

UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA (UNEB)

Pró-Reitoria de Pesquisa e Ensino de Pós-Graduação (PPG)

Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais (DTCS)

Programa de Pós-Graduação em Agronomia: Horticultura Irrigada (PPGHI)

JHONES GOMES LOPES

**APLICAÇÃO DE COLCHICINA PARA INDUÇÃO DE POLIPLOIDIA EM
ACEROLEIRA: CARACTERIZAÇÃO MORFOMÉTRICA DOS ESTÔMATOS**

JUAZEIRO – BA

2021

UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA (UNEB)

Pró-Reitoria de Pesquisa e Ensino de Pós-Graduação (PPG)

Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais (DTCS)

Programa de Pós-Graduação em Agronomia: Horticultura Irrigada (PPGHI)

JHONES GOMES LOPES

**APLICAÇÃO DE COLCHICINA PARA INDUÇÃO DE POLIPLOIDIA EM
ACEROLEIRA: CARACTERIZAÇÃO MORFOMÉTRICA DOS ESTÔMATOS**

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia: Horticultura Irrigada da Universidade do Estado da Bahia (PPGHI – UNEB/DTCS), como requisito para a obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração: Horticultura Irrigada.

Orientador: Manoel Abílio de Queiróz

Coorientador: Nataniel Franklin de Melo

JUAZEIRO – BA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
por Regivaldo José da Silva/CRB-5-1169

L864a Lopes, Jhones Gomes

Aplicação de colchicina para indução de poliploidia em aceroleira:
caracterização morfológica dos estômatos / Jhones Gomes Lopes.
Juazeiro-BA, 2021.
48 fls.: il.

Orientador (a): Prof. Dr. Manoel Abílio de Queiroz.
Coorientador (a): Prof. Dr. Nataniel Franklin de Melo.
Inclui Referências

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade do Estado da Bahia.
Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais – DTCS. Programa de
Pós-Graduação em Horticultura Irrigada - PPGHI, Campus III. 2021.

1. Malpighia emerginata D.C. 2. Aplicação de colchicina – Concentração de colchicina. 3. Cromossomos – Duplicação. I. Queiroz, Manoel Abílio de. II. Melo, Nataniel Franklin de. III. Universidade do Estado da Bahia. Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais – DTCS. IV. Título.

CDD: 572.82

FOLHA DE APROVAÇÃO

"APLICAÇÃO DE COLCHICINA PARA INDUÇÃO DE POLIPLOIDIA EM ACEROLEIRA:
CARACTERIZAÇÃO MORFOMÉTRICA DOS ESTÔMATOS"

JHONES GOMES LOPES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Horticultura Irrigada – PPHI, em 23 de julho de 2021, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Agronomia: Horticultura Irrigada pela Universidade do Estado da Bahia, conforme avaliação da Banca Examinadora:


Professor(a) Dr.(a) MANOEL ABÍLIO DE QUEIROZ
UNEB
Doutorado em Genetics and Plant Breeding
University of Cambridge


Professor(a) Dr.(a) RUY DE CARVALHO ROCHA
UNEB
Doutorado em Agronomia (Horticultura)
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho


Professor(a) Dr.(a) JOÃO GOMES DA COSTA
Embrapa Alimentos e Territórios
Doutorado em Biotecnologia
Universidade Estadual do Ceará

“Não temas, porque eu sou contigo; não te assombres, porque eu sou o teu Deus; eu te fortaleço, e te ajudo, e te sustento com a minha destra fiel.”

(Bíblia Sagrada, Isaías, 41 v.10)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família,
a todos que buscam através da pesquisa melhorar
o mundo e a todos que de forma direta e
indireta contribuíram para sua elaboração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço antes de tudo, à Deus, pois ele é o caminho.

À minha família, meu pai Antonio Lopes de Souza, minha Mãe Neide Medeiros Gomes Lopes, ao meu irmão Lennon Gomes Lopes, pois são meu porto seguro, e sei que os caminhos que eu os trilhar estarão lá para me apoiar.

Aos meus sobrinhos Lucas e Loki que muito alegram minha vida em um sentido único.

Aos meus orientadores Dr. Manoel Abilio de Queiroz e Dr. Nataniel Franklin de Melo por toda a orientação, disponibilidade e conhecimento a mim passados durante esses anos de trabalho.

À Universidade Estadual da Bahia – UNEB, que foi minha casa durante minha graduação e, da mesma forma como me senti acolhido durante essa passagem, também me fez sentir em casa durante os anos de mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela concessão da bolsa.

Um agradecimento especial a todos ligados ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia: Horticultura Irrigada, membros administrativos, corpo docente, pessoal da limpeza e aos meus colegas de turma que conviveram comigo durante todo o período do mestrado, e onde criamos laços de amizade que levarei por toda minha vida.

Agradeço à Embrapa Semiárido por toda a infraestrutura cedida para o desenvolvimento do experimento.

Ao pessoal do laboratório de biotecnologia vegetal da Embrapa Semiárido, Ângela, Francisco, Kananda, Tatiane, Marcos, Rayssa, Thiago e Wesley que dividiram comigo todos os momentos na minha passagem pela Embrapa.

Ao pessoal de apoio da casa de vegetação, em especial a Elenicio.

Por fim, gostaria de deixar aqui também registrado o meu muito obrigado a aqueles que de forma indireta contribuíram para que hoje eu estivesse aqui. Essa conquista não é só minha, mas sim de muitos, e parafraseando um professor(a) que agora não me recordo quem, um dia disse uma frase de Isaac Newton “Gigantes são os mestres nos ombros dos quais eu me elevei”.

Sumário

RESUMO	11
ABSTRACT.....	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. Descrição botânica da Aceroleira.....	17
2.2 Histórico de introdução, cultivo e importância econômica	18
2.3 Cultivares e melhoramento genético	20
2.4. Poliploidia	21
2.4.1 Conceito	21
2.4.2 Formas de ocorrência	22
2.4.3 Características	22
2.4.4 Indução e importância	23
2.4.5 Métodos de determinação do nível de ploidia.....	24
2.5 Caracterização morfométrica dos estômatos	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Local de condução e materiais do trabalho	26
3.2 Indução de poliploidia.....	27
3.3 Análise morfométrica dos estômatos	29
3.4 Análise estatística.....	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5. CONCLUSÕES.....	39
6. REFERÊNCIAS	40

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – (a) Mapa das áreas colhidas de acerola em hectares no Brasil; (b) <i>Ranking</i> dos estados por área colhida.....	13
Figura 2 – (a) Mapa das áreas colhidas de acerola em hectares no estado de Pernambuco; (b) <i>Ranking</i> das cidades do estado de Pernambuco por área colhida.....	13
Figura 3 – Plantas dos cultivares de aceroleira (<i>Malpighia emarginata</i> Sessé & Moc. ex DC.) cultivadas em vasos e utilizadas para indução de poliploidia com o uso de colchicina. (a) Vasos na casa de vegetação com plantas ainda sem poda; (b) Planta podada e pronta para aplicação da colchicina.....	26
Figura 4 – Visão geral das plantas dos cultivares de aceroleira (<i>Malpighia emarginata</i> Sessé & Moc. ex DC.) durante e após a aplicação tópica de colchicina em gemas foliares axilares. (a) Gemas tratadas com diferentes concentrações de colchicina e recobertas com papel alumínio; (b) Lavagem das gemas com água destilada após os prazos de 24 ou 48 h para retirada do excesso de colchicina; (c) Coleta das novas folhas após 15 dias para análise em laboratório.....	27
Figura 5 – Etapas de conservação (a), isolamento da película dos tecidos da epiderme da face abaxial de folhas (b), coloração com carmin acético (c) e captura de imagens dos estômatos (d) de folhas de aceroleira (<i>Malpighia emarginata</i> Sessé & Moc. ex DC.) submetidas ao tratamento com colchicina.....	28
Figura 8 – Lâmina de fotos capturadas no software <i>Dinocapture</i> de todos os tratamentos do acesso Cabocla.....	29
Figura 9 – Lâmina de fotos capturadas no software <i>Dinocapture</i> de todos os tratamentos do acesso Costa Rica.....	29
Figura 10 – Lâmina de fotos capturadas no software <i>Dinocapture</i> de todos os tratamentos do acesso Flor Branca.....	30
Figura 11 – Lâmina de fotos capturadas no software <i>Dinocapture</i> de todos os tratamentos do acesso Rubra.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resumo da análise de variância para a variável comprimento de estômatos em folhas de gemas de cultivares de aceroleira (<i>Malpighia emarginata</i> Sessé & Moc. ex DC.) submetidos a aplicação de diferentes concentrações de colchicina durante 24h e 48h – Cultivar Cabocla.....	32
Tabela 2 – Comparação dos comprimentos médios de estômatos em folhas de aceroleira da cultivar Cabocla submetida a aplicação de diferentes concentrações de colchicina (0; 0,05; 0,1; 0,2 e 0,3%) durante 24h e 48h.....	32
Tabela 3 – Resumo da análise de variância para a variável comprimento de estômatos em folhas de gemas de cultivares de aceroleira (<i>Malpighia emarginata</i> Sessé & Moc. ex DC.) submetidos a aplicação de diferentes concentrações de colchicina durante 24h e 48h – Flor Branca.....	33
Tabela 4 – Comparação dos comprimentos médios de estômatos em folhas de aceroleira cultivar Flor Branca submetida a aplicação de diferentes concentrações de colchicina durante 24h e 48h.....	34
Tabela 5 – Resumo da análise de variância para a variável comprimento de estômatos em folhas de gemas de cultivares de aceroleira (<i>Malpighia emarginata</i> Sessé & Moc. ex DC.) submetidos a aplicação de diferentes concentrações de colchicina durante 24h e 48h – Cultivar Costa Rica.....	35
Tabela 6 – Comparação dos comprimentos médios de estômatos em folhas de aceroleira da cultivar Costa rica submetida a aplicação de diferentes concentrações de colchicina durante 24h e 48h.....	36
Tabela 7 – Resumo da análise de variância para a variável comprimento de estômatos em folhas de gemas de cultivares de aceroleira (<i>Malpighia emarginata</i> Sessé & Moc. ex DC.) submetidos a aplicação de diferentes concentrações de colchicina durante 24h e 48h – Cultivar Rubra.....	38
Tabela 8 – Comparação dos comprimentos médios de estômatos em folhas de aceroleira da cultivar Rubra submetida a aplicação de diferentes concentrações de colchicina durante 24h e 48h.....	38

APLICAÇÃO DE COLCHICINA PARA INDUÇÃO DE POLIPLÓIDIA EACEROLEIRA: CARACTERIZAÇÃO MORFOMÉTRICA DOS ESTÔMATOS

RESUMO

A aceroleira (*Malpighia emarginata* Sessé & Moc. ex DC.) pertence à família Malpighiaceae que conta com cerca de 1.300 espécies e aproximadamente 75 gêneros. É uma espécie originária da América Central, Noroeste da América do Sul e Antilhas. Diversas ferramentas têm sido utilizadas por programas de melhoramento para a obtenção de genótipos superiores, e a poliploidia tem sido uma delas, fazendo uso de substâncias antimitóticas para promover a indução da formação de poliploides. O presente trabalho teve como objetivo estudar o uso da colchicina em cultivares da coleção do Banco Ativo de Germoplasma de aceroleira da Embrapa Semiárido como indutor da poliploidização. A aplicação da colchicina foi realizada em diferentes concentrações (0, 0,05, 0,1, 0,2 e 0,3%) em quatro cultivares de aceroleira: (Cabocla, Rubra, Flor Branca, e Costa Rica) durante 24h ou 48h. Inicialmente as plantas foram podadas e, em seguida, foram aplicados os tratamentos utilizando-se algodões umedecidos com as diferentes concentrações de colchicina nas gemas axilares. Após aguardar os períodos de 24h ou 48h, os algodões foram removidos e as gemas lavadas com água destilada. Em seguida, as folhas dos ramos recém crescidos foram coletadas e levadas para laboratório para as análises morfométricas. O experimento foi desenvolvido em esquema fatorial 4 (cultivares) x 5 (concentrações de colchicina) x 2 (tempo de aplicação da colchicina) distribuídos em delineamento em blocos ao acaso. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e as médias foram agrupadas pelo método de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade. As análises foram realizadas utilizando-se o software Genes. Os resultados obtidos mostraram que houve diferença entre os cultivares em relação aos efeitos da colchicina sobre o número e tamanho dos estômatos nos cultivares Cabocla e Flor Branca, evidenciando uma possível indução de poliploidia.

Palavras-chave: *Malpighia emarginata* D.C; aplicação e concentração de colchicina; duplicação do número de cromossomos.

COLCHICINE APPLICATION FOR POLYPLOIDY INDUCTION IN BARBADOS CHERRY: MORPHOMETRIC CHARACTERIZATION OF STOMATA

ABSTRACT

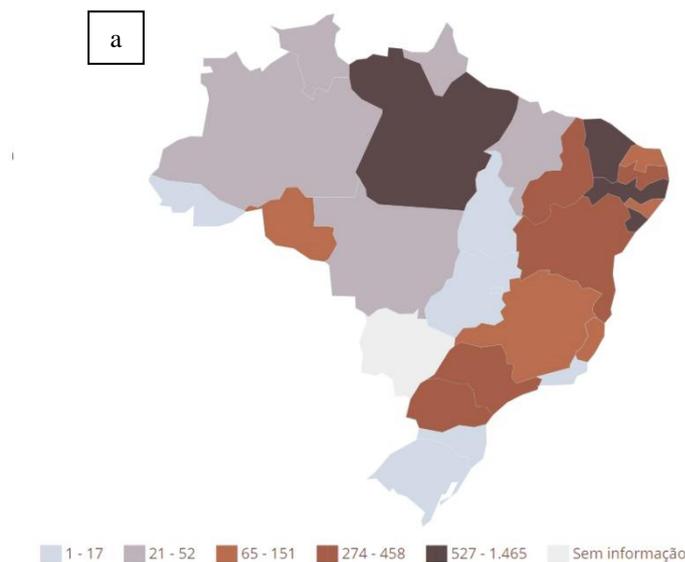
Barbados cherry (*Malpighia emarginata* Sessé & Moc. ex DC.) belongs to the *Malpighiaceae* family, which has about 75 genera and 1,300 species. It was originated in Central America, Northwest South America and Antilles. Several tools have been used by breeding programs to obtain superior genotypes, being polyploidy one of them, using antimetabolic substances to induce polyploid formation. The present work aimed at studying the use of the antimetabolic colchicine, applied topically in accessions of the collection of Barbados cherry from the Active Germplasm Bank of Embrapa Semi-Arid as polyploidization inducer, characterizing and evaluating the effect of colchicine applied in different concentrations (0; 0.05; 0.1; 0.2; 0.3) on number and size of stomata of four accessions. The study was carried out at the Laboratory of Plant Biotechnology and at a greenhouse of Embrapa Semi-Arid. The Barbados cherry accessions Cabocla, Rubra, Flor Branca and Costa Rica were used. Initially the plants were pruned and the treatments using cotton soaked with the different concentrations of colchicine were applied in the axillary buds. After 24 and 48 hours, the cottons were removed and the buds were washed with distilled water. After the growth of branches with completely expanded leaves, these were collected and taken to the laboratory for morphometric analysis. The experiment was carried out in a randomized block design in a factorial scheme 4 (cultivars) x 5 (colchicine concentrations) x 2 (colchicine application time). The obtained data were subjected to analysis of variance, the means were grouped by the Scott-Knott grouping method at 5% probability level and the Genes software was used for the analyses. The results showed that there was difference among accessions regarding the effects of colchicine. It was found that the use of colchicine promoted an increase in chromosome number in Cabocla and Flor Branca accessions, showing a possible induction of polyploidy.

Keyword: *Malpighia emarginata* D.C; colchicine application and concentration: doubling the number of chromosomes

1. INTRODUÇÃO

A aceroleira (*Malpighia emarginata* D.C) pertence à família Malpighiaceae que conta com cerca de 1.300 espécies distribuídas em aproximadamente 75 gêneros (SOUZA e LORENZI, 2008). E tem a América Central, Noroeste da América do Sul e Antilhas como sua origem (SHINOHARA et al., 2015). Foi introduzida no Brasil no ano de 1956 expandindo-se rapidamente por todo território nacional (GONZAGA NETO et al., 1994). O Brasil apresenta condições ideais para o seu cultivo, sendo um dos maiores produtores mundiais (PEREIRA et al., 2013). Essa rápida expansão despertou no meio científico grande interesse, o que fez com que diversos programas de melhoramento para a cultura fossem desenvolvidos.

Esse interesse na aceroleira é devido principalmente por seu fruto apresentar um alto teor de vitamina C, com relatos de variedades com teores entre 1.040 a 1.790mg/100g de polpa do fruto, além de ser também fonte de pró-vitamina A, ferro e cálcio (CARVALHO et al., 2018). É também utilizada para a produção de diversos produtos como sucos, geleias, sorvetes dentre outros, evidenciando assim sua grande importância econômica (MANICA, 2003; CAETANO et al., 2012), destacando-se o uso da vitamina C oriunda da aceroleira na indústria farmacêutica (LIMA et al., 2003). No ano de 2017 o Brasil colheu 66.966 toneladas de acerola em 5.753 hectares, sendo a região Nordeste e o Estado de São Paulo os maiores produtores (Figura 1). No estado de Pernambuco onde foram colhidos 1.465 hectares, o município de Petrolina destacou-se com 855 hectares colhidos, sendo responsável por 21.351 toneladas da produção nacional (Figura 2), (IBGE, 2017).



(b)

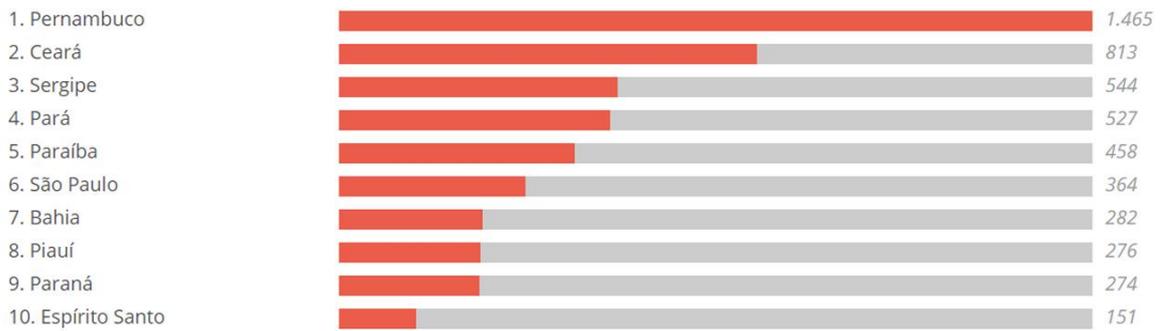
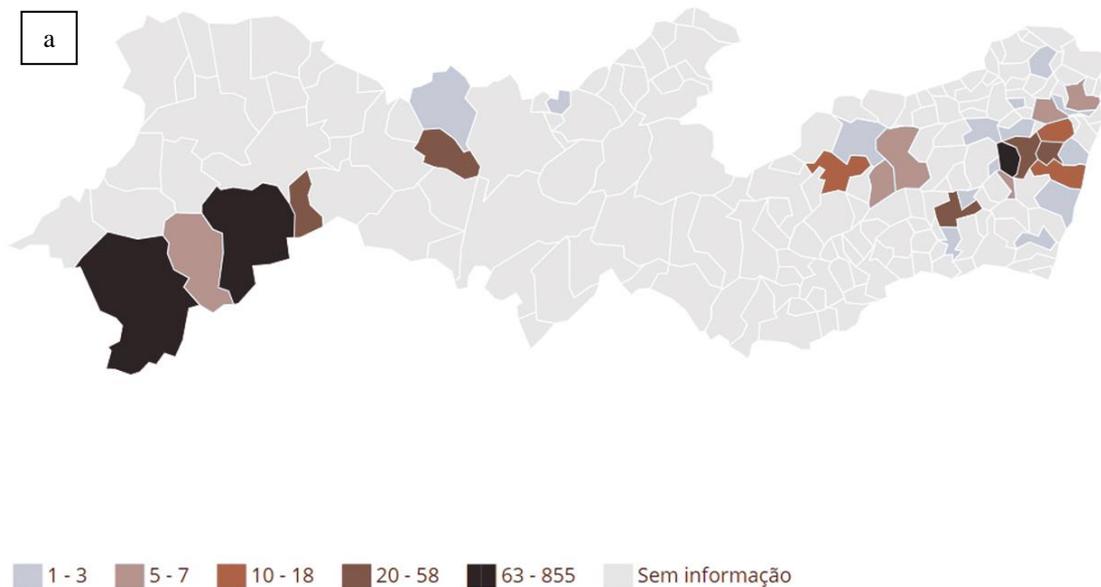


Figura 1 – (a) Mapa das áreas colhidas de acerola em hectares no Brasil; (b) *Ranking* dos estados por área colhida (Fonte: IBGE, 2017).



(b)

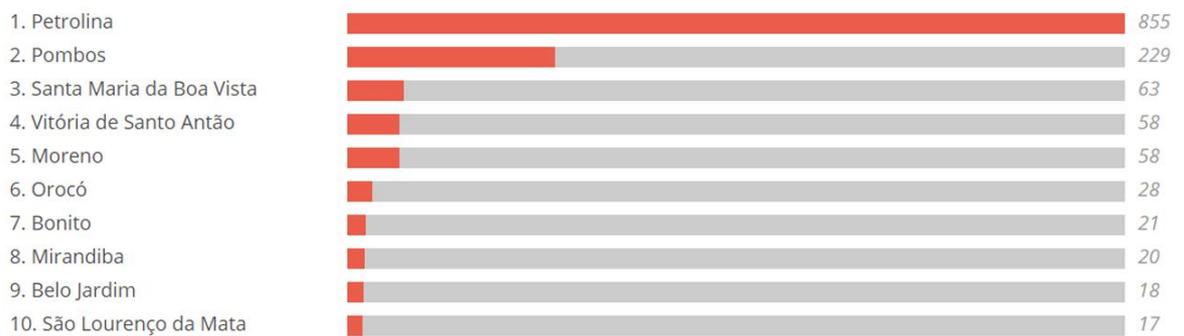


Figura 2 – (a) Mapa das áreas colhidas de acerola em hectares no estado de Pernambuco; (b) *Ranking* das cidades do estado de Pernambuco por área colhida (Fonte: IBGE, 2017).

Por outro lado, mesmo com uma extensa área plantada e com uma quantidade razoável de cultivares, a carência de materiais com melhores características agrônomicas e atributos sensoriais e nutracêuticos tem refletido numa baixa valorização do fruto, principalmente para sua comercialização *in natura*.

A procura da sociedade por uma melhor qualidade de vida está diretamente ligada à sua alimentação, e isso tem gerado um aumento na demanda por alimentos que, além de cumprirem suas funções nutricionais básicas, oferecem maiores benefícios à saúde. Espécies vegetais têm contribuído desde os primórdios como fonte de substâncias úteis ao tratamento de doenças que acometem o ser humano (BELWAL et al., 2018). Na literatura é relatado a aplicabilidade da acerola, como agente antioxidante, além de metabólitos secundários presentes em seu fruto, que possuem grande potencial antimicrobiano (REZENDE; NOGUEIRA; NARAIN, 2017).

Em diversas áreas, a versatilidade de uso de *Malpighia emarginata* colocam a acerola em destaque como fonte de tecnologias ainda pouco conhecidas (NOGUEIRA et al., 2019). Nesse contexto, a busca por inovações tecnológicas que impulsionam o desenvolvimento tende a auxiliar o aumento da produtividade e a geração de ganhos econômicos (ACIOLI; ABUD; JÚNIOR, 2015).

A aceroleira é considerada uma das principais frutíferas cultivadas no Nordeste do Brasil, sendo uma espécie que produz frutos com propriedades nutracêuticas importantes (alimentos ou parte de alimentos que apresentam benefícios à saúde, incluindo a prevenção e/ou tratamento a doenças). No entanto, a elevada acidez e baixos teores de açúcares fazem com que os frutos sejam pouco consumidos no mercado *in natura*. Na literatura não são encontrados trabalhos de melhoramento genético com acerola, o que deixa mais evidente a importância de se buscar realizar trabalhos com esta cultura.

A indução de poliploidia tem demonstrado ser uma importante ferramenta utilizada por programas de melhoramento, visando obter plantas com melhores qualidades, constituindo assim, uma das alternativas para tentar suprir essa carência de materiais com características superiores. Muitas mudanças genômicas ocorrem após o processo de poliploidização, e na maioria dos casos os indivíduos poliploides gerados após estas mudanças são superiores em muitos aspectos morfológicos, adaptabilidade genética e tolerância a ambientes com maior grau de estresse. Os indivíduos poliploides podem apresentar também algumas mudanças em sua fisiologia, como maior resistência a doenças e alterações em suas características de cultivo, como o florescimento e a qualidade pós-colheita. Estas mudanças são bem apreciadas visto que

podem contribuir para um maior sucesso comercial das culturas agrícolas e hortícolas (RIDDLE et al., 2006; XIONG et al., 2006; DHOOGHE et al., 2011).

Para induzir a poliploidização se faz necessário usar um agente que pode ser ele físico ou químico, de modo a interferir na formação do fuso mitótico (QUADER, 1998). Um dos agentes químicos mais utilizados na promoção da poliploidização é a colchicina, que é um alcalóide responsável por bloquear a divisão celular na metáfase e induzir a duplicação do número de cromossomos, gerando uma divisão celular incorreta que produz células com diferentes níveis de ploidia. Estas células podem ter seu número cromossômico multiplicado, produzindo indivíduos poliploides, que irão possivelmente apresentar características diferentes do material doador (EIGSTI; DUSTIN, 1955; DHOOGHE et al., 2011).

Um dos métodos utilizados para estimativa do nível de ploidia é a análise morfométrica dos estômatos. É uma metodologia simples e fácil que pode identificar supostos poliploides pela contagem e medição comparativas dos estômatos, visto que normalmente há um aumento do comprimento do estômato como consequência do aumento do número de cromossomos (VICHATO et al., 2006).

Assim, o presente trabalho teve como objetivo estudar o uso da colchicina em cultivares da coleção do Banco Ativo de Germoplasma de aceroleira da Embrapa Semiárido como indutor da poliploidização, avaliando o efeito da aplicação em diferentes concentrações sobre o tamanho dos estômatos de quatro cultivares. Espera-se com esta pesquisa subsidiar o programa de melhoramento genético pela obtenção de novas progênies, utilizando a poliploidia como uma valiosa ferramenta a ser mais explorada, com possibilidade de aumentar a variabilidade, produtividade e qualidade da aceroleira.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Descrição botânica da Aceroleira

A aceroleira (*Malpighia emarginata* Sessé & Moc. ex DC.) da família *Malpighiaceae* tem registradas 1.300 espécies pertencentes a aproximadamente 75 gêneros (SOUZA; LORENZI, 2008). (ALVES; SEBASTIANI, 2015). Em sua maioria, as espécies do gênero *Malpighia* são diploides, ou seja, $2n = 2x = 20$, havendo relatos de tetraploides com $2n = 4x = 40$ (LOMBELLO; FORNI-MARTINES, 2003).

A aceroleira de uma forma geral é uma planta que possui um porte arbustivo, podendo variar entre 2,5 m a 3 m de altura e apresentar copas tanto compactas como mais abertas (RITZINGER; RITZINGER, 2011). Seu sistema radicular pode ser formado por uma raiz pivotante ou por raízes axiais, e a maioria de suas raízes se localizam mais próximo da superfície do solo (LOPES; PAIVA, 2002; MANICA et al., 2003). Sua folhagem é do tipo simples, inteira e com distribuição pelos ramos de forma opostas, com coloração verde-escura e brilhante em sua face adaxial e um tom mais desbotado na sua face abaxial. Seus pecíolos podem ser tanto ovalados ou elípticos. Quando novos os ramos e folhas apresentam pelos que quando em contato com a pele podem ocasionar irritação.

Suas flores estão dispostas em cachos nas axilas das folhas de ramos mais novos ou quando em caso de surtos vegetativos nos esporões laterais. Possui tanto cinco sépalas como pétalas do tipo franjadas e que a depender do genótipo podem ter cores diferentes indo do branco a alguns tons de rosa. Seus estames são em um total de dez, possui três estiletos e três carpelos que unidos formam o ovário globular do tipo súpero, trilocolado onde em cada lóculo contém um óvulo. Em seu cálice para cada sépala há duas grandes glândulas que ficam na parte basal externa (JOLY, 1983). Seus grãos de pólen possuem coloração amarela, pegajosidade, e sua disseminação é unicamente realizada através de insetos polinizadores, tais como as abelhas do gênero *Centris* spp, e dependendo do acesso a viabilidade polínica pode variar entre 10% e 90% (RITZINGER; RITZINGER, 2011). Lopes e Paiva (2002) através de um estudo buscaram estimar a taxa de cruzamento da aceroleira, e com os dados obtidos perceberam que a espécie expressa-se ser predominantemente do tipo alógama, isto devido à grande variabilidade fenotípica observada nos pomares, o que indica que haja uma recombinação. Os autores concluem, que em condições experimentais, a autofecundação dos botões florais pode reduzir a fixação dos frutos, quando comparado com cruzamento artificial e polinização natural.

A aceroleira produz frutos do tipo drupas, tricarpelados e com o epicarpo fino. Sua polpa (mesocarpo) é carnosa e succulenta podendo apresentar-se nas cores vermelha, amarela e laranja. Possui três caroços de geometria triangular e alongados e em cada um pode se ter uma semente ou não. Suas sementes são pequenas, não albuminadas e de diferentes tamanhos, sendo proporcionais ao tamanho do fruto; sua germinação é baixa e a depender da maturação do fruto pode demorar meses para germinarem, o que faz com que seja comum acontecer de se ter sementes inviáveis para uma próxima germinação. Em geral a quantidade de caroços com sementes varia de 20% a 5%; apenas um ou dois dos três óvulos existentes se desenvolverem, seja por má formação do óvulo, falta de fertilização, degeneração do saco embrionário, entre outros (COSTA et al., 2003; RITZINGER; RITZINGER, 2011).

O formato do fruto pode variar, às vezes arredondado, outras ovalado ou até mesmo achatado. Sua superfície pode ser totalmente alisada, ou com a presença de sulco rasos ou profundos. Quando imaturo o fruto tem a coloração esverdeada, mas pode se encontrar alguns frutos ainda com cores acinzentadas ou um tom mesclado entre as cores verde e roxo. Já quando maduros podem ser notados frutos com cores vermelho-amarelados, vermelho-alaranjados ou um vermelho-purpura.

O fruto da aceroleira possui vitaminas A, B1, B2, C (até 100 vezes mais do que em outras frutas cítricas com laranja, limão, etc.), proteínas, cálcio, fósforo e ferro. O valor calórico está em torno de 6 kcal em 100 gramas de polpa (AZEVEDO, 2019).

2.2 Histórico de introdução, cultivo e importância econômica

A introdução da aceroleira no Brasil ocorreu especificamente no Estado de Pernambuco no ano de 1956 pela professora da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Maria Celene C. de Almeida, utilizando sementes obtidas em Porto Rico (COUCEIRO, 1985) e, com pouco tempo depois, a acerola foi difundida por todo Nordeste e para outras regiões do país. Atualmente a aceroleira é cultivada em todo o território nacional, com destaque para os estados da Bahia, Ceará, Paraíba e Pernambuco (CODEVASF, 2019).

No ano de 2017 o Brasil colheu 66.966 toneladas de acerola em 5.753 hectares cujos maiores produtores estão localizados na região Nordeste e no estado de São Paulo (IBGE, 2017).

O cultivo da aceroleira, especificamente no Submédio do Vale do São Francisco, deu-se também em meados dos anos 1980, e teve seu auge entre 1988 e 1992 quando a demanda

pela acerola foi alta, principalmente pelo mercado internacional, e uma das empresas que mais impulsionou este processo foi a Nichirei Agrícola do Brasil – Niagro (OLIVEIRA et al., 1998).

O cultivo de acerola vem se acentuando, o que tem despertado interesse entre os produtores e consumidores brasileiros ou estrangeiros, seja *in natura* ou por subprodutos industriais (FRANZÃO; MELO, 2019). Poucos países cultivam comercialmente a acerola e o Brasil se sobressaem nesse contexto, sendo atualmente o maior produtor, exportador e consumidor (SILVEIRA et al., 2020).

O fruto da aceroleira pode ser aproveitado de diversas formas, como: elaboração de polpas, sucos, compotas, doces, geleias, licores e até refrigerantes (MANICA, 2003; CAETANO et al., 2012), sendo que a polpa congelada, o suco engarrafado e o fruto *in natura* são as formas mais comercializadas (YAMASHITA et al., 2003). Outro mercado em que a vitamina C vem sendo amplamente utilizada é o farmacêutico, onde o ácido ascórbico é extraído servindo de matéria prima para confecção de diversos produtos (LIMA et al., 2003). A utilização da vitamina C é um dos grandes alvos da indústria cosmética devido às suas aplicações e resultados satisfatórios (VIDAL; FREITAS, 2015).

A acerola pode ser classificada como ácida, semidoce e doce a depender do seu teor de sólidos solúveis e acidez titulável para frutos maduros. Essas diferenças de classificação é que determinam para que público-alvo o fruto será destinado; os ácidos são mais bem aproveitados pela indústria de processamento, os doces para consumo *in natura*, e os semidoces abrangendo ambos os mercados (RITZINGER; RITZINGER, 2009).

A forma de propagação pode definir a uniformidade do plantio na aceroleira (GOMES et al., 2000). Entre os cultivares de aceroleiras existentes, a seleção normalmente é obtida por propagação vegetativa de plantas visando fixar características fenotípicas superiores. Por outro lado, nos anos entre 1980 e 1990 houve um rápido aumento das áreas cultivadas com acerola, sendo elas predominantemente propagadas através de sementes, o que resultou em pomares com grande variabilidade genética, por isso, no âmbito comercial, a propagação por sementes não é tão desejável por proporcionar plantas desuniformes, o que pode refletir na sua qualidade e produtividade (RITZINGER; RITZINGER, 2011).

Entretanto apesar de existir uma quantidade razoável de cultivares de aceroleira, ainda há uma certa escassez de cultivares que possuam características agronômicas e atributos sensoriais e nutracêuticos em níveis adequados, como frutos sem sementes ou com sementes menores, conseqüentemente um fruto com mais polpa, mais saborosos e menos perecíveis, além

da presença de teores relevantes de carotenoides e antocianinas, características estas desejáveis especialmente para suprir o mercado de frutos *in natura*. Portanto, com características como essas, o consumo e a demanda pela acerola seriam maiores, o que aumentaria a produção dos produtores (SOUZA et al., 2013). Muitos clones comerciais foram produzidos, mas grande parte favorece ao processamento industrial e pouco ao consumo *in natura*.

2.3 Cultivares e melhoramento genético

Em um levantamento realizado no Submédio do Vale do São Francisco, foi constatado que os cultivares de aceroleira mais cultivadas na região são os clones Junko, BRS Sertaneja, BRS Cabocla, Costa Rica, Flor Branca, Okinawa, Coopama N°1 e Nikki (SOUZA et al., 2013).

Por outro lado, a primeira cultivar desenvolvida na região como resultado de um projeto de melhoramento foi a cultivar Sertaneja, lançada pela Embrapa Semiárido no ano de 1998, a partir de um programa de melhoramento que visava selecionar plantas com genótipos superiores para serem implantadas em áreas irrigadas do Nordeste. Este programa de melhoramento foi iniciado em 1992 com o objetivo principal de introduzir, caracterizar, selecionar e difundir genótipos que fossem superiores no Submédio do Vale do São Francisco. Para isso, foram realizadas coletas nos estados da Bahia, Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte, sendo a maior parte dos cultivares obtidos via formação de mudas por estaquias ou enxertias. A partir dessa iniciativa foi criado o Banco Ativo de Germoplasma de Aceroleira da Embrapa Semiárido, estabelecido e implantado no Campo Experimental de Bebedouro, localizado nas proximidades da cidade de Petrolina-PE. O primeiro clone selecionado pelo programa foi o CPATSA 4.3, que apresentava uma alta produtividade, produção após seis meses do plantio em campo, e frutos com teores de vitamina C bem superiores a 1.500 mg/100 g de polpa. Este clone foi lançado pela Embrapa no ano de 1998 com o nome de ‘Sertaneja BRS 152’. Ao final dos anos 1990 já existiam 44 instituições no Brasil realizando pesquisas com acerola (OLIVEIRA et al., 1998). Porém, o mercado para a acerola começou a se desvalorizar, o que acabou por provocar na comunidade científica um desinteresse em continuar os estudos com a espécie, restando apenas alguns pequenos grupos isolados que ainda realizavam trabalhos com a planta, como a Embrapa. No ano de 2002 a Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical lançou a cultivar Cabocla e, no ano de 2004, a cultivar Rubra. Em 2003 as cultivares Apodi, Cereja, Roxinha e Frutacor foram lançadas pela Embrapa Agroindústria Tropical.

Atualmente existem registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), 14 cultivares de aceroleira. Porém este número se mostra maior na literatura, onde encontramos registros que nos pomares brasileiros são cultivados em torno de 25 clones, e dentre estes, oito são encontrados em cultivo na região do Submédio do Vale do São Francisco, sendo elas: ‘Junko’, ‘Flor Branca’, ‘BRS Sertaneja’, ‘Costa Rica’, ‘Okinawa’, ‘Nikki’, ‘Coopama N°1’ e ‘BRS Cabocla’. A exigência do mercado por cultivares com melhores características agronômicas seja para as indústrias de processamento ou para seu consumo *in natura*, tem impulsionado diversos programas de melhoramento em várias instituições de pesquisa. Com esta exigência por um alto padrão de qualidade, os frutos cada vez mais precisam apresentar as características desejáveis, e para isso a seleção das plantas é um ponto chave. As plantas devem ter uma alta taxa de frutificação, frutos cada vez maiores e mais suculentos, com teores de vitamina C acima de 1.000 mg de ácido ascórbico/100 g de polpa, um teor de sólidos solúveis (°Brix) mais elevado e com estrutura firme a fim de se evitar danos ao serem transportados.

A partir de 2012 foi iniciado o estabelecimento de uma nova coleção de cultivares de aceroleira pela Embrapa Semiárido, formada com amostras coletadas em diversas regiões produtoras de acerola, sendo esses enxertados e implantados no Campo Experimental de Bebedouro, que inicialmente totalizavam 32 cultivares (SOUZA et al., 2012). Já no ano de 2014 a Embrapa Semiárido passou a contar com cerca de 80 cultivares de aceroleira, sendo 32 oriundos de coletas realizadas nos estados de Pernambuco e Ceará (SOUZA et al., 2014). No entanto, levando em consideração a busca pelo desenvolvimento de cultivares para consumo *in natura*, a partir da seleção de genótipos superiores, a coleção existente na Embrapa Semiárido ainda carece desse tipo de material (SOUZA et al., 2013).

2.4. Poliploidia

2.4.1 Conceito

A poliploidização é tido como um dos processos evolutivos mais importantes na especiação de plantas superiores (SOLTIS et al. 2014). É a partir desse processo que se dá origem a um indivíduo poliploide com número de cromossomos equivalente a um múltiplo superior a dois genomas haploides. Muitas espécies encontradas na natureza são poliploides, e sua origem se deu por meio de gametas que não sofreram redução ou duplicação espontânea do zigoto na primeira divisão celular, o que lhes garantem uma maior adaptabilidade ao ambiente (SCHIFINO-WITTMANN, 2004).

2.4.2 Formas de ocorrência

Na natureza a poliploidização pode acontecer de forma sexual ou somática. A primeira ocorre a partir da união de gametas não reduzidos dando origem a um organismo que possui mais de dois conjuntos cromossômicos no mesmo núcleo. Já a somática é resultado de uma falha que ocorre na divisão mitótica quando a célula duplica seu material genético, porém não chega a completar a mitose, voltando a interfase com material genético duplicado (SOLTIS, SOLTIS; TATE, 2003). É de se esperar que os indivíduos poliploides se mostrem superiores aos diploides em muitas características, isso devido às características de adaptabilidade serem controladas por muitos alelos distribuídos em vários cromossomos (SIMION, 2004).

2.4.3 Características

Durante o processo evolutivo dos poliploides a poliploidia pode não ter tanto impacto em mutações individuais, mas, quando coletivamente, pode originar características diferentes submetidas ao controle de múltiplos alelos. Uma das vantagens do aumento de poliploidia é o fato de que efeitos de mutações deletérias possam ser mascarados por um efeito tamponante comum nos indivíduos poliploides, cujo efeito silencia essas mutações devido ao seu número maior de cópias gênicas (SILVA Jr., 2008).

Apesar da duplicação cromossômica não introduzir um novo material genético e apenas produzir cópias adicionais de genes e cromossomos já existentes, muitas mudanças genômicas ocorrem depois do processo de poliploidização (RANNEY, 2006). Estes eventos de duplicação podem causar mudanças fenotípicas, fisiológicas, genômicas e ecológicas nos poliploides quando comparados com seus progenitores diplóides (BALAO et al. 2016; HUSBAND et al. 2016; SOLTIS et al. 2014, 2016; VALLEJOMARÍN et al. 2016). Normalmente em indivíduos poliploides essas mudanças os tornam superiores em aspectos morfológicos, adaptabilidade genética e tolerância a ambientes com maior grau de estresse (XIONG et al., 2006). Os poliploides também podem apresentar mudanças em sua fisiologia, como resistência a doenças e em suas características de cultivo, como florescimento e qualidade no pós-colheita. Assim essas mudanças são bem apreciadas visto que podem contribuir para um maior sucesso comercial das culturas agrícolas e hortícolas (RIDDLE et al., 2006; XIONG et al., 2006; DHOOGHE et al., 2011).

A poliploidia é uma ferramenta utilizada para melhorar plantas com a finalidade de aperfeiçoar suas qualidades, bem como também pode ser usada para o processo de transferência gênica entre diferentes níveis de ploidia (WITMANN e DALL; AGNOL, 2003). A duplicação do genoma dentro de um único organismo é uma fonte de inovação, tendo um grande potencial

para gerar especiação através de barreiras reprodutivas com o genótipo progenitor (HEGARTY et al., 2013). Logo as plantas poliploides têm despertado bastante interesse para os cientistas ao longo dos anos, isso devido a sua grande importância na história evolutiva e ao seu potencial agrônomo, sendo sua produção artificial frequentemente realizada.

2.4.4 Indução e importância

Para induzir a poliploidização se faz necessário usar um agente que pode ser ele físico ou químico, de modo a interferir na formação do fuso mitótico. Uma das maneiras para se produzir plantas com o dobro dos cromossomos é através de interferências no ciclo mitótico. O ciclo celular pode ser interrompido por uma grande variedade de compostos químicos. Mas somente aqueles que o interferem entre o fim da fase S e o início da citocinese permitem a indução da duplicação cromossômica (DHOOGHE et al., 2011). O fuso é constituído por microtúbulos compostos basicamente por heterodímeros de α -tubulina e β -tubulina que alinham-se formando uma estrutura cilíndrica (QUADER, 1998).

Estes microtúbulos desempenham funções celulares que são importantes ao decorrer do crescimento e do ciclo mitótico, participando de inúmeros processos que envolvem a migração dos cromossomos, estruturação celular, orientação e disposição das microfibrilas de celulose, formação da parede celular, movimento intracelular e diferenciação celular, logo são essenciais para o processo de divisão e sobrevivência da célula (MOREJOHN; FOSKET 1991; JORDAN; WILSON, 1999).

Os agentes químicos utilizados para induzir a poliploidia são conhecidos como substâncias antimitóticas, que agem sobre as fibras do fuso acromático quando está ocorrendo o processo de divisão celular evitando-se que ocorra sua polimerização ou propiciando sua fragmentação, não deixando assim que ocorra a separação dos cromossomos na anáfase. Desta maneira, logo após o DNA se replicar, a célula possuirá o dobro de material genético inicial, porém essa não se divide por falta das fibras do fuso e volta assim à interfase com o dobro do número de cromossomos (PEREIRA et al., 2012).

O descobrimento dessas substâncias antimitóticas se deu na década de 1930 do século passado, quando foi descoberta a colchicina, dando início a experimentos para induzir poliploidia (DHOOGHE et al., 2011). A colchicina é um alcaloide extraído de sementes e bulbos da planta *Colchicum autumnale* L. que provoca falhas no ciclo mitótico da célula, fazendo com que a divisão celular ocorra de forma errada, produzindo células com diferentes níveis de ploidia (EIGSTI; DUSTIN, 1955; DHOOGHE et al., 2011). Os primeiros resultados

de duplicação cromossômica decorrentes de poliploidização induzida com colchicina foram apresentados por Blakeslee e Avery em seu trabalho, *Methods of inducing doubling of chromosomes in plants: by treatment with colchicine*, que para o melhoramento vegetal foi um grande avanço (SORIANO et al., 2007; GLOWACKA et al., 2009). Algumas outras substâncias antimitóticas como o APM (Amiprofos-methyl), orizalina e a atrifulina tem efeito similar à da colchicina, podendo também ser utilizadas para induzir poliploidia (SALON; EARLE, 1998; SCAGLIUSI et al., 2009; QUESENBERRY et al., 2010).

A poliploidização tem sido uma importante estratégia utilizada por programas de melhoramento devido a inúmeras vantagens como a possibilidade de ampliação da base genética, restaurar híbridos interespecíficos inférteis, obter linhagens em um curto espaço de tempo e a viabilização de cruzamentos de genótipos com ploidias diferentes (BARBOSA et al., 2007; CAMPOS et al., 2009; ISHIGAKI et al., 2009; SOUZA-KANESHIMA, 2010).

Por apresentarem grande importância evolutiva e potencial agrônômico, as plantas poliplóides são objeto de interesse científico há muitos anos, sendo frequentemente produzidas artificialmente. De acordo com Hegarty, et al. (2013), em sua revisão sobre poliploides artificiais, os primeiros poliploides induzidos artificialmente remontam as primeiras décadas do século passado. Criados acidentalmente por Winkler em 1916, os primeiros poliploides artificiais eram células provenientes de calos de *Solanum*. Mas foi na década de 1930 que foram relatadas as primeiras aplicações da poliploidização na agricultura, por Blakeslee e Avery (1937).

2.4.5 Métodos de determinação do nível de ploidia

Algumas metodologias podem ser utilizadas para a determinação direta ou indireta da poliploidização. Dentre elas temos a citogenética, citometria de fluxo e a análise morfométrica dos estômatos. A realização de análises citogenéticas é um processo demorado e um tanto trabalhoso, exigindo de quem for fazê-lo muita experiência na área. A citometria de fluxo é um processo rápido e relativamente fácil, contudo exige equipamentos mais sofisticados, o que faz com que seja difícil de se encontrar locais em que se possa realizar esta análise. Já a caracterização morfométrica dos estômatos, que por meio da avaliação de algumas características da planta, como por exemplo, tamanho e a densidade dos estômatos foliares, é uma maneira indireta de identificar possíveis poliploides (VANDENHOUT et al., 1995; MAGALLANES et al., 1996; SOUZA; QUEIRÓZ, 2004). É uma metodologia simples e fácil que pode identificar supostos poliploides pela contagem e medição comparativas dos

estômatos, visto que normalmente há um aumento do comprimento do estômato quando o número de cromossomos aumenta.

2.5 Caracterização morfométrica dos estômatos

Os estômatos são pequenos orifícios localizados principalmente na superfície das folhas e estão relacionados diretamente com a entrada de CO₂ e a perda de água via transpiração, sendo o principal mecanismo regulador destes processos (MENDONÇA, 2016).

A palavra estômato vem do grego (stoma) e significa boca. Dessa forma, o nome atribuído se dá pelo fato de que suas estruturas, vistas ao microscópio, assemelham-se a pequenas bocas. O estômato é constituído por duas células guardas e um orifício central denominado e poro estomático, ostíolo ou abertura estomática e seu tamanho médio varia de 3 a 12 μm de largura por 7 a 40 μm de comprimento e um conjunto de células adjacentes às células-guarda, que se diferem ou não das demais células da epiderme (VIEIRA et al., 2010). Quando as células na linha mais próxima das células-guarda (adjacentes) não se diferem das demais células da epiderme, elas são chamadas de células vizinhas, mas quando estas células se diferenciam em textura, tamanho ou até mesmo em forma, são denominadas subsidiárias. O conjunto formado pelo estômato, mais as células vizinhas ou subsidiárias, constitui o complexo estomático ou aparato estomático (METCALFE; CHALK, 1950; ESAU, 1960; PANT, 1965; STACE, 1965; VAN COTTEN, 1970; WILKINSON, 1979; CARPENTER, 2005). O estômato é fundamental para a sobrevivência das plantas terrestres, em termos evolutivos e essa estrutura teve uma importante contribuição para que os vegetais ocupassem o ambiente terrestre (JONES, 2013).

2.5.1 Densidade estomática e a relação com a fisiologia das plantas.

Comumente, as características analisadas acerca de respostas estruturais dos estômatos são densidade estomática e índice estomático (MARTINS, 2010). A densidade estomática está relacionada com o tamanho, posição e controle da abertura estomática, uma maior densidade e menor tamanho dos estômatos aumenta a resistência estomática e, conseqüentemente, limita o excesso de perda de água por transpiração, afetando a absorção do CO₂ (SILVA, 2008). Dessa forma, para Martins (2010), é esperado que as alterações na densidade estomática sejam acompanhadas de alterações em diferentes níveis e escalas anatômicas e fisiológicas nas plantas. Os estômatos fazem parte dos dois mais importantes processos que ocorrem em todas as plantas terrestres: a fotossíntese e a transpiração (PES; ARENHARDT, 2015).

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, a análise estomática torna-se 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). Assim, a caracterização do material pode ser realizada por comparações entre os estômatos dos poliploides com os de plantas diploides (normais). Portanto, a alteração no tamanho das células-guarda de estômatos de folhas de plantas tratadas com colchicina pode ser utilizada como característica indicativa da existência de poliploidia. Diversos trabalhos de indução de poliploidia em vegetais utilizaram essa característica para selecionar supostos poliploides, como em *Manihot esculenta* (GRANER, 1942), *Cattleya intermedia* (SILVA et al., 2000), *Heliconia bihai* (CAVALCANTE-FILHO, 2011), *Centella asiática* (KAENSAKSIRI et al., 2011), *Gerbera jamesonii* (GANTAIT et al., 2011) e *Lagerstroemia indica* (WANG et al., 2012), além de outros relatos (VANDENHOUT et al., 1995; MAGALHAES et al., 1996; SOUZA; QUEIROZ, 2004). A presente pesquisa utilizou a análise morfométrica como metodologia para indicar a eficácia do uso da colchicina como indutor de poliploidização.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de condução e materiais do trabalho

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Semiárido, sediada em Petrolina-PE, entre janeiro de 2019 a março de 2020. Foram utilizados quatro cultivares de aceroleira oriundos do Banco Ativo de Germoplasma de Aceroleira da Embrapa Semiárido, sendo um indivíduo de Cabocla, quatro de Rubra, um de Flor Branca, e três de Costa Rica.

O experimento foi conduzido em vasos mantidos em casa de vegetação na Embrapa Semiárido. Antes de dar início ao experimento, as plantas de cada acesso cultivadas em vasos foram podadas com o intuito de induzir a formação de novas brotações (Figura 3).



Figura 3 – Plantas dos cultivares de aceroleira (*Malpighia emarginata* Sessé & Moc. ex DC.) cultivadas em vasos e utilizadas para indução de poliploidia com o uso de colchicina. (a) Vasos na casa de vegetação com plantas ainda sem poda; (b) Planta podada e pronta para aplicação da colchicina.

3.2 Indução de poliploidia

Logo após a realização da poda das folhas e ramos, as gemas axilares restantes das plantas foram envolvidas com algodão umedecido em solução aquosa de colchicina nas concentrações de 0,05, 0,1, 0,2 e 0,3%, protegidas com papel alumínio e identificadas com fitas coloridas. Os algodões permaneceram na planta pelos períodos de 24h ou 48h; cada planta recebeu os quatro tratamentos (concentrações de colchicina) distribuídos pelos ramos. Não houve aplicação de diferentes tratamentos no mesmo ramo, onde cada ramo recebeu apenas um tratamento. Após passado os períodos de 24h ou 48h, os algodões foram removidos e as gemas lavadas com água destilada, visando a retirada do excesso de colchicina. Após 15 dias da aplicação foi realizada uma avaliação para verificar se houve ou não o crescimento de ramos e folhas. Nos novos ramos desenvolvidos foram coletadas no mínimo três folhas e levadas para laboratório para análise. Na Figura 4 se ilustra os principais passos realizados durante a aplicação dos tratamentos e coleta de folhas.

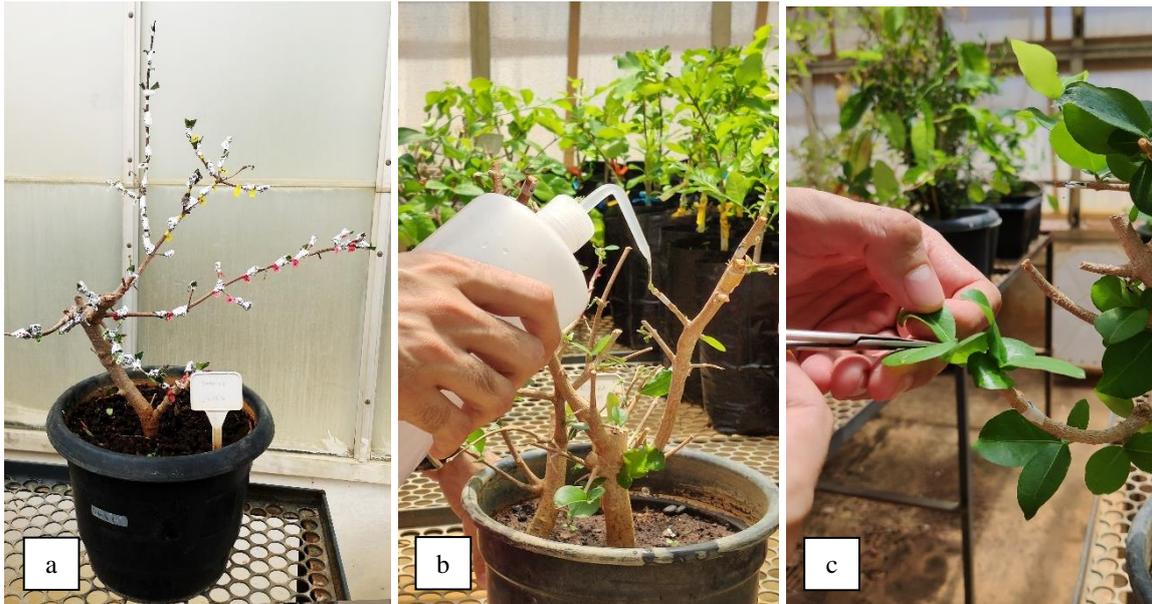


Figura 4 – Visão geral das plantas dos cultivares de aceroleira (*Malpighia emarginata* Sessé & Moc. ex DC.) durante e após a aplicação tópica de colchicina em gemas foliares axilares. (a) Gemas tratadas com diferentes concentrações de colchicina e recobertas com papel alumínio; (b) Lavagem das gemas com água destilada após os prazos de 24 ou 48 h para retirada do excesso de colchicina; (c) Coleta das novas folhas após 15 dias para análise em laboratório.

Para análise no laboratório, as folhas foram acondicionadas em recipiente com papel umedecido com o intuito de minimizar a perda de água. Com o auxílio de uma lupa e uma lâmina de bisturi foi feita a retirada de uma fina película da face abaxial de cada folha, sendo esta colocada em uma lâmina de vidro de microscopia preparada com uma gota de água destilada. Após esse procedimento foi adicionada à lâmina uma gota de corante carmin acético sobre o material vegetal e, por fim, coberto com uma lamínula de 22 x 22 mm. Foram preparadas uma lâmina para cada folha coletada. As lâminas prontas foram analisadas em um microscópio óptico com objetiva de aumento de 40x, sendo as imagens observadas capturadas com o auxílio do software *Dinocapture* (Figura 5).

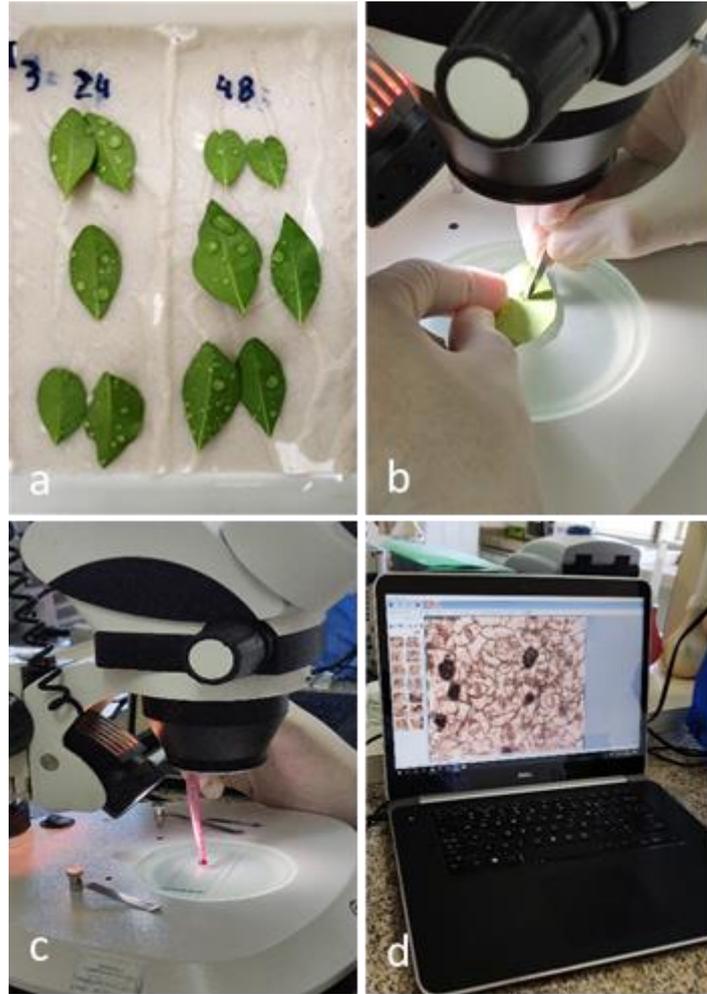


Figura 5 – Etapas de conservação (a), isolamento da película dos tecidos da epiderme da face abaxial de folhas (b), coloração com carmin acético (c) e captura de imagens dos estômatos (d) de folhas de aceroleira (*Malpighia emarginata* Sessé & Moc. ex DC.) submetidas ao tratamento com colchicina.

3.3 Análise morfométrica dos estômatos

Com o auxílio do software *Dinocapture* foram fotografados 10 campos aleatórios da película retirada de cada folha, totalizando 30 campos para cada tratamento com colchicina e tempo de exposição. Desses campos, foram selecionados 10, de maneira aleatória para a contagem do número de estômatos por área fotografada, bem como a medição do comprimento de 25 estômatos selecionados aleatoriamente (Figura 8, 9, 10, 11).

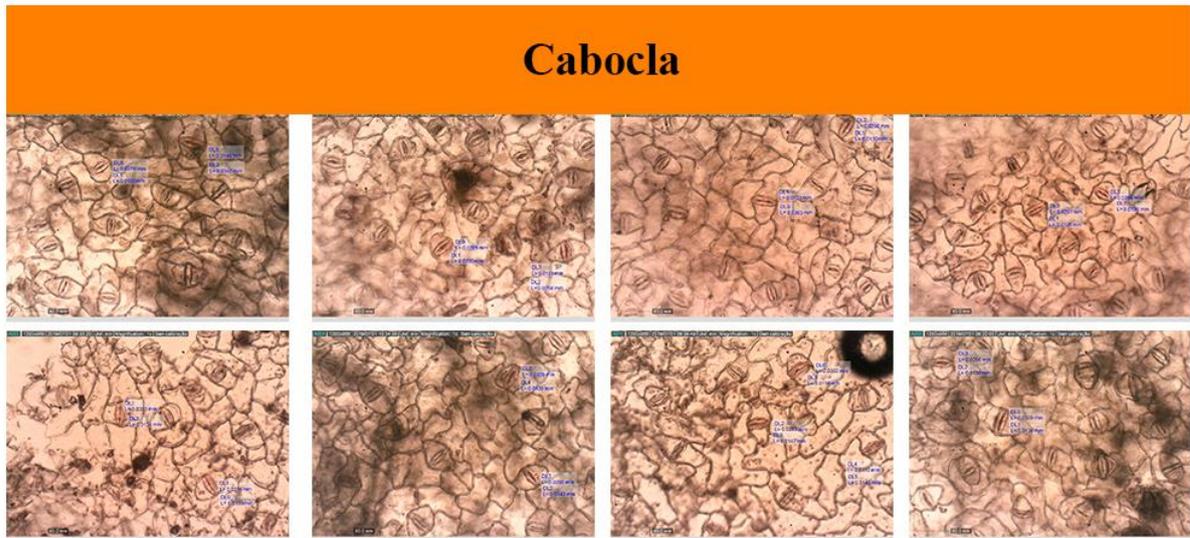


Figura 8 – Lâmina de fotos capturadas no software Dinocapture de todos os tratamentos do acesso Cabocla.

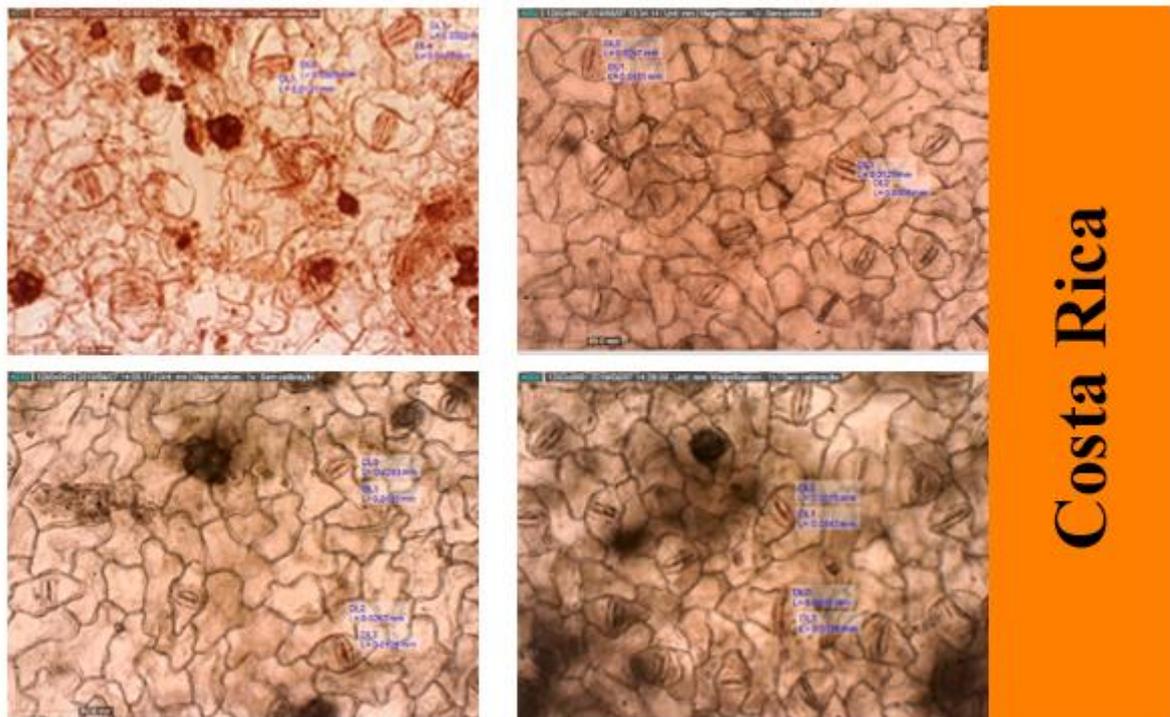


Figura 9 – Lâmina de fotos capturadas no software Dinocapture de todos os tratamentos do acesso Costa Rica.

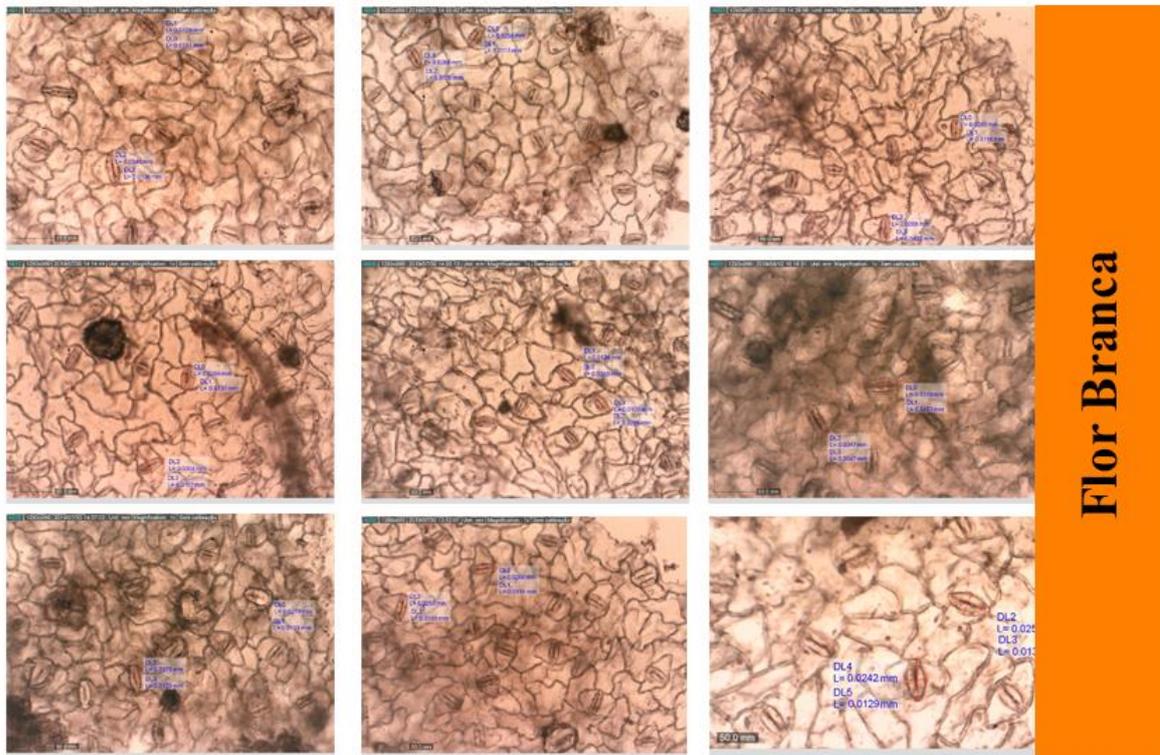


Figura 10 – Lâmina de fotos capturadas no software Dinocapture de todos os tratamentos do acesso Flor Branca

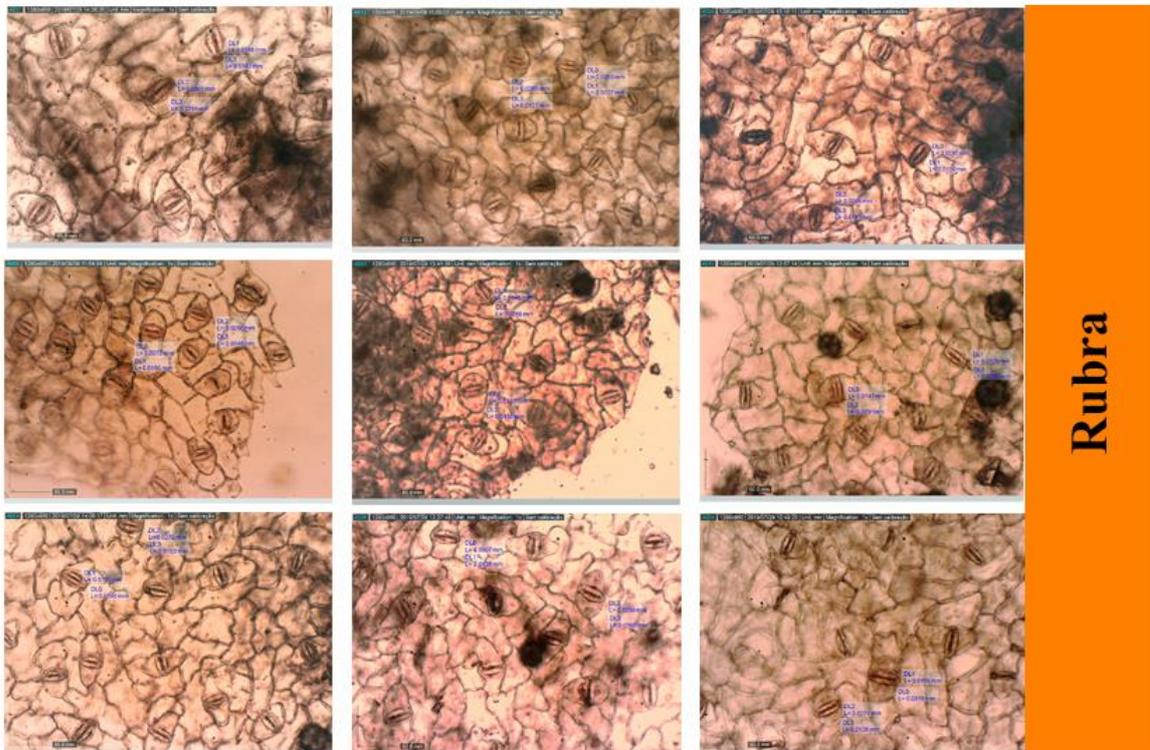


Figura 11 – Lâmina de fotos capturadas no software Dinocapture de todos os tratamentos do acesso Rubra.

3.4 Análise estatística

O experimento foi desenvolvido em esquema fatorial 4 (cultivares) x 5 concentrações de colchicina) x 2 (tempo de aplicação da colchicina) distribuídos em delineamento experimental inteiramente casualizado. Entretanto, análises individuais, por cultivares, foram realizadas visando uma melhor visualização dos resultados. Os dados obtidos foram submetido a análise de variância e as médias foram agrupadas pelo método de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade. As análises foram realizadas utilizando-se o software Genes (CRUZ, 2013).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da análise de variância encontram-se na Tabela 1. Houve significância estatística para o efeito de tratamentos que envolve a interação *concentração x tempo* para comprimento dos estômatos (CE) na cultivar Cabocla.

Tabela 1 – Resumo da análise de variância para a variável comprimento de estômatos em folhas de gemas de cultivares de aceroleira (*Malpighia emarginata* Sessé & Moc. ex DC.) submetidos a aplicação de diferentes concentrações de colchicina durante 24h e 48h – Cultivar Cabocla.

Fonte de variação	G.L.	F
Tratamento	9	1420,78*
Resíduo	162	-
C.V. (%)	4,11	

*= significativo a 1% pelo teste F.

O comportamento para Cabocla em relação ao comprimento médio dos estômatos após a aplicação das diferentes concentrações de colchicina por 24h e 48h, encontram-se na Tabela 2. Constata-se que houve diferença entre as concentrações e tempo de exposição. Quase todos os tratamentos apresentaram médias de comprimento acima do valor médio do controle, com exceção do tratamento (T2C5), em que não houve brotações nas gemas que receberam este tratamento. Estes resultados sinalizam uma possível indução da poliploidia, visto que o aumento do tamanho dos estômatos frequentemente está correlacionado com o aumento do número cromossômico, conforme relatado na literatura (VICHATO et al., 2006).

Tabela 2 – Comparação dos comprimentos médios de estômatos em folhas de aceroleira da cultivar Cabocla submetida a aplicação de diferentes concentrações de colchicina (0; 0,05; 0,1; 0,2 e 0,3%) durante 24h e 48h.

Tratamento	Tamanho estômatos (média) (μm)	Desvio Padrão (μm)	
(T1C1Cul1)	25,40	3,0	d
(T1C2Cul1)	29,50	2,0	a
(T1C3Cul1)	27,90	2,0	b
(T1C4Cul1)	27,80	1,0	b
(T1C5Cul1)	27,80	1,0	b
(T2C1Cul1)	25,40	3,0	d
(T2C2Cul1)	28,80	1,0	a
(T2C3Cul1)	27,70	1,0	b
(T2C4Cul1)	26,40	1,0	c
(T2C5cul1)	0,00	0,0	e

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de agrupamento de Scott-KnT1- 24h; T2 - 48h; C1- 0% controle; C2 – 0,05%; C3 – 0,1%; C4 - 0,2%; C5 - 0,3%.

Em trabalho sobre indução de poliploidia em *Heliconia bihai* L. realizado por Cavalcanti Filho (2011), foi relatado que os tratamentos com 0,05 e 0,1% de concentração de colchicina apresentaram médias do comprimento dos estômatos superiores ao controle, sendo o tratamento 0,05% no período de aplicação de 48h o que apresentou maior valor médio. Esse resultado é semelhante aos obtidos no nosso trabalho, diferindo apenas que a maior média do tamanho dos estômatos já foi observada no tratamento com colchicina no período de 24h, assim como também no tratamento durante 48h.

Os resultados da análise de variância para cultivar Flor Branca encontram-se na Tabela 3. Assim como para cultivar Cabocla, a Flor Branca apresentou significância estatística para o efeito de tratamento.

Tabela 3 – Resumo da análise de variância para a variável comprimento de estômatos em folhas de gemas de cultivares de aceroleira (*Malpighia emarginata* Sessé & Moc. ex DC.) submetidos a aplicação de diferentes concentrações de colchicina durante 24h e 48h – Flor branca.

Fonte de variação	G.L.	F
Tratamento	9	57,18*
Resíduo	162	-
C.V. (%)	4,64	

*= significativo a 1% pelo teste F.

A resposta da aceroleira cultivar Flor Branca em relação ao comprimento médio dos estômatos após a aplicação das diferentes concentrações de colchicina por 24h e 48h, encontram-se na Tabela 4. Constata-se que houve diferença para o efeito dos tratamentos entre as concentrações e tempo de exposição. Todos os tratamentos apresentaram médias de comprimento dos estômatos acima do valor médio do controle.

Tabela 4 – Comparação dos comprimentos médios de estômatos em folhas de aceroleira cultivar Flor Branca submetida a aplicação de diferentes concentrações de colchicina durante 24h e 48h.

Tratamento	Tamanho estômatos (média) (μm)	Desvio Padrão (μm)	
(T1C1cul2)	23,90	1,0	e
(T1C2cul2)	28,40	4,0	c
(T1C3cul2)	26,30	1,0	d
(T1C4cul2)	28,30	2,0	c
(T1C5cul2)	26,60	1,0	d
(T2C1cul2)	23,90	1,0	e
(T2C2cul2)	26,90	1,0	d
(T2C3cul2)	30,70	3,0	a
(T2C4cul2)	28,20	3,0	c
(T2C5cul2)	29,50	3,0	b

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de agrupamento de Scott-Knott.

T1- 24h; T2 - 48h; C1- 0% controle; C2 – 0,05%; C3 – 0,1%; C4 - 0,2%; C5 - 0,3%.

Há vários relatos sobre a correlação da aplicação de colchicina e aumento do tamanho dos estômatos. Em *Citrullus lanatus*, por exemplo, o uso de colchicina nas concentrações de 0,1% e 0,2% por 48h, resultou em aumento do comprimento médio dos estômatos, sendo o tratamento 0,1% o que apresentou maior valor médio (HANDAYANI et al., 2018), assemelhando-se ao obtido neste trabalho para a cultivar Flor Branca. O autor relatou ainda que todos os tratamentos com colchicina apresentaram médias dos tamanhos dos estômatos superiores ao controle, resultado que também observamos tanto para cultivar Cabocla (com exceção ao tratamento 0,3% no período de 48h), como para a cultivar Flor Branca.

Outros relatos indicam que o uso de colchicina tem efeito significativo no aumento do tamanho dos estômatos foram realizados em *Phalaenopsis amboinensis*, *Maranta arundinacea* L., *Glycyrrhiza glabra* var. *glandulifera* e *Carthamus tinctorius* L. (FITDIAN et al., 2006; MOGHBEL et al., 2015).

De uma maneira geral, o tamanho dos estômatos está correlacionado com o nível de ploidia dentro de um mesmo táxon, conforme descrito em vários estudos. Por exemplo, em trabalho realizado em *Bromis inermis*. Tan e Dunn (1973) utilizaram a análise do comprimento dos estômatos para distinguir os níveis de ploidia da espécie. Przywara et al., (1988) demonstraram que o comprimento estomático em Kiwi aumentava significativamente conforme o nível de ploidia também aumentava. Em *Coffea* L. Mishra (1997) também constatou que em todas as cultivares avaliadas o comprimento estomático aumentou com o aumento do nível de ploidia.

Alguns exemplos do uso de colchicina demonstram sua eficácia na indução de poliploidia. Beck et al., (2003), por exemplo, conseguiram induzir com sucesso a tetraploidia

em *Acacia mearnsii* a partir de sementes tratadas com colchicina. Nesse caso, o comprimento estomático foi um dos parâmetros utilizados para esta determinação, observando-se que todas as mudas originadas das sementes tratadas apresentaram estômatos com comprimentos maiores do que os indivíduos diploides não tratados. Ainda nesse trabalho, os resultados mostraram que o comprimento estomático pode ser utilizado para distinguir diploides de tetraploides. Em pesquisa realizada por Miao et al., (2016) com *Dendranthema indicum* var. *aromacticum* e por Shala et al., (2018) com *Catharanthus roseus* foi observado que os estômatos das plantas diploides tiveram valores médios do comprimento dos estômatos inferiores aos valores observados para os estômatos de plantas tetraploides. Miao et al., (2016) ainda destacaram que a concentração de colchicina como a duração do tratamento foram fatores-chaves no processo. Já Shala et al., (2018) demonstraram que tetraploides de *Catheranthus roseus* podem ser induzidos através do tratamento com colchicina em concentrações de 0,05, 0,1 e 0,2%. Tais resultados fortalecem a possibilidade de ter ocorrido indução de poliploidia em aceroleira para as cultivares Cabocla e Flor branca.

Por outro lado, as cultivares Costa Rica e Rubra apresentaram um cenário totalmente contrário ao que foi observado nas cultivares Cabocla e Flor Branca. De uma maneira geral, ambas cultivares apresentaram os estômatos das folhas de gemas que receberam tratamento com colchicina com tamanho médio inferior ao controle, com exceção do tratamento 0,05% no tempo 48h na cultivar Rubra, que apresentou um sutil aumento em relação ao controle (Tabelas 6 e 8).

Os resultados da análise de variância da Costa Rica e Rubra encontram-se na Tabela 5 e 7 respectivamente. Houve significância estatística para o efeito de tratamentos para comprimento dos estômatos (CE) na cultivar Costa Rica.

Tabela 5 – Resumo da análise de variância para a variável comprimento de estômatos em folhas de gemas de cultivares de aceroleira (*Malpighia emarginata* Sessé & Moc. ex DC.) submetidos a aplicação de diferentes concentrações de colchicina durante 24h e 48h – Cultivar Costa Rica

Fonte de variação	G.L.	F
Tratamento	9	7168,32*
Resíduo	162	-
C.V. (%)	3,71	

*= significativo a 1% pelo teste F.

Tabela 6 – Comparação dos comprimentos médios de estômatos em folhas de aceroleira da cultivar Costa rica submetida a aplicação de diferentes concentrações de colchicina durante 24h e 48h.

Tratamento	Tamanho estômatos (média) (μm)	Desvio Padrão (μm)	
(T1C1cul3)	30,70	1,0	a
(T1C2cul3)	18,00	1,0	c
(T1C3cul3)	17,50	1,0	d
(T1C4cul3)	18,10	1,0	c
(T1C5cul3)	19,60	1,0	b
(T2C1cul3)	30,70	1,0	a
(T2C2cul3)	8,30	1,0	f
(T2C3cul3)	0,00	0,0	g
(T2C4cul3)	8,70	0,4	e
(T2C5cul3)	0,00	0,0	g

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de agrupamento de Scott-Knott. T1- 24h; T2 - 48h; C1- 0% controle; C2 – 0,05%; C3 – 0,1%; C4 - 0,2%; C5 - 0,3%.

Tabela 7 – Resumo da análise de variância para a variável comprimento de estômatos em folhas de gemas de cultivares de aceroleira (*Malpighia emarginata* Sessé & Moc. ex DC.) submetidos a aplicação de diferentes concentrações de colchicina durante 24h e 48h – Cultivar Rubra.

Fonte de variação	G.L.	F
Tratamento	9	3187,34*
Resíduo	162	-
C.V. (%)	1,94	

*= significativo a 1% pelo teste F.

Tabela 8 – Comparação dos comprimentos médios de estômatos em folhas de aceroleira da cultivar Rubra submetida a aplicação de diferentes concentrações de colchicina durante 24h e 48h.

Tratamento	Tamanho estômatos (média) (μm)	Desvio Padrão (μm)	
(T1C1cul4)	33,40	2,0	b
(T1C2cul4)	32,40	2,0	c
(T1C3cul4)	32,00	1,0	d
(T1C4cul4)	23,30	1,0	g
(T1C5cul4)	16,00	0,5	i
(T2C1cul4)	33,40	2,0	b
(T2C2cul4)	33,80	2,0	a
(T2C3cul4)	24,60	1,0	e
(T2C4cul4)	24,00	1,0	f
(T2C5cul4)	17,80	1,0	h

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de agrupamento de Scott-Knott. T1- 24h; T2 - 48h; C1- 0% controle; C2 – 0,05%; C3 – 0,1%; C4 - 0,2%; C5 - 0,3%.

As cultivares Costa Rica e Rubra sofreram mais com a exposição à colchicina, possivelmente devido a uma maior susceptibilidade ao antimitótico. Nesse caso, observou-se em ambas as cultivares que as médias foram decrescendo tanto com o aumento da concentração como em relação ao tempo de exposição.

Na cultivar Costa Rica verificou-se que a queda na média do comprimento dos estômatos foi mais evidente no período de 48h de aplicação. Nos tratamentos 0,1% e o 0,3% por 48h as gemas não chegaram nem a brotar. Esse efeito pode ser relacionado ao fato da colchicina possuir gradientes de toxicidade, conforme relatado por Beck et al., (2003) em trabalho realizado com *Acacia mearnsii*, onde a mortalidade aumentou em todos os tratamentos com colchicina com o aumento da sua concentração, assim como também pelo aumento do tempo de exposição. Assim, percebe-se que a colchicina possui um grau de toxicidade associado ao tipo de material biológico. Suas especificidades em relação a interação com a colchicina, puderam ser vistas no presente trabalho em que dentro de uma mesma espécie, cultivares diferentes demonstraram respostas diferentes.

Finalmente, pode-se observar que a colchicina foi eficiente para promover o aumento do tamanho dos estômatos via aplicação tópica em gemas nodais nos cultivares Cabocla e Flor Branca, indicando também uma possível indução de poliploidia, conforme vários relatos da literatura.

5. CONCLUSÕES

Dentre as cultivares de aceroleira, a Flor Branca foi que melhor respondeu à aplicação da Colchicina, seguida da Cabocla. Os acessos Costa Rica e Rubra apresentaram-se estatisticamente inferiores, ou não significativos, quando comparados ao controle, demonstrando que a metodologia aplicada para indução de poliploidia nestas cultivares não foi eficiente, considerando as concentrações e períodos aplicados.

6. REFERÊNCIAS

- ACIOLI, G. R.; ABUD, A. K. S.; JUNIOR, A. M. O. Prospecção Tecnológica da Indústria Farmacêutica no Brasil. In: ENCONTRO NORDESTINO DE ETNOBIOLOGIA E ETNOECOLOGIA, 1995, Aracajú, Anais [...]. Aracajú: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2015. v.3, n.1, p.185-191.
- ALVES G. G. N., SEBASTIANI, R. Malpighiaceae na Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba, Santo André, SP, Brasil, São Paulo, 2015. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2236-89062015000300521. Acesso em: 27 de dezembro 2020.
- AZEVEDO R. B. Acerola. [S. l.], 2019. Disponível em: <https://www.portalsaofrancisco.com.br/alimentos/acerola>. Acesso em: 27 de dezembro 2020. PDF 9418-Texto do artigo-51543.
- BALAO F., TANNHÄUSER M., LORENZO M. T., HEDRÉN M., PAUN O. 2016 Genetic differentiation and admixture between sibling allopolyploids in the *Dactylorhiza majalis* complex. *Heredity*, 116, 351-361.
- BARBOSA, S.; DAVIDE, L. C.; PEREIRA, A. V.; ABREU, J. C. de. Duplicação cromossômica de híbridos triploides de capim elefante e milheto. *Bragantia*, v.66, n.3, p.365-372, 2007.
- BELWAL, T., DEVKOTA, H. P., HASSAN, H. A., Ahluwalia, S., Ramadan, M. F., Mocan, A., & Atanasov, A. G. 2018. Phytopharmacology of Acerola (*Malpighia* spp.) and its potential as functional food. *Trends in Food Science & Technology*, 74, 99–106.
- CAETANO, P.K.; DAIUTO, É.R.; VIEITES, R.L. 2012. Característica físico-química e sensorial de geleia elaborada com polpa e suco de acerola. *Brazilian Journal of Food Technology*, 15(3): 191-197.
- CAMPOS, J. M. S.; DAVIDE, L. C.; SALGADO, C. C.; SANTOS, F. C.; COSTA, P. N.; SILVA, P. S.; ALVES, C. C. S.; VICCINI, A. V.; PEREIRA, A. V. In vitro induction of hexaploid plants from triploid hybrids of *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum*. *Plant Breeding*, v.128, n.1, p.101-104, 2009.
- CARPENTER K. J. Stomatal architecture and evolution in basal angiosperms. *American Journal of Botany*, California: v. 92, p. 1595–1615, Out/2005.
- CARVALHO, M. E. A.; PIOTTO, F. A.; NOGUEIRA, M. L.; GOMES-JUNIOR, F. G.; CHAMMA, H. M. C. P.; PIZZAIA, D.; AZEVEDO, R. A. 2018. Cadmium exposure triggers

genotype-dependent changes in seed vigor and germination of tomato offspring. *Protoplasma*, 255, 989-999. doi:10.1007/s00709-018-1210-8.

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

Codevasf. Censo frutícola 2001. Brasília, 2001. Disponível em: <<http://www.codevasf.gov.br/fruticultura/>>. Acesso em: 18 de maio 2019.

COSTA, L.C.; PAVANI, M. C. M. D.; VITTIMORO, F.; PERECIN, D. Viabilidade de sementes de acerola (*Malpighia emarginata* DC): Avaliação da vitalidade dos tecidos. *Revista Brasileira de Fruticultura*. Jaboticabal, SP. v. 25, n. 3, p. 532- 534, 2003.

COUCEIRO, E. M. 1985. Curso de extensão sobre a cultura da acerola. Recife, Universidade Federal Rural de Pernambuco. 45 p.

CRUZ, C. D. Genes: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum. Agronomy*, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.

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

EIGSTI, O. J.; DUSTIN, P. Jr. Colchicine in agriculture, medicine, biology and chemistry. Ames, Iowa, U.S.A.; The Iowa State College Press, 1955, 470 p.

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

FITDIAN, G. A. 2006. Pengaruh Pemberian Colchicine Pada Tanaman Anggrek (*Phalaenopsis amboinensis*). [Thesis}. Universitas Muhammadiyah. Malang.

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

GLOWACKA, K.; Jez, S.; Kaczmarek, Z. Polyploidization of *Miscanthus sinensis* and *Miscanthus x giganteus* by plant colchicine treatment. *Industrial Crops and Products*, v.30, p. 444-446, 2009.

GOMES, J. E.; PERECIN, D.; MARTINS, A. B. G.; Ignácio, N. Enraizamento de estacas herbáceas de genótipos de acerola em câmara de nebulização intermitente tratadas com ácido indolbutírico em duas épocas. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 22, n. 3, p. 407-412, 2000.

GONZAGA NETO, L. Melhoria genética da aceroleira na Embrapa Semiárido. In: QUEIROZ, M. A. de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. (Ed.). Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro. Petrolina: Embrapa Semiárido; Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. Np.

GONZAGA NETO, L.; SOARES, J. M. Acerola para exportação: aspectos técnicos de produção. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI: FRUPEX, 1994. 43 p. (FRUPEX. Publicações Técnicas, 10).

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

HANDAYANI, Rd & YUSUF, MUHAMAD & AKMAL, AJMIR. 2018. Potential Changes in Watermelon (*Citrullus lannatus*) Ploidy Treated By Colchicine. *Journal of Tropical Horticulture*. 1. 10. 10.33089/jthort.v1i1.6.

HEGARTY, M.; COATE, J.; SHERMAN-BROYLES, S.; ABBOTT, R.; HISCOCK, S.; DOYLE, J. 2013. Lessons from Natural and Artificial Polyploids in Higher Plants. *Cytogenetic and Genome Research*. 140:204-225.

IBGE. 2017. Censo Agropecuário. Disponível em: <https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/templates/censo_agro/resultadosagro/agricultura.html?localidade=0&tema=76215>. Acesso em: 07 de nov. de 2020.

ISHIGAKI, G.; SUENAGA, K.; AKASHI, R. Induction of tetraploid ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*) plants by colchicine treatment of *in vitro* multiple-shoot clumps and seedlings. *Grassland Science*, v.55, n.3, p.164-170, 2009.

JOLY, A. B. *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*. 6. ed. São Paulo: Nacional, 1983. 778p.

JONES, H. *Plants and microclimate: a quantitative approach to environmental plant physiology*. 3. ed. Cambridge: University Press, 2013.

JORDAN, M. A. & WILSON, L. The use and action of drugs in analyzing mitosis. *Methods in Cell Biology*, 61:267-295, 1999.

- KAENSAKSIRI, T.; SONTORNCHAINAKSENG, P.; SOONTHORNCHAREONNON, N.; PRATHANTURARUNG, S. *In vitro* induction of polyploidy in *Centella asiatica* (L.) Urban. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 107, p. 187–194, nov. 2011.
- LIMA, V. L. A. G.; MELO, E. A.; MACIEL, M. L. S.; LIMA, D. E. S. Avaliação de teor de antocianinas em polpa de acerola congelada proveniente de frutos de 12 diferentes aceroleiras. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 23, n. 1, p. 101-103, 2003.
- LOMBELLO, R. A.; Forni-martins, E.R. Malpighiaceae: correlations between habit, fruit type and basic chromosome number. *Acta Botanica Brasilica*, São Paulo, v.17, n.2, p.171-178, 2003.
- LOPES, R.; PAIVA, J. R. Aceroleira. In: BRUCKNER, C.H. *Melhoramento de Fruteiras Tropicais*. Editora Universidade Federal de Vicosa/ UFV. p. 63-99. 2002.
- MAGALLANES M. G. R, PINTO C.A.B.P. & DAVIDE L. C. 1996. Determinação citomorfológica do nível de ploidia de clones de batata (*Solanum tuberosum* L.) obtidos por cruzamentos interespecíficos. *Ciência e Agrotecnologia* 20:480-484.
- MANICA, I. Processamento e aproveitamento da acerola. In: MANICA, I; ICUMA, I. M.; FIORAVANÇO, J. C.; PAIVA, J. R.; PAIVA, M. C.; JUNQUEIRA, N. T. v. *Acerola: tecnologia de produção, pós-colheita, congelamento, exportação, mercados*. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2003. p.337-374.
- MANICA, I.; ICUMA, I.M.; FIORAVANCO, J.C.; PAIVA, J.R.; PAIVA, M.C.; JUNQUEIRA, N.T.V. *Acerola – Tecnologia de produção, pós-colheita, congelamento, exportação, mercados*. Editora Cinco Continentes. 2003. 394 p.
- MARTINS, G. A. Avaliação de Características de Estômatos em Jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) com uso da Geoestatística. Lavras: UFLA, 2010. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal), Universidade de Lavras, 2010.
- MENDONÇA, V. *Biologia: Os seres vivos*. v. 2, 3. ed. São Paulo: AJS, 2016.
- METCALFE, C. R.; CHALK, L. *Anatomy of the dicotyledons*, Clarendon Press, Oxford, v. 2.
- H, MIAO & GAO, WENJIE & GAO, YAOHUI & LIU, YINGZHU & YANG, XUE & JIAO, HONGBIN & ZHOU, YUNWEI. 2016. Polyploidy induced by colchicine in *Dendranthema indicum* var. *aromaticum*, a scented chrysanthemum. *European Journal of Horticultural Science*. 81. 219-226. 10.17660/eJHS.2016/81.4.5.

- MISHRA M. K., Stomatal Characteristics at Different Ploidy Levels in *Coffea* L., *Annals of Botany*, Volume 80, Issue 5, November 1997, Pages 689–692, <https://doi.org/10.1006/anbo.1997.0491>.
- MOGHBEL, N., M. K. BORUJENI, F. BERNARD. 2015. Colchicine effect on the DNA content and stomata size of *Glycyrrhiza glabra* var. *glandulifera* and *Carthamus tinctorius* L. cultured in vitro. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 13: 1–6.
- MOREJOHN, L. C., FOSKET, D. E. 1991. The biochemistry of compounds with antimicrotubule activity in plant cells. *Pharmacology & Therapeutics*. 51: 217-230.
- NOGUEIRA, G. D. R. et al. Analysis of a hybrid packed bed dryer assisted by infrared radiation for processing acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) residue. *Food and Bioproducts Processing*, 114, p. 235–244, 2019.
- OLIVEIRA, J. R. P.; SOARES FILHO, W. dos S.; CUNHA, R. B. da. Guia de descritores de acerola: versão preliminar. Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMPF, 1998. 22 p. (EMBRAPA-CNPMPF. Documentos, 84).
- OUZA-KANESHIMA, A. M. de; SIMIONI, C.; FELISMINO, M. F.; MENDES-BONATO, A. B.; RISSO-PASCOTTO. C.; PESSIM. C.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. do. Meiotic behaviour in the first interspecific hybrids between *Brachiaria brizantha* and *Brachiaria decumbens*. *Plant Breeding*, v.129, n.2, p.186-191, 2010.
- PANT, D. D. On the ontogeny of stomata and other homologous structures. *Plant Sciences, Series (Allahabad)*, v. 1, p. 1–24, 1965.
- PEREIRA, C. T. M. P; SILVA, C. R. P.; LIMA, A.; PEREIRA, D. M.; COSTA, C. N.; NETO, A. A. C. Obtenção, caracterização físico-química e avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* da farinha de resíduo de acerola (*Malpighia glabra* L.). *Acta Tecnológica*, v. 8 (2), 2013.
- PEREIRA, R. C. et al. Duplicação cromossômica de gramíneas forrageiras: uma alternativa para programas de melhoramento genético. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 42, n. 7, p. 1278-1285. 2012.
- PES, L. Z.; ARENHARDT, M. H. *Fisiologia Vegetal*. Santa Maria (RS): Rede e-Tec, 2015.
- PRZYWARA, L., PANDEY, K. K, SANDERS P.M. 1988. Length of stomata as an indicator of ploidy level in *Actinidia deliciosa*. *New Zealand Journal of Botany* 26: 179–182
- QUADER, H. 1998. Cytoskeleton: Microtubules. *Progress in Botany*. 59: 375-395.

- QUESENBERRY, K. H. et al. Doubling the chromosome number of bahiagrass via tissue culture. *Euphytica*, v.17, n.1, p.43- 50(8), 2010.
- RANNEY, T. G. Polyploidy: from evolution to new plant development. *Proceeds of the International Plant Propagators Society*, v.56, p.137–142, 2006.
- REZENDE, Y. R. R. S.; NOGUEIRA, J. P.; NARAIN, N. Comparison and optimization of conventional and ultrasound assisted extraction for bioactive compounds and antioxidant activity from agro-industrial acerola (*Malpighia emarginata* DC) residue. *LWT - Food Science and Technology*, 85, p. 158–169, 2017.
- RIDDLE, N.C.; KATO, A.; BIRCHLER, J.A. Genetic variation for the response to ploidy change in *Zea mays* L. *Theoretical Applied Genetics*, v.114, p.101– 11, 2006.
- RITZINGER, R.; RITZINGER, C. H. S. P. Acerola. In: Santos-Serejo, J. A. dos; Dantas, J. L. L.; Sampaio, C. V.; Coelho, Y. da. S. *Fruticultura tropical: espécies regionais e exóticas*. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. 2009. p. 59-82.
- RITZINGER, R.; RITZINGER, C. H. S. P. Acerola. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v.32, n.264, p.17-25, 2011.
- SALON, P. R.; EARLE, E. D. Chromosome doubling and mode of reproduction of induced tetraploids of eastern gamagrass (*Tripsacum dactyloides* L.). *Plant Cell Reports, Heidelberg*, v. 17, p. 881-885, 1998.
- SHALA, AWAD & DENG, Z. 2019. Investigation of morphological and anatomical changes in *catharanthus roseus* (l.) g. don due to colchicine induced polyploidy. *Scientific Journal of Flowers and Ornamental Plants*. 5. 233-243. 10.21608/sjfop.2018.24216.
- SILVA, E. C. Respostas fisiológicas do umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda) aos estresses hídricos e salino. Recife: UFPE, 2008. Tese (Dotourado em Botânica) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2008.
- SCAGLIUS, S. M. et al. Estudos preliminares sobre o efeito da cafeína na duplicação cromossômica em plantas haplóides de cevada (*Hordeum vulgare* L.). Embrapa, documentos Online, ISSN: 1518-6512, 109, novembro, 2009. Disponível em: Acesso em: 18 jul. 2011.
- SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Poliploidia e seu impacto na origem e evolução das plantas silvestres e cultivadas. *Revista Brasileira de, Pelotas*, v.10, n.2, p.151-157, abr./jun. 2004.

SHINOHARA, N. K. S. *et al.* A Mãe da Acerola (*Malpighia glabra* L.) no Brasil. Revista Eletrônica “Diálogos Acadêmicos”, [S.l.], v. 9, n. 2, p. 49- 63, 2015.

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

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

SILVEIRA G. C. D; ROSSI M.F. M; PECHE P. M. Acerola: Detalhes do cultivo no Brasil. *Campo & Negócio Online*, [s. L.], 24 jun. 2020. Disponível em <https://revistacampoenegócios.com.br/acerola-detalhes-do-cultivo-no-brasil/>. Acesso em: 23 dezembro 2020.

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

SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; TATE, J. A. 2003. Advances in the Study of polyploidy since *Plant speciation*. *New Phytologist*. 161: 173-191

SOLTIS DE, VISGER CJ, SOLTIS O.S. 2014. The polyploidy revolution then... and now: Stebbins revisited. *Am. J. Bot* 101:1057-1078. doi:10.3732/ajb.1400178.

SORIANO, M.; CISTUÉ, L.; VALLÉS, M. P.; Castillo, A. M. Effects of colchicine on anther and microspore culture of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ culture*, 91, p. 225-234, 2007.

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

SOUZA, F. de F.; BRITO, E. T. S.; SANTOS, D. E. P. S.; NASCIMENTO, T. L. do; NASCIMENTO, D. M. do. Caracterização preliminar de cultivares de aceroleira da Embrapa Semiárido. In. CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS, 3., 2014, Santos. Anais... Brasília, DF: Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos, 2014.

SOUZA, F. de F.; DEON, M. D.; CASTRO, J. M. da C. e; LIMA, M. A. C. de; RYBKA, A. C. P. Avaliação preliminar de cultivares de acerola coletados no Vale do São Francisco. In:

- CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 22., 2012, Bento Gonçalves. Anais...Bento Gonçalves: SBF, 2012. 1 CD-ROM.
- SOUZA, F. F.; DEON, M. D.; CASTRO, J. M. C.; LIMA, M. A. C.; RYBKA, A. C. P.; FREITAS, S. T. 60 Principais variedades de aceroleiras cultivadas no Submédio do Vale do São Francisco. Petrolina: 61 Embrapa Semiárido, 2013. 21 p. (Embrapa Semiárido. Documentos, 255).
- SOUZA, V.C.; LORENZI, H. 2008. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II: 1-704. Instituto Plantarum, Nova Odessa
- STACE, C. A. Cuticular studies as an aid to plant taxonomy. *Bulletin of the British Museum (Natural History) Botany*, v. 4, p. 3–78. 1965.
- TAN G.Y, DUNN G. M. 1973. Relationship of stomatal length and frequency and pollen-grain diameter to ploidy level in *Bromus inermis* Leyss. *Crop Science* 13: 332–334.
- VALLEJO-MARÍN, M., A. M. COOLEY, M. Y. Q. LEE, M. R. FOLMER, M. R. MCKAIN, J. R. PUZEY. 2016. Strongly asymmetric hybridization barriers shape the origin of a new polyploid species and its hybrid ancestor. *American Journal of Botany*. 103 (10):1-17. doi: 10.1101/030932
- VAN COTTEN, W. R. J. A. classification of stomatal types. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 63, p. 235–246, Jul/1970.
- VANDENHOUT H, ORTIZ R, VUYLSTEKE D, SWENNEN R & Bai K.V. (1995). Effect of ploidy on stomatal and other quantitative traits in plantain and banana hybrids. *Euphytica* 83:117-122.
- VICHIATO M. R. M, Vichiato M, Castro MC, Dutra LF, Pasqual M, Marchiori-Junior W, Lima CDF e Salgado CC (2006). Análises estomática e morfométrica de folhas de plantas diplóides e tetraplóides de *Dendrobium nobile* Lindl. *Revista Ceres* 53: 541-548.
- VIDAL, P. C. L.; FREITAS, G. Estudo da antioxidação celular através do uso da vitamina C. *Revista UNINGÁ Review*, V.21, n.1, p.60-64 ,2015.
- VIEIRA, E. L. *et al.* Manual de Fisiologia Vegetal. São Luis (MA): EDUFMA, 2010.

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

WILKINSON, H. P. The plant surface (mainly leaf). In C. R. Metcalfe and L. Chalk [eds.], Anatomy of the dicotyledons, Clarendon Press, Oxford, 2nd ed., vol. 1, p. 97– 165. 1979.

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.

XIONG, Y. C.; LI, F. M.; ZHANG, T. Performance of wheat crops with different chromosome ploidy: root-sourced signals, drought tolerance, and yield performance. Planta, v.224, p.710–718, 2006.

YAMASHITA, F.; BENASSI, M. T.; TONZAR, A. C. et al. Produtos de acerola: estudos da estabilidade de vitamina C. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v.23, n.1, p.92-94, 2003.