

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal

Sara Malveira Costa Vieira

PARÂMETROS PARA POLIPLÓIDIZAÇÃO
***IN VITRO* DE *ADENIUM OBESUM*: CONTRIBUIÇÕES PARA O MELHORAMENTO**
DE PLANTAS ORNAMENTAIS

Montes Claros

2025

Sara Malveira Costa Vieira

**PARÂMETROS PARA POLIPLOIDIZAÇÃO
IN VITRO DE *ADENIUM OBESUM*: CONTRIBUIÇÕES PARA O MELHORAMENTO
DE PLANTAS ORNAMENTAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal.

Orientador(a): Silvia Nietzsche

Coorientador (a): Claudinéia Ferreira Nunes

Clívia Carolina Fiorilo Possobom

Montes Claros

2025

Vieira, Sara Malveira Costa.

V658p
2026

Parâmetros para poliploidização in vitro de *Adenium obesum* [manuscrito]: contribuições para o melhoramento de plantas ornamentais/ Sara Malveira Costa Vieira. Montes Claros, 2026.
60 f.: il.

Tese (doutorado) - Área de concentração em Produção Vegetal. Universidade Federal de Minas Gerais / Instituto de Ciências Agrárias.

Orientadora: Sílvia Nietzsche

Banca examinadora: Claudinéia Ferreira Nunes, Elka Fabiana Aparecida Almeida, Bruno Rafael Alves Rodrigues, Luciana Cardoso Nogueira Londe.

Inclui referências: f. 16-20; 56-59.

1. Plantas -- Efeito dos alcalóides. 2. Plantas -- Propagação in vitro -- Teses. 3. Endosperma -- Teses. 4. Poliploide -- Teses. 5. Rosa-do-deserto -- Teses. 6. Sementes -- Qualidade -- Teses. I. Nietzsche, Sílvia. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 631.52:635.9

ATA DE DEFESA DE TESE

Aos 28 dias do mês de novembro de 2025 às 14:00 horas, sob a Presidência da Professora Sílvia Nietzsche, D. Sc. (Orientadora - UFMG/ICA) e com a participação dos Professores Claudinéia Ferreira Nunes, D. Sc. (UFMG/ICA), Elka Fabiana Aparecida Almeida, D. Sc. (UFMG/ICA), Bruno Rafael Alves Rodrigues, D. Sc. (Unimontes) e de Luciana Cardoso Nogueira Londe, D. Sc. (EPAMIG), reuniu-se, por videoconferência, a Banca de tese de **Sara Malveira Costa Vieira**, aluna do Curso de Doutorado em Produção Vegetal. O resultado da defesa de tese intitulada: **"PARÂMETROS PARA POLIPLÓIDIZAÇÃO IN VITRO DE ADENIUM OBESUM: CONTRIBUIÇÕES PARA O MELHORAMENTO DE PLANTAS ORNAMENTAIS"** sendo a aluna considerada (aprovado(a)/reprovado(a)) **APROVADA**. E, para constar, eu, Professora Sílvia Nietzsche, Presidente da Banca, lavrei a presente ata que depois de lida e aprovada, será assinada por mim e pelos demais membros da Banca examinadora.

OBS.: A aluna somente receberá o título após cumprir as exigências do **ARTIGO 65** do regulamento do Curso de Doutorado em Produção Vegetal, conforme apresentado a seguir:

Art. 65 Para dar andamento ao processo de efetivação do grau obtido, o candidato deverá, após a aprovação de sua Dissertação ou Tese e da realização das modificações propostas pela banca examinadora, se houver, encaminhar à secretaria do Colegiado do Programa, com a anuência do orientador, 1 (um) exemplar impresso e 1 (um) exemplar eletrônico da dissertação ou tese, no prazo de 60 (sessenta) dias.

Montes Claros, 28 de novembro de 2025.



Documento assinado digitalmente
 para garantir a autoria, integridade e validade
 jurídica. Para mais informações, consulte o gov.br

Claudinéia Ferreira Nunes
 Coorientadora



Documento assinado digitalmente
 para garantir a autoria, integridade e validade
 jurídica. Para mais informações, consulte o gov.br

Elka Fabiana Aparecida Almeida
 Membro



Documento assinado digitalmente
 para garantir a autoria, integridade e validade
 jurídica. Para mais informações, consulte o gov.br

Bruno Rafael Alves Rodrigues
 Membro



Documento assinado digitalmente
 para garantir a autoria, integridade e validade
 jurídica. Para mais informações, consulte o gov.br

Luciana Cardoso Nogueira Londe
 Membro



Documento assinado digitalmente
 para garantir a autoria, integridade e validade
 jurídica. Para mais informações, consulte o gov.br

Sílvia Nietzsche
 Orientadora

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus pelo amparo, por ter me guiado e me dado forças para superar os desafios e realizar os meus sonhos.

Agradeço ao meu noivo, Pedro, por todo amor, carinho, compreensão e paciência; sua presença foi fundamental para essa conquista.

À minha querida e amada filha, Helena, que, tão pequena e com todo o seu amor, foi a minha força e motivação diária.

Agradeço aos meus pais, Marcílio e Marilda, por todo amor, apoio e dedicação durante todos os anos da minha vida. Aos meus irmãos, Lauro, Rodrigo e Gabriel, pelo incentivo e companheirismo diários.

Agradeço à minha sogra, Valdirene, por toda ajuda durante esses anos.

Agradeço a toda a minha família, que sempre me apoiou desde o início dessa caminhada, me incentivando e rezando por mim.

Agradeço à minha orientadora, Professora Dr^a Silvia Nietzsche, por todos os ensinamentos, orientação, paciência e incentivo; sempre me instruiu com sabedoria.

Agradeço à minha querida coorientadora, Professora Dr^a Claudinéia, pelas instruções relacionadas aos procedimentos experimentais, pela companhia no dia a dia do laboratório, pela paciência, pelo carinho e, por fim, pela amizade.

Agradeço à minha coorientadora, Professora Dr^a Clívia, por toda instrução na área de anatomia, apoio, paciência e carinho.

Agradeço ao Professor Dr. Sidnei pelo auxílio nas análises estatísticas e pela paciência.

Agradeço ao Lucas Ribeiro e Vitória, colegas de laboratório, pelo auxílio na realização das atividades experimentais e pelo apoio.

Agradeço aos professores com os quais tive a oportunidade de ser aluna neste curso de doutorado.

Agradeço aos professores que compõem a banca, pelas valiosas contribuições ao trabalho.

Agradeço à Universidade Federal de Minas Gerais/Instituto de Ciências Agrárias e ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, que contribuíram para a minha formação acadêmica.

Agradeço aos amigos por todo carinho e companheirismo, fundamentais para me manter motivada durante todo esse percurso.

Enfim, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram e torceram por essa vitória.

RESUMO GERAL

Adenium obesum, conhecida popularmente como rosa-do-deserto é uma planta ornamental de grande atratividade relacionada às suas características morfológicas e ao seu potencial econômico. Para a otimização de protocolos para a indução de poliploides faz-se necessário estabelecer tipo de explante, tipo do agente químico, concentração de antimetabólitos e tempo de exposição. Em contrapartida, estudos relacionados a estrutura da semente e formação dos tecidos do endosperma são importantes para melhor conhecimento e identificação da espécie, além de auxiliar em processo de germinação e melhoramento genético. Diante disso, essa tese foi dividida em dois artigos, com os seguintes objetivos, estabelecer um sistema de regeneração *in vitro* para produção de plantas poliploides a partir do uso de antimetabólito em *A. obesum* para melhoria dos atributos vegetativos e florais da espécie e identificar a estrutura da semente e dos tecidos endospermicos em *A. obesum*. Para o artigo 1 seguiram os seguintes procedimentos, no ensaio 1, em um esquema fatorial (3x3x3+1), foram avaliados três tipos de explantes (apical, medial e basal), submetidos a três concentrações de colchicina (0,01%, 0,05% e 0,1%) + 0% em diferentes tempos de exposição (6h, 12h e 18h). No ensaio 2, também em esquema fatorial (3x2 +1), ápices caulinares foram submetidos a três concentrações de colchicina (0,001%, 0,005% e 0,01%) +0%, em diferentes tempos de exposição (9h e 12h). No ensaio 1, observou-se que os explantes provenientes das regiões apical e medial apresentaram as maiores taxas de sobrevivência, sobretudo nos períodos mais prolongados de exposição. A ocorrência de brotações foi nos intervalos de 6 e 12h. No ensaio 2, os resultados foram significativos apenas na característica de oxidação. Nesse mesmo ensaio, as análises por citometria de fluxo evidenciaram, elevada poliploidização em explantes da região apical, nas concentrações de 0,001%, 0,005% e 0,01% por 9 h, além daqueles expostos a 0,01% por 12 h. Para o segundo artigo, os resultados anatômicos revelam que *A. obesum* apresentam óvulos anátropos, unitegumentados e tenuinucelados, formados por um tegumento, nucelo e um saco embrionário. Com oito dias após a polinização (DAP) foi possível observar uma célula volumosa com vacúolo central, citoplasma periférico e multinucleada, caracterizando a célula primária do endosperma. Aos 40 DAP a celularização do endosperma estava completa e foi possível observar o embrião. A semente é formada por um tegumento, tecido de reserva e embrião. Com isso, concluímos que foi possível induzir a poliploidia em *A. obesum* através da otimização de protocolos que indicaram a região apical e o tempo de 9h com maior eficiência. Paralelamente, estudos anatômicos das sementes e seus tecidos endospermicos são fundamentais para um melhor conhecimento do desenvolvimento embrionário, visto que pouco se sabe ainda da espécie, além de conseguir fornecer com esses estudos uma compreensão da dinâmica de germinação e desenvolvimento da plântula.

Palavras-chave: colchicina; explantes; endospermogênese; poliploidia; rosa-do-deserto; semente.

GENERAL ABSTRACT

Adenium obesum, popularly known as desert rose, is a highly attractive ornamental plant due to its morphological characteristics and economic potential. Optimizing protocols for polyploid induction requires establishing the type of explant, the type of chemical agent, the concentration of antimitotics, and the exposure time. Conversely, studies related to seed structure and endosperm tissue formation are important for better understanding and identification of the species, as well as assisting in germination processes and genetic improvement. Therefore, this thesis was divided into two articles with the following objectives: to establish an in vitro regeneration system for the production of polyploid plants using antimitotics in *A. obesum* to improve the vegetative and floral attributes of the species, and to identify the structure of the seed and endosperm tissues in *A. obesum*. For article 1, the following procedures were followed: in trial 1, in a factorial design (3x3x3+1), three types of explants (apical, medial, and basal) were evaluated, subjected to three concentrations of colchicine (0.01%, 0.05%, and 0.1%) + 0% at different exposure times (6h, 12h, and 18h). In trial 2, also in a factorial design (3x2 +1), shoot apices were subjected to three concentrations of colchicine (0.001%, 0.005%, and 0.01%) + 0%, at different exposure times (9h and 12h). In trial 1, it was observed that explants from the apical and medial regions showed the highest survival rates, especially during the longer exposure periods. Sprouting occurred at 6 and 12h intervals. In trial 2, the results were significant only in the oxidation characteristic. In the same study, flow cytometry analyses showed high polyploidization in explants from the apical region at concentrations of 0.001%, 0.005%, and 0.01% for 9 hours, in addition to those exposed to 0.01% for 12 hours. For the second article, the anatomical results reveal that *A. obesum* presents anatropous, unitegumented, and tenuinucellate ovules, formed by a tegument, nucellus, and embryo sac. Eight days after pollination (DAP), it was possible to observe a voluminous cell with a central vacuole, peripheral cytoplasm, and multinucleation, characterizing the primary endosperm cell. At 40 DAP, endosperm cellularization was complete, and the embryo could be observed. The seed is formed by a tegument, storage tissue, and embryo. Therefore, we conclude that it was possible to induce polyploidy in *A. obesum* through the optimization of protocols that indicated the apical region and the 9h time with greater efficiency. In parallel, anatomical studies of the seeds and their endospermic tissues are fundamental for a better understanding of embryonic development, since little is still known about the species, in addition to providing, with these studies, an understanding of the dynamics of germination and seedling development.

Keywords: colchicine; explants; endospermogenesis; polyploidy; desert rose; seed.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	08
2 OBJETIVOS	10
2.1 Objetivo Geral.....	10
2.2 Objetivos Específicos.....	10
3 REVISÃO DE LITERATURA	11
3.1 Aspectos botânicos e importância.....	11
3.2 Poliploidia e uso de agentes antimitóticos.....	12
3.3 Endosperma.....	14
4 REFERÊNCIAS	16
5 ARTIGOS	21
5.1 Artigo 1.....	21
5.2 Artigo 2.....	43
6 CONCLUSÃO	55
7 REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

Adenium obesum (Forssk.), popularmente conhecida como rosa do deserto, é uma espécie ornamental pertencente à família Apocynaceae, com ploidia natural $2n = 22$ (Rosa et al., 2025). Originária de regiões áridas e semiáridas da África e da Península Arábica (Elhag et al., 2019). Adaptada a ambientes de baixa disponibilidade hídrica, a espécie apresenta características fisiológicas e morfológicas que lhe conferem grande rusticidade, como o caule suculento (caudex), que atua como órgão de reserva de água, além de folhas coriáceas e flores de cores variadas. Essa plasticidade adaptativa, somada à sua ampla distribuição geográfica, contribuiu para a formação de elevada variabilidade genética, o que se reflete em diferentes padrões de flores, cores, formatos de caudex e tolerância a condições de estresse (Sharma et al., 2017).

O valor ornamental da rosa do deserto está associado principalmente à exuberância de suas flores, que podem variar em coloração, formato e número de pétalas, bem como ao caudex escultural, características que conferem grande apelo comercial no mercado de plantas ornamentais (Al-Saadi et al., 2021). Nos últimos anos, a demanda por novas variedades tem impulsionado programas de melhoramento genético, voltados ao desenvolvimento de materiais inovadores com atributos de alto valor ornamental, como flores bicolors, dobradas e de maior durabilidade, além de plantas mais compactas e resistentes a estresses bióticos e abióticos (Sharma et al., 2017; Al-Saadi et al., 2021).

A geração de variabilidade genética constitui um dos pilares do melhoramento de plantas ornamentais, sendo alcançada por diferentes ferramentas, entre as quais se destacam a hibridação, a indução de mutações e a poliploidização (Cui et al., 2023). A hibridação permite a recombinação de genomas distintos, resultando em novas combinações de caracteres de interesse ornamental (Souza et al., 2020). A indução de mutações, seja por agentes físicos ou químicos, amplia a diversidade genética ao gerar variantes que podem apresentar características florais únicas e desejáveis (Jin et al., 2023). Já a poliploidização, obtida por meio de duplicação cromossômica natural ou induzida (principalmente por substâncias como a colchicina), promove alterações fenotípicas expressivas e está entre as técnicas mais relevantes para a criação de novos cultivares ornamentais (Griesbach, 2005; Chen et al., 2011). A poliploidia também pode ser obtida através do cruzamento de

plantas diploides (2x) com tetraploides (4x), e por fim, por meio do cultivo do endosperma *in vitro* (Wang et al., 2016).

O endosperma é um tecido triploide (3n), isto é, apresenta três conjuntos de cromossomos, como resultado da fertilização dupla. Na cultura de tecidos, protocolos com esse tecido de reserva embrionária já apresentam resultados bem-sucedidos, como ser o método mais direto e eficiente para a produção de plantas triploides (Thomas et al., 2000; Miyashita et al., 2009; Sun et al., 2011; Wang et al., 2016; Asakura et al., 2017; Antoniazzi et al., 2018). E como característica essas plantas apresentam um aumento no seu tamanho, em suas flores ou células, melhorando aspectos morfológicos, fisiológicos, qualidade, resistências a doenças e pragas, entre outros (Chung et al., 2014; Antoniazzi et al., 2018, Islam et al., 2022).

No caso das espécies ornamentais, a poliploidização tem ganhado destaque por suas vantagens na geração de materiais genéticos de alto valor comercial. Plantas poliploides frequentemente apresentam flores maiores, cores mais intensas, maior espessura de pétalas e folhas, além de maior longevidade e resistência a estresses bióticos e abióticos, características altamente valorizadas pelo mercado ornamental (Chen et al., 2011; Pereira et al., 2020). Além disso, a poliploidização pode induzir esterilidade parcial, característica desejável em ornamentais cultivados para fins exclusivamente estéticos, pois prolonga o período de floração (Leonhardt, 2019; Manzoor et al., 2019; Seo et al., 2024). Dessa forma, o uso dessa ferramenta representa uma estratégia promissora para o desenvolvimento de novas variedades que atendam à demanda crescente por diversidade e inovação no setor de plantas ornamentais.

Em várias espécies, já foram relatados sucessos na formação de plantas poliploides com o uso da colchicina, principalmente em plantas ornamentais, como a *Calanthe* (Chung et al., 2014), *Phalaenopsis* (Griesbach, 1981), *Paphiopedilum* (Watrous; Wimber, 1988), *Cattleya* (Silvia et al., 2000), em *Rosa roxburghii f. eseiosa* (Wu et al., 2023), em *Alocasia* (Thao et al., 2003), *Caladium* Vent (Zhang et al., 2020), *Brassolaelio cattleya* (Vilcherrez-Atoche et al., 2023), entre outras.

A colchicina, é um alcaloide e age inibindo a formação de microtúbulos no fuso cromático, causando não disjunção e subsequente duplicação de cromossomos dentro das células vegetais, gerando assim células poliploides, que se desenvolvem e se regeneram em plantas poliploides (Eng; Ho, 2019). Inúmeros estudos destacam

a importância em avaliar o tempo de exposição ao antimitótico, a concentração e o tipo de explantes. Essa otimização visa aumentar a taxa de sobrevivência e consequentemente uma validação da poliploidização (Zhang et al., 2020).

Embora vários estudos tenham sido conduzidos sobre a duplicação cromossômica *in vitro* em plantas ornamentais, ainda não se tem na literatura relatos dos efeitos e protocolos eficientes que visam alcançar a poliploidização em *A. obesum*. Nesse contexto, o trabalho descrito a seguir concentrou esforços em avaliar diferentes tipos de explantes, concentração e o tempo de exposição do agente mitótico colchicina, bem como entender o processo de formação do tecido endospermico em sementes visando desenvolver um protocolo para poliploidização e duplicação cromossômica artificial *in vitro* em *A. obesum*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estabelecer um sistema eficiente de regeneração *in vitro* para a produção de plantas poliploides de *Adenium obesum* por meio da aplicação de antimitóticos, visando a melhoria dos atributos vegetativos, reprodutivos e florais da espécie.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar o tipo de explante mais responsivo à regeneração e à indução de poliploidia em *A. obesum*;
- Determinar o tempo de exposição mais adequado à colchicina para a indução de poliploidia em tecidos da espécie;
- Avaliar diferentes concentrações de colchicina e sua eficiência na indução da poliploidia em tecidos *in vitro* de *A. obesum*;

-Caracterizar a estrutura da semente e o desenvolvimento dos tecidos endospermicos, fornecendo subsídios anatômicos essenciais para aprimorar estratégias de germinação, propagação e melhoramento genético da espécie.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Aspectos botânicos e importância

Adenium obesum, é uma planta ornamental, de ocorrência natural da África tropical, onde ocorre ao longo da faixa subsaariana, do Senegal à Etiópia, da Somália à Tanzânia e ao sul da Península Arábica, incluindo Arábia Saudita, Omã, Iêmen e Socotra (Elhag et al., 2019). A rosa-do-deserto pertence à família Apocynaceae, uma das 10 maiores e mais importantes famílias das angiospermas, apresenta uma distribuição global, e cerca de 4.500 espécies que são classificadas com cerca de 370 gêneros (Stevens, 2001; Endress et al., 2014; APG, 2016; Bhadane et al., 2018). As espécies pertencentes a essa família dispõem de diversas características, dentre elas medicinal, frutífera, uso na construção civil, móveis de madeira ou produção de látex. Algumas espécies dessa família destacam-se pela produção de alcalóides, terpenóides, esteroides, flavonóides, glicerol cosídeos, fenóis simples, lactonas e hidrocarbonetos (Judd et al., 2009; Bhadane et al., 2018).

A importância econômica de *A. obesum* está associada as diversas características apresentadas pela espécie. *Adenium* é classificada como um arbusto suculento, o seu caule que se apresenta engrossado ou globoso na região basal, que atua principalmente como reserva de água e nutrientes. Os galhos apresentam coloração de verde acinzentado a marrom, as folhas podem variar quanto a tamanhos, formas e cores, podendo ser espiraladas, com lâmina obovada a linear, além da variação em tons de verde (Plaizier, 1980; Hastutti et al., 2009; Rzepecky, 2015; Colombo et al., 2015; Colombo et al., 2018; Santos et al., 2020; Nietzsche et al., 2021). As exuberantes flores, são hermafroditas, podem variar quanto ao tamanho, forma, disposição das pétalas, podendo ser simples, duplas ou triplas, além da variação de cores, que vai desde o vermelho púrpuro, ao roxo, rosa e

branco (Colombo et al., 2015; Colombo et al., 2018). De acordo com Oyen (2008), as sépalas são unidas na base, formato entre oblongas e ovaladas, acuminadas, inteiras e normalmente pubescentes em ambas as faces, a corola com tubo em forma de funil com pilosidade ou glabro do lado de fora, ovário superior, composto de dois carpelos livres, estiletos fundidos e delgados. Os estames têm filetes fortes e curtos e as cinco longas anteras triangulares inclinam-se para dentro de um cone fechado sobre o estigma. A única entrada para a câmara interna é através de cinco fendas estreitas entre anteras adjacentes (Rowley, 1980). O fruto, é classificado como um folículo, que se divide lateralmente para liberar as sementes (McLaughlin; Garofalo, 2002).

Com o incremento do mercado de plantas ornamentais, a procura por produtos de alta qualidade também se tornou mais exigentes, dessa forma, pesquisas dedicadas às espécies em extinção ou de grande valor de mercado são essenciais, tanto para um melhor entendimento do processo de produção como para atender as expectativas dos consumidores. Na rosa-do-deserto, os estudos dos atributos botânicos são essenciais para o melhoramento vegetal, visto que irá contribuir na longevidade, no florescimento mais uniforme, surgimento de novas cores para as flores, entre outros requisitos que são essenciais para o melhor manejo e desenvolvimento da planta.

3.2 Poliploidia e uso de agentes antimetabólicos

A poliploidia representa um fenômeno na evolução, especialmente quando se trata de plantas superiores. Nas angiospermas a poliploidia possui uma frequência de cerca de 35%, além disso são bem comuns em ornamentais (Wood et al., 2009; Cui et al., 2023). A poliploidia consiste no aumento de mais de dois conjuntos básicos completos de cromossomos em um organismo (Soltis et al., 2015; Cui et al., 2023). Esse processo pode ocorrer por vias naturais, no qual a probabilidade é baixa, ou por indução artificial, através do uso de antimetabólicos (Cui et al., 2023). Um dos principais agentes químicos classificados como antimetabólicos é a colchicina. Essa molécula ($C_{22}H_{25}O_6N$), é um alcaloide extraído de sementes e bulbos de uma liliaceae (*Conchicum autumnale*), com função específica de atuação ligando-se aos

microtúbulos e impedindo o movimento dos cromossomos durante a mitose, levando à prevenção da divisão celular e em consequência a duplicação dos cromossomos (Cui et al., 2023).

A poliploidia pode se apresentar de duas formas, sendo auto e aloploidia. Os autopoliploides têm sua origem na duplicação de genes idênticos em uma única espécie, enquanto os aloploidos têm sua origem na duplicação de um genoma diferente formado a partir da hibridação entre duas espécies diferentes (Acquaah, 2009). Já por vias naturais, a poliploidia pode ocorrer através de duas maneiras, através da duplicação cromossômica em células somáticas como resultado de erros durante a mitose e através da união de gametas não reduzidos ($2n$) que foram formados como resultado de erros durante a meiose (Ranney, 2006). Esse primeiro processo é habitual em angiospermas e algas, porém ausente nas gimnospermas (Barow; Meister, 2003; Maluszynska et al., 2013).

A poliploidização somática, ocorre devido a endopoliploidia, denominado como endoreduplicação, definido como a duplicação exponencial do conteúdo nuclear que ocorre em células ou tecidos somáticos de um organismo sem passar pelo processo de citocinese durante o processo de mitose (Maluszynska et al., 2013; Pacey et al., 2020). Já a poliploidização sexual, outra alternativa para a poliploidização natural, ocorre pela união de gametas não reduzidos ($2n$) (Harlan; De Wet, 1975; Ramsey; Schemske, 1998).

A poliploidia, tem se tornado uma ferramenta importante no melhoramento genético, com amplas possibilidades de gerar novas cultivares (Alderete et al., 2007). No caso das plantas ornamentais, a poliploidização pode alterar vários atributos, como o aumento no tamanho de órgãos como folhas e flores, maior durabilidade, aumento na intensidade de cores, melhoria na arquitetura floral, restauração da fertilidade, produção triploide e aumento da variabilidade genética (Alderete et al., 2007; Griesbach, 1985; Sattler et al., 2016).

Em plantas ornamentais, estudos sobre esse fenômeno poliploidização, tem-se tornado mais frequente e preferível, devido principalmente pela sua busca comercial. Na orquídea híbrida *Brassolaeliocattleya*, foram avaliados dois tipos de explantes, sementes e protocormos, e de acordo com os autores, o melhor explante para indução de poliploidia neste híbrido foi o protocormo, com 500-750 μM de

colchicina por cerca de 18 horas, por apresentar maior eficiência de regeneração de poliploides. Em lírios o uso de protocormos ou brotos regenerados, submetidos a distintas concentrações e tempos de exposição a colchicina, promoveram a poliploidia com modificações em sua morfologia e anatomia (Taratima et al., 2023; Tang et al., 2025). Na planta ornamental *Melastoma candidum*, a poliploidia foi melhor induzida na concentração 0,2% por quatro ou mais dias em que apresentaram 100% de indução. Notou-se nesse estudo modificações morfológicas e anatômicas (Zou et al., 2024). Na espécie *Catharanthus roseus* (L.) G. Don notou-se alterações morfológicas, anatômicas e nos pólenes. Induziu-se tetraploides e mixaploides, principalmente na concentração de 0,2%, seguida de 0,1%, com aplicações nas mudas (Shala; Deng, 2018).

3.3 Endosperma

O endosperma é um tecido triploide ($3n$), que envolve o embrião e tem como principal função servir de fonte de nutrientes para o embrião em desenvolvimento (Zhang et al., 2025). A formação do endosperma se dá através da dupla fertilização, em que dois gametas masculinos são transportados pelo tubo de pólen para o óvulo: em que um gameta fertiliza a célula do óvulo para formação do zigoto, e o outro se funde com os dois núcleos polares na célula central para formar uma célula de endosperma ($3n$). Esse tecido em desenvolvimento, possui duas vias, ou degenera ou persiste em algumas espécies (Antoniazzi et al., 2018). Quando ocorre a persistência, desenvolve papéis importantes na germinação e no estabelecimento das mudas, fornecendo todo suporte para o desenvolvimento da plântula. Ademais, estudos recentes indicam que esse tecido pode ser utilizado para a produção de triploides através do cultivo *in vitro* (da Silva et al., 2020; Narukulla et al., 2023; Tang et al., 2024; Nakano et al., 2025).

O endosperma tem sido uma fonte promissora para a produção de plantas triploides com características desejáveis e aumentando a variabilidade genética, o que contribui significativamente com o melhoramento genético (Hoshino et al., 2011; Wang et al., 2016; Asakura; Hoshino, 2017; Antoniazzi et al., 2018). Esse fenômeno tem relevância por conferir diversas características, como aumento do tamanho de folhas e flores, maior vigor e biomassa, células somáticas e guardas maiores, maior

período de floração, esterilidade parcial ou total, frutos sem sementes, como em melancia, banana e cítricos (Jones et al., 2007; Sun et al., 2011; Wang et al., 2016). Alguns estudos já demonstram a produção de triploides a partir do endosperma, como em *Carica papaya* (Sun et al., 2011), *Actinidia kolomikta* (Asakura; Hoshino, 2017), *Passiflora edulis Sims* (Antoniazzi et al., 2018), *Morus alba* (Thomas et al., 2000) e *Lonicera caerulea* (Miyashita et al., 2009).

4 REFERÊNCIAS

- ACQUAAH, G. Polyploidy in plant breeding. In: ACQUAAH, G. *Principles of plant genetics and breeding*. Malden: John Wiley & Sons, 2009. p. 214–230.
- ALDERETE, M.; BOLOGNA, P.; FACCIUTO, G.; HAGIWARA, J. C.; KATO, A.; ESCANDÓN, A. S. El uso de mutágenos en el mejoramiento de germoplasma ornamental nativo. *Ornamental Horticulture*, v. 13, p. 1938–1943, 2007.
- AL-SAAD, A.; AL-SAID, F.; KHAN, M. *Adenium obesum*: a review of its botanical, horticultural and medicinal importance. *Plant Archives*, v. 21, n. 1, p. 123–131, 2021.
- ANTONIAZZI, C. A.; DE FARIA, R. B.; DE CARVALHO, P. P.; MIKOVSKI, A. I.; DE CARVALHO, I. F.; DE MATOS, E. M.; DA SILVA, M. L. In vitro regeneration of triploid plants from mature endosperm culture of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims). *Scientia Horticulturae*, v. 238, p. 408–415, 2018.
- ASAKURA, I.; HOSHINO, Y. Endosperm-derived triploid plant regeneration in diploid *Actinidia kolomikta*, a cold-hardy kiwifruit relative. *Scientia Horticulturae*, v. 219, p. 53–59, 2017.
- ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP (APG). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 181, p. 1–20, 2016.
- BAROW, M.; MEISTER, A. Endopolyploidy in seed plants is differently correlated to systematics, organ, life strategy and genome size. *Plant, Cell and Environment*, v. 26, n. 4, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2003.00988.x>.
- BHADANE, B. S.; PATIL, M. P.; MAHESHWARI, V. L.; PATIL, R. H. Etnofarmacologia, fitoquímica e avanços biotecnológicos da família Apocynaceae: uma revisão. *Pesquisa em Fitoterapia*, v. 32, n. 7, p. 1181–1210, 2018.
- CHEN, Z. J.; BIRCHLER, J. A.; PIRES, J. C. Polyploidy in plants and animals. *Nature Reviews Genetics*, v. 12, n. 6, p. 411–424, 2011.
- COLOMBO, R. C.; FAVETTA, V.; YAMAMOTO, L. Y.; ALVES, G. A. C.; ABATI, J.; TAKAHASHI, L. S. A.; FARIA, R. T. D. Biometric description of fruits and seeds, germination and imbibition pattern of desert rose (*Adenium obesum* (Forssk.) Roem. & Schult.). *Journal of Seed Science*, v. 37, p. 206–213, 2015.
- COLOMBO, R. C.; CRUZ, M. A. D.; CARVALHO, D. U. D.; HOSHINO, R. T.; ALVES, G. A. C.; FARIA, R. T. D. *Adenium obesum* como nova flor de vaso: manejo cultural. *Ornamental Horticulture*, v. 24, p. 197–205, 2018.
- CHUNG, M. Y.; KIM, C. Y.; MIN, J. S.; LEE, D. J.; NAING, A. H.; CHUNG, J. D.; KIM, C. K. In vitro induction of tetraploids in an interspecific hybrid of *Calanthe* (*Calanthe discolor* × *Calanthe sieboldii*) through colchicine and oryzalin treatments. *Plant Biotechnology Reports*, v. 8, p. 251–257, 2014.
- CUI, L.; LIU, Z.; YIN, Y.; ZOU, Y.; FAIZAN, M.; ALAM, P.; YU, F. Research progress of chromosome doubling and 2n gametes of ornamental plants. *Horticulturae*, v. 9, n. 7, p. 752, 2023.

- DA SILVA, N. T.; SILVA, L. A. S.; REIS, A. C.; MACHADO, M.; DE MATOS, E. M.; VICCINI, L. F.; DA SILVA, M. L. Endosperm culture: a facile and efficient biotechnological tool to generate passion fruit (*Passiflora cincinnata* Mast.) triploid plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, v. 142, n. 3, p. 613–624, 2020.
- ENDRESS, M. E.; LIEDE-SCHUMANN, S.; MEVE, U. An updated classification for Apocynaceae. *Phytotaxa*, v. 159, p. 175–194, 2014.
- ELHAG, M.; BABIKER, M. E.; MOHAMMED, A. Desert rose (*Adenium obesum*): a review of propagation methods. *International Journal of Research in Agricultural Sciences*, v. 6, n. 1, 2019.
- ENG, W. H.; HO, W. S. Polyploidization using colchicine in horticultural plants: a review. *Scientia Horticulturae*, v. 246, p. 604–617, 2019.
- GRIESBACH, R. J. Colchicine-induced polyploidy in *Phalaenopsis* orchids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 1, p. 103–107, 1981.
- GRIESBACH, R. J. Polyploidy in *Phalaenopsis* orchid improvement. *Journal of Heredity*, v. 76, n. 1, p. 74–75, 1985.
- GRIESBACH, R. J. Developing new ornamental plants by induced polyploidy. *Acta Horticulturae*, n. 683, p. 137–145, 2005.
- HASTUTI, D.; SURANTO, S. P. Variation of morphology, karyotype and protein band pattern of *Adenium obesum* varieties. *Nusantara Bioscience*, v. 1, p. 2, 2009.
- HARLAN, J. R.; DE WET, J. M. J. On Ö. Winge and a prayer: the origins of polyploidy. *The Botanical Review*, v. 41, n. 4, p. 361–390, 1975. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02860830>.
- HOSHINO, Y.; MIYASHITA, T.; THOMAS, T. D. In vitro culture of endosperm and its application in plant breeding: approaches to polyploidy breeding. *Scientia Horticulturae*, v. 130, p. 1–8, 2011.
- ISLAM, M. M.; DEEPO, D. M.; NASIF, S. O.; SIDDIQUE, A. B.; HASSAN, O.; PAUL, N. C. Cytogenetics and consequences of polyploidization on stress tolerance. *Plants*, v. 11, n. 20, p. 2684, 2022.
- JIN, C.; GAO, H.; YANG, X. Creating novel ornamentals via new strategies in the era of genome editing and genomics. *Frontiers in Plant Science*, v. 14, p. 1142866, 2023.
- JONES, K. D.; REED, S. M.; RINEHART, T. A. Analysis of ploidy level and its effects on guard cell length, pollen diameter, and fertility in *Hydrangea macrophylla*. *HortScience*, v. 4, p. 483–488, 2007.
- JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. *Sistemática vegetal: um enfoque filogenético*. Porto Alegre: Artmed, 2009.
- LEONHARDT, K. W. Polyploidy as a management strategy for invasive species. *HortTechnology*, v. 29, n. 5, p. 554–558, 2019.
- MALUSZYNSKA, J.; KOLANO, B.; SAS-NOWOSIELSKA, H. Endopolyploidy in plants. In: *Plant genome diversity*. Vienna: Springer, 2013. v. 2, p. 99–119.

- MANZOOR, A.; AHMAD, T.; BASHIR, M. A.; HAFIZ, I. A.; SILVESTRI, C. Studies on colchicine-induced chromosome doubling for enhancement of quality traits in ornamental plants. *Plants*, v. 8, n. 7, p. 194, 2019.
- MCLAUGHLIN, J.; GAROFALO, J. *The desert rose (Adenium obesum)*. Miami-Dade: Miami-Dade County/University of Florida Cooperative Extension Service, 2002.
- MIYASHITA, T.; OHASHI, T.; SHIBATA, F.; ARAKI, H.; HOSHINO, Y. Plant regeneration with maintenance of the endosperm ploidy level by endosperm culture in *Lonicera caerulea* var. *emphylocalyx*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, v. 98, n. 3, p. 291–301, 2009.
- NARUKULLA, V.; LAHANE, Y.; PANDEY, S.; FISKE, K.; UGE, P.; KAWALE, K.; ZIOGAS, V. Development of triploid seedless Nagpur mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) through endosperm rescue. *Agronomy*, v. 13, p. 2814, 2023.
- NAKANO, A.; MII, M.; HOSHINO, Y. Endosperm culture-based allotriploid hybrid production from an interspecific cross of *Haemanthus* spp.: new insights into polyploidization and hybridization. *BMC Plant Biology*, v. 25, n. 1, p. 1–13, 2025.
- NIETSCHE, S.; ALMEIDA, E. F. A.; MENDES, R. B. *Cultivo e manejo da rosa-do-deserto*. 2021.
- NOUROZI, E.; HEDAYATI, A.; MADANI, H.; HOSSEINI, B.; HEMMATY, S. In vitro synthetic polyploidization and enhancement of anticancer compounds in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don important cultivars. *Scientific Reports*, v. 15, n. 1, p. 6563, 2025.
- OYEN, L. P. A. *Adenium obesum* (Forssk.) Roem. & Schult. In: SCHMELZER, G. H.; GURIB-FAKIM, A. (ed.). *Plant resources of tropical Africa*. [Holanda], v. 11, n. 1, p. 45–49, 2008.
- PACEY, E. K.; MAHERALI, H.; HUSBAND, B. C. The influence of experimentally induced polyploidy on the relationships between endopolyploidy and plant function in *Arabidopsis thaliana*. *Ecology and Evolution*, v. 10, n. 1, p. 198–216, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/ece3.5886>.
- PLAIZIER, A. C. A revision of *Adenium* Roem. & Schult. and of *Diplorhynchus* Welw. ex Fic. & Hiern (Apocynaceae). *Mededelingen Landbouwhogeschool*, v. 80, p. 1–40, 1980.
- PEREIRA, R. C.; CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R. Polyploidization in ornamental plants: biological relevance, induced methods, and applications in breeding. *Plant Cell Reports*, v. 39, n. 9, p. 1145–1160, 2020.
- RANNEY, T. G. Polyploidy: from evolution to new plant development. In: *Combined Proceedings International Plant Propagators' Society*. Carlisle, 2006. v. 56, p. 137–142.
- RAMSEY, J.; SCHEMSKE, D. W. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v. 29, n. 1, p. 467–501, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.29.1.467>.
- ROWLEY, G. D. The pollination mechanism of *Adenium* (Apocynaceae). *The National Cactus and Succulent Journal*, v. 35, n. 1, p. 2–5, 1980.

ROSA, T. A. D. O.; SILVA, J. M. D.; VALENTIM, T. S.; ASSIS, R. D.; PARTEKA, L. M.; VANZELA, A. L. L. Genome and karyotype differences between diploid and tetraploid desert roses. *Ornamental Horticulture*, v. 31, p. 312810, 2025.

RZEPECKY, A. *Adenium dhofarensis* Rzepecky sp. nov., a long-overlooked species from the central-southern Arabian Peninsula. *Cactus and Succulent Journal*, v. 87, n. 3, p. 129–135, 2015.

SANTOS, C. A. et al. Seed germination and development of desert rose seedlings (*Adenium obesum* Roem. & Schult.) on different substrates. *Ciência Rural*, v. 50, 2020.

SATTLER, M. C.; CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R. The polyploidy and its key role in plant breeding. *Planta*, v. 243, n. 2, p. 281–296, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2450-x>.

SEO, E. J. et al. Polyploidization and ornamental trait enhancement in *Allium* species native to Korea. *Horticultural Science (Coreano)*, v. 32, n. 3, p. 171–184, 2024.

SHARMA, P.; SHARMA, J.; SHARMA, R. Genetic variability and ornamental importance of desert rose (*Adenium obesum*). *Journal of Ornamental Horticulture*, v. 20, n. 1, p. 45–52, 2017.

SHALA, A.; DENG, Z. Investigation of morphological and anatomical changes in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don due to colchicine-induced polyploidy. *Scientific Journal of Flowers and Ornamental Plants*, v. 5, n. 3, p. 233–243, 2018.

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

SOLTIS, O. S.; MARCHANT, D. B.; VAN DE PEER, Y.; SOLTIS, D. E. Polyploidy and genome evolution in plants. *Current Opinion in Genetics & Development*, v. 35, p. 119–125, 2015.

SOUZA, V. D. O. et al. Morphological and cytogenetic characterization of new ornamental *Passiflora* hybrids. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v. 20, n. 3, 2020.

STEVENS, P. F. Angiosperm phylogeny website. Version 12, 2001–. Disponível em: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. Acesso em: 1 ago. 2017.

SUN, D. Q.; LU, X. H.; LIANG, G. L.; GUO, Q. G.; MO, Y. W.; XIE, J. H. Production of triploid plants of papaya by endosperm culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, v. 104, n. 1, p. 23–29, 2011.

TARATIMA, W.; ROHMAH, K. N.; PLAIKHUNTOD, K.; MANEERATTANARUNGROJ, P.; TRUNJARUEN, A. Optimal protocol for in vitro polyploid induction of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. *BMC Plant Biology*, v. 23, n. 1, p. 295, 2023.

TANG, J.; LUO, X.; ZHU, Y.; CAI, N.; CHEN, L.; CHEN, S.; XU, Y. N. In vitro regeneration of triploid from mature endosperm culture of *Passiflora edulis* “Mantianxing”. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 88, n. 4, p. 412–419, 2024.

- TANG, Y. Q.; ZHANG, H.; QIAN, Q.; CHENG, S. Y.; LU, X. X.; LIU, X. Y.; FU, Y. Y. In vitro polyploidy induction of *Lilium lancifolium* and morphological and molecular characterization. *Plants*, v. 14, n. 13, p. 1987, 2025.
- THAO, N. T. P.; URESHINO, K.; MIYAJIMA, I.; OZAKI, Y.; OKUBO, H. Induction of tetraploids in ornamental *Alocasia* through colchicine and oryzalin treatments. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 72, p. 19–25, 2003.
- THOMAS, T. D.; BHATNAGAR, A. K.; BHOJWANI, S. S. Production of triploid plants of mulberry (*Morus alba* L.) by endosperm culture. *Plant Cell Reports*, v. 19, n. 4, p. 395–399, 2000.
- VILCHERREZ-ATOCHE, J. A. et al. In vitro polyploidization of *Brassolaeliocattleya* hybrid orchid. *Plants*, v. 12, n. 2, p. 281, 2023.
- WANG, X.; CHENG, Z. M.; ZHI, S.; XU, F. Breeding triploid plants: a review. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, v. 52, n. 2, p. 41–54, 2016.
- WATROUS, S. B.; WIMBER, D. E. Artificial induction of polyploidy in *Paphiopedilum Lindleyana*, v. 3, p. 177–183, 1988.
- WOOD, T. E.; TAKEBAYASHI, N.; BARKER, M. S.; MAYROSE, I.; GREENSPOON, P. B.; RIESEBERG, L. H. The frequency of polyploid speciation in vascular plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 106, p. 13875–13879, 2009.
- WU, H.; JIANG, L.; LI, J. E.; LU, M.; AN, H. Polyploid induction and identification of *Rosa roxburghii*. *Plants*, v. 12, n. 11, p. 2194, 2023.
- ZHANG, Y. S.; CHEN, J. J.; CAO, Y. M.; DUAN, J. X.; CAI, X. D. Induction of tetraploids in 'Red Flash' caladium using colchicine and oryzalin: morphological, cytological, photosynthetic and chilling tolerance analysis. *Scientia Horticulturae*, v. 272, p. 109524, 2020.
- ZHANG, F.; WEI, X.; WANG, H.; ZHENG, K.; HAN, S. Non-coding RNA-mediated regulation of seed endosperm development. *Frontiers in Plant Science*, v. 16, p. 1640284, 2025.
- ZOU, P.; ZHENG, Y.; WANG, Y.; HU, X.; DAI, S.; WANG, W.; LIU, G. In vitro induction of tetraploids in the ornamental plant *Melastoma candidum* using colchicine treatment, 2024.

5 ARTIGOS

5.1 Artigo- Indução de poliploidia em *Adenium obesum* através de colchicina: avaliação de explantes, concentrações e tempos de exposição

RESUMO

Adenium obesum possui grande importância econômica e ornamental em razão à sua forma exuberante e à ampla variabilidade na disposição e na coloração de suas flores. Diante desse potencial ornamental, a indução artificial de poliploides tem sido explorada como uma estratégia de melhoramento, uma vez que pode promover benefícios significativos, como melhorias nos atributos morfológicos, anatômicos e genéticos das plantas. Para que esse processo ocorra de maneira satisfatória, se faz necessário otimizar protocolos eficientes, estabelecendo um tipo de antimitótico, a concentração, o tempo de exposição e por fim, o tipo de explante. Esse estudo teve como objetivo estabelecer um sistema de regeneração *in vitro* para produção de plantas poliploides a partir do uso da colchicina em *A. obesum* para melhoria dos atributos vegetativos e florais da espécie. Para o ensaio 1, em um esquema fatorial (3x3x3+1) foram utilizados três tipos de explantes (apical, medial e basal) com cerca de 1 cm de comprimento cada, e submetidas a três concentrações de colchicina (0,01%, 0,05% e 0,1%) + testemunha em diferentes tempos de exposição (6h, 12h e 18h). No ensaio 2, em um esquema fatorial (3x2+1) ápices caulinares com aproximadamente de 1,5 cm de comprimento foram submetidos a três concentrações (0,001%, 0,005% e 0,01%) de colchicina + testemunha (0%), em diferentes tempos de exposição (9h e 12h). Após os tratamentos, as plântulas foram cultivadas em condições controladas e avaliadas aos 30 dias. No ensaio 1, a taxa de sobrevivência foi maior nos explantes das regiões apical e medial, especialmente nos tempos de exposição mais longos (12h e 18 h), com destaque para a formação de brotações nos tempos de 6h e 12 h. No ensaio 2, apenas a porcentagem de oxidação dos explantes foi significativa, sendo mais elevada na dose de 0,001%. A análise por citometria de fluxo, realizada exclusivamente no ensaio 2, evidenciou elevada taxa de poliploidização, permitindo a distinção entre plantas poliploidizadas e não poliploidizadas. A maior quantidade de indivíduos poliploides foi regenerada a partir de explantes da região apical, tratados com colchicina a 0,001%, 0,005% e 0,01% por um tempo de exposição de 9 h, bem como aqueles expostos a 0,01% por 12 h. Diante disso, podemos concluir que a região apical e o tempo de 9h apresenta uma maior competência para a indução de poliploides em *A. obesum*. Logo, esse trabalho apresenta uma ferramenta promissora para a geração de variabilidade genética da espécie com características elevadas e aprimoradas, além da otimização de protocolos de poliploidização para a espécie.

Palavras-chave: antimitóticos; cultivo *in vitro*; plantas ornamentais; poliploides; rosa-do-deserto.

ABSTRACT

Adenium obesum has great economic and ornamental importance due to its exuberant form and the wide variability in the arrangement and coloration of its flowers. Given this ornamental potential, the artificial induction of polyploids has been explored as a breeding strategy, since it can promote significant benefits, such as improvements in the morphological, anatomical, and genetic attributes of the plants. For this process to occur satisfactorily, it is necessary to optimize efficient protocols, establishing a type of antimitotic, the concentration, the exposure time, and finally, the type of explant. This study aimed to establish an *in vitro* regeneration system for the production of polyploid plants using colchicine in *A. obesum* to improve the vegetative and floral attributes of the species. For experiment 1, in a factorial design (3x3x3+1), three types of explants (apical, medial, and basal), each approximately 1 cm long, were used and subjected to three concentrations of colchicine (0.01%, 0.05%, and 0.1%) + control at different exposure times (6h, 12h, and 18h). In experiment 2, in a factorial design (3x2+1), shoot apices approximately 1.5 cm long were subjected to three concentrations (0.001%, 0.005%, and 0.01%) of colchicine + control (0%), at different exposure times (9h and 12h). After the treatments, the plantlets were cultivated under controlled conditions and evaluated at 30 days. In trial 1, the survival rate was higher in explants from the apical and medial regions, especially at longer exposure times (12h and 18h), with notable sprout formation at 6h and 12h. In trial 2, only the percentage of explant oxidation was significant, being higher at the 0.001% dose. Flow cytometry analysis, performed exclusively in trial 2, showed a high rate of polyploidization, allowing the distinction between polyploidized and non-polyploidized plants. The largest number of polyploid individuals were regenerated from explants in the apical region treated with colchicine at 0.001%, 0.005%, and 0.01% for an exposure time of 9h, as well as those exposed to 0.01% for 12h. Therefore, we can conclude that the apical region and a 9-hour time point show greater competence for the induction of polyploids in *A. obesum*. Thus, this work presents a promising tool for generating genetic variability in the species with elevated and improved characteristics, as well as optimizing polyploidization protocols for the species.

Keywords: antimitotics; *in vitro* cultivation; ornamental plants; polyploids; desert rose.

1 INTRODUÇÃO

A poliploidia representa um fenômeno evolutivo de significativa importância, especialmente em plantas superiores, ocorrendo em aproximadamente 35% das angiospermas e sendo particularmente comum em espécies ornamentais (Wood et al., 2009; Cui et al., 2023). Este processo consiste no aumento de mais de dois conjuntos básicos completos de cromossomos em um organismo (Soltis et al., 2015; Cui et al., 2023), podendo ocorrer naturalmente, embora com baixa probabilidade, ou por indução artificial mediante o uso de agentes antimitóticos.

A colchicina destaca-se como o principal agente químico antimitótico utilizado para indução de poliploidia. Esta molécula atua ligando-se aos microtúbulos, impedindo o movimento cromossômico durante a mitose, resultando na prevenção da divisão celular e consequente duplicação cromossômica (Cui et al., 2023).

A poliploidia tem se consolidado como ferramenta importante no melhoramento genético, oferecendo amplas possibilidades para geração de novas cultivares (Alderete et al., 2007). Em plantas ornamentais, a poliploidização pode alterar diversos atributos desejáveis, incluindo aumento no tamanho de órgãos vegetativos e reprodutivos como folhas e flores, maior durabilidade, intensificação de colorações, melhoria na arquitetura floral, restauração da fertilidade, produção de indivíduos triploides e incremento da variabilidade genética (Alderete et al., 2007; Griesbach, 1985; Sattler et al., 2016).

Entretanto, o desenvolvimento de protocolos eficazes para a produção de plantas poliploides via colchicina em espécies ornamentais apresenta múltiplos desafios técnicos e biológicos que demandam otimização específica para cada material vegetal (Wang et al., 2024; Cui et al., 2023). A determinação das concentrações ótimas do agente antimitótico constitui um dos principais obstáculos, uma vez que existe um delicado equilíbrio entre eficiência de indução e viabilidade celular. Estudos recentes demonstram variações significativas nas concentrações e tempo entre espécies (Taratima et al., 2023; Zou et al., 2024; Vilcherrez-Atoche et al., 2023).

O tempo de exposição representa outro fator crítico, onde protocolos de "choque curto" (12-18 horas com concentrações elevadas de 250-750 μM) competem com tratamentos prolongados (5-8 semanas com concentrações menores), sendo que cada estratégia apresenta vantagens e limitações específicas

relacionadas à recuperação celular e estabilidade cromossômica (Wang et al., 2023; Peeters et al., 2024).

Por fim, a seleção adequada dos explantes vegetais emerge como determinante fundamental do sucesso, com protocormos e tecidos embrionários de orquídeas (*Aerides rósea* e *Dendrobium wardianum*) demonstrando superioridade significativa sobre explantes vegetativos, atingindo taxas de indução até cinco vezes maiores que sementes em condições idênticas (Wang et al., 2023; Wang et al., 2024).

Considerando o potencial ornamental e econômico de *A. obesum*, aliado às possibilidades oferecidas pela poliploidização artificial, torna-se evidente a necessidade de investigações que visem compreender os efeitos da indução de poliploidia nesta espécie, contribuindo para o desenvolvimento de programas de melhoramento que atendam às demandas crescentes do mercado de plantas ornamentais. Diante do exposto, o principal objetivo do presente estudo foi desenvolver e otimizar protocolos padronizados para a indução eficiente de poliploidia via colchicina em *A. obesum*, estabelecendo parâmetros técnicos específicos que maximizem as taxas de conversão cromossômica e minimizem a mortalidade celular.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Descrição da área experimental

O trabalho foi conduzido em casa de vegetação e em laboratório, ambos sediados no Instituto de Ciências Agrárias (ICA) da Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, Minas Gerais, Brasil.

2.2 Material vegetal e condições de cultivo

Para a realização do presente estudo foram selecionadas plantas de *A. obesum* pertencentes à coleção do Instituto de Ciências Agrárias e mantidas em

condições de casa-de-vegetação (80% sombreamento), com idade aproximada de um ano. Quatro genótipos foram utilizados como genitores: ICA-rxS (flores de pigmentação petalar roxa e disposição petalar simples), ICA-roS (flores de pigmentação petalar rosa, com disposição petalar simples) ICA-bdC (flores de pigmentação petalar brancas com arranjo de pétalas duplas) e ICA-vT (flores com pigmentação petalar vermelha e arranjo de pétalas triplas). As plantas foram mantidas em vasos de 4 litros com substrato comercial da marca Bioplant®, adubadas semanalmente com adubo comercial Fort flores® e irrigadas manualmente de acordo com a demanda hídrica. Foi realizada a polinização artificial entre os genitores descritos acima com o objetivo de obter sementes para o desenvolvimento dos ensaios experimentais (Nietsche et al., 2021).

2.3 Germinação *in vitro*

Em torno de 120 dias após a polinização artificial, as vagens foram coletadas e encaminhadas ao laboratório. As sementes, recém-dispersas, foram desinfestadas com imersão em álcool a 70 % (v/v), por 01 minuto e em hipoclorito de sódio a 2,5 % (p/v), contendo duas gotas de detergente Tween-20, por 15 minutos, seguida de quádrupla lavagem em água destilada e esterilizada. Em seguida, as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio de 50 mL, contendo 10 mL de meio MS (Murashige; Skoog, 1962) com a concentração de macro e micronutrientes reduzida pela metade, acrescido de 4,0 g L⁻¹ de gellan e 30 g L⁻¹ de sacarose. O pH do meio foi ajustado para 5,8±0,1 antes da autoclavagem a 121±1°C e pressão de 1,05 atm por 15 min.

Cada tubo de ensaio recebeu uma única semente, e após a inoculação os tubos foram vedados com película de PVC e mantidos em sala de crescimento a 25±2°C (dia/noite) com 16/8 h de fotoperíodo (Araújo et al., 2022). Com cerca de 30 dias de cultivo, quando as plântulas apresentavam em torno de 4 cm de comprimento foram utilizadas como fonte de explantes (Figura 1). Foram conduzidos dois experimentos de forma sequencial, com o objetivo de identificar o tipo de explante, a concentração do agente mitótico e o tempo de exposição mais adequados para estabelecer um protocolo de poliploidização *in vitro* de *A. obesum*.

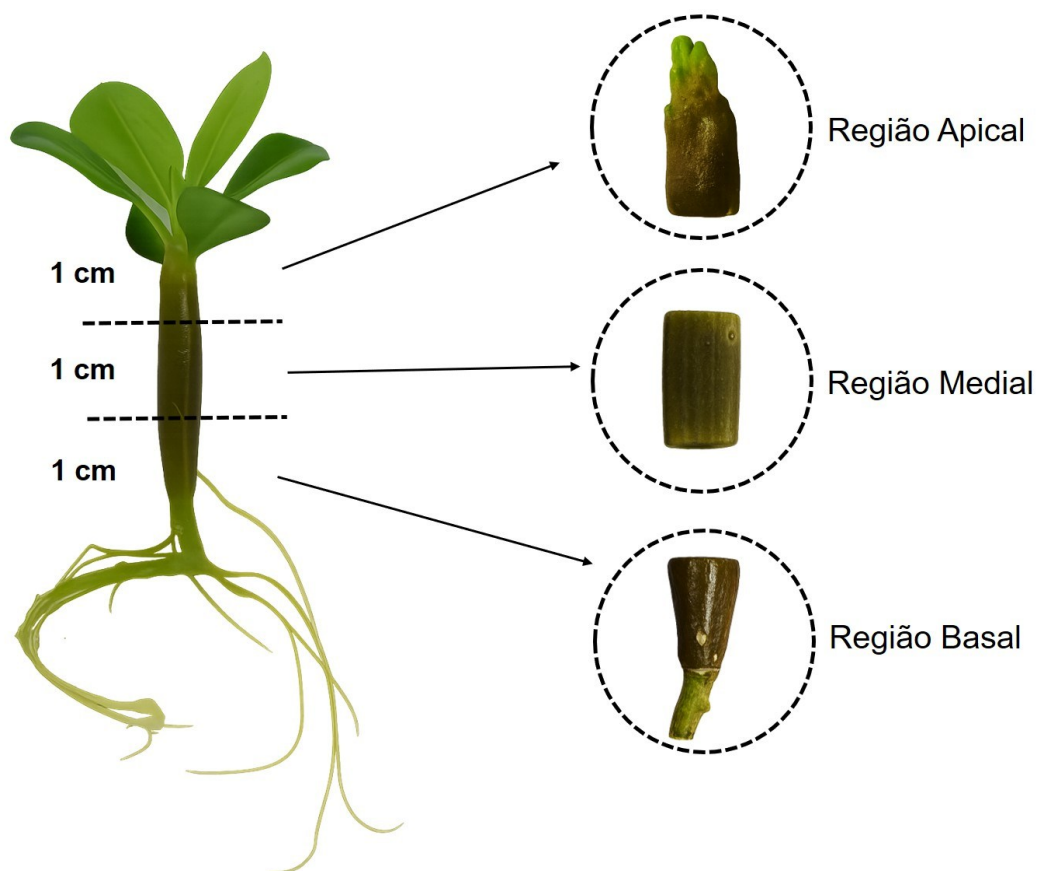


Figura 1: Tipos de explantes usados para indução de poliploidia: região apical, medial e basal de plântulas de *A. obesum* pré-estabelecidas *in vitro*. Fonte: Da autora, 2025

2.4 Indução de poliploidização

2.4.1 Tipos de explantes, concentrações e tempos de exposição à colchicina

Foi utilizado o agente antimitótico, colchicina (Thao et al., 2003; Dhooghe et al., 2009; Zhang et al., 2020; Zakizadeh et al., 2020; Cabahug et al., 2021; Vilcherrez-Atoche et al., 2023; Wu et al., 2023). A solução de colchicina foi preparada a partir da dissolução em uma solução de 1% de Dimetilsufóxido (DMSO) e esterilizadas a frio com auxílio de filtro EMD Millipore Millex™. A solução foi esterilizada, filtrada e distribuída em Erlenmeyers de 250 mL.

Após a preparação da solução de colchicina foram implantados dois ensaios.

Ensaio 1: foram utilizados três tipos de explantes seccionados das plântulas *in vitro* (apical, medial, basal), com aproximadamente 1,0 cm de comprimento (Figura 1). Em câmara de fluxo laminar, os explantes foram seccionados e imediatamente mergulhados na solução de colchicina (100 mL) em erlenmeyers de 250 mL nas diferentes concentrações (0,01; 0,05 e 0,1%). Em seguida, os frascos foram encaminhados para agitadores rotativos horizontais (shaker) a 60 rpm e mantidos no escuro a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante períodos distintos (6h, 12h e 18h).

Ensaio 2: foi utilizado um único tipo de explante seccionado das plântulas (apical), com aproximadamente 1,5 cm de comprimento (Figura 1), com duas de suas folhas fragmentadas pela metade. Em câmara de fluxo laminar, os explantes apicais foram seccionados e imediatamente mergulhados nas soluções de colchicina (100 mL) em erlenmeyers de 250 mL nas diferentes concentrações (0,001; 0,005 e 0,01%). Em seguida, os frascos foram encaminhados para agitadores rotativos horizontais (shaker) a 60 rpm e mantidos no escuro a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante períodos distintos (9h e 12h).

Em ambos os ensaios foi estabelecido o tratamento controle em que os explantes foram introduzidos em Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio MS líquido e mantidos sob agitação pelos tempos estabelecidos em ambos os ensaios.

Após os períodos em agitação, os explantes foram retirados das soluções e procedeu-se a limpeza com água destilada estéril seis vezes com objetivo de eliminar resíduos da colchicina. Após este procedimento, os explantes do Ensaio 1 foram inoculados em placas petri de acrílico contendo 10 mL de meio de cultura MS. Os explantes provenientes do Ensaio 2 foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio MS. Nos dois distintos recipientes utilizados (placa de Petri e tubos de ensaio) o meio MS foi preparado com a concentração de macronutrientes reduzida pela metade, 30 g L^{-1} de sacarose, $0,1 \text{ g L}^{-1}$ de Inositol, $3,0 \text{ g L}^{-1}$ de gellan e pH ajustado para 5,8.

Para ambos os ensaios, os recipientes (placas de Petri e tubos de ensaio) foram mantidos a temperatura de $25 \pm 2 \text{ C}^\circ$. Os explantes permaneceram na ausência de luz durante os sete primeiros dias. Após os períodos descritos acima, os explantes foram expostos ao fotoperíodo de 16 horas.

Com o desenvolvimento da parte aérea, a etapa seguinte consistiu na indução do enraizamento. No Ensaio 1, trinta dias após a inoculação em meio MS, os explantes foram transferidos para frascos com o mesmo meio MS (já descrito acima) adicionados de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA (Ácido α -naftalenacético) e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP (6-benzilaminopurina). Além disso, foram adicionados o $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ carvão ativado e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ PVP (Polivinilpirrolidona), a fim de evitar oxidação dos explantes. No Ensaio 2, não houve transferências, as plântulas foram mantidas no tubo de ensaio e a partir disso, foram feitas observações sobre as características avaliadas e sobre o desenvolvimento morfológico da plântula.

2.5 Avaliações

Aos 30 dias de cultivo dos explantes em meio MS para os dois ensaios (Ensaio 1 e Ensaio 2) foram avaliadas as seguintes variáveis: a frequência de mortalidade, de calos, de contaminação, de oxidação e presença de brotos e raízes. No ensaio 1, não houve plântulas regeneradas para a realização das análises.

Após o desenvolvimento dos explantes do Ensaio 2, em plântulas completas a identificação de poliploides via citometria de fluxo foi realizada com objetivo de identificar a eficiência do uso da colchicina.

2.6 Confirmação do nível de ploidia por análise de citometria de fluxo

A análise do conteúdo de DNA foi realizada por citometria de fluxo no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG.

As análises foram realizadas apenas a partir de plântulas regeneradas a partir dos tratamentos estabelecidos no Ensaio 2. Amostras contendo aproximadamente 10 mg de tecido foliar de plântulas da espécie *A. obesum* foram trituradas com bisturi em placa de Petri contendo 1 mL de tampão de extração de núcleos, contendo 0,1 M de Tris-Cl, 2,5 mM de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 85 mM de NaCl, 0,1% de Triton-

100, 2% de polivinilpirrolidona-10 (PVP), e pH 7,0 (Forti et al., 2018). Após o preparo, as amostras foram aspiradas com auxílio de pipeta Pasteur e filtrada em malha de 50 µm. Em seguida, a suspensão foi corada com 25 µL de solução de iodeto de propídio (1 mg mL⁻¹). Dois mil núcleos foram analisados em cada amostra quanto à emissão de fluorescência.

A análise foi realizada em citômetro BD FACSCalibur 4 cores (Becton Dickinson). Os histogramas foram obtidos e analisados no software BD Cell Quest. O padrão de referência utilizado foi a espécie *Vicia faba* cv. Inovec (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.

2.7 Delineamentos Experimentais e Análises Estatísticas

No Ensaio 1, foi utilizado um delineamento experimental inteiramente casualizado em um esquema fatorial 3x3x3+1, com três tipos de explantes (apical, medial e basal), três tempos de exposição à colchicina (6, 12 e 18 horas) e três concentrações de colchicina (0,01; 0,05 e 0,1%), com uma testemunha controle, com oito repetições e dois explantes por parcela experimental.

No Ensaio 2, foi utilizado um delineamento experimental inteiramente casualizado, em um esquema fatorial 2x3+1, avaliando apenas um tipo de explante (apical), dois tempos de exposição (9 e 12 horas) e três concentrações de colchicina (0,001; 0,005 e 0,01%) e uma testemunha controle, com oito repetições, sendo um explante por parcela experimental.

Por se tratar de dados categóricos, os mesmos foram analisados por meio do procedimento FREQ do software SAS (SAS Institute, 2025). Esse procedimento possibilitou a geração das tabelas de frequências (contingência) e a aplicação do teste do qui-quadrado, com o objetivo de avaliar a significância das associações entre os fatores doses, região e tempo e as variáveis estudadas.

3 RESULTADOS

3.1 Avaliações de caracteres

No Ensaio 01, os resultados mostraram que a exposição dos explantes de *A. obesum* aos diferentes tratamentos geraram significâncias nas interações triplas.

Na variável morte as interações dose, tempo de exposição e tipo de explante, predominou maiores incidências nas doses 0%, 0,01% e 0,05% na região basal, com tempo de exposição de 6 horas (Figura 2A-C).

A taxa de oxidação foi predominante apenas na dose de 0,05%, na região apical e medial, principalmente nos tempos de extremos de 12 e 18 horas (Figura 2D-E).

A formação de calo foi estatisticamente significativa na interação entre dose, tempo e região, de maneira bem diversificada. Na testemunha (dose 0%), em todas as regiões, a formação de calos foi mais expressiva no tempo de 12 horas (Figura 2F-G). Enquanto na dose 0,01%, os calos foram mais expressivos na região apical, medial e basal, com mais destaque nos tempos de 6 e 12 horas (Figura 3H-J). Na dose 0,05%, observou-se também evidência nas três regiões estudadas, com maiores médias nos tempos de 6 e 12 horas (Figura 3K-M). Na dose 0,1%, notou-se também maiores formações de calo nas três regiões de estudo, com maiores médias nos tempos de 6 e 12 horas (Figura 3N-P).

A formação de brotos foi significativa nas interações triplas, em que se notou diferenças estatísticas em comum, para todas as doses, na região apical, com maiores médias, nos tempos de 6 e 12 horas (Figura 3Q-T).

A emissão de raízes foi significativa na dose 0%, na região apical e medial, em comum no tempo de 12 horas (Figura 3U e Figura 4V). Já na dose 0,01%, 0,05% e 0,1%, foi evidente apenas na região basal, no tempo de 12 horas (Figura 4W-Y).

No ensaio 02, a associação de dose, evidenciou apenas uma interação significativa, na variante oxidação, em que a maior taxa foi na dose de 0,001% (Figura 5A).

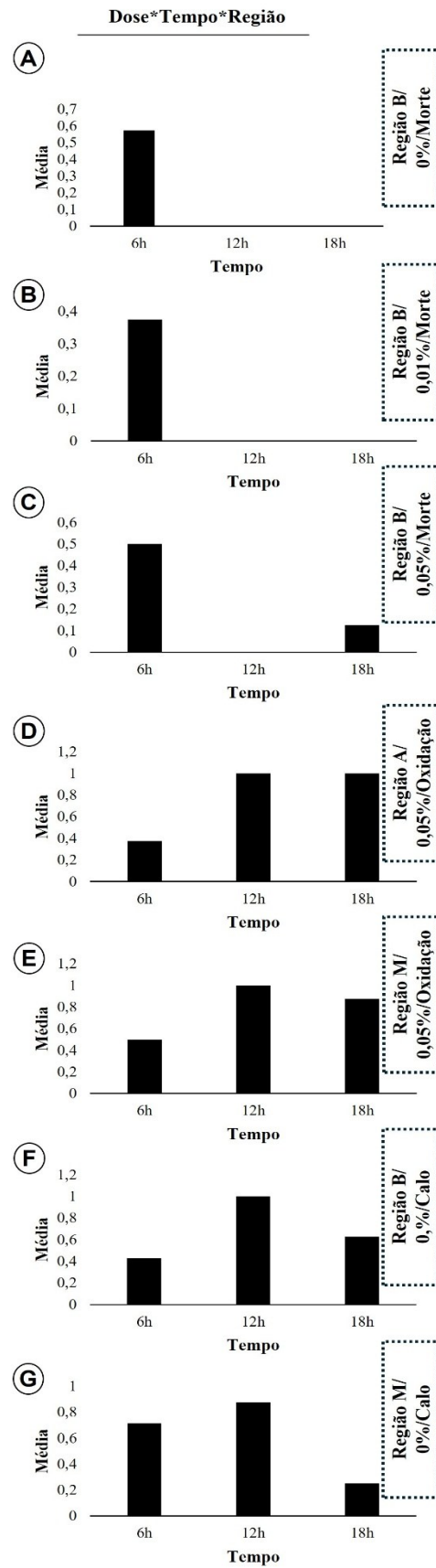


Figura 2: Variáveis de mortalidade, oxidação e calos dos fatores triplos de dose, tempo e região do ensaio 1. **A-G:** características associadas a interação tripla dose*tempo*região.

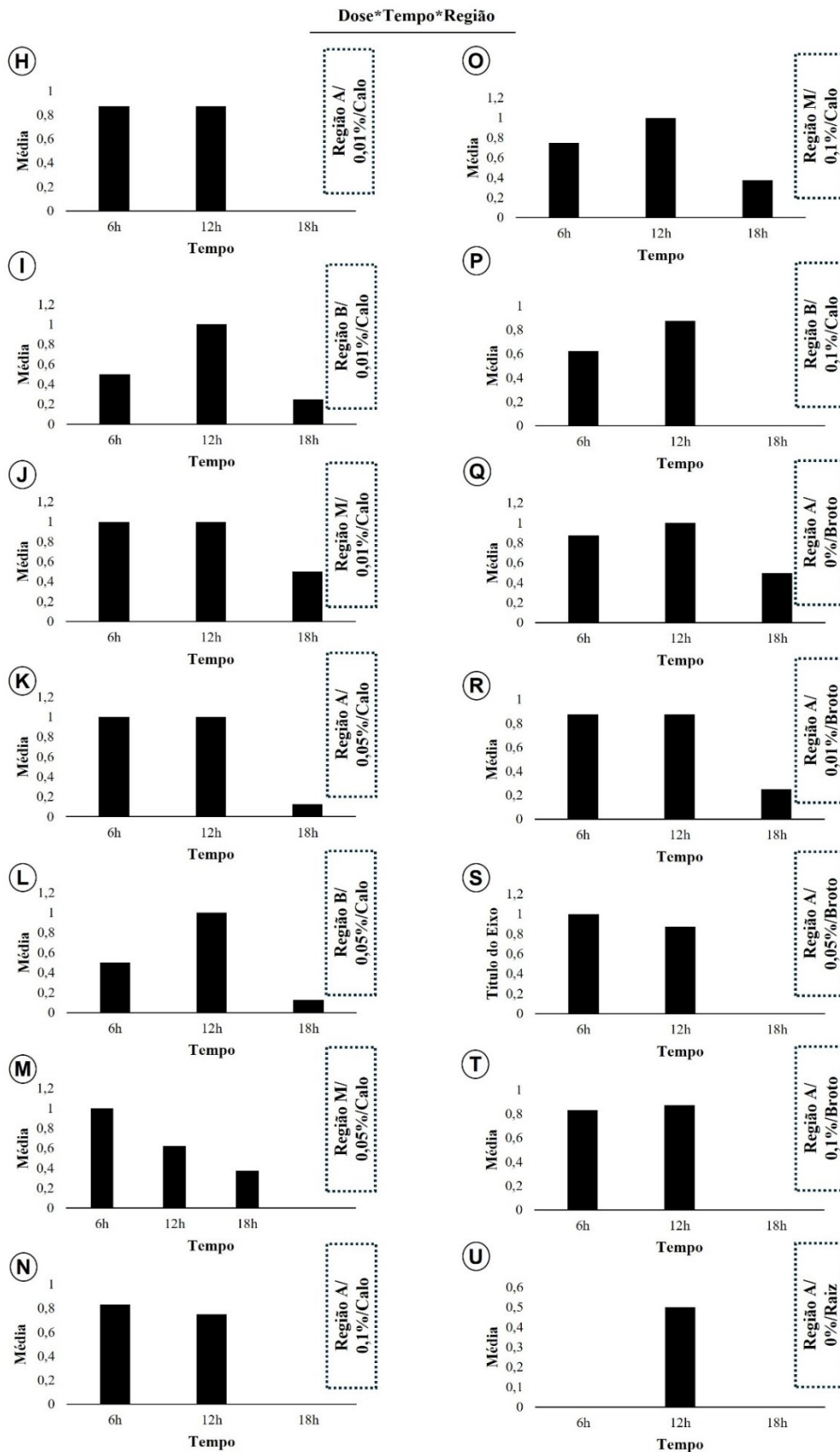


Figura 3: Variáveis de calos, brotos e raízes das interações triplas dose*região e dose*tempo do ensaio 1. **A-G:** características associadas a interação dose*região. **H-U:** características associadas a interação tripla dose*tempo*região.

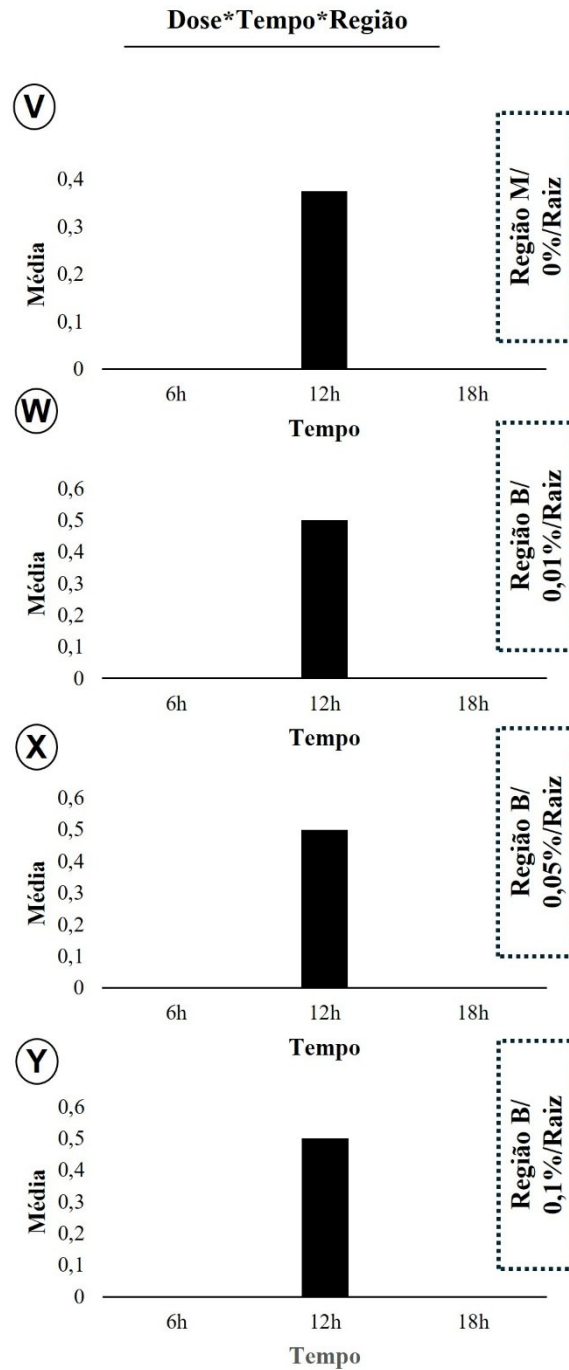


Figura 4: Variáveis de raízes das interações triplas dose*região e dose*tempo do ensaio 1. **V-Y:** características associadas a interação tripla dose*tempo*região.

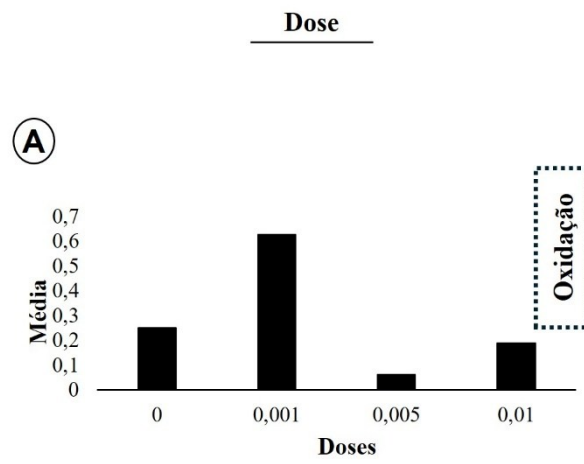


Figura 5: Variável de oxidação do fator independente dose do ensaio 2. **A:** característica oxidação do fator dose.

3.2 Análise de Citometria de Fluxo

Embora o número de amostras não tenha sido suficiente para realizar a análise estatística, as plântulas encaminhadas para a citometria de fluxo confirmaram a formação de poliploides em *A. obesum* para a maioria dos tratamentos testados. No Ensaio 1, nenhuma plântula foi obtida, impossibilitando a análise de citometria de fluxo.

No Ensaio 2, de um total de 64 explantes inoculados, ao final do processo de regeneração em meio MS, foram obtidas 62 plântulas. Dessas, 29 desenvolveram estruturas radiculares. A seguir segue descrição do número de plântulas obtidas por tratamento: sete advindas do tratamento 9 horas+ 0% de colchicina, 8 plântulas do tratamento 9 horas + 0,001% de colchicina, 8 plântulas do tratamento 9 horas + 0,005% de colchicina e 8 plântulas do tratamento 9 horas + 0,01% de colchicina; 8 plântulas advindas do tratamento 12 horas+ 0% de colchicina, 7 plântulas do tratamento 12 horas + 0,001% de colchicina, 8 plântulas do tratamento 12 horas + 0,005% de colchicina e por fim, 8 plântulas do tratamento 12 horas + 0,01% de colchicina.

Das 62 plântulas que se desenvolveram, 13 plântulas que apresentavam estruturas radiculares foram conduzidas para o processo de aclimatização, 8 plântulas (uma de cada tratamento) foram destinadas para análise de citometria de fluxo e 8 plântulas foram conduzidas para contagem de cromossomo (não foi possível a realização no presente trabalho em virtude da finalização do tempo para a defesa). Todas as plântulas encaminhadas ao processo de aclimatização morreram, e dessa forma não foi possível dar continuidade ao processo de avaliação das características morfológicas.

De acordo com a figura 9, todas as 8 plântulas regeneradas a partir do Ensaio 2 apresentaram um pico principal de intensidade relativa durante a análise de ploidia, esses picos correspondem a pesagem do conteúdo genômico, ou seja, quantidade de células analisadas. A Figura 6A, que corresponde ao tratamento 9 horas+ 0% de colchicina, controle diploide, apresenta os histogramas de rosa-do-deserto diploides (posição 2C-2x) com a formação de dois picos, G1, pico maior, e G2, pico menor. O pico G2 apresenta o dobro da ploidia, ou seja, material genético

duplicado, e o pico G1 o DNA nuclear, sendo diploide. Para interpretação dos gráficos é necessário observar a posição que o histograma se encontra no eixo x. O eixo y corresponde a quantidade de células em dada posição no eixo x. A altura do pico varia com relação a quantidade de folha que foi utilizada para o preparo da amostra, nesse caso não tem influência na determinação da ploidia do material.

Já nas figuras 6B (plântula regenerada a partir do tratamento de 9 horas na concentração de 0,001% de colchicina), 6C (plântula regenerada a partir do tratamento de 9 horas na concentração de 0,005% de colchicina) e 6D (plântula regenerada a partir da exposição por 9 horas na concentração 0,01% de colchicina) indica a formação de um pico maior exatamente na posição onde o pico G2 é formado no material diploide, ou seja, quando o pico G1 do poliploide sobrepõe o pico G2 do diploide, correspondendo, portanto, a um material na posição 4C (tetraploide-4x), de acordo com o conteúdo de DNA (pg) que dobrou com relação ao tratamento controle (Tabela 1).

No tempo de 12 horas, a figura 6E (plântula regenerada a partir do tratamento de 12 horas na concentração de 0% de colchicina), que corresponde ao controle, apresenta os histogramas de rosa-do-deserto diploides (posição 2C-2x) com a formação de dois picos, G1, pico maior, e G2, pico menor. Nesse tempo, a maioria dos histogramas apresentaram-se como diploide, na posição 2C (diploide), indicando uma baixa poliploidização, assim como nas figuras 6F e 6G. Apenas a amostra da figura 6H (plântula regenerada a partir do tratamento de 12 horas na concentração de 0,01% de colchicina), o pico maior está exatamente na posição onde o pico G2 é formado no material diploide, ou seja, quando o pico G1 do poliploide sobrepõe o pico G2 do diploide, correspondendo, portanto, a um material tetraploide (4x), de acordo com o conteúdo de DNA (pg) que dobrou com relação ao tratamento controle (Tabela 1).

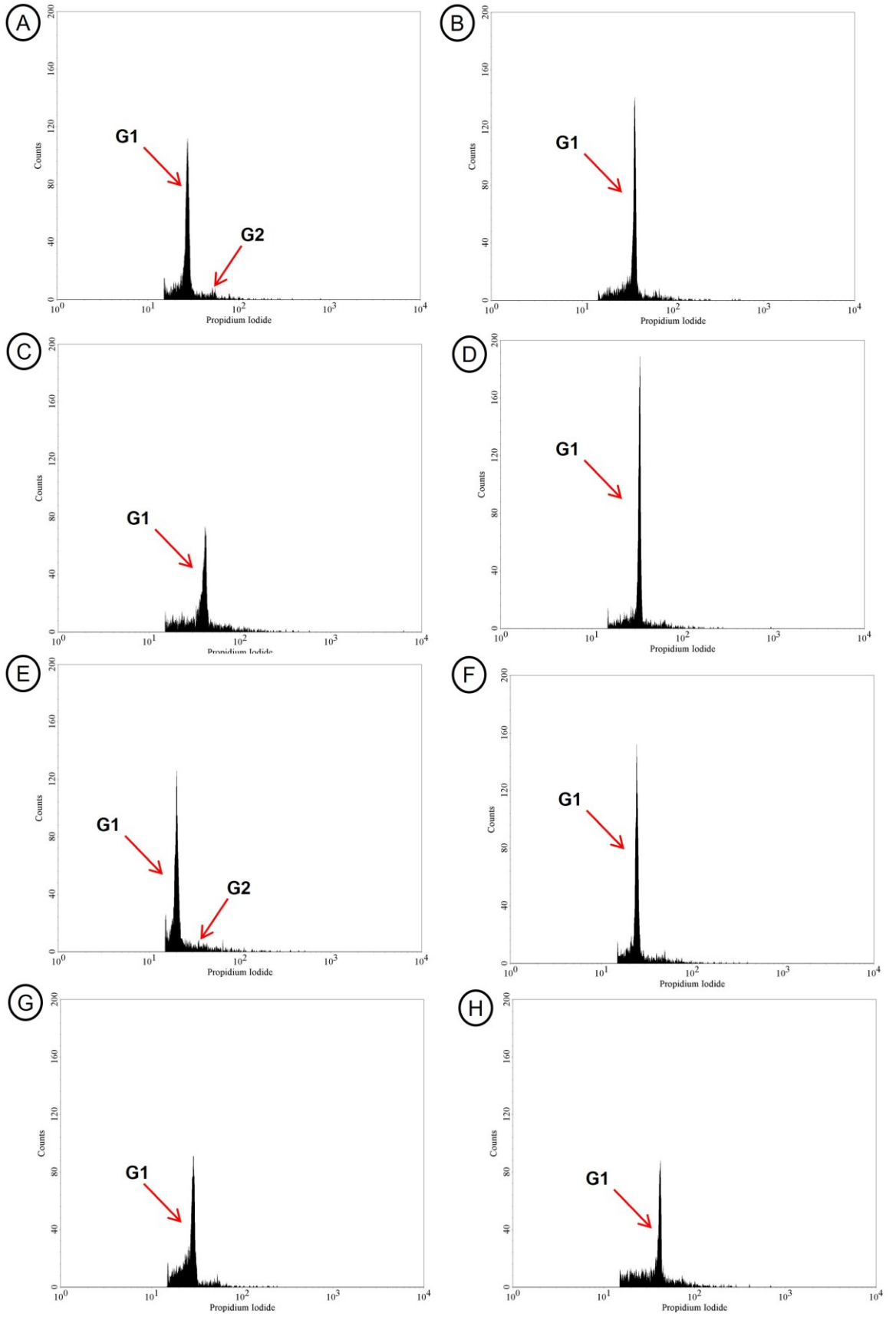


Figura 6: Citometria de fluxo da região apical de plântulas regeneradas *in vitro* de rosa-do-deserto tratadas com colchicina. Histogramas dos níveis de ploidia: **A:** tempo de exposição 9 horas+ 0% de colchicina (controle), com G1 indicando material diploide e G2 material poliploide; **B:** tempo de exposição 9 horas+ 0,001% de colchicina; **C:** tempo de exposição 9 horas+ 0,005% de colchicina; **D:** tempo de exposição 9 horas+ 0,01% de colchicina; **E:** tempo de exposição 12 horas+ 0% de colchicina (controle); **F:** tempo de exposição 12 horas+ 0,001% de colchicina; **G:** tempo de exposição 12 horas+ 0,005% de colchicina; **H:** tempo de exposição 12 horas+ 0,01% de colchicina.

Tratamentos	Conteúdo de DNA (pictogramas)
9 horas+ 0% de colchicina	0,72
9 horas + 0,001% de colchicina	1,12
9 horas + 0,005% de colchicina	1,23
9 horas + 0,01% de colchicina	1,02
12 horas+ 0% de colchicina	0,60
12 horas + 0,001% de colchicina	0,74
12 horas + 0,005% de colchicina	0,86
12 horas + 0,01% de colchicina	1,25

Tabela 1: Valores do conteúdo de DNA para cada tratamento dos tempos de 9 e 12 horas.

4 DISCUSSÃO

Nesse estudo, o tempo de exposição ao alcaloide e a região, indicando o tipo de explantes foram fatores determinantes e devem ser levados em consideração no processo para a implementação de um protocolo de formação de poliploides em *A. obesum*.

De acordo com os nossos resultados, podemos observar que a taxa de mortalidade, foi menor em regiões apicais e mediais, e em maiores tempos de exposição ao antimitótico, 12 e 18 horas. A maior sobrevivência dos explantes apicais e mediais já era esperado, devido a maior atividade meristemática dessas regiões, quando comparada ao explante da região basal. O tempo maior de exposição, também possui respostas positivas, como em *Fagopyrum esculentum* (Srivastava; Kumar, 2022), Red Flash (Zhang et al., 2020), *Brassolaeliocattleya* (Vilcherrez-Atoche et al., 2023), *Catharanthus roseus* (L.) G. (Nourozi et al., 2025) e *Lilium lancifolium* (Tang et al., 2025). Os diversos trabalhos publicados indicam que cada espécie se comporta de uma determinada forma quanto exposta ao reagente, já que o esperado seria uma maior taxa de sobrevivência em uma exposição a tempos reduzidos, como podemos constatar na progênie de *Brassolaeliocattleya* (Vilcherrez-Atoche et al., 2023), em *Echeveria peerless* (Cabahug et al., 2021), em

Dendrobium wardianum (Wang et al., 2023), em *Agastache mexicana* (Martínez-Aguilar et al., 2024), entre outras.

Ainda na variável taxa de mortalidade, é possível notar um maior impacto com relação a região e o tempo, sem influência da dose. A maior incidência foi na região basal, esse fato pode estar associado a uma baixa atividade meristemática nessa região, baixa lignificação, além de estar suscetível a um maior estresse químico devido a baixas divisões que ocorrem nesse local. Com relação ao tempo, foi notório uma maior porcentagem de mortalidade do explante as 6 horas de exposição ao antimetabólico. Esse fato pode estar atribuído a uma resposta rápida do antimetabólico, no tempo inicial, causando uma maior taxa de mortalidade comum a todas as doses.

A taxa de mortalidade, em geral, também foi relatada em diversos estudos, e as causas prováveis, não são destinadas apenas a colchicina, mas também aos compostos fenólicos que são liberados pelas plantas como mecanismo de defesa, contra a exposição ao estresse, isso ocasiona na produção de radicais oxidativos tóxicos que impedem a regeneração do material de estudo. Yan et al. (2022), relataram que em sementes outros compostos como flavonoides e terpenoides também aumentam a toxidez no cultivo *in vitro*.

A oxidação foi comum em todas as regiões; apicais, mediais e basais, porém sempre em tempos de maior exposição ao antimetabólico, que foram de 12 e 18 horas. Logo, podemos inferir que essa oxidação pode estar relacionada com esses períodos prolongados, em que o estresse oxidativo é maior, ocasionando no escurecimento e conseqüentemente em uma futura degradação dos explantes (Sasiree et al., 2013). De acordo com Griesbach (1981), o escurecimento causado na orquídea *Phalaenopsis* é devido ao aumento de substâncias fenólicas proporcionado após a exposição a colchicina. Sanford (1983), diz que altas concentrações e maior tempo de exposição causam escurecimento e necrose do tecido meristemático e conseqüentemente a morte das mesmas. Já em *Agastache mexicana* em relataram que uma das primeiras conseqüências da colchicina foi o escurecimento e redução do crescimento das plântulas tratadas (Martínez-Aguilar et al., 2024).

Para a formação de calos, o tempo foi o fator determinante, indicando que tempos intermediários, entre 6 e 12 horas, são essenciais para que ocorra a reorganização tecidual, esse padrão de calogênese foi semelhante com *Alocasia* (Thao et al., 2003).

Os brotos jovens, formam-se principalmente nos tempos que 6 e 12 horas, pois são tempos menores e com menor tempo de exposição ao antimitótico, favorecendo ao local com intensa atividade meristemática, além de ser um local altamente responsivo a organogênese e regeneração (Aoun et al., 2008; Kwiatkowska, 2008; Xue et al., 2023).

Para a formação de raízes, o fator determinante foi a região basal. Esse resultado também era esperado, já que o explante da região basal apresenta maior competência para a indução de raízes, além disso fatores hormonais, como a auxina, em que seu fluxo se concentra mais na região basal, logo favorecendo a rizogênese (Overvoorde et al., 2010). Podem estar associadas também a maior competência para reprogramação, que seria a capacidade de formar meristemas radiculares (Steffens; Rasmussen, 2016). Já a maior evidência seria no tempo de 12 horas, em que tempos intermediários são essenciais para indução radicular.

A citometria de fluxo é um recurso altamente confiável e simples para observar o nível de ploidia de plantas e pesos do genoma de variados tipos de plantas (Sattler et al., 2016; Eng; Ho, 2019). No presente estudo, para avaliação de poliploides foi usado a citometria para detectar picos e pesagem do DNA, que atribuem a possíveis poliploides.

Avaliando as plântulas que foram submetidas à análise de citometria de fluxo, podemos observar que todos os tratamentos do tempo de 9 horas produziram poliploides, mostrando a eficiência desse tempo de exposição ao antimitótico. Esse sucesso provavelmente se deve a um conjunto de fatores, dentre os quais, a permeabilidade do tecido e da capacidade de transferir agentes antimitóticos para segmentos de meristema, também com o tempo intermediário de exposição aplicado ao explante apical, que pode ter promovido efeito de menor citotoxicidade e necrose nos tecidos, aumentando assim a eficiência da duplicação (Sattler et al., 2016; Nourozi et al., 2025). Outro fator que pode ter auxiliado de forma sinérgica, foi a condição *in vitro* em que o explante apical foi acondicionado logo após a exposição

do agente antimitótico (tubos de ensaio). Os explantes foram individualizados em tubos em um ambiente sem competição com outros explantes e submetidos a um baixo estresse abiótico, aumentando as chances das células já duplicadas continuar os processos de divisão celular.

No tempo de 12 horas apenas o último tratamento de 0,01% apresentou-se como um poliploide. Quando avaliamos o tempo de 12 h de exposição, os baixos números de poliploidização podem ser em função de uma possível fitotoxidez que pode estar ocasionando uma baixa eficiência na duplicação dos cromossomos. De acordo com Sattler et al. (2016), o tempo e a concentração são fatores primordiais na indução de poliploidia, visto que tempos muito altos podem ocasionar toxidez nas células, logo se fazendo necessário achar um ponto ideal que não ocasione morte das células vegetais.

Com isso, os resultados do presente estudo indicam uma maior eficiência em todas as doses, no tempo de 9 horas para indução de poliploides. Esses resultados são os primeiros passos para o ajuste de uma metodologia eficiente e confiável para implementação em programas de desenvolvimento e indução de poliploidia em *Adenium obesum*, visando a geração de novas variantes genéticas. Logo, futuros trabalhos adicionais precisam ser conduzidos para ajustar todos as etapas do protocolo de poliploidização da rosa-do-deserto e assim poder torná-la como espécie-modelo no melhoramento genético da horticultura ornamental, além de atribuir as novas características adquiridas pela espécie.

5.2 Artigo- Estrutura das sementes e desenvolvimento do endosperma em *Adenium obesum* (Apocynaceae)

RESUMO

Adenium obesum, pertencente à família Apocynaceae, é nativa da África tropical, conhecida popularmente como rosa-do-deserto é uma planta suculenta e ornamental com diversas características que vêm potencializando o seu crescimento econômico. Estudos anatômicos irão auxiliar no entendimento da formação de tecidos que são essenciais para a melhor propagação e o desenvolvimento de plantas, além de ampliar o conhecimento sobre a espécie e família, que são de extrema importância. Esse trabalho tem como objetivo descrever a estrutura semente, elucidando aspectos da endospermogênese da rosa-do-deserto, que irão auxiliar para trabalhos futuros. Plantas cultivadas em casa de vegetação, foram submetidas à polinização artificial para obtenção de sementes. Para o estudo da estrutura e do desenvolvimento de ovários e sementes foram coletados em diferentes estádios de desenvolvimento, em pré-antese e 1, 2, 3, 8, 21, 40, 51 e 120 dias após a polinização artificial (DAP); as amostras foram processadas segundo técnicas usuais em anatomia vegetal. Os óvulos são anátropos, unitegmentados e tenuinucelados e são formados por um tegumento, nucelo e saco embrionário. O saco embrionário é reto, delimitado por células do endotélio, e constituído por duas sinérgides, oosfera, célula média e três antípodas voltadas para a região da calaza. Aos 40 DAP a celularização do endosperma está completa e é possível observar o embrião. A semente é formada por um tegumento, tecido de reserva e embrião. Esses estudos são essenciais para descrever e conhecer sobre a espécie, e dos seus atributos reprodutivos, além de contribuir com trabalhos futuros, já que o estudo da endospermogênese, contribuirá para aplicações na germinação e melhoramento genético.

Palavras-chave: rosa-do-deserto; endospermogênese; sementes, óvulos.

ABSTRACT

Adenium obesum, belonging to the Apocynaceae family, is native to tropical Africa and popularly known as desert rose. It is a succulent and ornamental plant with several characteristics that have been boosting its economic growth. Anatomical studies will help in understanding the formation of tissues that are essential for better propagation and plant development, as well as expanding knowledge about the species and family, which are extremely important. This work aims to describe the seed structure, elucidating aspects of endospermogenesis in desert rose, which will assist in future work. Plants cultivated in a greenhouse were subjected to artificial pollination to obtain seeds. For the study of the structure and development of ovaries and seeds, samples were collected at different stages of development, in pre-anthesis and 1, 2, 3, 8, 21, 40, 51 and 120 days after artificial pollination (DAP); the samples were processed according to usual techniques in plant anatomy. The ovules are anatropous, unitegumented, and tenuinucellate, and are formed by an integument, nucellus, and embryo sac. The embryo sac is straight, delimited by endothelial cells, and consists of two synergids, an oosphere, a median cell, and three antipodal cells facing the chalaza region. At 40 DAP (days after planting), endosperm cellularization is complete, and the embryo can be observed. The seed is formed by an integument, storage tissue, and embryo. These studies are essential to describe and understand the species and its reproductive attributes, as well as to contribute to future work, since the study of endospermogenesis will contribute to applications in germination and genetic improvement.

Keywords: desert rose; endospermogenesis; seeds; ovules.

1 INTRODUÇÃO

As sementes estão associadas a perpetuação das espécies, e com isso possuem função na propagação natural, atuando na dispersão das espécies em diferentes ambientes e na manutenção da variabilidade genética, fato esses que são essenciais para o processo evolutivo (Bewley et al., 2012; Taiz et al., 2017). Em *Adenium obesum* essas sementes são alongadas, coloração marrom e cerdas (nas extremidades) que atuam principalmente no processo de dispersão das sementes (Colombo et al., 2015; Avelin et al., 2016).

A. obesum apresenta uma maior variação na morfologia dentro de gênero *Adenium* e por isso, muitos aspectos devem ser estudados para um melhor conhecimento da espécie, uma delas está diretamente ligada à via de reprodução, que acontece, via semente, que está associada a programas de melhoramento, porém para a produção da mesma, são necessárias altas produções de sementes, o que é dificultado devido à esterilidade de flores masculinas e femininas que conseqüentemente afeta diretamente na polinização da espécie. Logo, conhecimento sobre o desenvolvimento das estruturas reprodutivas são essenciais para que esse processo seja eficaz.

Estudos sobre a embriogênese e endospermogênese são de extrema importância para variadas áreas dos estudos. Estudos em Apocynaceae sobre a estrutura da semente, são voltados principalmente para apresentar dados úteis na delimitação e identificação de espécie (Gabr, 2014), para identificar táxons (Vaughan, 1968), avaliar a qualidade da espécie (Schvambach et al., 2022), além de resolver aspectos relacionados a sistemática e filogenética. Com relação ao endosperma, os estudos sobre esse tecido, auxilia no conhecimento sobre o desenvolvimento do endosperma e sua interação com o embrião, o que conseqüentemente ajudará em melhorias nas taxas de germinação da espécie, na otimização de protocolos para embriogênese somática, e no melhoramento genético que inclui a hibridação e poliploidização (Yan et al., 2014; Lafon-Placette; Köhler, 2014; Kordyum; Mosyakin, 2020).

Apesar de alguns avanços, ainda pouco se sabe sobre desenvolvimento anatômico da semente da rosa-do-deserto e principalmente sobre estrutura, fases

do desenvolvimento e papel do endosperma, que poderá servir de subsídio para estudos e produção de plantas triploides a partir do mesmo. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar em um contexto anatômico a endospermogênese de *A. obesum* visando um melhor entendimento da sua formação e fases, bem como permitir a aplicação de futuras ferramentas para o melhoramento da espécie.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Descrição da área experimental

O trabalho foi conduzido em casa de vegetação e em laboratórios, sediados no Instituto de Ciências Agrárias (ICA) da Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, Minas Gerais, Brasil.

2.2 Material vegetal e condições de cultivo

Para a realização do presente estudo foram selecionadas plantas de *A. obesum* com idade aproximada de um ano e cujas flores variaram conforme segue: 1) pétalas com disposição simples e coloração roxa e rosa; 2) pétalas com disposição dupla e coloração branca ou 3) pétalas com disposição tripla e coloração vermelha.

As plantas, acondicionadas em vasos de quatro litros com substrato comercial da marca Bioplant®, foram mantidas em condições de casa-de-vegetação (80% sombreamento), adubadas semanalmente com composto comercial Fort flores e irrigadas manualmente de acordo com a demanda.

Para obtenção das amostras para estudos anatômicos, polinizações artificiais das flores foram feitas de acordo com metodologia proposta por Nietzsche et al. (2021).

2.3 Estudos anatômicos

Ovários e sementes foram coletados em diferentes estádios de desenvolvimento, sendo na pré-antese e com 1, 2, 3, 8, 21, 40, 51 e 120, DAP.

O material vegetal foi fixado em solução FAA₇₀ (Johansen, 1940) e mantido em etanol 70% até o processamento.

Amostras foram desidratadas em série ascendente de etanol, pré-infiltradas por embebição em resina-etanol (1:1) e em resina pura, sendo posteriormente submetidas à inclusão, de acordo com as recomendações do fabricante (Historesin Embedding Kit, Leica®). Secções longitudinais e transversais (4 µm) foram obtidas com micrótomo rotativo (Yidi-YD-315), submetidas à coloração com azul de toluidina 0,05% em pH 4,7 (O'Brien et al., 1964, modificado) e montadas entre lâminas de vidro e lamínulas com verniz incolor (Acrilex®). As fotomicrografias foram obtidas com câmera digital AxioCam 105 color acoplada a um microscópio primo star (Zeiss®).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os óvulos maduros de *A. obesum* são anátropos, unitegmentados e tenuinucelados (Figura 1A-B). Essas mesmas características podemos encontrar em espécies de Apocynaceae, como em *Rauvolfia L.* (Souto; Kocht, 2018). As características mais comuns do grupo das Apocynaceae são de óvulos unitegmentados e tenuinucelados (Periasamy, 1963; Latto, 1974; Balasubramanian, 1980; Sud, 1984) enquanto a classificação dos óvulos costuma diferenciar dentro da família, sendo mais comum em algumas espécies a classificação de óvulos hemianátropos (Latto, 1974; Sud, 1984; Khan; Singh, 1986).

Em óvulos anátropos o funículo é paralelo à região da rafe, e o saco embrionário e nucelo são retos, já os óvulos campilótropos, apresentam curvatura que abrange a base ovular até a região calazal e também a parte superior do óvulo,

consequentemente ficando curvado o saco embrionário e nucelo (Endress; Matthews, 2006).

O funículo, pedúnculo que liga o óvulo ao ovário, é formado por células cúbicas, volumosas e alongadas, com paredes celulares finas, núcleos volumosos e citoplasma periférico, o que evidencia características comuns em tecidos de sustentação e condução durante as fases iniciais de desenvolvimento do óvulo. Nota-se a presença de feixes vasculares que se entendem desde a placenta até a região da calaza (Figura 1A), que é amplamente evidenciada em angiospermas (Johri et al., 2013). A micrópila é representada por um canal bastante estreito e alongado formado pelo único tegumento (Figura 1A), características típicas de Apocynaceae (Rudall, 2021; Casanova; De Toni, 2025). Em Apocynaceae, essa redução tegumentar pode estar relacionada a uma especialização do endóstio e do endotélio, que tem como função direcionar o tubo polínico, em seguida nutrir o saco embrionário (Endress, 2011).

O tegumento apresenta células de formatos variados e volumosas, núcleo evidente e citoplasma abundante, sendo possível observar indícios de divisão celular e atividade mitótica evidente (Figura 1A-D). O nucelo na fase de pré-antese, é reduzido, formado por poucas camadas, de células volumosas e de formatos variados, núcleo evidente e vacuola desenvolvido (Figura 1B). O nucelo degenera precocemente nas fases pós-fertilização. Alguns estudos relatam esse mesmo evento, e que podem estar relacionados ao estabelecimento do endosperma alocando nutrientes para o endosperma e embrião (Xu et al., 2016; Lu; Magnani, 2018).

O saco embrionário é reto, delimitado pelo endotélio, que apresenta células mais achatadas e citoplasma denso. O saco é constituído por duas sinérgides, oosfera, célula média e três antípodas voltadas para a região da calaza (Figura 1C-D). As antípodas têm um formato arredondado, com parede celular fina, núcleo evidente, citoplasma reduzido e vacúolo lateral único (Figura 1B-C). A célula central também possui uma parede celular fina e um grande vacúolo central, citoplasma periférico (Figura 1C). As sinérgides e oosfera apresentam parede celular fina, núcleo evidente e vacúolo lateral, oosfera com citoplasma denso (Figura 1C-D). O vacúolo da oosfera está voltado para a extremidade micropilar, e o núcleo para a extremidade calazal (Figura 1D).

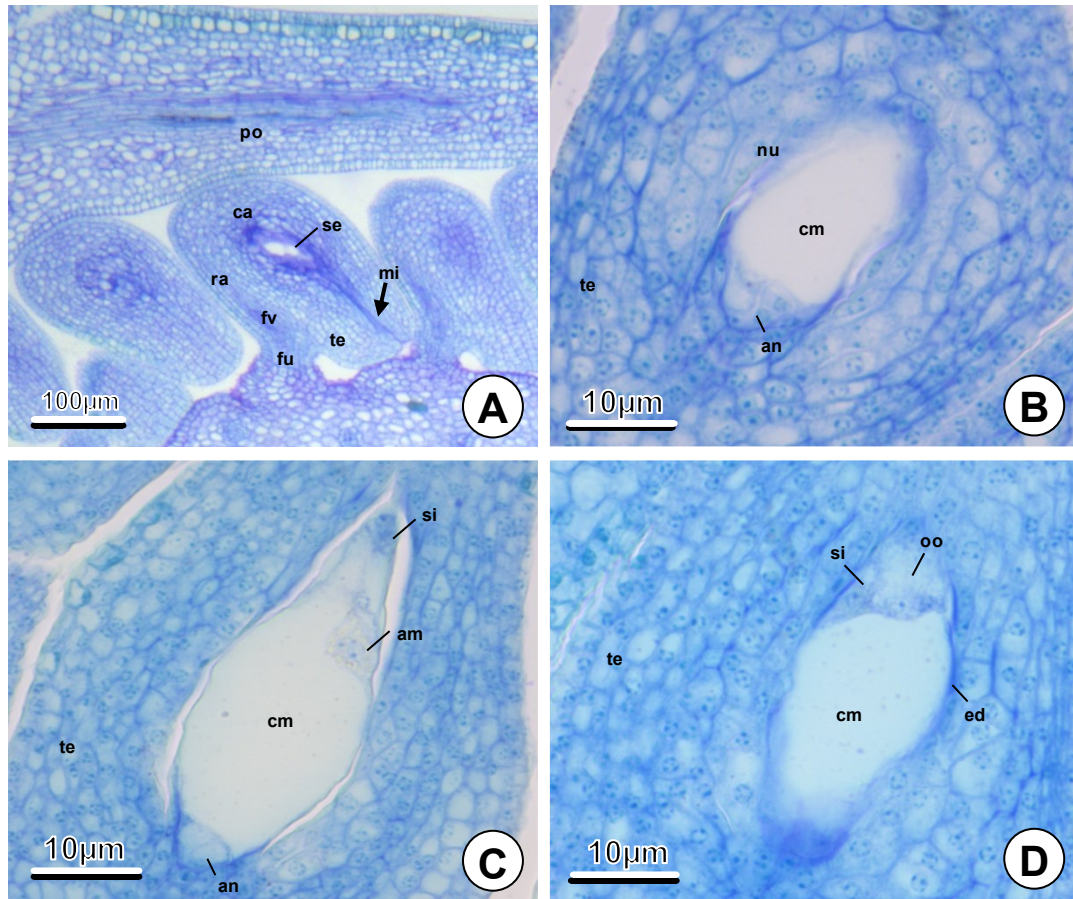


Figura 1: Secções longitudinais de óvulos em *Adenium obesum*, com 3 dias após a polinização (a) e na pré-antese (b-d). (A) Estrutura geral do óvulo, constituído de funículo, feixe vascular, rafe, calaza, saco embrionário, tegumento e micrópila. (B-C) Óvulo com nucelo tenuinucelado e tegumento unitegumentados. Detalhes do saco embrionário com célula média, antípodas voltadas para região calazal e sinérgides para a micrópila. (D) Destaque para as sinérgides e oosfera. an, antípodas; am, amido; ca, calaza; cm, célula média; ed, endotélio; fu, funículo; fv, feixe vascular; mi, micrópila; nu, nucelo; oo, oosfera; po, parede ovariana; ra, rafe; se, saco embrionário; si, sinérgides; te, tegumento.

Com 1, 2 e 3 DAP, notamos apenas uma célula média (Figura 2A-C). Após 8 DAP, é possível notar uma célula volumosa com vacúolo central, citoplasma periférico e multinucleada, caracterizando a célula primária do endosperma (Figura 2D). Com 21 DAP, observa-se um maior número de núcleos livres (Figura 2E). Aos 40 DAP, a celularização do endosperma, está completa e é possível observar embrião em fase globular (Figura 2F-G). O endosperma, de acordo com algumas evidências, podemos classificá-lo como do tipo nuclear, em que as paredes celulares não se formam concomitante a divisão do núcleo, vale ressaltar que essas divisões ainda não apresentam citocinese para gerar uma maior quantidade de núcleos livres na periferia da célula central, então o endosperma se torna celular após citocinese

em sentido vacúolo (Lopes; Larkins, 1993). Dessa mesma classificação podemos destacar em milho, cevada e arroz (Lopes; Larkins, 1993).

Aos 51 DAP, nota-se endosperma totalmente celularizado (Figura 2H). Em Apocynaceae. Poucos trabalhos foram realizados a respeito da endospermogênese, e com classificação do tipo nuclear, podendo ser encontrados em *Trachelospermum fragrans* e em *Holarrhena antidysenterica wall* (Latto, 1974; Sud, 1984). Já em outras espécies, o mesmo processo do presente trabalho também foi constatado, como em *Bulbostylis* Kunth e em *Dyckia pseudococcinea* (Mendes et al., 2021; Reutemann Arnolfo et al., 2021).

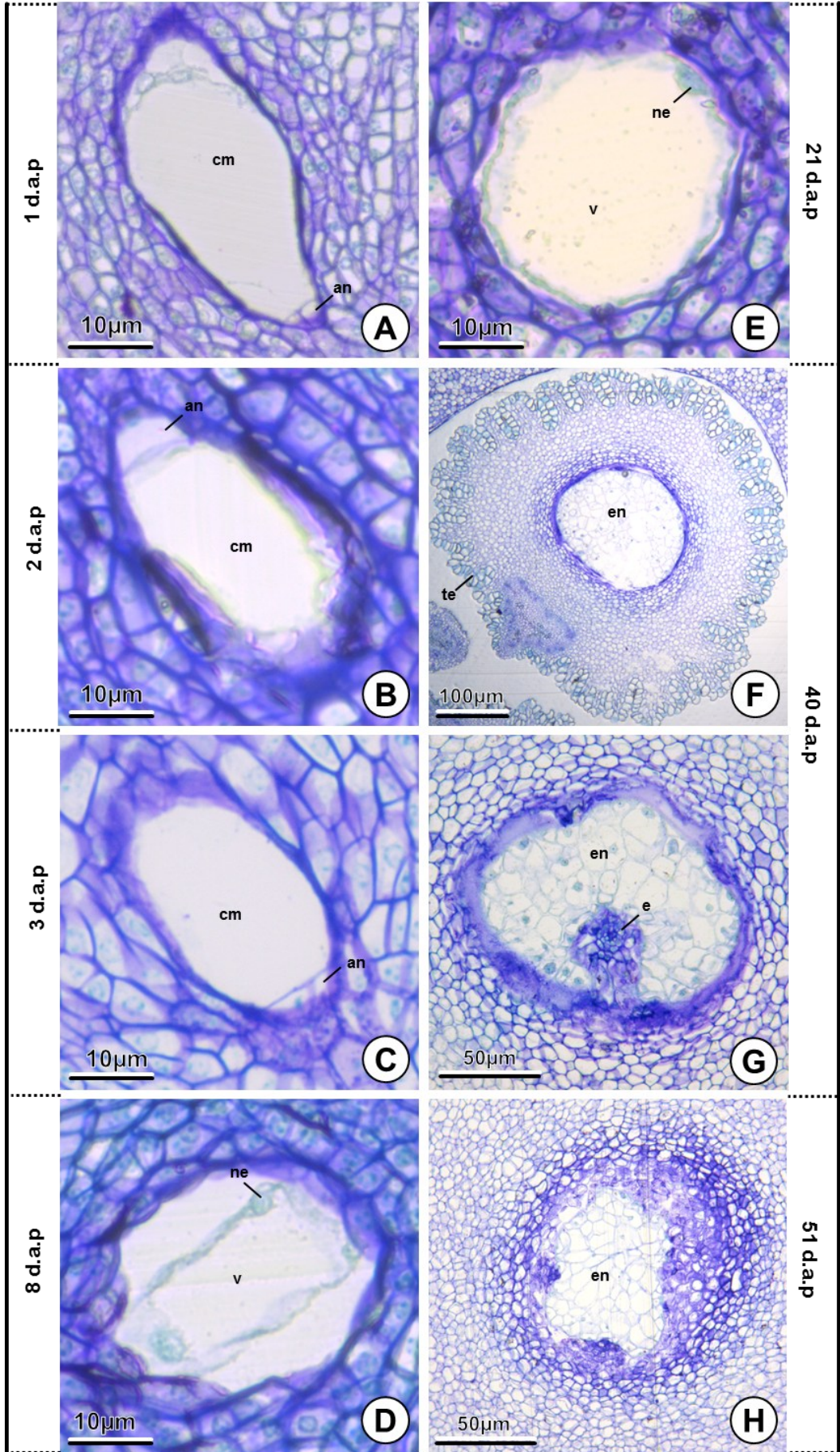


Figura 2: Secções longitudinais (**a-d**) e transversais (**e-h**) de óvulos em *Adenium obesum*, em diferentes dias após polinização (DAP). (**A-C**) Saco embrionário com poucas alterações com relação à pré-antese. (**D**) Com 8 DAP, notar célula primária do endosperma com núcleos livres. (**E**) Com 21 DAP, aumento da quantidade de núcleos livres. (**F-G**) Com 40 DAP, endosperma celularizado e embrião em fase globular. (**H**) Semente com 51 DAP, endosperma totalmente celularizado. an, antípodas; cm, célula média; e, embrião; en, endosperma; ne, núcleo do endosperma se, saco embrionário; te, tegumento; v, vacúolo.

A semente madura de *Adenium obesum*, com 120 DAP tem formato cilíndrico, seu tegumento possui uma coloração marrom, e nas suas extremidades nota-se a presença de cerdas com coloração marrom-dourado que é uma adaptação da espécie que facilita a dispersão das mesmas pelo vento (Figura 3A). Na morfologia externa de espécies da família Apocynaceae, como *Adenium arabisum* se assemelha com *Adenium obesum*, e se difere com *Pachypodium lamerei* e *Pachypodium meridionale* que possuem um formato mais ovoide. Quanto às cerdas em *Pachypodium lamerei* e *Nerium oleander* notou-se apenas em uma das extremidades (Colombo et al., 2015; Avelin et al., 2016).

Em secção longitudinal, a semente é formada por um tegumento, reduzido tecido de reserva e embrião. O tegumento é formado por células volumosas, de formatos variados e de contorno irregular nas suas extremidades, e com 40 DAP apresenta-se ruminado, com pequenas invaginações (Figura 2F, 3B-C). O tecido de reserva, interno ao tegumento, é formado por células pouco volumosas e de formatos variados, suas paredes são delgadas, com células justapostas, nota-se a presença de um citoplasma denso e núcleo pouco evidente (Figura 3B-C).

O embrião tem dois cotilédones completos com formato arredondado em sua extremidade (Figura 3D), e eixo embrionário tem formato cilíndrico, padrão esse que também pode ser encontrado em Apocynaceae (Johri et al., 2013). Constatou-se também uma curvatura no ápice radicular com uma porção reduzida, princípio da formação do caudex. Anatomicamente os cotilédones e o eixo embrionário apresentaram células de formatos variados, volumosas, com parede delgada, núcleo evidente. Na região mais externa do embrião, notou-se a presença de laticíferos do tipo articulado, encontrado também na família (Prado; Demarco, 2018) (Figura 3E-F).

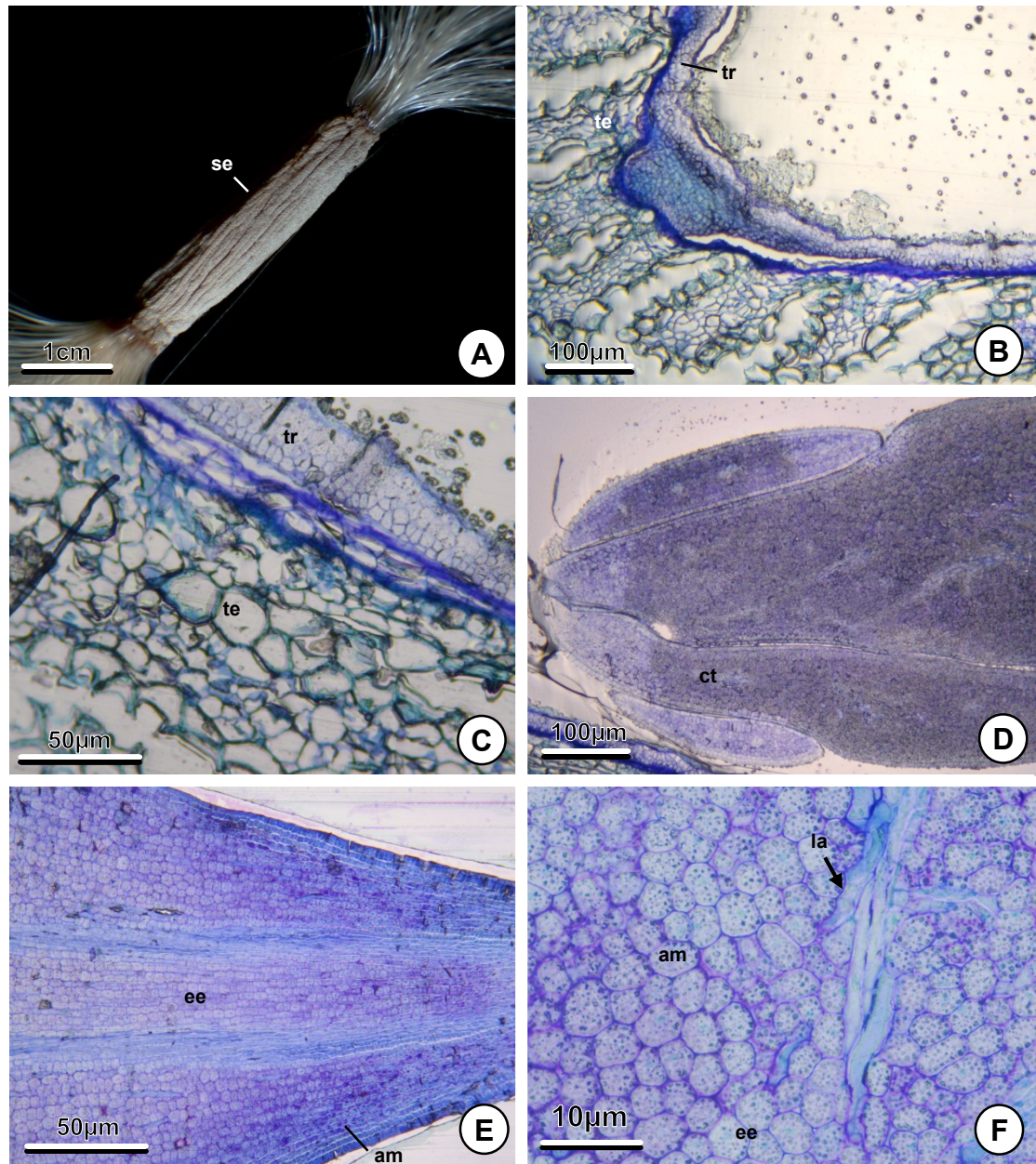


Figura 3: Secções longitudinais sementes maduras de *Adenium obesum*. (A) Estrutura externa da semente. (B-C) Parte externa da semente mostrando tegumento ruminado na sua extremidade e tecido de reserva. (D) Nota-se a presença de dois cotilédones completos. (E-F) Eixo embrionário contendo células volumosas, de formas variadas. Laticíferos do tipo articulado (seta). am, amido; ct, cotilédones; ee, eixo embrionário; la, laticíferos, se, semente; te, tegumento; tr, tecido de reserva.

6 CONCLUSÃO GERAL

Este estudo relata os diferentes efeitos do tempo de exposição à diferentes doses de colchicina e tipos de explantes na indução da poliploidia em *A. obesum*. A dose não foi responsiva em relação a colchicina, por outro lado, a região do explante e o tempo foram fundamentais para a indução da poliploidia. Ademais, a citometria de fluxo foi eficiente na estimativa da ploidia e na separação de plantas poliploides de plantas não poliploides. O estudo estrutural da semente demonstraram clareza sobre a identificação da espécie, além de contribuir para trabalhos futuros relacionados a germinação da espécie, quanto para o melhoramento genético. O estudo do endosperma é fundamental para otimizar futuros trabalhos com a produção de plantas triploides, uma vez que ela pode proporcionar características ornamentais mais desejáveis, além disso determinar o estágio em que o tecido endospermico esteja mais responsivo, é essencial para manter a capacidade de divisão e diferenciação.

7 REFERÊNCIAS

ARAÚJO, R. C.; RODRIGUES, F. A.; DÓRIA, J.; PASQUAL, M. In vitro germination of *Adenium obesum* under the effects of culture medium and light emitting diodes of different colors. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, v. 149, n. 3, p. 523–533, 2022.

ALDERETE, M.; BOLOGNA, P.; FACCIUTO, G.; HAGIWARA, J. C.; KATO, A.; ESCANDÓN, A. S. El uso de mutágenos en el mejoramiento de germoplasma ornamental nativo. *Ornamental Horticulture*, v. 13, p. 1938–1943, 2007.

AOUN, M.; CHARLES, G.; HOURMANT, A. Micropropagation of three genotypes of Indian mustard (*Brassica juncea* (L.) Czern.) using seedling-derived transverse thin cell layer (tTCL) explants. *arXiv preprint, arXiv:0807.1061*, 2008.

AVEKIN, Y. V.; NUZHINA, N. V.; GAIDARZHI, M. M. Estrutura de sementes de representantes suculentos da família Apocynaceae. *The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University. Series Biology*, v. 26, p. 16–28, 2016.

BALASUBRAMANIAN, V. Development of gametophytes in *Rauwolfia beddomei* Hook. *Current Science*, v. 49, p. 559–560, 1980.

BEWLEY, J. D.; BRADFORD, K.; HILHORST, H. *Seeds: physiology of development, germination and dormancy*. New York: Springer, 2012.

CASANOVA, J. M.; DE TONI, K. L. Development of ovules in Apocynaceae and their evolution in Gentianales. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 2025.

CABAHUG, R. A. M.; KHANH, H. T. T. M.; LIM, K. B.; HWANG, Y. J. Phenotype and ploidy evaluation of colchicine-induced *Echeveria* 'Peerless'. *Toxicology and Environmental Health Sciences*, v. 13, p. 17–24, 2021.

COLOMBO, R. C. et al. Biometric description of fruits and seeds, germination and imbibition pattern of desert rose (*Adenium obesum* (Forssk.) Roem. & Schult.). *Journal of Seed Science*, v. 37, p. 206–213, 2015.

CUI, L. et al. Research progress of chromosome doubling and 2n gametes of ornamental plants. *Horticulturae*, v. 9, n. 7, p. 752, 2023.

DHOOGHE, E. et al. In vitro induction of tetraploids in ornamental *Ranunculus*. *Euphytica*, v. 168, p. 33–40, 2009.

ENDRESS, P. K.; MATTHEWS, M. L. First steps towards a floral structural characterization of the major rosid subclades. *Plant Systematics and Evolution*, v. 260, p. 223–251, 2006.

ENDRESS, P. K. Angiosperm ovules: diversity, development, evolution. *Annals of Botany*, v. 107, n. 9, p. 1465–1489, 2011.

ENG, W. H.; HO, W. S. Polyploidization using colchicine in horticultural plants: a review. *Scientia Horticulturae*, v. 246, p. 604–617, 2019.

FORTI, V. A. et al. Flow cytometry as a tool for analyses of soybean seed vigour. *Seed Science and Technology*, v. 46, n. 2, p. 217–224, 2018.

GABR, D. G. Seed morphology and seed coat anatomy of some species of Apocynaceae and Asclepiadaceae. *Annals of Agricultural Sciences*, v. 59, n. 2, p. 229–238, 2014.

GRIESBACH, R. J. Polyploidy in *Phalaenopsis* orchid improvement. *Journal of Heredity*, v. 76, n. 1, p. 74–75, 1985.

GRIESBACH, R. J. Colchicine-induced polyploidy in *Phalaenopsis* orchids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 1, n. 1, p. 103–107, 1981.

JOHANSEN, D. A. *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill, 1940.

JOHRI, B. M.; AMBEGAOKAR, K. B.; SRIVASTAVA, P. S. *Comparative embryology of angiosperms*. New York: Springer, 2013.

KHAN, P. S.; SINGH, R. Structure and development of seeds of *Wrightia* species (Apocynaceae). *Geophytology*, v. 16, n. 1, p. 107–112, 1986.

KWIATKOWSKA, D. Flowering and apical meristem growth dynamics. *Journal of Experimental Botany*, v. 59, n. 2, p. 187–201, 2008.

KORDYUM, E. L.; MOSYAKIN, S. L. Endosperm of angiosperms and genomic imprinting. *Life*, v. 10, n. 7, p. 104, 2020.

LAFON-PLACETTE, C.; KÖHLER, C. Embryo and endosperm, partners in seed development. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 17, p. 64–69, 2014.

LATTOO, C. S. Morphology and embryology of *Holarrhena antidysenterica* Wall. *Botanical Gazette*, v. 135, n. 3, p. 173–180, 1974.

LOPES, M. A.; LARKINS, B. A. Endosperm origin, development, and function. *The Plant Cell*, v. 5, n. 10, p. 1383, 1993.

LU, J.; MAGNANI, E. Seed tissue and nutrient partitioning: a case for the nucellus. *Plant Reproduction*, v. 31, n. 3, p. 309–317, 2018.

MENDES, S. P.; COSTA, C. G. D.; DE TONI, K. L. G. Endosperm development in *Dyckia pseudococcinea* (Pitcairnioideae-Bromeliaceae). *Rodriguésia*, v. 72, p. e01682019, 2021.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v. 15, p. 473–497, 1962. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

MARTÍNEZ-AGUILAR, A.; SÁNCHEZ, E. V.; VALENCIA-DÍAZ, S.; ESTRADA-SOTO, S. E.; NAPSUCIALY-MENDIVIL, S.; BARBA-GONZÁLEZ, R.; PEREA-ARANGO, I. Tiliacin content and morphological characterization of colchicine-induced autotetraploids in *Agastache mexicana*. *PeerJ*, v. 12, p. e18545, 2024.

NIETSCHE, S.; ALMEIDA, E. F. A.; MENDES, R. B. *Cultivo e manejo da rosa-do-deserto*. 2021.

NOUROZI, E.; HEDAYATI, A.; MADANI, H.; HOSSEINI, B.; HEMMATY, S. In vitro synthetic polyploidization and enhancement of anticancer compounds in

- Catharanthus roseus* (L.) G. Don important cultivars. *Scientific Reports*, v. 15, n. 1, p. 6563, 2025.
- O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma*, v. 59, p. 368–373, 1964.
- OVERVOORDE, P.; FUKAKI, H.; BEECKMAN, T. Auxin control of root development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 2, n. 6, p. a001537, 2010.
- PRADO, E.; DEMARCO, D. Laticifers and secretory ducts: similarities and differences. *Ecosystem Services and Global Ecology*, p. 103, 2018.
- PERIASAMY, K. Studies on seeds with ruminant endosperm: III. Development of rumination in certain members of the Apocynaceae. In: *Proceedings of the Indian Academy of Sciences*, v. 58, n. 6, p. 325–332, 1963.
- PEETERS, M. K. R.; MARYNS, I.; GHESQUIERE, A. et al. Optimized tetraploidization strategies in tissue culture for *Lolium*, *Festuca* and *Festulolium*. *Biologia Plantarum*, v. 68, p. 1–12, 2024.
- REUTEMANN ARNOLFO, A. G.; MUCHUT, S. E.; UBERTI MANASSERO, N. G.; LAFORGA VANZELA, A. L.; LÓPEZ, M. G.; VEGETTI, A. C.; GONZÁLEZ, A. M. A comparative approach to understanding the ovule, seed, and fruit development in *Bulbostylis*. 2021.
- RUDALL, P. J. Evolution and patterning of the ovule in seed plants. *Biological Reviews*, v. 96, n. 3, p. 943–960, 2021.
- SASIREE, B. T.; TAYCHASINPITAK, S.; WONGCHAOCHANT; KIKUCHI, S. Effect of colchicine tablets on morphology of *Torenia fournieri*. *International Transaction Journal of Engineering, Management and Applied Sciences and Technologies*, v. 4, p. 299–309, 2013.
- SANFORD, J. C. Ploidy manipulations. In: JANICK, J. (ed.). *Advances in fruit breeding*. West Lafayette: Purdue University Press, 1983. p. 100–123.
- SATTLER, M. C.; CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R. The polyploidy and its key role in plant breeding. *Planta*, v. 243, n. 2, p. 281–296, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2450-x>
- SOLTIS, O. S.; MARCHANT, D. B.; VAN DE PEER, Y.; SOLTIS, D. E. Polyploidy and genome evolution in plants. *Current Opinion in Genetics & Development*, v. 35, p. 119–125, 2015.
- SRIVASTAVA, A.; KUMAR, G. Induced polyploidization in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, v. 82, n. 3, p. 333–341, 2022.
- STEFFENS, B.; RASMUSSEN, A. The physiology of adventitious roots. *Plant Physiology*, v. 170, n. 2, p. 603–617, 2016.
- SOUTO, L. S.; KOCH, I. Explaining ovule sterility in *Rauvolfia* L. (Apocynaceae). *International Journal of Plant Sciences*, v. 179, n. 5, p. 368–376, 2018.

- SUD, K. C. A contribution to the embryology of *Trachelospermum fragrans* Hook. f. (Apocynaceae). *Proceedings: Plant Sciences*, v. 93, p. 495–501, 1984.
- SCHVAMBACH, M. I. et al. Anatomical and histochemical characterization of seeds of *Cattleya intermedia* subjected to different storage conditions. *Rodriguésia*, v. 73, p. e01632021, 2022.
- TANG, Y. Q. et al. In vitro polyploidy induction of *Lilium lancifolium* and characterization. *Plants*, v. 14, n. 13, 2025.
- TARATIMA, W. et al. Optimal protocol for in vitro polyploid induction of *Cymbidium aloifolium*. *BMC Plant Biology*, v. 23, n. 1, p. 295, 2023.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I. M.; MURPHY, A. *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- THAO, N. T. P. et al. Induction of tetraploids in ornamental *Alocasia*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 72, p. 19–25, 2003.
- VAUGHAN, J. G. Seed anatomy and taxonomy. *Proceedings of the Linnean Society of London*, v. 79, p. 251–255, 1968.
- VILCHERREZ-ATOCHÉ, J. A.; SILVA, J. C.; CLARINDO, W. R. In vitro polyploidization of Brassolaeliocattleya hybrid orchid. *Plants*, v. 12, n. 2, p. 281, 2023.
- WANG, F. et al. In vitro induction of polyploidy in *Dendrobium wardianum*. *HortScience*, v. 58, n. 11, p. 1368–1375, 2023.
- WANG, L.; ZHENG, P.; GE, H. Colchicine-induced tetraploidy in *Aerides rosea*. *Plants*, v. 13, n. 24, p. 3535, 2024.
- WOOD, T. E. et al. The frequency of polyploid speciation in vascular plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, p. 13875–13879, 2009.
- WU, H. et al. Polyploid induction and identification of *Rosa roxburghii*. *Plants*, v. 12, n. 11, p. 2194, 2023.
- XUE, Y. et al. Micropropagation of *Duboisia* species via shoot tip meristem. *Horticulturae*, v. 9, n. 12, p. 1313, 2023.
- XU, W. et al. Endosperm and nucellus develop antagonistically in *Arabidopsis* seeds. *The Plant Cell*, v. 28, n. 6, p. 1343–1360, 2016.
- YAN, D. et al. The functions of the endosperm during seed germination. *Plant and Cell Physiology*, v. 55, n. 9, p. 1521–1533, 2014.
- ZHANG, Y. S. et al. Induction of tetraploids in 'Red Flash' caladium. *Scientia Horticulturae*, v. 272, p. 109524, 2020.
- ZAKIZADEH, S.; KAVIANI, B.; HASHEMABADI, D. In vivo-induced polyploidy in *Dendrobium 'Sonia'*. *Brazilian Journal of Botany*, v. 43, p. 921–932, 2020.
- ZOU, P.; ZHENG, Y.; WANG, Y. In vitro induction of tetraploids in *Melastoma candidum*. *Research Square*, 2024.