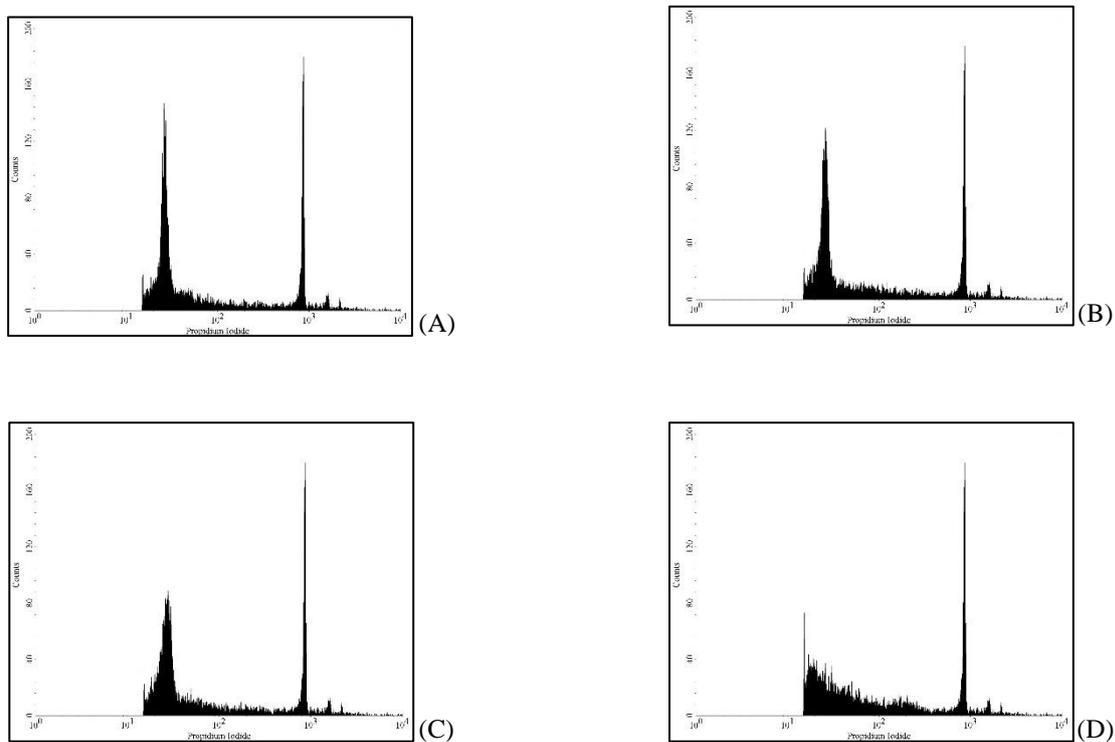


Figura 5. Histogramas obtidos pela análise de citometria de fluxo para determinação do conteúdo de DNA em picogramas (pg). A: controle; B: 0,05% e tempo de 2 horas; C: 0,10% e tempo de 2 horas e D: 0,20% e tempo de 4 horas de exposição. Itacoatiara, AM. 2022.

Os coeficientes de variação encontrados para os picos G1 variaram de 3,65 a 8,22% (Tabela 10), caracterizando resultados adequados, uma vez que os tratamentos avaliados não apresentaram variação no conteúdo de DNA celular e conseqüentemente não houve sucesso no experimento de poliploidização induzida. Galbraith et al. (2001) citam que, coeficientes de variação de até 5% podem ser tomados como aceitáveis devido alto grau de resolução de citometria de fluxo. Quanto menor o coeficiente de variação menor é a largura do pico e maior é a precisão dos experimentos.

Tabela 10 - Coeficiente de Variação estimado por citometria de fluxo de rizomas induzidos à poliploidia de *A. comosus* var. *erectifolius*. Itacoatiara, AM. 2022.

Tratamentos	Tempo	Doses (%)	CV (%)	cDNA (pg)
T0	2	0,00	3,65	0,81
T0	4	0,00	8,22	0,74
T0	6	0,00	6,15	0,66
T1	2	0,05	5,06	0,80
T1	4	0,05	5,38	0,81
T2	2	0,10	5,06	0,80
T3	2	0,20	3,91	0,81
T3	4	0,20	-	-

Tratamentos com colchicina: T1 = controle, sem adição de colchicina na solução de imersão; T2 = 0,05%; T3 = 0,10% e T4 = 0,20%.

Raizer (2017) obteve coeficientes de variação entre 2,33 a 6,70% em seu experimento com genótipos à poliploidia de *Heliconia chartacea* var. Sex Pink. Dos 20 genótipos estudados pelo autor, dois deles apresentaram resultados acima do que pode ser considerado como adequado, mas estes dois pela análise são mixoplóides, ou seja, ainda não possuem seu conteúdo de DNA completamente definido, podendo nas futuras gerações tender a diploide ou a tetraploide e essa variação pode ter causado o resultado mais elevado.

O agente antimitótico colchicina mostrou ser uma substância tóxica para os rizomas. As concentrações mais altas de colchicina a 0,20% produziram alterações nas plantas, tornando-as inviáveis e diminuindo a eficiência de converter plantas diploides em poliplóides. Observa-se que os tratamentos que apresentaram maiores perdas de material, foram os tratamentos que receberam maiores concentrações de dose de colchicina (T2 e T3). Além da colchicina ter retardado a emissão dos brotos e o crescimento da planta. Borini et al. (2010) trabalhando com espécies do gênero *Cattleya* (Orchidaceae), observaram que a colchicina em altas concentrações nos tratamentos, tornaram-se tóxicas para os tecidos vegetais.

Em muitos trabalhos com a indução a ploidia por agente antimitótico, podem ser verificados que a eliminação cromossômica é frequente, sendo esta eliminação parcial ou até

total (ADAMWSKI et al., 1998; GIACOMELLI, 2000; CARVALHO, 2000; PAGLIARINI, 2001).

Henny et al. (2009), trataram híbridos do gênero *Dieffenbachia* com diferentes concentrações de colchicina, determinaram que a sobrevivência das gemas tratadas decrescia à medida que aumentava a concentração do agente antimitótico. Zhang et al. (2007) observaram que durante o processo de indução de tetraplóides em *Phlox subulata* L., a sobrevivência das gemas tratadas com colchicina foram afetadas pela concentração e o tempo de tratamento, de tal forma que com a maior concentração e tempo de exposição, a sobrevivência das gemas foi menor.

Cavalcanti (2011) trabalhando com a indução de poliploidia em *Heliconia bihai*, observou alterações na forma das folhas, intolerância dos explantes e o atraso do seu crescimento quando foram usadas doses maiores a 0,1% de colchicina. Este autor indica que a mortalidade e o desenvolvimento lento dos materiais vegetais submetidos a poliploidização estão relacionados com a toxicidade da colchicina, que bloqueia a formação das fibras do fuso acromático, alterando o ciclo mitótico e podendo interromper por completo, produzindo perturbações fisiológicas na célula, o que resulta em uma taxa reduzida de divisão celular.

Sabe-se que a poliploidia se comporta como uma fonte de variabilidade genética, ao alterar a estrutura genômica dos organismos de maneira direta, ou indiretamente, ao interagir com outros fatores, fisiológicos e ambientais (LEWIS, 1980; STEBBINS, 1985). A poliploidia pode considerar-se em si mesma como um fator explicativo do polimorfismo morfológico, já que um dos seus efeitos é o notável aumento do tamanho das células, que pode ver-se refletido em um aumento de determinados órgãos da planta (GOULD, 1957; STEBBINS, 1971; PEGTEL, 1999). Trocas no volume celular modificam a relação superfície-volume, o qual altera a taxa de processos fisiológicos e metabólicos que dependem de sistemas regulatórios (ALCÁNTAR VÁZQUEZ, 2014).

Paredes et al. (2018) em estudo com indução de poliploidia com colchicina em vitroplantas de *Aloe vera*, obtiveram resultados semelhantes a este trabalho, onde todas as células analisadas foram diplóides. Brandham e Johnson (1982) e Nejat-zadeh-Barandozi e Akbari (2013) indicaram que as plantas do gênero *Aloe* se caracterizam por possuir uma grande estabilidade cromossômica em condições *in vivo* e *in vitro*.

Os resultados deixam estabelecidos que é necessário aumentar a concentração de colchicina com um menor tempo de exposição dos rizomas de curauá ou que são necessários menores concentrações e maior tempo de exposição dos rizomas submetidos a colchicina. Segundo Pereira et al. (2012), independente de qual metodologia é empregada, o

estabelecimento de protocolos eficientes é dependente de diversos fatores, como, substância antimitótica, tipo de explante, concentração dos antimitótico e tempo de exposição dos explantes aos tratamentos e o genótipo selecionado.

6 CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos do presente trabalho, foi possível observar os efeitos que o antimitótico colchicina causa nas plantas que são expostas em diferentes concentrações e tempos de imersão, afetando a taxa de sobrevivência das plantas, o desenvolvimento dos brotos e o crescimento das plantas, causando retardo nos diferentes caracteres avaliados.

Em relação as plantas sobreviventes à indução a poliploidia, as porcentagens de mortalidade em pré-emergência (plantas que não sobreviveram) foram muito afetadas pelas concentrações e tempo a que foram expostos os rizomas, em que na concentração 0,20% e no tempo de 6 horas, foram de 100%. Já na sobrevivência das plantas, verificou-se maior sobrevivência quando tratadas com colchicina, nas concentrações a 0,05% e no tempo de 2 horas de exposição.

Os efeitos esperados de indução à ploidia não foram obtidos nesse estudo. Vários agravantes foram responsáveis pelos resultados obtidos, como efeitos ambientais externos, os tempos e as doses de colchicina não terem sido suficientes para obter plantas poliplóides, conseqüentemente não foi possível estabelecer um protocolo definitivo de indução à ploidia para o curauá.

Portanto, as concentrações de colchicina aplicadas em *Ananas comosus* var. *erectifolius* em diferentes tempos influenciou diretamente nos resultados obtidos do conteúdo de DNA através de citometria de fluxo. Mas, este estudo torna-se importante, porque com os resultados obtidos será possível estabelecer um novo protocolo adequando a metodologia usada neste estudo, para posteriormente ser usado em programas de melhoramento genético de espécies de plantas da família Bromeliaceae.

REFERÊNCIAS

- ABREU, J. C. **Mixoploidia em híbridos de capim-elefante x Milheto tratados com agentes antimitóticos**. Tese (Doutorado em Agronomia/Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras- MG, 72 p. 2002.
- ABRAPA. A cadeia do algodão brasileiro: safra 2016/2017: desafios e estratégias / Associação Brasileira dos Produtores de Algodão. NEVES, M. F.; PINTO, M. J. A. (org). Brasília, DF, 2017.
- ADAMOWSKI, E. V.; PAGLIARINI, M. S.; BATISTA, L. A. R. Chromosome elimination in *Paspalum subciliatum* (Notata group). **Sex. Plant Reprod**, v.11, p. 272- 276, 1998.
- ALCÁNTAR VÁZQUEZ, J. P. La Poliploidía su importancia evolutiva. **Temas Cienc. Tecnol.** v. 18, n. 54, p. 17-29, 2014.
- ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo: Edgar Blucher, p. 381, 1971.
- ALVES, E. S.; GIUSTI, P. M.; DOMINGOS, M.; SALDIVA, P. H. N.; GUIMARÃES, E. T.; LOBO, D. J. A. Anatomic studies on *Trandescantia* hibrid genótipo 4430 leaves: changes caused by urban air pollution. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, p. 561-566, 2001.
- ARMSTRONG, J. M.; ROBERTSON, R. W. Studies of colchicine induced tetraploids of *Trifolium hybridum* L. II. Comparison of characters in tetraploid and diploid. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, Ottawa, v. 2, n. 4, p. 371-378, 1960.
- ARAÚJO, C. R. **Cinética de decomposição térmica de compósitos poliméricos com fibras de curauá**. 2003. 220 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2003.
- BARROS, L. M.; FERREIRA, F. R.; CABRAL, J. R. S.; SOUZA, F. V. D.; FAVERO, A. P.; MENDES, R. A.; BUSO, G. S. C.; TORRES, A. C. Descriptors to characterize and evaluate the ornamental species of Ananas in Brazil. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 2, p. 524.
- BALZER, P. S.; VICENTE, L. L.; BRIESEMEISTER, R.; BECKER, D.; SORDI, V.; RODOLFO Jr, A.; FELTRAN, M. B. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, 17, p.1, 2007.
- BARBOSA, S. **Micropropagação e duplicação cromossômica de híbridos triploides de capim elefante e milheto**. Tese (Doutorado) –119p. UFLA, 2004.
- BENITEZ, L. C.; RODRIGUES, I. C. S.; ARGE, W. P.; RIBEIRO, M. V.; BRAGA, E. J. B. Análise multivariada da divergência genética de genótipos de arroz sob estresse salino durante a fase vegetativa. **Revista Ciência Agronômica**. v. 42, n. 2, p. 409-416, 2011.
- BINGHAM, E. T. Stomatal chloroplasts in alfalfa at four ploidy levels. **Crop Science**, Madison, v. 8, p. 509-510, 1968.

BLANK, A. F.; FILHO, J. L. S. C.; NETO, A. L. S.; ALVES, P. B.; BLANK, M. F. A.; MANN, R. S.; MENDONÇA, M. C. Caracterização morfológica e agrônômica de acessos de manjerição e alfavaca. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, p. 113-116, 2004.

BLIND, A. D. **Diversidade genética em acessos de *Luffa cylindrica* baseado em análise molecular e caracteres morfo-agronômicos**. 2016. 108 f. Trabalho de conclusão de curso (Tese). - Agronomia Tropical - Universidade Federal do Amazonas, 2016.

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

BOEGER, M. R. T.; WISNIEWSKI, C. Comparação da morfologia foliar de espécies arbóreas de três estádios sucessionais distintos de Floresta Ombrófila Densa (Floresta Atlântica) no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n. 1, p. 61-72, 2003.

BORINI, A.; KEIKO, L.; ASSARI, L.; TADEU, R. Sobrevivência e desenvolvimento *in vitro* de *Catleya* (Orchidaceae) submetida a tratamentos com colchicina. **Ciências Agrárias**, v. 31, p. 1337-1342, 2010.

BRANDHAM, P.; JOHNSON, M. Polyploidy and Chromosome Interchange in *Aloe* (Liliaceae) from Somalia. **Kew Bulletin**, v. 37, n. 3, p. 389-395, 1982.

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

CAMARGO, M. A. B.; MARENCO, R. A. *Density, size and distribution of stomata in 35 rainforest tree species in Central Amazonia*. **Acta Amazônica**, v. 41, n. 2. 2011.

CAMPELO, M. F.; LAMEIRA, O. A.; MOREIRA, R. K. V. P. P.; RAMIRES, A. C. S. Avaliação morfológica de *Ananas comosus* var. *erectifolius* (L.B Smith) Coppens & F. Leal-Bromeliaceae. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 9, 2021.

CAMPOS, V.; TILLMANN, M. A. A. Avaliação da metodologia para teste de germinação em sementes de tomate. **Revista Brasileira de Agrociência**. v. 3, n. 1, p. 37-42, 1997.

CARASCHI, J. C.; LEÃO, A. L. **Characterization of curaua fiber**. **Molecular Crystal and liquid Crystals Science Technology, Section A: Molecular Crystals and Liquid Crystals**, v. 353, p. 149-152, 2000.

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

CARPENTER, K. J. Stomatal architecture and evolution in basal angiosperms. **American Journal of Botany**, v. 92, p. 1595–1615, out. 2005.

CASTRO, A. F. N. M.; CASTRO, R. V. O.; CARNEIRO, A. C. O.; LIMA, J. E.; SANTOS, R. C.; ALVES, I. C. N. Análise multivariada para seleção de clones de eucalipto destinados à produção de carvão vegetal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 6, p. 627-635, 2013.

CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia Vegetal: estrutura e função dos órgãos vegetativos**. Lavras: UFLA, ed. 1, 234 p. 2009.

CASTRO, E.M.; PINTO, J. E. B. P.; MELO, H. C. de; SOARES, A. M.; ALVARENGA, A. A. de; LIMA JÚNIOR, E. de C. Aspectos anatômicos e fisiológicos de plantas de guaco submetidas a diferentes fotoperíodos. *Horticultura Brasileira*. Lavras, v. 23, p. 846-850, 2005., H. C., *et al.* Influência da aplicação de cálcio e alagamento do solo sobre características anatômicas das folhas de milho (*Zea mays* L.) “Saracura” BRS-4154. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 3, p. 333-342. 2004.

CARVALHO, F. I. F. de; SILVA, S. A.; KUREK, A. J.; MARCHIORO, V. S. **Estimativas e implicações da herdabilidade como estratégia de seleção**. Pelotas: UFPel. ed. 1, Universitária, 99 p. 2001.

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

CAVALCANTI, G. **Indução de poliploidia in vitro com aplicação de *Heliconia bihai***. Tesis de Maestria en Ciencias Biológicas. Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. 2011.

CLEMENT, R. C.; KERR, W. E.; YUYAMA, L. K. O.; KERR, L. S. **Cozinhando com pupunha**. – 2 ed., ver. e amp. ---- Manaus: Editora INPA, 94 p. 2012.

COIMBRA, R. R.; MIRANDA, G. V.; CRUZ, C. D.; ECKERT, F. R. Caracterização e divergência genética de populações de milho resgatadas do Sudeste de Minas Gerais. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 41, n. 1, p. 159-166, 2010.

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

CORREIA, D.; BORGES, N. S. S.; RIBEIRO, E. M.; MORAIS, J. P. S. **Produção de mudas in vitro e indução floral de abacaxizeiro ornamental**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 24p, 2011.

COPPENS, G.; LEAL, F. Morphology, anatomy and taxonomy, In: **The pineapple: botany, production and uses**. Editors: Bartholomew, D. P., R. E. Paull & K. G. Rohrbach, CABI publishers, Wallingford UK and New York USA, 2003.

CORDEIRO, I. M. C. C. **Comportamento de *Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (Huber ex Ducke) Barneby e *Ananas comosus* var. *erectifolius* (LB Smith) Coppens & Leal sob diferentes sistemas de cultivo no município de Aurora do Pará (PA)**. 2007. 115 f. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2007.

CORDEIRO, I. M. C. C.; OLIVEIRA JUNIOR, M. C. M. D.; GAZEL-FILHO, A. B.; BARROS, P.; LAMEIRA, O. A.; OLIVEIRA, F. D. A. Crecimiento del *Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* cultivado en presencia de *Ananas comosus* var. *erectifolius* en Pará, Brasil. **Agrociencia**, v. 50, n. 1, p. 79-88, 2016.

CRUZ, C. D. **Aplicações de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas**. 1990, 188 f. Trabalho de conclusão de curso (Tese) Genética e Melhoramento de Plantas – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 1990.

CRUZ, C. D. **Princípios da genética quantitativa**. Editora UVF: Viçosa 1 ed., p. 394, 2005.

CRUZ, C. D. **Princípios de Genética Quantitativa**, Editora UFV, 1 ed., p. 394, 2010.

CUNHA, E. J. de S. Utilização industrial de fibras vegetais. In: FARIA, L. J. G de COSTA, C. M. L (Coord.). **Tópicos especiais em tecnologia de produtos naturais**. Belém: UFPA/NUMA/POEMA, 82 p. 1998.

CUTTER, E. G. **Anatomia Vegetal**. 1 ed. São Paulo: Roca, 336 p. 2002.

DAROS, M.; JÚNIOR, A. T. A.; PEREIRA, T. N. S.; LEAL, N. R.; FREITRAS, S. P.; SEDIYMA, T. Caracterização morfológica de acessos de batata-doce. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 43-47, 2002.

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

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

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

DHOOGHE, E.; EECKHAUT, T.; VAN LAERE, K.; LEUS, L. Duplicação de cromossomos mitóticos de tecidos vegetais in vitro. **Cultura de Células, Tecidos e Órgãos Vegetais (PCTOC)**, v. 104, n. 3, p. 359-373, 2011.

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

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

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

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

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Produção de abacaxi ornamental para flor de corte**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2014.

ERENO, D. "Fibra para Toda Obra". **Boletim Eletrônico Fapesp**, n. 104, 2004. Disponível em: <https://fapesp.br/agencia/boletim_dentro.php?data%25Bid_materia_boletim%25D=2621>. Acesso em: 13 fev. 2022.

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

FERRÃO, L. F. V.; CECON, P. R.; FINGER, F. L.; SILVA, F. F.; PUIATTI, M. Divergência genética entre genótipos de pimenta com base em caracteres morfoagronômicos. **Horticultura Brasileira**, v. 29, n. 3, p. 354-358, 2011.

FONSECA, A. F. A.; SEDIYAMA, T.; CRUZ, C. D.; SAKAIYAMA, N. S.; FERRÃO, M. A. G.; FERRÃO, R. G.; BRAGANÇA, S. M. Divergência genética em café conilon. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 4, p. 599-605, 2006.

GALBRAITH, D. W.; LAMBERT, G. M.; MACAS, J.; DOLEZEL, J. Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants. **Current Protocols in Cytometry**. 365 p. 2001.

GALVANI, E.; ESCOBEDO, J. F.; CUNHA, A. R.; KLOSOWSKI, E. S. Estimativa do índice de área foliar e da produtividade de pepino em meio protegido - cultivos de inverno e de verão. **R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental**, v. 4, n. 1, p. 8-13, 2000.

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

GMITTER, F. G.; LING, X. Embryogenesis in vitro and non chimeric tetraploid plant recovery from undeveloped citrus ovules treated with colchicines. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 116, p. 317-321, 1991.

GMITTER, F. G.; LING, X.; CAI, C.; GROSSER, J. W. Colchicine-induced polyploidy in Citrus embryogenic cultures, somatic embryos, and regenerated plantlets. **Plant Science**, v. 74, p. 135-141, 1991.

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

GOULD, F. W. Pollen size as related to polyploidy and speciation in the *Andropogon saccharoides* - *A. barbinodis* complex. **Brittonia**, v. 9, p. 71-75, 1957.

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

HAIR, J. F.; BLACK, W.; BABIN, B.; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. L. **Análise Multivariada de dados**. Editora Bookman, Porto Alegre, 6 ed., 688 p. 2009.

HEIKO, R. **Estimativas de parâmetros genéticos e fenotípicos de uma população de soja avaliada em quatro anos**. Trabalho de conclusão de curso (Mestrado) – Agronomia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 91 p. nov. 2001.

HENNY, R. J., HOLM, J. R., CHEN, J., SCHEIBER, M. *In vitro* induction of tetraploids in *Dieffenbachia* 'Star Bright M-1' by colchicine. **Hortscience**, v. 44, ed. 3, p. 646-650, 2009.

HUANG, X.; LIN, S.; HE, S.; LIN, X.; LIU, J.; CHEN, R.; LI, H. Characterization of stomata on floral organs and scapes of cut 'Real' gerberas and their involvement in postharvest water loss. **Postharvest Biology and Technology**, v. 142, p. 39-45, 2018.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/am/pesquisa/14/0?tipo=ranking>. 2020. Acesso em: 25 fev. 2022.

KHAN, P.S.; KOZAI, T.; NGUYEN, Q. T.; KUBOTA, C.; DHAWAN, V. **Growth and water relations of *Paulownia fortunei* under photomixotrophic and photoautotrophic conditions**. *Biologia Plantarum*, Copenhagen, v. 46, n. 2, p. 161-166, 2003.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 431 p. 2008.

KIM, M. S.; KIM, J. Y. Chromosome doubling of a *Cymbidium* hybrid with colchicine treatment in meristematic culture. **Proceedings of NIOC**, Nagoya, Japão, p. 37-40, 2003.

LAWSON, T.; SIMKIN, A. J.; KELLY, G.; GRANOT, D. Mesophyll photosynthesis and guard cell metabolism impacts on stomatal behaviour. **New Phytologist**, Colchester, v. 203, p. 1064-1081, 2014.

LAKE, J. A.; WOODWARD, F. I. Response of stomatal numbers to CO₂ and humidity: control by transpiration rate and abscisic acid. **New Phytologist**, Sheffield, v. 179, p. 397-404, 2008.

LEDO, I. A. de M. **O cultivo do curauá no Lago Grande da Franca**. Santarém: Banco de Crédito da Amazônia. 23 p. 1929.

LEDO, I. A. de M. **O cultivo do curauá no lago grande de Franca**. Belém: Banco da Amazônia S/A – BASA. 123 p. 1967.

LEA, H. Z.; DUNN, G. M.; KOCH, D. W. Stomatal indexes in three ploidy levels of *Bromus inermis* Leyss. **Crop Science**, v. 17, n. 4, p. 669-670, 1977.

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

LEHRER, J. M.; BRAND, M. H.; LUBELL, J. D. Induction of tetraploidy in meristematically active seeds of Japanese barberry (*Berberis thunbergii* var. *atropurpurea*) through exposure to colchicine and oryzalin. **Scientia Horticulturae**, v. 119, p. 67-71, 2008.

LEWIS, W. H. Polyploidy in Species Populations. In: LEWIS W.H. (ed.) Polyploidy. **Basic Life Sciences**, v. 13. Springer, Boston, MA. 1980.

LOUREIRO, J.; SANTOS, C. Métodos em Biotecnologia - Citometria de Fluxo I. Aplicação da Citometria de Fluxo ao estudo do Genoma Vegetal. **Boletim de Biotecnologia**. 2005.

MAGALLANES, M. G. R.; PINTO, C. A. B. P.; DAVIDE, L. C. Determinação citomorfológica do nível de ploidia de clones de batata (*Solanum tuberosum* L.) obtidos por cruzamentos interespecíficos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 20, n. 4, p. 480-484, 1996.

MARINELLI, A. L.; MONTEIRO, M. R.; AMBRÓSIO, J. D. Desenvolvimento de compósitos poliméricos com fibras vegetais naturais da Biodiversidade: Uma contribuição para a sustentabilidade Amazônica. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 18, n. 2, p. 92-99, 2008.

MARTINELLO, G. E.; LEAL, N. R.; JÚNIOR, A. T. A.; PEREIRA, M. G.; DAHER, R. F. Divergência genética em acessos de quiabeiro com base em marcadores morfológicos, **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 52-58, 2002.

MARTINS, C. P. S.; MELO, M. T. P.; HONÓRIO, I. C. G.; D'ÁVILA, V. A.; CARVALHO JÚNIOR, W. G. O. Caracterização morfológica e agrônômica de acessos de jambu (*Spilanthes oleracea* L.) nas condições do Norte de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Plantas medicinais**, v. 14, p. 410-413, 2012.

MATTOSO, L. H. C.; PEREIRA, N. C.; SOUZA, M. L.; AGNELLI, J. A. M. Produção e Informação, in: Odilon R R F da Silva; Napoleão E D M Beltrão. (Org.). **O Agro Negócio do Sisal no Brasil**. Brasília: EMBRAPA, 1 ed., p. 161, 1999.

MCAINSH, M. R.; TAYLOR, J. E. Stomata. **Plant Sciences**, 2 ed., v. 1, p. 1459-1466, 2017.

MEDINA, J. C. **Plantas fibrosas da flora mundial**. Campinas/SP. Editora Instituto Agrônômico, 913 p. 1959.

MELO, H. C., CASTRO, E. M.; ROMERO, J. L.; ALVES, J. D.; FRIES, D. D.; MELO, L. A.; MAGALHÃES, P. C. Influência da aplicação de cálcio e alagamento do solo sobre características anatômicas das folhas de milho (*Zea mays* L.) "Saracura" BRS-4154. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 3, p. 333-342. 2004.

MERCIER, H.; KERBAUY, G. B. The importance of tissue culture technique for conservation of endangered Brazilian bromeliads from Atlantic rain forest canopy. **Selbyana**, v. 16, p. 147-149, 1995.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. Anatomy of the dicotyledons. **Clarendon Press**, v. 2, p. 243-245, 1950.

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

MINGOTI, A. S. **Análise de dados através de métodos de estatística multivariada**. Belo Horizonte, Editora UFMG, 295 p. 2007.

MORI, I.; MURATA, Y. ABA signaling in stomatal guard cells: lessons from *Commelina* and *Vicia*. **Journal of Plant Research**, v. 124, p. 477-487, 2011.

MOTONOBU, E., KIM, J. S.; INADA, I. Production and characteristics of chromosome doubled plants of small flowered garden Chrysanthemum, *Dendranthema grandiflorum* Ramat. Kitam. cv. YS by colchicine treatment of cultured shoot tips. **Journal Japan Society Horticulturae Science**, v. 65, n. 4, p. 528-833, 1997.

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

MOTHÉ, C. G.; ARAÚJO, C. R. - Compósitos de Poliuretano com Fibras de Curauá. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 14, n. 4, p. 274-278, 2004.

NASCIMENTO FILHO, F. J.; ATROCH, A. L.; SOUSA, N. R de; GARCIA, T. B.; CRAVO, M. da S.; COUTINHO, E. F. Divergência genética entre clones de guaranazeiro. **Pesq. agropec. bras.** Brasília, v. 36, n. 3, p. 501-506, 2001.

NASS, L. L. **Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília: Embrapa Cenargen, 858 p. 2007.

NEJAD, A. R.; VAN MEETEREN, U. **Stomatal response characteristics of *Tradescantia virginiana* grown at high relative air humidity**. *Physiologia Plantarum*, v. 125, p. 324-332, 2005.

NEJATZADEH-BARANDOZI, F.; AKBARI, L. Karyotypic variation of the *Aloe vera* L. and *Aloe littoralis* Baker in Iran. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 11 n. 4, p. 233-37, 2013.

NETO, L. F.; PARDINI, L. C. “**Compósitos estruturais: ciência e tecnologia**”. Editora Edgard Blucher Ltda, São Paulo, 2006.

NOTHENBERG, M. **Cresce o interesse pelo uso de fibras naturais. Anuário Brasileiro do Plástico**, p. 9-15. 1996.

OLIVEIRA, Y. de; ANSELMINI, J. I.; CUQUEL, F. L.; PINTO, F.; QUOIRIN, M. Pré-aclimatização *in vitro* de abacaxi ornamental. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, p. 1647-1653, 2010.

OTTO, S. P. The Evolutionary Consequences of Polyploidy. **Cell**, v. 131, p. 452-462, 2007.

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

PAREDES, T. M.; NARVÁEZ, M. V.; FERNÁNDEZ, E. V. Inducción de poliploidia con colchicina en vitroplantas de *Aloe vera* (L.). **Rev. Colomb. Biotecnol.** v. 19, n. 2, p. 97-105, 2018.

PAULA, C. C. **Cultivo de Bromélias**. Editora Viçosa: Aprenda Fácil, 139 p. 2000.

PAULA, C. C.; SILVA, H. M. P. da. **Cultivo prático de Bromélias**. Editora UFV, Viçosa. 73 p. 2001.

PEARCE, D. W.; MILARD, S.; BRAY, D. F.; ROOD, S. B. Stomatal characteristics of riparian poplar species in a semi-arid environment. **Tree Physiology**, v. 26, n. 2, p. 211-218, 2006.

PEGTEL, D. M. Effect of ploidy level on fruit morphology, seed germination and juvenile growth in scurvy grass (*Cochlearia officinalis* L. s.l., Brassicaceae). **Pl. Spec. Biol.** v. 14, ed. 3, p. 201- 215, 1999.

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

PEREIRA, R. C.; DAVIDE, L. C.; TECHIO, V. H.; TIMBÓ, A. L. O. Duplicação cromossômica de gramíneas forrageiras: uma alternativa para programas de melhoramento genético. **Ciência Rural**, v. 42, n. 7, p. 1278-1285, 2012.

PHILLIPS, R. L.; KAEPLER, S. M.; OLHOFT, P. Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls. **Proceedings of the National Academy of Sciences. USA**, v. 91, n. 12, p. 5222-5226, 1994.

PIMENTA, J. A. Relações Hídricas. In: KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 431 p. 2008.

POULOS, H. M.; GOODALE, U. M.; BERLYN, G. P. Drought response of two Mexican oak species, *Quercus laceyi* and *Q. sideroxyla* (Fagaceae), in relation to elevational position. **American Journal of Botany**, v. 94, n. 5, p. 809-818, 2007.

QUEIROZ, M. A. Germoplasma de Cucurbitáceas no Brasil. In: **51 Congresso brasileiro de olericultura**. Horticultura Brasileira, Viçosa, v. 29, n. 2, jul. 2011.

RAIZER, M. D. M. **Identificação e caracterização de plantas poliploides de *Heliconia chartacea* var. Sexy Pink.** Embrapa Amazônia Ocidental-Tese/dissertação (ALICE), 2017.

RAMALHO, E. **A folha amazônica que virou arte.** 2005. Disponível em: <http://www.rfi.fr/actubr/articles/068/article_124.asp>. Acesso em: 13 fev. 2022.

RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. F. B.; SANTOS, J. B.; NUNES, J. A. R. **Aplicações da genética quantitativa no melhoramento de plantas autógamas.** Lavras: UFLA, 522 p, 2012.

RAMOS, S. L. F.; DEQUIGIOVANNI, G.; SEBBENN, A. M.; LOPES, M. T. G.; MACÊDO, J. L. V.; VEASEY, E. A.; ALVES-PEREIRA, A.; SILVA, P. P.; GARCIA, J. N.; KAGEYAMA, P. Y. Paternity analysis, pollen flow, and spatial genetic structure of a natural population of in the Brazilian Amazon. **Ecology and Evolution**, v. 8, p. 11143-11157, 2018.

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

R Development Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: **R Foundation for Statistical Computing**.

RANDOLPH, L. F. Alguns efeitos da alta temperatura na poliploidia e outras variações em milho. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 18, n. 3, p. 222, 1932.

RAUH, W. **Bromeliads for home, gardens and greenhouses**. London: Blandford Press, 58 p. 1979.

RECH FILHO, A. **Biorreatores de imersão temporária e unidades encapsuláveis como ferramentas na consolidação de protocolos de micropropagação de bromélias**. 2004, 87 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 87 p. 2004.

RÊGO, E. R.; RÊGO, M. M.; MATOS, I. W. F.; BARBOSA, L. A. Morphological and chemical characterization of fruits of *Capsicum* spp. Accessions. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 364-371, 2011.

REIS, I.; FILHO, B. G. dos S.; CASTRO, C. V. B.; LAMEIRA, C. N.; ROSSATO, V. Trocas gasosas e alocação de biomassa em plantas jovens de curauá (*Ananas erectifolius* L. B. Smith) submetidas ao alagamento. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 504-506, 2007.

RENDEIRO, R. **Embrapa de Belém é finalista nacional do prêmio Finep**. 2007.

RICHARDSON, A. D.; ASTHON, P. M. S.; BERLYN, G. P.; MCGRODD, M. E.; CAMERON, I. R. With-crow foliar plasticity of western hemlock, *Tsuga heterophylla* in relation to stand age. **Annals of Botany**, v. 88, p. 1007-1015, 2001.

ROSSMMAN, H. **Estimativas de parâmetros genéticos e fenotípicos de uma população de soja avaliada em quatro anos**. 2001 80 f. Trabalho de conclusão de curso (Dissertação) – Agronomia, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP. 2001.

RODRIGUES, L. S.; ANTUNES, I. F.; TEIXEIRA, M. G.; SILVA, J. B. Divergência genética entre cultivares locais e cultivares melhoradas de feijão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 9, p. 1275-1284, 2002.

SANTOS, E. R.; SANTOS, A. F.; CAPONE, A.; SANTOS, W. R.; MOURA, S. G.; BARROS, H. B. Genetic dissimilarity between soybean genotypes cultivated in lowland irrigated intercropping. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n. 3, p. 222-231, 2013.

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

SILVA, A. J. **Indução de Poliploidia em *Eucalyptus grandis* Hill (Ex Maiden)**. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, 2016.

SILVA, M. L. D. **Cultivo agroflorestal de *Psychotria Ipecacuanha* (Brot.) Stokes no território do baixo sul da Bahia**. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2014.

SILVA, T. A. L.; TAMBOURGI, E. B. Estudo da Estabilidade da Enzima Bromelina Extraída do Curauá roxo (*Ananas erectifolius*). **Scientia Plena**, v. 7, n. 1, 2011.

SILVA, R. V.; AQUINO, E. M. F.; RODRIGUES, L. P. S.; BARROS, A. R. F. Desenvolvimento de um compósito laminado híbrido com fibras natural e sintética. **Revista Matéria**, v. 13, n. 1, p. 154-161, 2008.

SILVA, R. de N. P. da. **Crescimento e sintomas de deficiência de macronutrientes em plantas de curauá (*Ananas erectifolius* L. B Smith)**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2006.

SILVA, M. L.; QUEIRÓZ, M. A.; FERREIRA, M. A. J. F.; BUSO, G. S. C. Caracterização morfológica e molecular de acessos de melancia. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 24, p. 405-409, 2006.

SILVA, P. A. K. X. M.; Callegari-Jacques, S.; Bodanese-Zanettini, M.H. Induction and identification of polyploids in *Cattleya intermedia* Lindl. (Orchidaceae) by in vitro techniques. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, p. 105-111, 2000.

SILVEIRA, E. O. da. **Indução à ploidia e caracterização em *Echynochloa polystachya* (Kunth) Hitchc na Amazônia Ocidental**. Dissertação (Doutorado em Agronomia Tropical) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2020.

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

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

SPECKMANN, G. J.; POST, J.; DIJKSTRA, H. The length of stomata as an indicator for polyploidy in rye-grasses. **Euphytica**, 14, 225-230, 1965.

STRIKER, G. G.; INSAUSTI, P.; GRIMOLDI, A. A.; PLOCHUK, E. L.; VASELLATI, V. Physiological and anatomical basis of differential tolerance to soil flooding of *Lotus corniculatus* L. and *Lotus glaber* Mill. **Plant and Soil**, v. 276, p. 301-311, 2005.

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

STEBBINS, G. L. Polyploidy, Hybridization, and the Invasion of New Habitats. **Ann. Missouri Bot. Gard.** v. 72, p. 824-832, 1985.

TAKAMURA, T.; MIYAJIMA, I. Colchicine induced tetraploids in yellow-flowered cyclamens and their characteristics. **Scientia Horticulture**, v. 65, p. 305-312, 1996.

TAMAKI, V.; CARVALHO, C.; PAULA, S.M.; KANASHIRO, S. Soluções nutritivas alternativas para o cultivo de bromélias ornamentais. **O Mundo da Saúde**, São Paulo, v. 35, n.1, p. 91-97, 2011.

TAIZ, L.; ZAIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed., 918 p. 2009.

TICHÁ, I. Photosynthetic characteristics during ontogenesis of leaves – Stoma density and sizes. **Photosynthetica**, v. 16, p. 375-471, 1982.

VAKILI, N. G. The Experimental Formation of Polyploidy and its Effect in the Genus *Musa*. **American Journal of Botany**, v. 54, n. 1, p. 24-36, 1967.

VANDENHOUT, H.; ORTIZ, R.; VUYLSTEKE, D.; SWENNEN, R.; BAI, K. V. Effect of ploidy on stomatal and other quantitative traits in plantain and banana hybrids. **Euphytica**, v. 83, p. 117-122, 1995.

VEIGA, R. F. A.; VOLTAN, R. B. Q.; VALLS, J. F. M.; FÁVERO, A. P.; BARBOSA, W. Caracterização morfológica de acessos de germoplasma de quatro espécies brasileiras de amendoim-silvestre. **Bragantia**, Campinas, v. 60, p. 167-176, 2001.

VIEIRA, E. A.; FIALHO, J. F.; FALEIRO, F. G.; BELLON, G.; FONSECA, K. G.; CARVALHO, L. J. C. B.; SILVA, M. S.; PAULA-MORAES, S. V.; FILHO, M. O. S. S.; SILVA, K. N. Divergência genética entre acessos açucarados de mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 12, p. 1707-1715, 2008.

VILLA, V. B. **Análise citomorfoanatômica e eletroforética de híbridos de *Solanum tuberosum* L. X (*Solanum tuberosum* L. X *Solanum chacoense* Bitt)**. 1995, 76 f. Trabalho de conclusão de curso (Dissertação) - Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade Federal de Lavras, Lavras. 1995.

VICHIAATTO, M. R. M.; VICHIAATTO, M.; CASTRO, D. M.; DUTRA, L. F.; PASQUAL, M.; MARCHIORI JÚNIOR, W.; LIMA, C. D. F.; SALGADO, C. C. Análises estomática e morfométrica de folhas de plantas diplóides e tetraplóides de *Dendrobium nobile* Lindl. **Revista Ceres**. v. 53, n. 310, p. 541- 548, 2006.

VOGT, G. A.; BALBINOT JÚNIOR, A. A.; SOUZA, A. M. Divergência genética entre cultivares de girassol no planalto norte catarinense. **Scientia Agraria**, Paraná, v. 11, n. 4, p. 307- 315, 2010.

WAKANA, A.; HANADA, N.; PARK, S.M.; FUKUDOME, I.; KAJIWARA, K. Production of tetraploid forms of acid citrus cultivars by top grafting of shoots with sprouting axially buds treated with colchicines **Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University**, v. 50, p. 93-102, 2005.

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

WITTMANN, M. T. S.; DALL'AGNOL, M. **Indução de poliploidia no melhoramento de plantas**. Pesq. Agrop. Gaúcha, v. 9, n. 1-2, p. 155-164, 2003.

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

YANG, T.; SACK, F. D. The too many mouths and four lips mutations affect stomatal production in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 7, n. 12, p. 2227-2239, 1995.

YORDANOVA, R. Y.; UZUNOVA, A. N.; POPOVA, L. P. Effects of short-term soil flooding on stomata behaviour and leaf gas exchange in barley plants. **Biologia Plantarum**, v. 49, n. 2, p. 317-319, 2005.

YUKAWA, T.; ANDO, T.; KARASAWA, K.; HASHIMOTO, K. Existence of two stomatal shapes in the genus *Dendrobium* (Orchidaceae) and its systematic significance. **American Journal of Botany**, v. 79, p. 946-952, 1992.

ZHANG, Z.; LI, Y.; WANG, Z.; XIA, Q.; YI, M. *In vitro* tetraploid induction and its identification in *Anthurium andraeanum*. **Acta Horticulture Sinica**, v. 3, p. 245-253, 2007.