

EMANUELE CAROLINA BARICHELLO

EFEITOS DA COLCHICINA NO TRATAMENTO DE SEMENTES DE (*Physalis peruviana* L.), VISANDO A DUPLICAÇÃO CROMÔSSOMICA

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Produção vegetal.

Orientador: Dr. Jefferson Luís Meireles Coimbra

Co-orientadora: Dr. Patrícia Maria Oliveira Pierre

Lages, SC

2020

Dedico esse trabalho para meus pais e irmão, por todo amor, dedicação e esforço, para que eu pudesse estudar e chegar até aqui.

“Clama a mim, e reponder-te-ei, e anunciar-te-ei, coisas grandes e ocultas, que não sabem.”

Jeremias 33:3

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida maravilhosa! E a força para vencer as dificuldades.

A minha família, por todo amor e dedicação e força nessa caminhada.

Aos meus pais e irmão, pelo amor, paciência, esforço e incentivo em toda minha caminhada para o meu processo de formação profissional. Agradeço de todo coração.

Ao Prof Dr. Jefferson Luís Meirelles Coimbra, por ter a oportunidade de ser sua orientada. Agradeço por todos ensinamentos durante esse tempo, paciência, apoio, e correções na elaboração deste trabalho.

Ao Prof Dr. Altamir Guidolin, por todo suporte, ensinamentos que agregaram muito na minha formação e do trabalho.

A Prof Dr. Patrícia Maria Oliveira Pierre, por todos ensinamentos, esforço, dedicação, apoio e incentivo durante a formação desse trabalho.

A Prof Dr. Nicole Trevisani, agradeço por todos os seus ensinamentos, paciência, conselhos profissionais e pessoais, incentivo enorme na minha formação!

As minhas amigas de laboratório, Inayara Albuquerque e Jucimara Alves, pela amizade, apoio, confiança, contribuição e auxílio na elaboração desse trabalho. Essa jornada não seria a mesma sem vocês!

Aos colegas de Laboratório do grupo IMEGEM, por toda ajuda e contribuição nas etapas importantes da pesquisa;

Ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade do Estado de Santa Catarina, pela oportunidade de todo aprendizado adquirido durante o curso de mestrado;

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e por aceitarem contribuir com seus conhecimentos;

A CAPES pelo apoio financeiro durante a realização dessa pesquisa;

E a todos que de alguma forma contribuíram direta e indiretamente para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

O cultivo de *Physalis* demonstra relevante importância na classe dos pequenos frutos, devido ao seu valor como vitaminas A e C, fósforo e ferro. Com o aumento da procura por esse fruto com benefícios medicinais, é buscada a obtenção de genótipos com características superiores, como: aumento de tamanho de planta e conseqüentemente de frutos, maior produtividade, resistência a doenças entre outros. Uma das formas de ampliar a variabilidade genética existente é por meio da mutagênese (indução de poliploidia), para obter plantas com características fenotípicas desejáveis. A substância mais utilizada como indutora de poliploidia é a colchicina, um agente antimitótico, que tem como ação alterar o nível de ploidia da planta. O objetivo do presente estudo foi estabelecer uma metodologia para a indução de poliploidia em plantas tetraploides ($2n=4x=48$), visando a duplicação cromossômica, usando a colchicina, em *Physalis peruviana* L. Foi utilizada uma população de *Physalis*, proveniente de estudos anteriores. O delineamento experimental foi em esquema fatorial sendo 5 x 3 (doses x tempos) com 3 repetições. Os níveis dos fatores doses de colchicina foram 0, 0,01, 0,02, 0,04 e 0,08 g mL⁻¹, aliado aos tempos de exposição de 0, 8 e 12 horas. Para a indução foram utilizadas sementes, submetidas a uma solução de colchicina nos tempos pré estabelecidos. Foram avaliados: tamanho de radícula, densidade, diâmetro equatorial (largura), diâmetro polar (comprimento) de estômatos e quantidade 2C de DNA nuclear, para verificar se houveram mudanças no nível de ploidia. Os dados foram submetidos a análise de variância ($p>0,05$), com especificação do erro experimental e de amostragem para avaliar a variação e a interação dos níveis de tratamento (dose*tempo). Foi realizado o estudo dos efeitos de forma aninhada, onde a análise se torna mais informativa. Como os níveis são de origem quantitativa os dados foram submetidos ao desdobramento, por meio dos contrastes ortogonais para avaliar o comportamento dos tratamentos em relação ao desempenho das doses ao longo dos tempos de exposição. Com a indução foi possível avaliar que as variáveis de comprimento de radícula e densidade, diâmetro equatorial e diâmetro polar de estômatos apresentaram um comportamento diferenciado. A análise de citometria de fluxo realizada para quantidade 2C de DNA nuclear em *Physalis* apontou que não houve duplicação cromossômica. Assim, acredita-se que o comportamento diferenciado observado nos caracteres morfológicos seja decorrente de fatores ambientais, uma vez que os mesmos apresentam grande plasticidade fenotípica. Recomenda-se realizar a indução com doses com concentrações mais elevadas e tempos de exposição mais longos.

Palavras – chave: Citometria de fluxo, mutagênese, *Physalis*.

ABSTRACT

The cultivation of physalis shows relevant importance in the small fruit class, due to its value as vitamins A and C, phosphorus and iron. With the increased demand for this fruit with medicinal benefits, it is sought to obtain genotypes with superior characteristics, such as: increase in plant size and consequently in fruits, greater productivity, resistance to diseases, among others. One of the ways to increase the existing genetic variability is through mutagenesis (polyploidy induction), to obtain plants with desirable phenotypic characteristics. The substance most used as a polyploidy inducer is colchicine, an antimitotic agent, whose action is to change the ploidy level of the plant. The objective of the present study was to establish a methodology for the induction of polyploidy in tetraploid plants ($2n = 4x = 48$), aiming at chromosomal duplication, using colchicine, in *Physalis peruviana* L. A population of physalis, from previous studies, was used. The experimental design was in a factorial scheme with 5×3 (doses \times times) with 3 repetitions. The levels of the dose factors of colchicine were 0, 0,01, 0,02, 0,04 and 0,08 g mL⁻¹, combined with the exposure times of 0, 8 and 12 hours. For induction, seeds were used, submitted to a colchicine solution at pre-established times. Radicle size, density, equatorial diameter (width), polar diameter (length) of stomata and 2C amount of nuclear DNA were evaluated to check for changes in the ploidy level. The data were subjected to analysis of variance ($p > 0.05$), with specification of the experimental and sampling error to assess the variation and interaction of treatment levels (dose \times time). The study of effects was carried out in a nested way, where the analysis becomes more informative. As the levels are of quantitative origin, the data were submitted to unfolding, using orthogonal contrasts to assess the behavior of treatments in relation to the performance of doses over the exposure times. With the induction it was possible to evaluate that the variables of radicle size and density, equatorial diameter and polar diameter of stomata presented a different behavior. Flow cytometry analysis performed for 2C amount of nuclear DNA in physalis showed that there was no chromosomal duplication. Thus, it is believed that the different behavior observed in the morphological characters is due to environmental factors, since they have great phenotypic plasticity. It is recommended to perform induction at doses with higher concentrations and longer exposure times.

Keywords: Flow cytometry, mutagenesis, physalis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1-** Representação gráfica das equações polinomiais de segundo grau, com coeficiente de determinação r^2 , para a variável densidade de estômato μm , em função dos tempos de exposição de 0, 8 e 12 horas e doses de colchicina (0; 0,01; 0,02; 0,04 e 0,08 g mL^{-1}).....28
- Figura 2** – Representação gráfica das equações polinomiais de primeiro e segundo grau e coeficiente de determinação r^2 , para a variável densidade de estômatos μm , em função das doses de colchicina (0; 0,01; 0,02; 0,04 e 0,08 g mL^{-1}) e tempos de exposição de (0, 8 e 12 horas).....30
- Figura 3** – Representação gráfica das equações polinomiais de segundo grau, com coeficiente de determinação r^2 , para a variável diâmetro equatorial (largura) de estômato μm , em função dos tempos de exposição de 0, 8 e 12 horas e doses de colchicina (0; 0,01; 0,02; 0,04 e 0,08 g mL^{-1}).....32
- Figura 4** – Representação gráfica das equações polinomiais de primeiro e segundo grau e coeficiente de determinação r^2 , para a variável diâmetro equatorial (largura) estômatos μm , em função das doses de colchicina (0; 0,01; 0,02; 0,04 e 0,08 g mL^{-1}) e tempos de exposição de (0, 8 e 12 horas).....34
- Figura 5** – Representação gráfica das equações polinomiais de segundo grau, com coeficiente de determinação r^2 , para a variável diâmetro polar (comprimento) de estômato μm , em função dos tempos de exposição de 0, 8 e 12 horas e doses de colchicina (0; 0,01; 0,02; 0,04 e 0,08 g mL^{-1}).....36
- Figura 6**– Representação gráfica das equações polinomiais de primeiro e segundo grau e coeficiente de determinação r^2 , para a variável diâmetro polar (comprimento) de estômatos μm , em função das doses de colchicina (0; 0,01; 0,02; 0,04 e 0,08 g mL^{-1}) e tempos de exposição de (0, 8 e 12 horas).....37

Figura 7 – Densidade equatorial (largura) μm e Densidade polar (comprimento) de estômatos μm , da vista frontal da face abaxial (aumento de 200x) da folha, após a indução a duplicação em *Physalis peruviana* L. Área total de cada imagem 0,093 μm . Barra = 10 μm38

Figura 8 – Representação gráfica das equações polinomiais de primeiro e segundo grau e coeficiente de determinação r^2 , para a variável comprimento de radícula mm, em função das doses de colchicina (0; 0,01; 0,02; 0,04 e 0,08 g mL^{-1}) e tempos de exposição de (0, 8 e 12 horas).....39

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Análise de variância para o estudo do comportamento dos efeitos simples e da interação dos tempos de exposição (0, 8 e 12 horas), dose de colchicina de (0 ; 0,01; 0,02; 0,04 e 0,08 g mL⁻¹), e contrastes ortogonais, para a variável: densidade de estômatos μm , UDESC – IMEGEM, Lages SC, 2020.....25
- Tabela 2** - Funções polinomiais ajustadas para representar a relação entre densidade de estômatos μm , diâmetro equatorial (largura) de estômatos μm , diâmetro polar (comprimento) de estômatos μm e tamanho de radícula mm, e os tempos de exposição de cada tempo de exposição de (0, 8 e 12 horas), e cada dose de colchicina de (0 ; 0,01; 0,02; 0,04 e 0,08 g mL⁻¹). UDESC – IMEGEM, Lages SC, 2020.....27
- Tabela 3** – Análise de variância para o estudo do comportamento dos efeitos simples e da interação dos tempos de exposição (0, 8 e 12 horas), dose de colchicina de (0 ; 0,01; 0,02; 0,04 e 0,08 g mL⁻¹), e contrastes ortogonais, para a variável: diâmetro equatorial (largura) de estômatos μm , UDESC – IMEGEM, Lages SC, 2020.....31
- Tabela 4** – Análise de variância para o estudo do comportamento dos efeitos simples e da interação dos tempos de exposição (0, 8 e 12 horas), dose de colchicina de (0 ; 0,01; 0,02; 0,04 e 0,08 g mL⁻¹), e contrastes ortogonais de doses(tempo) e tempo (dose), para a variável: diâmetro polar (comprimento) de estômatos μm , UDESC – IMEGEM, Lages SC, 2020.....35
- Tabela 5** - Análise de variância para os efeitos simples de doses de colchicina (0; 0,01; 0,02; 0,04 e 0,08 g mL⁻¹) e tempos de exposição (0, 8 e 12 horas), para a variável comprimento de radícula mm. UDESC – IMEGEM, Lages SC, 2020.....38
- Tabela 6** - Conteúdo de 2C de DNA nuclear em picogramas (pg) na população de Lages, considerando as médias das quatorze amostras de doses de colchicina (0; 0,01; 0,02;0,04 e 0,08 g mL⁻¹) aliados aos tempos de exposição (0, 8 e 12 horas) de cada

planta. UDESC – IMEGEM ,Lages SC,
2020.....40

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	12
1.1 Importância econômica de <i>Physalis peruviana</i> L.	12
1.1.2 Melhoramento genético da espécie	13
2 CAPÍTULO I: EFEITOS DA COLCHICINA NO TRATAMENTO DE SEMENTES DE (<i>Physalis peruviana</i> L.), VISANDO A DUPLICAÇÃO CROMÔSSOMICA	17
2.1. RESUMO	17
2.2 INTRODUÇÃO	18
2.3 MATERIAL E MÉTODOS	19
2.3.1 Indução de duplicação cromossômica em sementes	20
2.3.2 Caracteres avaliados.....	20
2.3.3 Quantificação estomática.....	20
2.3.4 Comprimento de radícula	21
2.3.5 Citometria de fluxo para a determinação da quantidade do conteúdo 2C de DNA nuclear	21
2.3.6 Análise estatística.....	22
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
3.1 Densidade de estômatos	23
3.1.2 Diâmetro equatorial (largura)	30
3.1.3 Diâmetro polar (comprimento)	34
3.1.4 Comprimento de Radícula	38
3.1.5 Quantidade 2C de DNA nuclear	39
3.2 CONCLUSÃO	42
4. REFERÊNCIAS	43

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Importância econômica de *Physalis peruviana* L.

A espécie *Physalis peruviana* L, figura atualmente como destaque na classe dos pequenos frutos, em virtude de sua importância econômica. Existem mais de 100 espécies do gênero *Physalis* (TREVISANI et al.; 2018). O nome *physalis* tem origem grega, onde o termo inicial “Physsa”, tem significado de bolha ou bexiga, que faz referência ao cálice que envolve o fruto (CHAVES, 2017). A *physalis* se evidencia pela sua importância farmacêutica, sendo rico em vitaminas, flavonoides, fisalinas e compostos bioativos benéficos a saúde humana. Os frutos são delicados muito utilizados em doces, sucos, e enfeites de confeitaria, as raízes e folhas são designadas na produção de medicamentos (MUNIZ et al.; 2015).

A espécie se caracteriza pelo cultivo de baixo custo, facilidade de adaptação em ambientes variados, sendo em grande parte cultivada por pequenos produtores (BUFFON et al.; 2020). Como principal produtor de *physalis*, a Colômbia se sobrepõe pela sua grande produção, sendo 50% do que é produzido é exportado, onde a qualidade do fruto possui rigoroso padrão para ser revendido (RODRIGUES et al.; 2013). Segundo a Agronet 2017, em sua última atualização a Colômbia produz 18,889 toneladas de frutos, sendo estes *in natura*, desidratado e para fins medicinais. O Brasil é dependente da importação dos frutos, onde são revendidos por preços elevados entre R\$ 50,00 a 80,00 Kg, e no Estado de Santa Catarina a produção é considerada insignificante, em relação a demanda do mercado consumidor. Além da produção não apresentar normas de padronização de qualidade de tamanho de fruto (TREVISANI et al.; 2018). Embora no país a produção de *physalis* não seja em larga escala, seu consumo é considerado igualmente ou até elevado em comparação as demais classes dos pequenos frutos. A *physalis* é reconhecida na região Centro-Sul do Brasil, e vem sendo inserida aos poucos nas demais regiões no país (MUNIZ et al.; 2015).

A grande quantidade de propriedades medicinais benéficas, presentes no *physalis* ao organismo humano e pela sua plasticidade na gastronomia, desperta o interesse da comunidade científica. Como é um gênero relativamente com poucos estudos e apresenta vasta variação morfológica inter e intraespecífica, principalmente em tamanho de fruto, é buscado explorar e estudar esse gênero (GODINA, 2012). Para a exploração, tem -se como objetivo melhorar a produção da cultura e tamanho de fruto, por meio do melhoramento genético de plantas, tanto para a criação ou exploração da variabilidade genética (LUIS, 2016).

1.1.2 Melhoramento genético da espécie

O estudo em *Physalis peruviana* L é considerado muito recente. No Brasil os trabalhos iniciaram em 2006, na Universidade Federal de Pelotas (UFPel) e na Universidade do Estado de Santa Catarina, apresentando resultados benéficos na tecnologia de produção, com isso, muitas pesquisas ainda não são totalmente consolidadas por ser uma cultura relativamente nova introduzida no país (MUNIZ et al.; 2015). Desta forma, estudos voltados ao melhoramento genético também são considerados muito recentes (TREVISANI et al.; 2018).

O melhoramento genético de *physalis* vem aos poucos se destacando em várias áreas, sendo estas agrícolas e farmacêuticas. Como citado anteriormente, o cultivo de *physalis* se destaca pelas suas propriedades medicinais e frutos que são utilizados para diversos fins. Sendo assim, vários estudos voltados ao melhoramento genético vem sendo desenvolvidos, com o intuito de criar e selecionar genótipos com características superiores, tanto para indústrias farmacêuticas destinados para medicamentos e fins terapêuticos, quanto para o mercado agrícola, resultando em plantas que apresentem altas produtividades aliados com frutos de qualidade (ARAUJO, 2012). Por ser uma cultura que apresenta grande variação entre os gêneros em relação ao nível de ploidia, tamanho de planta e fruto e coloração das flores, muito dessa diversidade é explorada para o aprimoramento dos programas de melhoramento genético (SILVA et al.; 2017).

Em países da América do Sul como Brasil, Chile, Equador, foram organizadas coleções de genótipos silvestres e selvagens de *physalis*, que apresentam alta variabilidade genética e características diferenciadas (FISCHER et al.; 2014). Nas coleções é permitido consolidar uma base de dados, são estudados e pesquisados genótipos que apresentam uma maior variabilidade genética a ser explorada (LAGOS et al.; 2007). Dessa forma, busca-se o melhoramento dessa frutífera, com a principal finalidade de desenvolver genótipos que apresentem características para seleção, resultando em maior variabilidade genética, proporcionando plantas com excelente produção e frutos de qualidade (TREVISANI et al.; 2018). Na busca da criação ou seleção de variabilidade genética, o primeiro passo do melhorista, é identificar e selecionar genótipos que apresentem características desejáveis entre os existentes na natureza. Como a duplicação cromossômica natural é rara na natureza, são utilizadas técnicas capazes de gerar a variação genética, principalmente para o caráter de interesse (CONDORI et al.; 2016).

As técnicas utilizadas na criação ou seleção de variabilidade genética, como mutação, hibridação e indução de poliploidia são usadas, tanto para a duplicação cromossômica quanto para a restauração da fertilidade (LAGOS et al.; 2007). No melhoramento genético de plantas,

a pesquisa busca explorar a variabilidade genética, sendo esta existente ou gerada de forma induzida. Com isso, o objetivo central no melhoramento é o aumento da expressão de genes em caracteres quantitativos e qualitativos, voltados para tamanho de plantas e frutos, e teores de compostos bióticos (ARAUJO, 2012).

Por meio de pesquisas e estudos, busca-se técnicas para melhorar caracteres de plantas por meio de subsídios do melhoramento. Em *Physalis* o caráter de maior relevância é a qualidade de fruto, com isso, busca-se explorar e aumentar o seu tamanho (ARAUJO, 2012). Sendo assim, uma das técnicas mais empregadas na criação de variabilidade para o caráter tamanho de fruto é a indução de poliploidia, que visa a duplicação cromossômica, fazendo com que as plantas apresentem, raízes e caules espessos, estômatos, folhas, flores e frutos maiores. Também pode apresentar, ciclo mais longo, resistência a doenças e pragas e maior tolerância a estresse causados pelo ambiente (LUIS, 2016). Normalmente a poliploidia de forma induzida também pode ser utilizada para restauração da fertilidade e pode causar esterilidade em híbridos interespecíficos (PIO, 2008). Um dos efeitos fenotípicos mais vistos, quando realizada a indução artificial, é a esterilidade (GROSSER et al.; 2014), que segundo Wittmann et al, (2013) é devida a distribuição irregular do pareamento dos cromossomos durante a meiose. A ação da colchicina em plantas com números básicos elevados, reflete diretamente nos processos fisiológicos das plantas, causando a esterilidade, que em muitos casos não é considerada desfavorável.

A maioria das espécies do gênero *Physalis* é diploide $x=12$. No entanto, a *Physalis peruviana* é tetraploide $2n=4x=48$, onde é buscada a duplicação cromossômica, com intuito de aumento de tamanho de fruto para um octaploide (TREVISANI et al.; 2018). A poliploidia é utilizada como um método de criação ou ampliação da variabilidade genética e vem trazendo grandes benefícios para o melhoramento genético (VEASEY et al.; 2011). Se demonstra como uma técnica ampla para obtenção de plantas com características superiores. (SILVA, 2014). Essa alteração cromossômica ocorre por meio de mudanças que podem ser esporadicamente dentro da natureza ou por induções de mutações, com o uso de agentes antimitóticos como a colchicina (VEASEY et al.; 2011). A utilização de agentes mutagênicos é muito usada na criação e no estudo de genes de alto interesse agrônomico (COIMBRA et al; 2005).

A utilização da colchicina é capaz de produzir plantas com maior nível de ploidia, por meio da interrupção do ciclo mitótico. A colchicina atua na despolimerização dos microtúbulos. Dessa forma, os cromossomos ficam no núcleo de restituição, fazendo com que a célula apresente o dobro do número de cromossomos. De uma forma geral, a formação de poliploides artificiais, é considerada benéfica para o processo evolutivo, sendo que a poliploidia produz um

efeito de heterose nas plantas, fazendo com que ocorra maiores combinações gênicas, ampliando a variabilidade genética (SILVA, 2014).

Os poliploides podem ser divididos em: autopoliploides, onde o genoma básico está presente mais que duas vezes, ex: *Physalis peruviana* L e, em alopoliploides, onde o genoma de duas ou mais espécies distintas é combinado e estão presentes duas vezes. Os autoalopoliploides que estão presentes no genoma em quatro vezes e podem ser combinados com genomas não homólogos, mas de forma compatível (BATTISTIN et al.; 2013).

As plantas são testadas e adequadas as técnicas de indução de poliploidia como a de cultura de tecidos, onde são utilizados explantes e ápices caulinares. Também é possível utilizar as sementes e plântulas de *physalis* imergidas diretamente na solução de colchicina. Desta forma, podem ser testadas diferentes doses de colchicina aliado a tempos de exposição para estudar e avaliar quais apresentaram resposta de taxas de duplicação. Por ser um produto com elevada toxicidade, algumas espécies podem apresentar anomalias, perdas de cromossomos e infertilidade (LUIS, 2016).

Na identificação de duplicação cromossômica, são observados vários caracteres morfológicos e anatômicos como: crescimento radicular, tamanho e quantidade de estômatos, tamanho de folha, quantidade de clorofila *a* e *b* e tamanho de fruto (LUIS, 2016). Outras análises e estudos citogenéticos são empregados na verificação de alteração no nível de ploidia como: viabilidade polínica, se os mesmos se mantêm férteis ou apresentam alguma anomalia. Também busca-se caracterizar e contar o número de cromossomos, fornecendo informações úteis para os programas de melhoramento (ARAÚJO et al.; 2015). Os caracteres morfológicos servem como indicativos prévios para seleção de poliploides, a confirmação deve ser feita por meio de citometria de fluxo (LOUREIRO, 2004). Assim, esta técnica pode ser considerada como uma estratégia promissora para o aumento do tamanho dos frutos em *physalis* (BETANCOURT, 2014). Além disso, a formação de plantas poliploides em espécies alogâmicas como *Physalis peruviana* L, faz com que ocorra uma maior recombinação gênica, aumentando a probabilidade de se obter um genótipo duplicado e equilibrado (LUIS, 2016).

Como ressaltado em vários trabalhos, a taxa de duplicação nem sempre apresenta grandes sucessos, por ser utilizado produtos com altas taxas de toxicidade, que causam mortalidades em quase todo o experimento. Dessa forma, é necessário um equilíbrio na utilização dessa técnica, dosando as doses de colchicina e os tempos de exposição, sendo utilizada inicialmente como uma ferramenta importante em programas de melhoramento (WITTMANN et al.; 2013).

No trabalho desenvolvido por Luis (2016), foi possível observar uma taxa de 80% de indução, com resultados responsivos, o que gerou aumento de produtividade de frutos por planta, maior quantidade de metabólitos secundários como vitamina C e uma pequena alteração no sabor do fruto, sendo este mais adocicado. Vários trabalhos têm demonstrado a eficiência da técnica de duplicação, sendo esta, usada para estratégias em programas de melhoramento para aumentar a variabilidade genética, com isso ampliar os estudos na comunidade científica, por ser uma cultura tão recente no país.

O objetivo do presente estudo foi estabelecer uma metodologia para indução de poliploida, buscando um equilíbrio entre as doses de colchicina aliado aos tempos de exposição, com intuito de promover a duplicação cromossômica em *Physalis peruviana* L.

2 CAPÍTULO I: EFEITOS DA COLCHICINA NO TRATAMENTO DE SEMENTES DE (*Physalis peruviana* L.), VISANDO A DUPLICAÇÃO CROMOSSOMICA

2.1. RESUMO

A indução da poliploidia ou duplicação cromossômica, é uma técnica amplamente utilizada no melhoramento genético em várias culturas, seja para restauração da fertilidade ou para o aumento de estruturas morfológicas da planta. O objetivo do presente estudo foi estabelecer uma metodologia para a indução de poliploidia em plantas tetraploides $2n=4x=48$, visando a duplicação cromossômica, usando a colchicina em diferentes concentrações em sementes de genótipos tetraploides de *Physalis peruviana* L. O experimento foi conduzido em delineamento experimental de esquema fatorial, com 5 x 3 (doses de colchicina x tempos de exposição), composto por 3 repetições. Foram utilizados cinco sacos de tule contendo 300 sementes cada, pré-embebidas em água destilada por duas horas. Em seguida, foram imergidas na solução de colchicina com as respectivas doses de 0, 0,01, 0,02, 0,04 e 0,08 g mL⁻¹, aliado a diferentes tempos de exposição de 0, 8 e 12 horas. Os caracteres avaliados foram: tamanho de radícula mm, densidade de estômatos, diâmetro equatorial e polar de estômatos e quantidade 2C de DNA nuclear. Os dados foram submetidos à análise de variância, para a compreensão do comportamento dos efeitos de dose aninhado dentro de tempo e tempo aninhado dentro de dose, e interação dos níveis de dose*tempo. Na análise, estudou-se a variação dos tratamentos, utilizando a especificação do erro experimental e de amostragem. Para cada variável, foram ajustadas curvas de regressão de acordo com cada grau dos polinômios. Na análise dos efeitos aninhados, observou-se que o tempo foi preponderante na maioria das variáveis, demonstrando que o mesmo deve ser equilibrado com as doses de colchicina, para que a duplicação cromossômica ocorra com sucesso. Nas outras análises, foi possível observar que as variáveis: tamanho de radícula, densidade, diâmetro equatorial (largura) e diâmetro polar (comprimento) de estômatos, apresentaram um comportamento diferenciado. Esse comportamento encontrado principalmente nas variáveis estomáticas, possivelmente é devido a vários fatores correlacionados, como efeitos genéticos, fatores ambientais e plasticidade foliar, não sendo dessa forma, provenientes de mudanças induzidas por meio da poliploidia. Essa resposta é corroborada pela análise de citometria de fluxo, onde foi possível observar que não houve mudanças na quantidade 2C de DNA nuclear nas plantas de *physalis* provenientes da indução.

Palavras-chave: Fatores aninhados, quantificação estomática, nível de ploidia.

2.2 INTRODUÇÃO

O cultivo da espécie *Physalis peruviana* L. vem demonstrando importância na classe dos pequenos frutos, pelo seu alto valor nutricional e a presença de fitoesteróis, como as fisalinas (CONDORI et al.; 2016). As fisalinas tem funções imunológicas e podem ser utilizadas em produtos farmacêuticos para fins medicinais, no tratamento de doenças (OLIVEIRA, 2018). A produção se destaca em países Andinos, como Peru, Chile, Bolívia e Colômbia onde, esse último com rendimento segundo a AGRONET, 2017, de 15,01 t.ha⁻¹, sendo o principal produtor e exportador da physalis (FISCHER et al.; 2014).

Estudos sobre a physalis no Brasil, estão aumentando gradativamente devido à demanda pelo mercado consumidor do fruto *in natura* e demais formas processadas. Desta forma, programas de melhoramento estão buscando obter ganhos genéticos em caracteres quantitativos, com destaque ao tamanho de fruto (CONDORI et al.; 2016). Diferentes estratégias de melhoramento são utilizadas para alcançar tal objetivo, dentre as quais, se destacam hibridação interespecífica e intraespecífica. Estas estratégias visam um incremento de variabilidade genética, possibilitando a seleção de genótipos superiores (BORÉM et al.; 2013). A indução a poliploidia é utilizada no melhoramento genético, há mais de sete décadas, com o objetivo de explorar e aumentar a variabilidade disponível por meio da modificação do grau de ploidia da planta (WITTMANN et al.; 2013).

A indução de poliploidia age especificamente na divisão celular, causando modificações no número básico do genoma da espécie (VEASEY et al.; 2011), usada tanto para mudanças morfológicas quanto para a restauração da fertilidade. Portanto, é uma alternativa utilizada em programas de melhoramento, para obtenção de plantas com um aumento dos cromossomos, o denominado efeito “giga” (VEASEY et al.; 2011). A indução é realizada pelo uso de agentes químicos, com ação antimitótica, como por exemplo, o uso do óxido nitroso, orizalina, trifluralina e da colchicina, um alcaloide que é frequentemente empregado no uso da duplicação cromossômica (ALLARD, 1971). Estudos realizados em frutíferas como *Citrus grandis* L. Osbeck, com a aplicação de colchicina em meio *in vitro*, apresentaram sucesso na duplicação cromossômica para formação de plantas tetraploides, e regeneração da fertilidade (GROSSER et al.; 2014).

Com perspectivas na seleção de genótipos superiores, com base em caracteres de fruto, estudos avaliam o potencial produtivo de populações introduzidas no Brasil de diferentes locais, com a finalidade de selecionar populações com maior tamanho de fruto. Grande parte das populações de physalis cultivadas no Brasil são tetraploides ($2n=4x=48$), e isso ocorre

possivelmente em virtude da origem comum destas populações, vindas da importação de frutos (TREVISANI et al.; 2016).

De acordo com Godina et al. (2013), existem genótipos de *Physalis* diploides, porém, em virtude do menor valor econômico são pouco cultivados. Mantidos em bancos de germoplasma na Colômbia, podendo ser utilizados em programas de melhoramento com outras finalidades. Com isso, as populações usadas frequentemente em pesquisas são de origem tetraploide, onde é empregada a utilização da poliploidia como forma de obter plantas com características fenotípicas superiores (LUIS, 2016).

O objetivo do presente estudo foi estabelecer uma metodologia para indução de poliploida, buscando um equilíbrio entre as doses de colchicina aliado aos tempos de exposição, com intuito de promover a duplicação cromossômica em genótipos tetraploides de *Physalis peruviana* L.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Análises Genéticas do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), em Lages, e na Universidade Federal de Santa Catarina (USFC), em Curitiba. A análise de citometria de fluxo foi realizada no Laboratório de Genética da Universidade de Juiz de Fora (MG). O experimento foi realizado em esquema fatorial, sendo 5 x 3 (doses de colchicina x tempos de exposição) e 3 repetições, totalizando 45 observações para as variáveis: tamanho de radícula e quantidade 2C de DNA nuclear. Para as variáveis densidade, diâmetro equatorial e diâmetro polar de estômatos, o experimento também foi realizado em esquema fatorial, 5 x 3 (doses de colchicina x tempos de exposição) e 2 repetições, totalizando 30 observações.

Os genótipos utilizados no presente estudo foram provenientes da população de Lages, proveniente de uma coleção de genótipos do Instituto de Melhoramento e Genética Molecular da UDESC. A determinação do número de cromossomos desta população cultivada no Brasil, foi determinada anteriormente no estudo de TREVISANI et al, (2016), que revelou a uniformidade quanto ao número de cromossomos ($2n= 4x= 48$) e conteúdo 2C de DNA médio igual a 13,23pg, classificadas como tetraploides.

As sementes foram primeiramente pré embebidas em 200 mL de água destilada por um período de duas horas e posteriormente, embebidas em uma solução de colchicina com as respectivas doses de colchicina: 0, 0,01, 0,02, 0,04 e 0,08 g mL⁻¹. Posteriormente, as mesmas foram colocadas em placas de Petri.

2.3.1 Indução de duplicação cromossômica em sementes

As sementes foram dispostas em cinco sacos de tule, cada um contendo aproximadamente 300 sementes, posteriormente foram pré - embebidas em 200 mL de água destilada por um período de duas horas. Após a embebição, cada saco de tule foi disposto em cinco béqueres de 50 mL em uma solução aquosa, contendo suas respectivas concentrações de doses de colchicina 0, 0,01, 0,02, 0,04 e 0,08 g mL⁻¹, aliado ao tempo de exposição de 0 sendo o controle, 8 e 12 horas.

Após o período de exposição, as sementes foram lavadas durante uma hora em água corrente e uma hora em água destilada para a retirada do excesso da solução. Em seguida, 25 sementes foram dispostas em placas de Petri, contendo duas folhas de papel germitest pré-umedecido com água destilada (2,0mL) em cada placa. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial com a caracterização dos efeitos principais dose e tempo (5x3) seguido de três repetições, totalizando 45 observações.

As sementes tratadas foram semeadas em bandejas no laboratório do Imegem e mantidas até atingirem 15 cm de altura, posteriormente foram aclimatadas em casa de vegetação em vasos, em cima de bancadas. As plantas eram irrigadas diariamente no verão, sendo realizado mais que uma vez por dia, para a planta não sofrer estresse, e no inverno a irrigação era realizada de forma intercalada nos dias da semana. A temperatura no verão era em torno de 27° a 30° dentro da casa de vegetação, onde os exaustores ficavam ligados diariamente, para diminuir a temperatura.

2.3.2 Caracteres avaliados

2.3.3 Quantificação estomática

O material vegetal consistiu em folhas de plântulas oriundas da germinação de sementes pré-tratadas com as diferentes concentrações de colchicina em diferentes tempos de exposição. A avaliação foi realizada em plântulas, 65 dias após a germinação. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial de (5 doses x 3 tempos x 2 folhas/repetição) totalizando 30 folhas. As folhas foram coletadas ao final da tarde, lavadas e em seguida acondicionadas em sacos herméticos, e levadas ao Laboratório de Biologia Celular da UFSC em Curitiba e foram preparadas duas lâminas por folha.

As lâminas para a contagem e tamanho de estômatos foram realizadas por meio da técnica de impressão da epiderme, que consiste em colocar uma gota de adesivo instantâneo universal (éster de cianoacrilato) na parte abaxial da folha na região entre as nervuras e pressionar a lâmina por 10 segundos, tempo suficiente para que o adesivo se distribua sobre a região desejada e seque, permitindo com que ocorra a impressão da epiderme sobre a lâmina (SEGATTO et al.; 2004).

As imagens foliares foram captadas pelo microscópio de epifluorescência Olympus BX-60, acoplado com a câmera Olympus DP-70, para a contagem número de estômatos cinco campos foram fotografados de cada lâmina, para contagem total de estômatos por campo (densidade estomática). Da mesma forma para avaliação de largura e comprimento de estômatos, sendo medido um estômato por campo. As características estomáticas de densidade, diâmetro equatorial (largura) e diâmetro polar (comprimento) de estômatos em μm foram quantificadas por meio do software Image J.

2.3.4 Comprimento de radícula

O material avaliado foi oriundo das sementes tratadas com as doses de colchicina 0, 0,01, 0,02, 0,04, e 0,08 g mL^{-1} , nos respectivos tempos de 0, 8 e 12 horas. As placas foram armazenadas por 30 dias, em temperatura de 27°C , com fotoperíodo de 12 horas, até a germinação e emissão da radícula. Após foi realizado a medição do comprimento de radícula mm das sementes, utilizando-se um paquímetro.

2.3.5 Citometria de fluxo para a determinação da quantidade do conteúdo 2C de DNA nuclear

Para a quantificação do conteúdo 2C de DNA nuclear, foi realizada a coleta das folhas das plantas que foram aclimatas em casa de vegetação, oriundas das sementes tratadas com colchicina em diferentes tempos de exposição, sendo que nem todos os tratamentos tiveram a mesma quantidade de plantas. Quando a planta atingiu 20 cm de altura, foram coletadas e selecionadas as folhas jovens. O experimento foi em esquema fatorial 5 doses x 3 tempos x 3 folhas/repetição, totalizando 45 folhas, coletadas em casa de vegetação. A análise de citometria de fluxo foi realizada no Laboratório de Genética da Universidade de Juiz de Fora (MG).

As folhas jovens de *Physalis peruviana* e de *Pisum sativum* (cultura de padrão interno), colocadas em 1mL de meio de isolamento de tampão Triton X-100 lise, responsável pela restrição de ação de compostos fenólicos, com o apoio de um bisturi foram seccionadas

“chopping” em 50 mg de *Physalis* e *Pisum Sativum* (padrão) e realizado o isolamento dos núcleos (LOUREIRO et al.; 2004). Posteriormente, eles foram filtrados por uma rede de nylon de 50 µm, com função de restringir os resíduos restantes.

Em seguida foi realizado a adição de 50 µg mL⁻¹ de iodeto de propídeo e de 50 µg mL⁻¹ de RNase. O material celular é submetido à temperatura ambiente, durante 60 a 120 minutos no escuro, antecedendo a citometria (TREVISANI, 2018). Para tanto, as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo (FacsCalibur – Becton Dickinson). Os histogramas foram obtidos e analisados pelo software CytExpert. Os valores do conteúdo 2C de DNA são calculados de acordo com TREVISANI, (2018), pela seguinte fórmula: Amostra (2C) = (Valor observado no canal do pico da espécie (*Physalis*) valor observado no canal do pico padrão (*Pisum Sativum*) x 9,09pg.

2.3.6 Análise estatística

Os dados foram analisados no software estatístico SAS University, por meio do procedimento GLM. Foram testadas as pressuposições de homogeneidade e normalidade pelos testes de Shapiro wilk e Bartlett para as variáveis: tamanho de radícula mm, densidade, diâmetro equatorial (largura) e diâmetro polar (comprimento) de estômatos em µm e conteúdo 2C de DNA em pg.

O modelo estatístico em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial usado na mensuração do erro experimental e amostral foi:

$$y_{ij} = dose_i + tempo_j + dose * tempo (rep)_{ij} + dose * tempo * rep (medida)$$

Onde, Y é o valor observado para a variável resposta obtido para o i-ésimo tratamento em sua j-ésima repetição, onde dose *tempo (rep)_{ij} caracteriza o erro experimental e dose*tempo*rep (medida) caracteriza o erro de amostragem.

Para as variáveis: densidade, diâmetro equatorial (largura) e diâmetro polar (comprimento) de estômatos (µm) e tamanho de radícula (mm), foi realizada análise de variância com especificação de erro entre (p<0,05) (erro experimental) e (erro de amostragem). Com isso, é possível entender a variação dos erros e possibilitar isolar as causas de variação (ALMEIDA et al.; 2011).

Da mesma forma, estudou-se os efeitos simples por ambos os fatores serem relevantes, justificando o estudo da variação de cada um dos níveis atribuídos e aninhados um dentro do

outro ((dose(tempo)) e ((tempo(dose))). Com isso, a análise dos efeitos simples demonstra -se mais informativa (SILVA, 2003).

Em função da natureza quantitativa dos dados, foram obtidos os parâmetros de regressão com a utilização dos coeficientes estabelecidos para 1º e 2º grau dos polinômios ortogonais. E em seguida, a estimação de verificação de equação de regressão linear simples.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Densidade de estômatos

Para as cinco variáveis avaliadas: densidade, diâmetro equatorial e diâmetro polar de estômatos em μm , tamanho de radícula mm e quantidade 2C de DNA nuclear, foram realizados os testes de homogeneidade (Bartlett) e normalidade (Shapiro wilk), onde foi aceito a hipótese de nulidade, sendo possível afirmar que as variâncias se comportam de maneira homogênea ($\sigma^2_1 = \sigma^2_2, \dots = \sigma^2_n$), onde os dados seguem uma distribuição normal. Dessa forma, as inferências sobre as amostras podem ser realizadas de forma segura.

A análise de todas as variáveis estomáticas foi realizada na superfície abaxial da folha, onde os estômatos ficam distribuídos de forma desorganizada, sendo classificados como hipoestomáticos anomocíticos, conforme, (RODRIGUES; (2011).

Os dados foram submetidos a análise variância com especificação de erro experimental e amostral, para as variáveis densidade, diâmetros equatorial e polar de estômatos e tamanho de radícula. A análise de variância faz inferência entre as fontes de variação que são controladas, sobre as que não são controladas (MELO, 2018). Tendo em vista a possibilidade dessa variação dos tratamentos, é realizado o isolamento dos erros de amostragem e experimental, que compõem o quadrado médio dos tratamentos, restando apenas os efeitos de tratamento (ALMEIDA et al.; 2011).

Na análise de variância (Tabela 1), foi possível observar que o erro experimental, tempo e a interação foram significativos para a variável densidade de estômatos. A interação, demonstra que, a combinação de tratamento A (dose), com o outro fator B (tempo), resulta de forma multiplicativa na variável (MELO et al.; 2020). Como o erro experimental é calculado pelas diferenças das variações observadas nas repetições, os níveis de interação dose*tempo, demonstraram um comportamento diferenciado. No entanto, esse comportamento diferenciado para caracteres morfológicos, como os estômatos podem ser influenciados pelo ambiente,

fazendo com que ocorra um equívoco na avaliação em relação a duplicação cromossômica (SOUZA et al.; 2004). E o resultado para o erro de amostragem demonstra que não houve diferença dentro dos tratamentos, sendo assim, homogêneos, fazendo com que seja de menor importância (Tabela 1). Conforme observado os resultados para a variável densidade de estômatos apresentou significância para a interação, onde a mesma obteve a maior variação da soma de quadrados, demonstrando relevância para o presente estudo. Desse modo, um fator depende da presença ou da ausência do outro (PERECIN et al.; 2008). Com isso, justifica-se fazer inferências simultaneamente sobre os dois fatores de forma aninhada ((Dose (Tempo)) e ((Tempo (Dose))).

Tabela 1 – Análise de variância para o estudo do comportamento dos efeitos simples e da interação dos tempos de exposição (0, 8 e 12 horas), dose de colchicina de (0 ; 0,01; 0,02; 0,04 e 0,08 g mL⁻¹), e contrastes ortogonais, para a variável: Densidade de estômatos, UDESC – IMEGEM, Lages SC, 2020.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	*Probabilidade
Dose (D)	4	145	36	0,8974
Tempo (T)	2	862	431	0,0786
Dose*Tempo (D*T)	6	3604	601	0,0127
Tempo	GL	SQ	QM	*Probabilidade
0	3	1158	386	0,0825
8	4	2254	564	0,0235
12	3	337	112	0,5099
Contrastes	GL	SQ	QM	*Probabilidade
Tempo 0 - Linear	1	24	24	0,6837
Tempo 0 - Quadrática	1	866	866	0,0266
Tempo 0 - Cúbica	1	269	269	0,1870
Tempo 8 - Linear	1	655	655	0,0486
Tempo 8 - Quadrática	1	1211	1211	0,0111
Tempo 8 - Cúbica	1	2,6	2,6	0,8937
Tempo 8 - Quarto grau	1	385	385	0,1191
Tempo 12 - Linear	1	268	268	0,1878
Tempo 12 - Quadrática	1	0,11	0,11	0,9789
Tempo 12 - Cúbica	1	69	69	0,4916
Dose	GL	SQ	QM	*Probabilidade
0 g mL ⁻¹	1	1081	1081	0,0152
0,01 g mL ⁻¹	2	661	330	0,1312
0,02 g mL ⁻¹	1	1155	1155	0,0127
0,04 g mL ⁻¹	2	1503	751	0,0193
0,08 g mL ⁻¹	2	67	34	0,7880
Contrastes	GL	SQ	QM	*Probabilidade
Dose 0 - T8 vs. T12	1	1081	1081	0,0152
Dose 0,01 - Linear	1	26	26	0,6733
Dose 0,01 - Quadrática	1	634	634	0,0518
Dose 0,02 - T0 vs. T8	1	1155	1155	0,0127
Dose 0,04 - Linear	1	978	978	0,0197
Dose 0,04 - Quadrática	1	525	525	0,0735
Dose 0,08 - Linear	1	16,8	16,8	0,7331
Dose 0,08 - Quadrática	1	51	51	0,5566
Erro experimental	13	1800	138	0,0001
Erro amostragem	104	1305	13	

Notas: * Estatística F. GL = graus de liberdade, SQ = soma de quadrados e QM = quadrado médio. Quantidade de estômatos: Média geral (18,5 µm), Coeficiente de variação (19%) e Coeficiente de determinação – R² (0,83).

Conforme a Tabela 1, para densidade de estômatos foi possível observar que nos tempos de exposição de 0, 8 e 12 horas, foi significativo apenas para o tempo de 8 horas, onde a soma de quadrados captou maior parte dessa variação, apresentando também um comportamento diferenciado. A significância encontrada nesse tempo de exposição, possivelmente é uma

variação derivada do ambiente ou de efeitos genéticos, e não um indicativo de duplicação. Como são encontradas variações na classificação dos estômatos dentro das espécies de *physalis*, a avaliação prévia somente dos estômatos na verificação de duplicação cromossômica, não é considerada totalmente segura (RODRIGUES, 2011). E nos tempos de 0 e 12 horas, não houve diferença nos tratamentos para esse caráter. Com isso, demonstrando que os tempos de exposição não foram suficientes para corroborar na duplicação cromossômica. Um dos indicativos prévios mais utilizados na técnica de indução de poliploidia para a mensuração prévia de duplicação cromossômica é redução da quantidade de estômatos e aumento foliar (SILVA, 2014).

Dessa forma, os tempos de exposição de 0, 8 e 12 horas, aninhados ((dose(tempo))), foram desdobrados pelo método dos contrastes ortogonais de primeiro, segundo, cúbico e quarto grau. Os dados referentes a todas as variáveis estomáticas são desbalanceados, dessa forma não possuem todos os valores para os contrastes, tanto para os tempos de exposição, quanto para as doses de colchicina.

Os valores de parâmetros da equação de regressão (Tabela 2), (a), (b) e (c), são determinantes na avaliação para a verificação da variação causada pelas doses e tempos na variável densidade de estômatos.

Tabela 2- Funções polinomiais ajustadas para as variáveis:, densidade de estômatos, diâmetros equatorial e polar de estômatos e tamanho de radícula, e os tempos de exposição de cada tempo de exposição de (0, 8 e 12 horas), e cada dose de colchicina de (0 ; 0,01; 0,02; 0,04 e 0,08 g mL⁻¹). UDESC – IMEGEM, Lages SC, 2020.

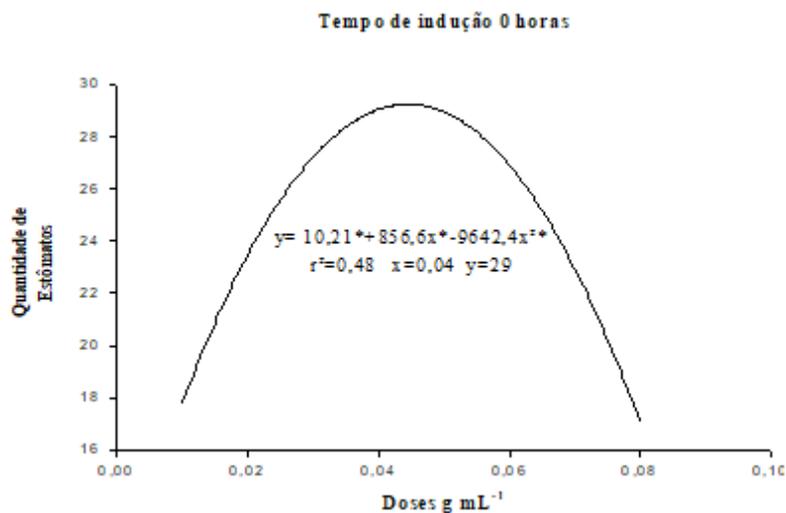
Variáveis	Tempo	Equação Ajustada	
Densidade de estômatos	0	$Y = 10,21^* + 856,6x^* - 9642,4x^{2*}$	
	8	$Y = 27,9^* - 767,5x^* + 7751,8x^{2*}$	
	12	$Y = 15,6$	
	Doses	Equação Ajustada	
	0,01	$Y = 15,7^* + 3,7x^* - 0,3104x^{2*}$	
	0,04	$Y = 25,2^* - 1,145x^*$	
	0,08	$Y = 17,7$	
	Tempo	Equação Ajustada	
	0	$Y = 31,73^* - 510,96x^* + 5260,5x^{2*}$	
	8	$Y = 21,76^* + 54,69x^*$	
Diâmetro equatorial (largura) estômatos	12	$Y = 24,61^* - 175,91x^* + 2465,4x^{2*}$	
	Doses	Equação Ajustada	
	0,01	$Y = 28,96^* - 0,467x^*$	
	0,04	$Y = 21,42$	
	0,08	$Y = 25,91$	
	Tempo	Equação Ajustada	
	0	$Y = 19,37^* - 229,11x^* + 2231,92x^{2*}$	
	8	$Y = 14,60^* + 26,128x^*$	
	Diâmetro polar (Comprimento) de estômatos	12	$Y = 16,1$
		Doses	Equação Ajustada
0,01		$Y = 17,1$	
0,04		$Y = 14,77^* - 0,6775x^* + 0,710x^{2*}$	
0,08		$Y = 15,19^* + 0,7506x^* - 0,0591x^{2*}$	
Doses		Equação Ajustada	
Comprimento de radícula		0,01	$Y = 28,03^* - 0,5981x$
		0,02	$Y = 22$

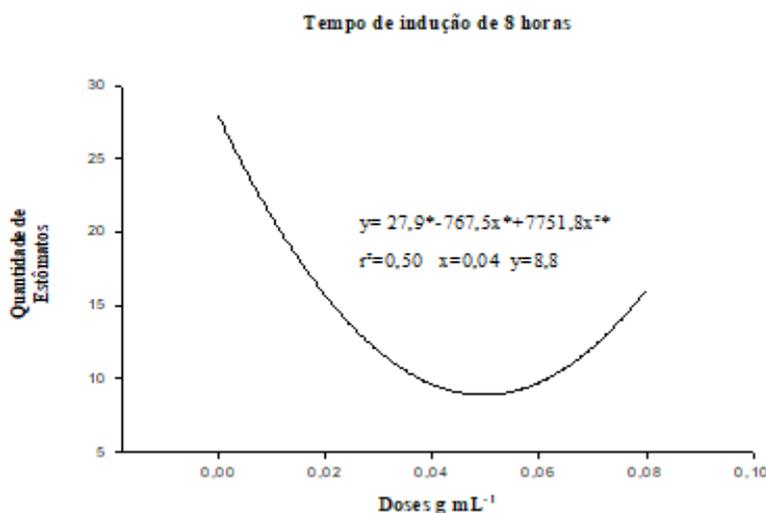
Notas: * Estatística F.

Para densidade de estômatos o comportamento foi quadrático para os tempos de exposição de 0, 8 horas (Figura 1), onde foi possível observar que o coeficiente de regressão

(c) é negativo e significativo no tempo de 0 horas, e positivo no de 8 horas, sendo também, significativo (Tabela 2). Isso demonstra que as curvas apresentam comportamento decrescente, mas ao longo das doses de colchicina no tempo de 8 horas apresentou um leve crescimento, indicando uma possível variação na quantidade de estômatos. Da mesma forma, essa variação também pode ser considerada proveniente do ambiente, observando o fenótipo das plantas não houve mudanças de tamanho foliar que indicassem alguma mudança no grau de ploidia. Conforme Vichiato (2006), a folha é um órgão vegetal que apresenta grande plasticidade, dessa forma se modifica com facilidade ao meio e as alterações ambientais. E no tempo de 12 horas não foi significativo para os polinômios, demonstrando que não houve variação na inclinação na reta da regressão, não havendo alteração na densidade de estômatos. A equação se resume a média 15,6 μm . Em várias culturas onde a poliploidia é induzida ou de forma natural, é possível observar as alterações fisiológicas e fenotípicas, tamanho de frutos, quantidade de clorofila existente, folhas e grãos maiores e um vigor fisiológico expressivo em relação a plantas diploides (2n) (GRIFFITHS et al.; 2000).

Figura 1 – Representação gráfica das equações polinomiais de segundo grau, com coeficiente de determinação r^2 , para a variável densidade de estômato μm , em função dos tempos de exposição de 0, 8 horas e doses de colchicina (0; 0,01; 0,02; 0,04 e 0,08 g mL^{-1}).





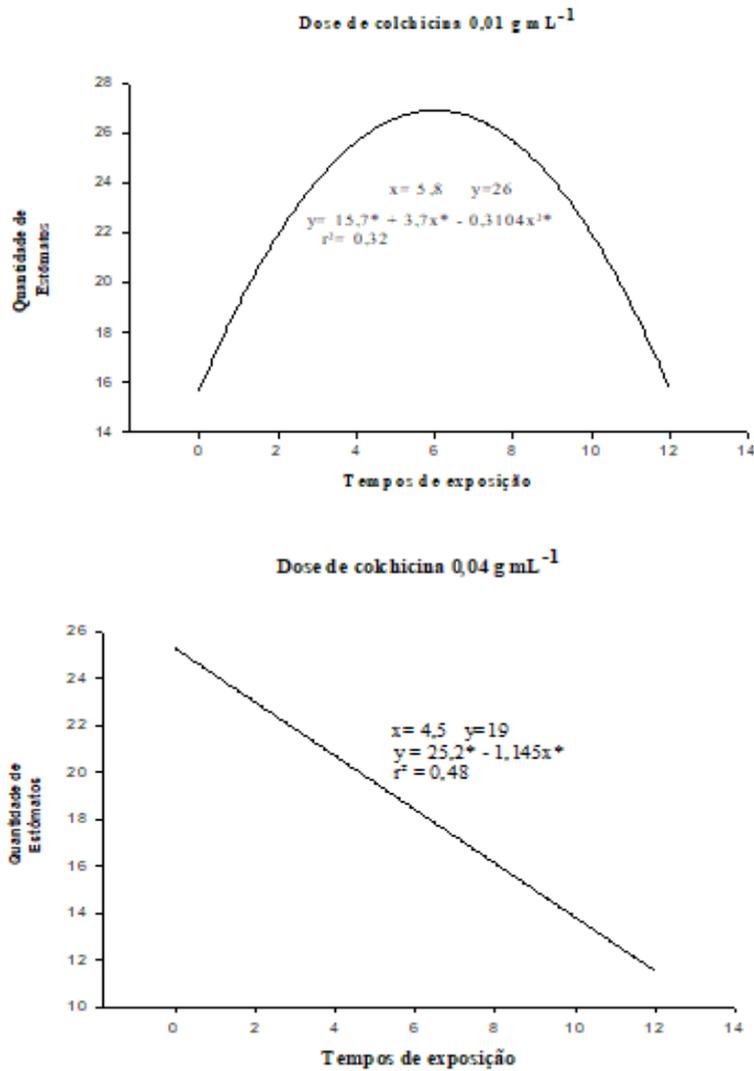
Fonte: Próprio autor.

Da mesma forma, para o estudo do comportamento do efeito simples das doses de colchicina dentro de cada tempo de exposição, ((Tempo (Dose))), foi possível mensurar quais doses de colchicina demonstram maior variação para esse caráter (Tabela 1). Na densidade de estômatos, foi possível observar que as doses 0, 0,02 e 0,04 g mL⁻¹ foram significativas, demonstrando que as mesmas, captaram mais a variação da soma de quadrados, apresentando um comportamento diferenciado. E nas doses 0,01 e 0,08 g mL⁻¹ não houve indicativos de variação. Com os resultados dos dados, demonstraram que a variação da resposta do fator dose depende do outro nível de fator tempo, e assim inversamente (SILVA, 2003). Da mesma forma, é apropriado seguir com a decomposição dos efeitos simples e interação, por meio dos polinômios ortogonais, estabelecendo equações polinomiais para os fatores aninhados de ((Tempo (Dose))).

Os dados foram submetidos a decomposição por meio dos polinômios ortogonais, sendo definido o grau e ajustadas as equações (Tabela 2). Para a variável densidade de estômatos (Figura 2), o comportamento foi quadrático para a dose 0,01g mL⁻¹, com intercepto (a) e coeficiente (b) significativos, indicando uma curva com comportamento decrescente na densidade de estômatos. Na dose 0,04 g mL⁻¹ o comportamento foi linear decrescente, indicando que as doses de colchicina aliada aos tempos de exposição não foram suficientes para gerar mudanças cromossômicas. Para a dose de 0,08g mL⁻¹, que não apresentou significância para os polinômios, resultando na média de 17,7µm (Figura 2). Conforme vários estudos realizados em análises de duplicação cromossômica, em caracteres morfológicos como os estômatos, a duplicação está inversamente ligada a densidade de estômatos, mas não sendo

totalmente confirmada, vários fatores não controlados podem influenciar diretamente nesse caráter (VICHATO et al.; 2006).

Figura 2 – Representação gráfica das equações polinomiais de primeiro e segundo grau e coeficiente de determinação r^2 , para a variável densidade de estômatos, em função das doses de colchicina (0; 0,01; 0,02; 0,04 e 0,08 g mL^{-1}) e tempos de exposição de (0, 8 e 12 horas).



Fonte: Próprio autor.

3.1.2 Diâmetro equatorial

Para a variável de diâmetro equatorial de estômatos, foi possível observar na Tabela 3, que o erro experimental não foi significativo juntamente com o erro de amostragem, indicando que os tratamentos não tiveram diferença para este caráter, sendo assim, homogêneos.

Tabela 3 – Análise de variância para o estudo do comportamento dos efeitos simples e da interação dos tempos de exposição (0, 8 e 12 horas), dose de colchicina de (0 ; 0,01; 0,02; 0,04 e 0,08 g mL⁻¹), e contrastes ortogonais, para a variável: diâmetro equatorial de estômatos, UDESC – IMEGEM, Lages SC, 2020.

Fontes de Variação	GL	SQ	QM	*Probabilidade
Dose	4	563	140	0,0008
Tempo	2	0,66	0,33	0,9780
Dose*Tempo	6	332	55	0,0229
Tempo	GL	SQ	QM	*Probabilidade
0	3	535	178	0,0005
8	4	211	52	0,0369
12	3	149	49	0,0535
Contrastes	GL	SQ	QM	*Probabilidade
Tempo 0 - Linear	1	16	16	0,3163
Tempo 0 - Quadrática	1	268	268	0,0010
Tempo 0 - Cúbica	1	250	250	0,0013
Tempo 8 - Linear	1	119	119	0,0143
Tempo 8 - Quadrática	1	26	26	0,2066
Tempo 8 - Cúbica	1	61	61	0,0634
Tempo 8 - Quarto grau	1	3,68	3,68	0,6283
Tempo 12 - Linear	1	31	31	0,1703
Tempo 12 - Quadrática	1	91	91	0,0283
Tempo 12 - Cúbica	1	26	26	0,2052
Dose	GL	SQ	QM	*Probabilidade
0 g mL ⁻¹	1	31	31	0,1735
0,01 g mL ⁻¹	2	192	96	0,0116
0,02 g mL ⁻¹	1	63	63	0,0602
0,04 g mL ⁻¹	2	2,77	1,38	0,9121
0,08 g mL ⁻¹	2	43	21	0,2699
Contrastes	GL	SQ	QM	*Probabilidade
Dose 0 - T8 vs. T12	1	31	31	0,1735
Dose 0,01 - Linear	1	162	162	0,0058
Dose 0,01 - Quadrática	1	29	29	0,1836
Dose 0,02 - T0 vs. T8	1	63	63	0,0602
Dose 0,04 - Linear	1	2,06	2,06	0,7168
Dose 0,04 - Quadrática	1	0,71	0,71	0,8303
Dose 0,08 - Linear	1	31	31	0,1690
Dose 0,08 - Quadrática	1	11	11	0,3929
Erro experimental	13	194	14,98	0,1449
Erro amostragem	104	1067	10,26	

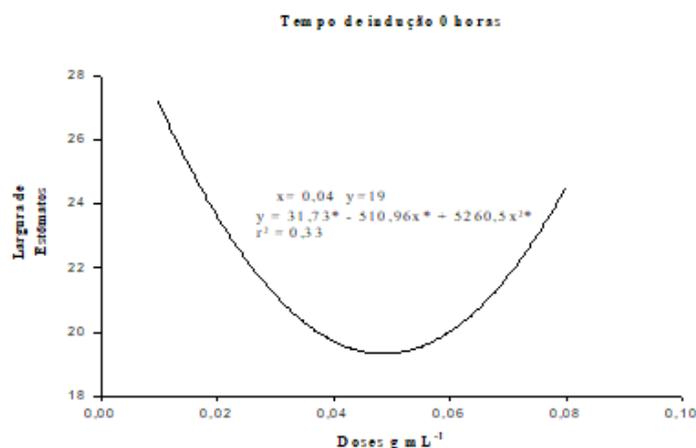
Notas: * Estatística F. GL = graus de liberdade, SQ = soma de quadrados e QM = quadrado médio. Largura de estômatos: Média geral (23,6 µm) e Coeficiente de determinação – R² (1,0).

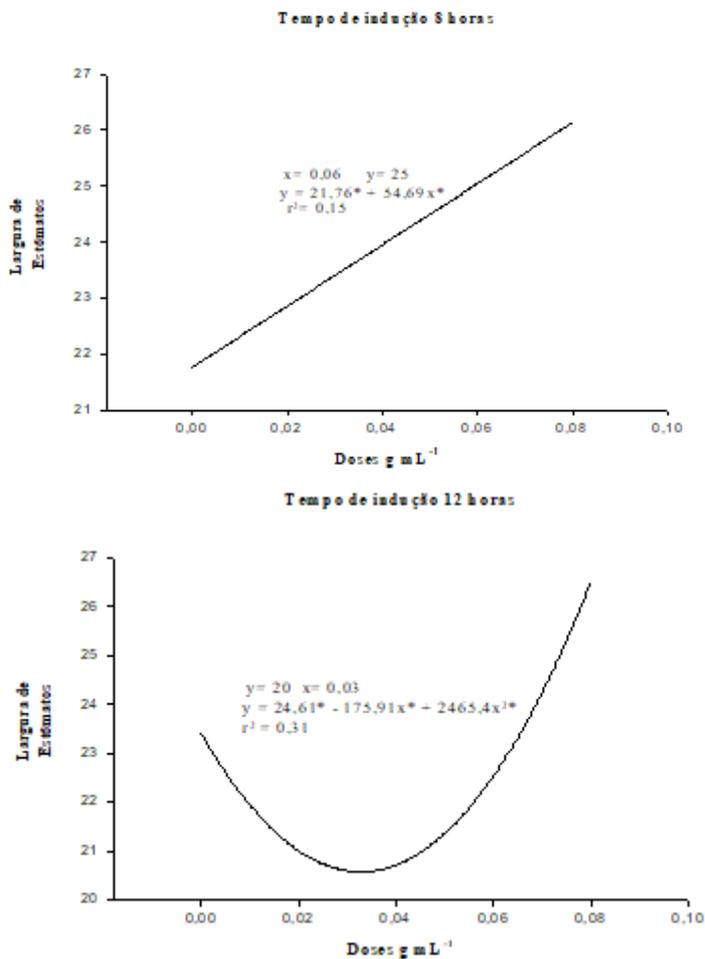
Já para o efeito de dose de colchicina e interação, foram significativos, demonstrando um comportamento diferenciado, e da mesma forma desdobradas, primeiramente para os efeitos aninhados de ((Dose (Tempo)). Na Tabela 3, para a variável diâmetro equatorial de estômatos,

foi realizado a análise de variância para os efeitos aninhados, onde observou-se que os tempos de 0, 8 e 12 horas foram significativos, onde a soma de quadrados obteve maior parte dessa variação no tempo 0, demonstrando um comportamento diferenciado, indicando que os efeitos aninhados de ((Dose (Tempo))), foram benéficos para largura dos estômatos. Falconer e Mackay (1996), observaram que a variação genética existente e ambiental estão diretamente correlacionados, influenciando os caracteres por meio de mecanismos fisiológicos.

Para a mensuração de qual dos tempos apresentou maior variação, os mesmos foram submetidos aos contrastes polinomiais, sendo estes quadrático para os tempos de 0 e 12 e linear para 8 horas. Para densidade equatorial de estômatos no tempo de 0 e 12 horas os interceptos foram significativos com coeficientes lineares b negativos, (Figura 3), demonstrando um decrescimento da curva, não havendo aumento de tamanho estomático nesses tempos. No tempo de 8 horas foi crescente apresentando um comportamento diferenciado (Tabela 2). Os tempos de exposição foram benéficos para a variável diâmetro equatorial, apresentando variações para esse caráter, mas como apresentam alta plasticidade, essa variação possivelmente é devida ao ambiente. Conforme Vichiato (2006), o aumento do nível de ploidia da planta está proporcionalmente relacionado ao tamanho de estômatos, mas vários estudos vêm demonstrando que, como análise prévia de duplicação cromossômica, a quantificação estomática pode não ser segura, visto que a influência ambiental afeta de forma direta. Dessa forma, fazendo com que a utilização desse caráter como indicativo de duplicação cromossômica prévia não seja recomendada.

Figura 3 – Representação gráfica das equações polinomiais de segundo grau, com coeficiente de determinação r^2 , para a variável diâmetro equatorial estômatos, em função dos tempos de exposição de 0, 8 e 12 horas e doses de colchicina (0; 0,01; 0,02; 0,04 e 0,08 g mL⁻¹).



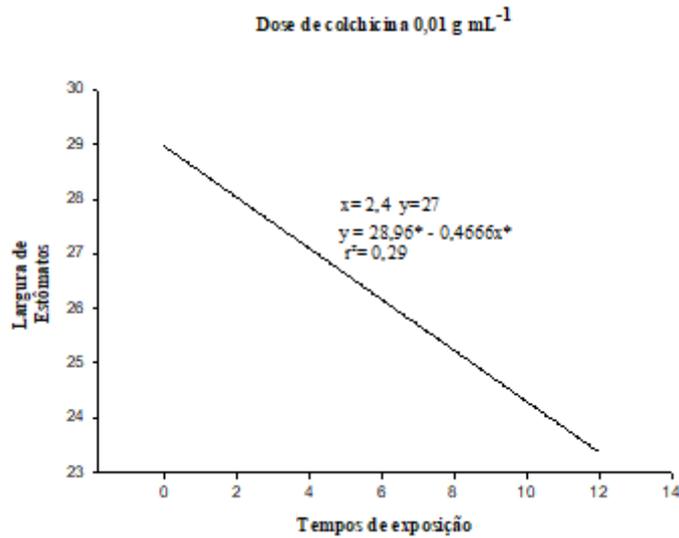


Fonte: Próprio autor.

Da mesma forma, os níveis aninhados de ((Tempo (Dose))), foram analisados. Para o caráter diâmetro equatorial de estômatos, foi possível observar que as doses 0, 0,02, 0,04 e 0,08 g mL^{-1} não foram significativas, demonstrando que não houve diferença entre as mesmas, sendo possível afirmar que as essas doses de colchicina não foram suficientes para gerar alguma alteração cromossômica. E a dose 0,01 g mL^{-1} apresentou um comportamento diferenciado.

Conforme a (Tabela 2), as doses de colchicina foram submetidas aos contrastes ortogonais, onde foi identificado para dose de colchicina 0,01 g mL^{-1} comportamento linear decrescente, e para as doses 0,04 e 0,08 g mL^{-1} , não foram significativas para os polinômios, tendo médias de 21,42 e 25,91 μm . Indicando que as doses de colchicina juntamente com os tempos de exposição não foram suficientes para causar alterações a nível de ploidia (Figura 4).

Figura 4 – Representação gráfica das equações polinomiais de primeiro e segundo grau e coeficiente de determinação r^2 , para a variável diâmetro equatorial de estômatos (largura), em função das doses de colchicina (0; 0,01; 0,02; 0,04 e 0,08 g mL⁻¹) e tempos de exposição de (0, 8 e 12 horas).



Fonte: Próprio autor.

3.1.3 Diâmetro polar

Para o caráter diâmetro polar (Tabela 4), a análise seguiu da mesma forma, onde o erro experimental, a interação e o efeito simples de dose de colchicina, foram significativos, indicando variação e um comportamento diferenciado entre os tratamentos. Os efeitos aninhados de ((Dose (Tempo))) foram testados, demonstrando que para os tempos de 0 e 8 horas foram significativos, demonstrando que os tempos foram benéficos aliados as doses de colchicina para o caráter de comprimento de estômatos. Mesmo não sendo possível observar nenhuma mudança a nível fenotípico. Os estômatos de plantas dos tratamentos submetidos a 12 horas de exposição não apresentaram variações.

Tabela 4 – Análise de variância para o estudo do comportamento dos efeitos simples e da interação dos tempos de exposição (0, 8 e 12 horas), dose de colchicina de (0 ; 0,01; 0,02; 0,04 e 0,08 g mL⁻¹), e contrastes ortogonais de doses(tempo) e tempo (dose), para a variável: diâmetro polar UDESC – IMEGEM, Lages SC, 2020.

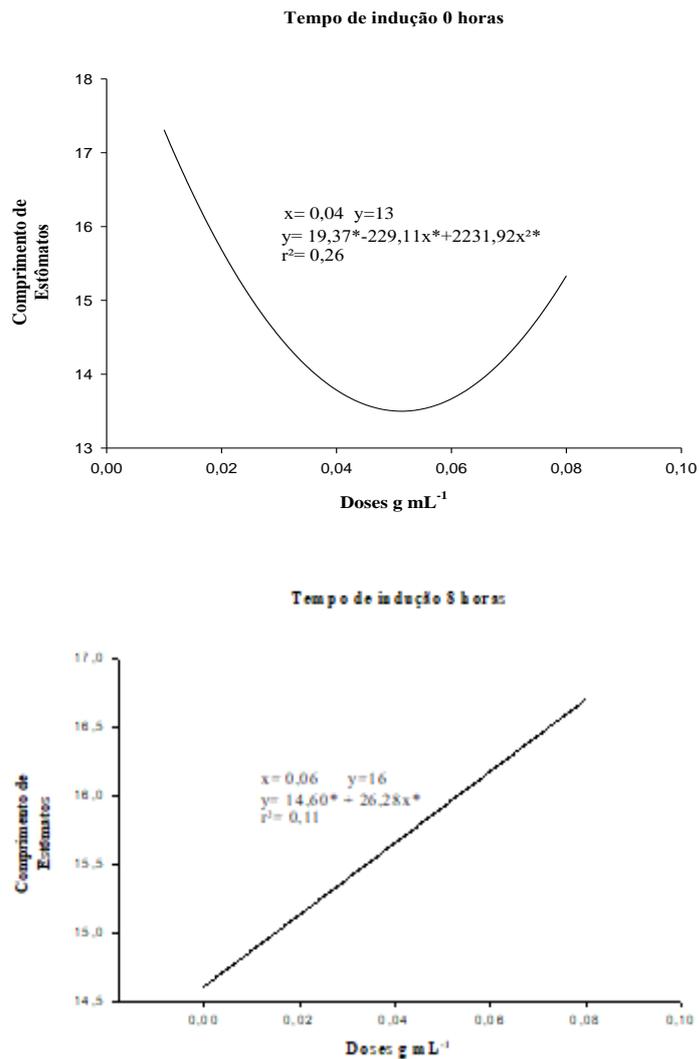
Fontes de Variação	GL	SQ	QM	*Probabilidade
Dose (D)	4	120	30	0,0071
Tempo (T)	2	8,44	4,22	0,4707
Dose*Tempo (D*T)	6	110	18,36	0,0283
Tempo	GL	SQ	QM	*Probabilidade
0	3	124	41	0,0030
8	4	74	18	0,0367
12	3	31	10	0,1705
Contrastes	GL	SQ	QM	Probabilidade
Tempo 0 - Linear	1	14	14	0,1221
Tempo 0 - Quadrática	1	48	48	0,0098
Tempo 0 - Cúbica	1	62	62	0,0045
Linear	1	27	27	0,0406
Tempo 8 - Quadrática	1	18	18	0,0875
Tempo 8 - Cúbica	1	27	27	0,0400
Tempo 8 - Quarto grau	1	1,87	1,87	0,5614
Tempo 12 - Linear	1	0,0022	0,0022	0,9839
Tempo 12 - Quadrática	1	21	21	0,0654
Tempo 12 - Cúbica	1	9,60	9,60	0,2005
Dose	GL	SQ	QM	Probabilidade
0 g mL ⁻¹	1	1,08	1,08	0,6579
0,01 g mL ⁻¹	2	31	15	0,0850
0,02 g mL ⁻¹	1	12	12	0,1545
0,04 g mL ⁻¹	2	46	23	0,0345
0,08 g mL ⁻¹	2	27	13	0,1145
Contrastes	GL	SQ	QM	Probabilidade
Dose 0 - T8 vs. T12	1	1,08	1,08	0,6579
Dose 0,01 - Linear	1	15	15	0,1141
Dose 0,01 - Quadrática	1	16	16	0,1004
Dose 0,02 - T0 vs. T8	1	12	12	0,1545
Dose 0,04 - Linear	1	13	13	0,1353
Dose 0,04 - Quadrática	1	33	33	0,0263
Dose 0,08 - Linear	1	4,12	4,12	0,3930
Dose 0,08 - Quadrática	1	23	23	0,0570
Erro experimental	13	68	5,28	0,0283
Erro amostragem	104	309	2,97	

Notas:* Estatística F. GL = graus de liberdade, SQ = soma de quadrados e QM = quadrado médio. Comprimento de estômatos: Média geral (15 µm) e Coeficiente de determinação – R² (1,0).

Quando submetidos a regressão, os tempos de exposição de 0 e 8 horas foram significativos para os polinômios, apresentando um comportamento quadrático para 0 e linear para 8 horas. Conforme a Tabela 2, com intercepto e coeficiente b linear e c significativo, com curva decrescente para 0 horas. E no tempo de 8 horas o comportamento foi crescente,

demonstrando um comportamento diferenciado. E para o tempo de exposição de 12 horas não foi significativo para os polinômios tendo média de 16,1 μm (Figura 5).

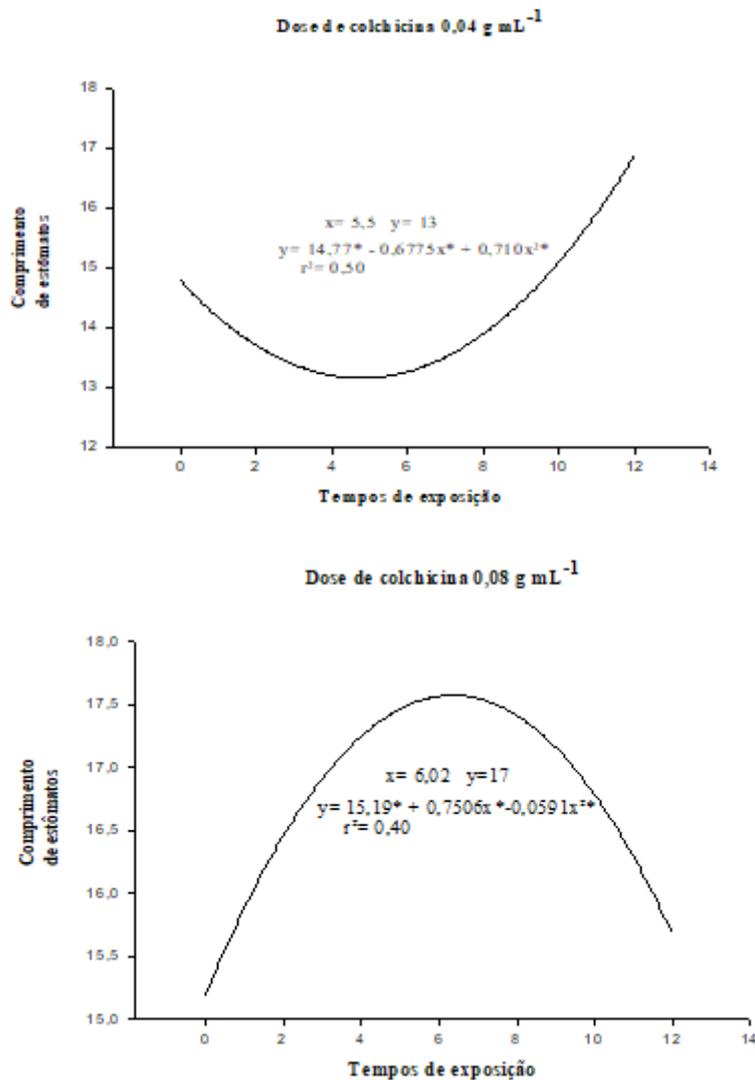
Figura 5 – Representação gráfica das equações polinomiais de segundo grau, com coeficiente de determinação r^2 , para a variável diâmetro polar (comprimento) de estômato μm , em função dos tempos de exposição de 0, 8 e 12 horas e doses de colchicina (0; 0,01; 0,02; 0,04 e 0,08 g mL^{-1}).



Fonte: Próprio autor.

Da mesma forma foram analisados os efeitos aninhados ((Tempo (Dose)), as doses 0,04 e 0,08 g mL^{-1} , apresentaram um comportamento quadrático, e interceptos, coeficientes b e c significativos com curvas decrescentes, demonstrando que as mesmas não foram suficientes para causar duplicação cromossômica. Indicando que não houve alteração no comprimento estomático, e para a dose 0,01 g mL^{-1} , não foi significativa para os polinômios, apresentando média de 17,1 μm (Figura 6).

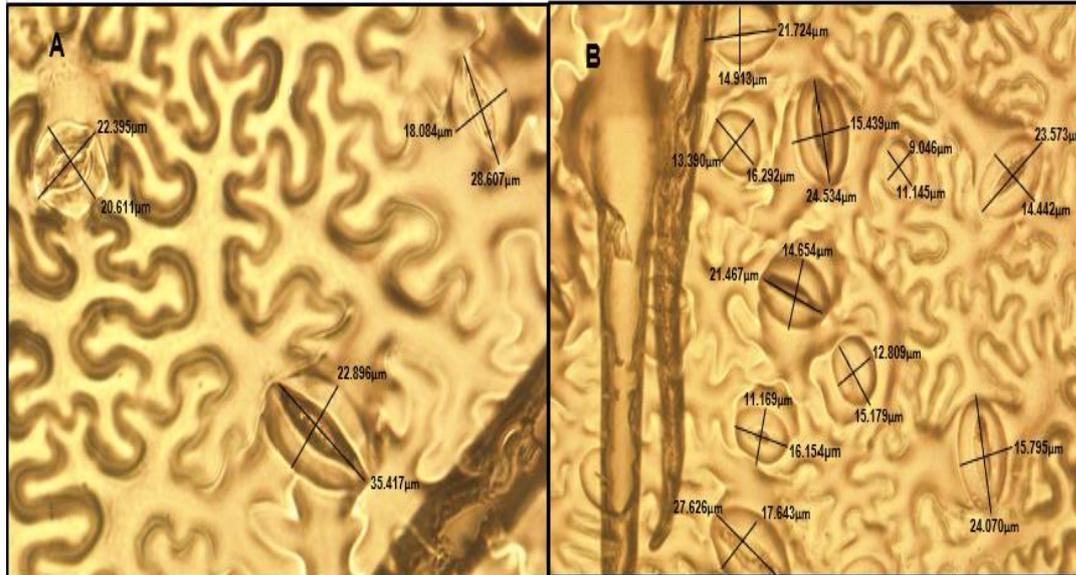
Figura 6 – Representação gráfica das equações polinomiais de primeiro e segundo grau e coeficiente de determinação r^2 , para a variável diâmetro polar (comprimento) de estômatos, em função das doses de colchicina (0; 0,01; 0,02; 0,04 e 0,08 g mL^{-1}) e tempos de exposição de (0, 8 e 12 horas).



Fonte: Próprio autor.

A figura abaixo demonstra como foi realizada a quantificação estomática por meio do software Image J.

Figura 7 – Diâmetro equatorial e diâmetro polar de estômatos, da face abaxial (aumento de 200x) da folha, após a indução a duplicação em *Physalis peruviana* L. Área total de cada imagem 0,093 μm . Barra = 10 μm .



Fonte: Próprio autor.

3.1.4 Comprimento de Radícula

Para a variável comprimento de radícula o erro experimental e dose foram significativos, demonstrando que os efeitos estão causando um comportamento diferenciado esse caráter, o erro experimental apresenta diferenças entre os tratamentos, mesmo não sendo possível observar qualquer alteração a nível fenotípico (Tabela 5).

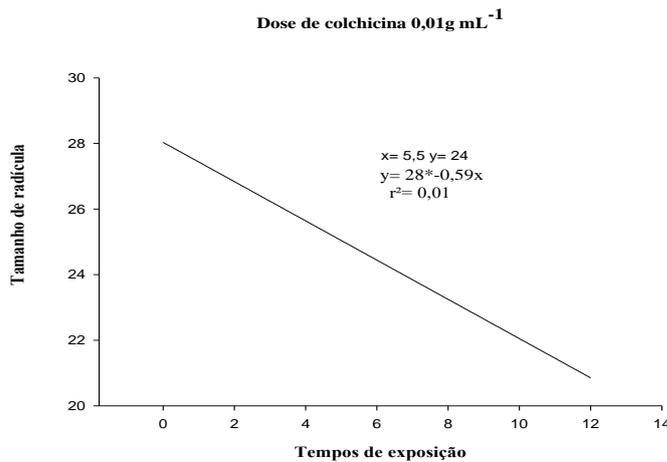
Tabela 5 - Análise de variância para os efeitos simples de doses de colchicina (0; 0,01; 0,02; 0,04 e 0,08 g mL^{-1}) e tempos de exposição (0, 8 e 12 horas), para a variável comprimento de radícula. UDESC – IMEGEM, Lages SC, 2020.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	*Probabilidade
Dose (D)	4	28380	7095	0,0134
Tempo (T)	2	3501	1750	0,4057
Dose*Tempo (D*T)	8	19784	2473	0,2746
Dose	GL	SQ	QM	*Probabilidade
C ₁ : Linear	1	12324	12324	0,0158
C ₂ : Quadrática	1	11974	11974	0,0172
C ₃ : Cúbica	1	312	312	0,6865
C ₄ : Quarto grau	1	3768	3768	0,6865
Erro experimental	30	56482	1882	0,0001
Erro amostragem	1080	546409	505	

Notas: * Estatística F. Tamanho de Radícula: Média geral (21,7 mm), Coeficiente de variação (1%). GL = graus de liberdade, SQ = soma de quadrados e QM = quadrado médio. C = contraste.

Para esse caráter foram testados apenas os efeitos aninhados de ((Tempo (Dose)), conforme a Tabela 5 apresentou, somente o nível de dose foi significativo. Dessa forma, foram testados os polinômios para o caráter tamanho de radícula, indicando que para as doses 0,01 e 0,02 g mL⁻¹ foram significativas para linear e quadrática. (Figura 8).

Figura 8 – Representação gráfica das equações polinomiais de primeiro e segundo grau e coeficiente de determinação r^2 , para a variável tamanho de radícula, em função das doses de colchicina (0; 0,01; 0,02; 0,04 e 0,08 g mL⁻¹) e tempos de exposição de (0, 8 e 12 horas).



Fonte: próprio autor.

A dose 0,01 g mL⁻¹ indicou comportamento decrescente com intercepto significativo, indicando que a dose de colchicina não foi suficiente para gerar alterações significativas. Normalmente plantas que foram duplicadas apresentam características como crescimento lento, raízes mais espessas e folhas maiores de acordo com a quantidade de estômatos, em comparação com plantas controle (PIO, 2008). Essas características não foram observadas e quando mensuradas também não apresentaram indicativos de duplicação. Para a dose 0,02 g mL⁻¹ para o polinômio não foi significativa com média de 22 mm (Figura 8). A combinação dos níveis de fatores para tamanho de radícula, não resultou em alterações cromossômicas. O desenvolvimento do tamanho radicular das plantas tratadas com as doses de colchicina em relação ao controle, não apresentaram variações de tamanho radicular.

3.1.5 Quantidade 2C de DNA nuclear

Para a verificação se os níveis de tratamento resultaram em alguma duplicação cromossômica, foi empregado como análise final a citometria de fluxo, responsável por identificar o conteúdo 2C de DNA, se houve alteração no nível de ploidia (SILVA, 2014).

A análise de citometria de fluxo teve como finalidade, avaliar a quantidade do conteúdo 2C de DNA nuclear dos tratamentos submetido a exposição de colchicina (Tabela 6). Para a indução foram utilizados indivíduos que já eram tetraploides ($2n = 4x = 48$) de Trevisani (2018), com conteúdo 2C de DNA nuclear médio de 13,23 pg, com o objetivo de induzir alterações cromossômicas para gerar plantas com características de fruto superiores para o melhoramento.

Tabela 6 - Conteúdo de 2C de DNA nuclear em picogramas (pg) na população de Lages, considerando as médias das quatorze amostras de doses de colchicina (0; 0,01; 0,02; 0,04 e 0,08 g mL⁻¹) aliados aos tempos de exposição (0, 8 e 12 horas) de cada planta. UDESC – IMEGEM, Lages SC, 2020.

População Lages	Quantidade 2C de DNA nuclear (picogramas)
Amostra 1	13,2880
Amostra 2	13,1858
Amostra 3	13,1286
Amostra 4	13,4253
Amostra 5	12,8371
Amostra 6	12,4749
Amostra 7	13,0135
Amostra 8	12,6983
Amostra 9	12,8937
Amostra 10	12,7780
Amostra 11	12,6138
Amostra 12	13,1613
Amostra 13	12,7689
Amostra 14	12,9705
Média geral	12,9455

Notas:* Estatística F.

Na estimativa do conteúdo 2C de DNA nuclear de *Physalis* por meio de citometria de fluxo, é realizado em comparação com o padrão *Pisum sativum* que apresenta genoma nuclear estável, e com um valor médio de picogramas, que auxilia na verificação de alteração do nível de ploidia (JESUS et al.; 2016). Com a análise de citometria foi possível observar que não houve alteração no nível de ploidia, pois todos os genótipos avaliados apresentaram conteúdos de DNA similares ao relatado para plantas tetraploides analisadas por Trevisani (2016). Na

Tabela 6 observa-se que a média se manteve em 12,94 pg, não apresentando variações entre os tratamentos. Não havendo, portanto, duplicação cromossômica.

Mesmo a análise de citometria não tendo revelado mudanças na quantidade de DNA, as variáveis morfológicas avaliadas apresentaram um comportamento diferenciado. Tais variações possivelmente são provenientes da interação entre fatores genéticos e ambientais, já que os caracteres morfológicos avaliados possuem alta plasticidade fenotípica, sendo muito influenciados pelo ambiente. Variações na densidade estomática são respostas comumente encontradas em plantas sujeitas a diferentes irradiâncias, como sombreamento ou altos níveis de radiação solar. Esses diferentes níveis de irradiância podem causar alterações morfológicas e fisiológicas nas folhas, juntamente com as características de plasticidade desse órgão, podem causar variações na biomassa, pigmentos fotossintetizantes e na densidade estomática (SOARES, 2012). A densidade de estômatos das folhas é definida no decorrer do desenvolvimento da planta, dessa forma é um caráter que apresenta alta plasticidade que varia sob restrição hídrica severa ou moderada e diferentes irradiâncias. Com disponibilidade ou falta hídrica e de radiação pode causar um aumento no número de estômatos, sendo considerado como um mecanismo de adaptação dos mesmos. Com isso, os estômatos apresentam alta plasticidade fenotípica, não podendo ser um parâmetro totalmente seguro de alteração do nível de ploidia (FASOLIN et al., 2019). Dessa forma, os níveis de doses de colchicina e tempo de exposição não foram suficientes para mudar o nível de ploidia do genótipo avaliado. Recomenda-se para os futuros trabalhos de indução de poliploidização, prolongar os tempos de exposição para essas mesmas doses de colchicina, e avaliar o comportamento nas plantas. Mantendo o cuidado com o nível de toxicidade do produto para não ter grandes taxas de mortalidade.

Com as inferências realizadas dos efeitos simples aninhados ((tempo(dose))), pode-se observar que, os mesmos apresentaram diferenças e variações para os caracteres avaliados. Os caracteres morfológicos como as folhas, apresentam alta plasticidade, se modificam com facilidade ao ambiente, fazendo com que o comportamento diferenciado encontrado seja devido a esses fatores não controlados, como genéticos e ambientais. Dessa forma, os fatores aninhados demonstraram que as doses de colchicina e os tempos de exposição, não foram suficientes para causar a duplicação cromossômica nas plantas de *Physalis*. Nos trabalhos de indução de poliploidia de *Physalis*, observa-se que a taxa de duplicação é de 1,2%, indicando que são necessários vários pré-testes, para avaliar qual das metodologias empregadas apresenta maior sucesso (LUIS, 2016), buscando o equilíbrio de concentração da colchicina e o tempo de exposição.

3.2 CONCLUSÃO

O tratamento com doses de colchicina, aliado aos tempos de exposição nos caracteres avaliados não foram suficientes para causar alterações no nível de ploidia no genótipo tetraploide de *Physalis peruviana* L.

4. REFERÊNCIAS

AGRONET. 2017. Agronet MinAgricultura. Disponível em: https://www.agronet.gov.co/Documents/39-UCHUVA_2017.pdf. Acesso em: outubro de 2020.

ALLARD, R.W. **Princípios do Melhoramento genético das Plantas**. São Paulo: Edgard Blucher, 1971. 333p.

ALMEIDA, C.B.; ARRUDA, B.; PEREIRA, T.P.; VALE, M.N.; HEIDEMAN, J.C.; COIMBRA, J.L.M.; GUIDOLIN, F.A. **Existe variabilidade para o carácter tempo de cocção em feijão? Depende do erro**. *Bioscience Journal*, Uberlândia, v.27, n.6, p.915-923,2011.

ARAÚJO, F.L **Estudo Genético e Citogenético de duas espécies do gênero *Physalis* (*Solanaceae*)**. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais), Feira de Santana -BA, p 1-15, 2012.

ARAÚJO, F.L; QUEIROZ, S.R.O.D; PASSOS, A.R; OSUNA, J.T.A. **Caracterização cromossômica em *Physalis angulata* L. e *P. peruviana* L.** *Magistral*, Cruz das Almas-BA, v.27, n.1, p 82-89, 2015.

BASTTISTIN, A; ALMEIDA, A.L.S.M; NOGUEIRA, I.D; PASQUALETTI, M.V; GONÇALVES, R.S; FERMINO, M.H; SILVEIRA, R.P. **Caracterização citogenética para identificação dos níveis de ploidia em cinco espécies do gênero *Mentha* L.** *Campinas, Ver. Bras.Med*, v.15, n.4, p 684 -691, 2013.

BETANCOURT, E. P.S. **Nível de ploidía de plantas de uchuva provenientes de cultivo de anteras**. 2014. 48F. Dissertação (Mestrado em ciências agrárias) – Universidad nacional de Colômbia. Facultad de ciências agrárias. Colômbia – Bogotá. 2014.

BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. **Melhoramento de Plantas**. Viçosa: Ed.UFV, 2013. 523p.

BUFFON, P.A; SCHWAB, N.T; BOTH, V; FUHR, A; BINSFELD, M.C. **Desenvolvimento, produtividade e qualidade de physalis conduzido em diferentes sistemas de tutoramento.** Acta Iguazu, Cascavel, v.9, n.2, p 134-147, 2020.

CHAVES, M.C. **Mecanismos reprodutivos em *Physalis angulata* L.** Feira de Santana -BA, 2017. Dissertação (Mestrado em Recursos Vegetais), p 1-25.

COIMBRA, J.L.M. et al. **Doses de raio gama na cultura da aveia estatura de planta.** Revista Brasileira de Agrociência. V.11, n.3, p 305-308, 2005.

CONDORI, C.; PAOLA, D. **Determinación de la concentración y tiempo de exposición de la colchicina para la duplicación del número cromosómico de *Physalis peruviana* L. en condiciones *in vitro*.** 2016. 99F. Dissertação (Mestrado em Biología) - Universidad Nacional San Agustín de Arequipa Facultad de Ciencias Biológicas Escuela Profesional y Académica de Biología. Arequipa 2016.

FALCONER, D.S; MACKAY, T.F.C. **Introduction to Quantitative Genetics.** 4. London: Longman, p. 463,1996.

FASOLIN, J.P; ZUCARELI, V; CARBONIEREI, J; NAGASHIMA, G.T; MORAIS, H; CARAMORI, P.H; MEDRI, M.E. **Varição anatômica e fisiológica do amendoin (cultivar IAPAR 25 Tição) cultivado sob diferentes regimes hídricos.** Cascavel, v.8, n.3, p 92-104, 2019.

FISCHER, G.; ALMANZA-MERCHAN, P. J; MIRANDA, D. **Importância y cultivo de la uchuva (*Physalis peruviana* L.).** Revista Brasileira de Fruticultura. Jaboticabal, v. 36, n. 1, p. 01-15, março, 2014.

JESUS, M.R.S; SILVA, S.O; SILVEIRA, D.G; SANTOS-SEREJO, J.A; SAMPAIO, A.H.R; GIMENEZ, A.C. **Pré-Seleção de poliploides por métodos foliares em acessos de bananeira.** Pesquisa Agrop. Brasileira, v.51, n.12, 2016, p. 1957-193.

GODINA, F.R **Caracterización de tetraploides y formación de Híbridos Triploides em tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot)**. Dissertação (Doutorado em Manejo y administración de recursos vegetales). San Nicolás de los Garça, 2012, p 9-25.

GODINA, F.R; TORRES, V.R; POURNAVAB, F; MENDOZA, A.B; PIÑERO, J.L; VALDES, M.H.R; VÁZQUEZ, M.A.A. **Yield and fruit quality evaluation in husk tomato autotetraploides (*Physalis Ixocarpa*) and diploids**. Australian Journal of Crop Science. p 933-940, 2013.

GRIFFITHS, A.J.F.; GERBART, W.M.; LEWONTIN, R.C.; WESSLER, S.R.; SUZUKI, D.T.; MILLER, J.H. **Uma introdução a análise Genética**. cap. 18. Nova York. v.7. 2000.

GROSSER, W.J.; KAINTH, D.; DUTT, M. **Production of colchicine-induced autotetraploides in Pummelo (*Citrus grandis* L. Osbeck) through indirect organogenesis**. University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences. 2014, p 944-948.

LAGOS, T.C.; VALLEJO, F.A.; CRIOLLO, H. **Análise da aptidão combinatória de algumas características do fruto de *Physalis peruviana* L**. Agronomia colombiana. Bogotá, V.25, p 36-46, 2007

LUIS, B. M. S. ***Physalis peruviana*: ensaios de cultura in vitro e hibridação**. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal). Universidade de Coimbra. Portugal 2016, p 70-81.

LOUREIRO, J.; SANTOS, C. **Aplicação da Citometria de Fluxo ao estudo do Genoma Vegetal**. Laboratório de Biotecnologia e Citómica Vegetal. Campus Universitário de Santiago 3810-193. Aveiro, Portugal, 2004, p 18-19.

MELO, R.C.; TREVISANI, N.; SANTOS, M.; GUIDOLIN, A.F.; COIMBRA, J.L.M.; **Pressuposições do modelo estatístico atendidas por modelos lineares: Clássicos e generalizados mistos**. Revista Ciência Agrônômica. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, v.51, n.1, p 1-9, 2020.

MELO, R.C. **Análise de Variância no melhoramento genético de feijão: Pressuposições do modelo estatístico e consideração das fontes de variação apropriadas.** Lages SC, 2018. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade do estado de Santa Catarina, p 28-31.

MUNIZ, J; MOLINA, A.B; MUNIZ, J. **Physalis: Panorama produtivo e econômico no Brasil.** Revista Hort. Brasileira, v.33, n.2, 2015.

OLIVEIRA, A.A.L.A. **Caracterização agrônômica do camapu (*Physalis angulata* L.), qualidade pós-colheita e aproveitamento tecnológico dos frutos.** Manaus AM, 2018. Dissertação (Mestrado em Tecnologia em Alimentos) – Instituto Nacional da Amazônia, p 2-15.

PERECIN, D; FILHO, A. C. **Efeitos por comparação e por experimento em interações de experimento fatoriais.** Lavras, Ciência Agrotec, v.32, n.1, p 68-72, 2008.

PIO, L.A.S. **Indução e identificação de poliploidia em Bananeira (*Musa acuminata*, Colla).** Lavras MG, 2008. Dissertação (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, p 30-45.

RODRIGUES, F.A. **Caracterização físico-química e anatômica de *Physalis peruviana* L.** Lavras MG, 2011. Dissertação (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, p 88 - 94.

RODRIGUES, F.A; PENONI, E.S; SOARES, J. D.R; SILVA, R.A.L; PASQUAL, M. **Caracterização fenológica e produtividade de *Physalis peruviana* cultivada em casa de vegetação.** Uberlândia. Biociencia. Journal, v.29, n.6, 2013.

SEGATTO, F. B; BISOGNIN, D. A; BENEDETTI, M; COSTA, L. C; RAMPELOTTO.M V; NICOLOSO, F. T. **Técnica para o estudo da epiderme foliar da Batata.** Revista Ciência Rural. Santa Maria, v.34, n.5, p 1597-1601, outubro, 2004.

SILVA, J.G.C. **Estatística Experimental: Análise Estatística de experimentos.** UFPel, Pelotas, p 38-39, 2003.

SILVA, D.F; PIO, R; NOGUEIRA, P.V; SILVA, P.A.O; FIGUEIREDO, A.L. **Viabilidade polínica e quantificação de grãos de pólen em espécies de fisális.** Fortaleza, Revista, Ciência. Agro. V.48, n.2, p 365-373, 2017.

SILVA, P.A.K.X.M. **Indução de poliploidia em mandioca.** (Tese de doutorado), São Paulo, p 28, 2014.

SOARES, M.G. **Plasticidade fenotípica de plantas jovens de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. Ex DC.) Mattos (Biognoniaceae) em resposta a radiação solar.** Vitória. 2012. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal). Universidade Federal do Espírito Santo. p 25-71.

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

TREVISANI, N. **Citogenética, Endogamia E Heterose Em Fisális (*Physalis peruviana* L.) Cultivado.** Lages SC. 2018. Dissertação (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade do estado de Santa Catarina, Lages. 2018, p 42-43.

TREVISANI, N; SCHMIT, R; BECK, M; GUIDOLIN, A.F; COIMBRA, J.L.M. **Seleção de populações de fisális para hibridizações, baseada em caracteres do fruto.** Revista Brasileira de Fruticultura. Jaboticabal. V.38, n.2, 2016, p 1-7.

VEASEY, E.A; PIOTTO, F.A; NASCIMENTO, W.F; RODRIGUES, J.F; MEZETTE, F.T; BORGES, A; BIGUZZI, F.A; SANTOS, F.R.C; SOBIERAJSKI, G.R; RECCHIA, G.H; MISTRO, J.C. **Processos evolutivos e origem das plantas cultivadas.** Ciência Rural. Santa Maria. V.41, n.7, 2011, p 1218-1228.

VICHIATO, M.R.M; VICHIATO, M; CASTRO, D.M; DUTRA, L.F; PASQUAL, M; JÚNIOR, M.W; LIMA, C.D.F; SALGADO, C. C. **Análises Estomáticas e Morfométrica de folhas de plantas diploides e tetraploides de *DENDROBIUM NOBILE LINDL.*** Lavras, Revista Ceres, 2006, p 541-548.

WITTMANN, M.T.S, DALL'AGNOL, M, 2013. **Indução de Poliploidia no Melhoramento de Plantas**. Pesquisa Agropecuária Gaúcha. Porto Alegre, v. 9. n. 1-2. P. 155-164. 2003.