

Renata Alves Lara Silva Rezende
Universidade Federal de Lavras
renata_vga@yahoo.com.br

Leila Aparecida Salles Pio
Universidade Federal de Lavras
leila.pio@dag.ufla.br

Filipe Almendagna Rodrigues
Universidade Federal de Lavras
filipealmendagna@yahoo.com.br

Moacir Pasqual
Universidade Federal de Lavras
mpasqual@dag.ufla.br

Ramiro Machado Rezende
Universidade Vale do Rio Verde
ramiromr@globo.com

Sebastião de Oliveira e Silva
Embrapa Mandioca e Fruticultura
ssilva@cnpmf.embrapa.br

CITOMETRIA DE FLUXO E ANATOMIA FOLIAR PARA VERIFICAÇÃO DA ESTABILIDADE GENÔMICA DE AUTOPOLIPOIDES ARTIFICIAIS DE *Musa acuminata* Colla

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi verificar o nível de ploidia de plantas diploides, mixoploides e tetraploides de bananeira (*Musa acuminata* Colla) obtidas há quatro anos e sua relação com a anatomia foliar. Mudanças de bananeira foram submetidas à duplicação de cromossomos *in vitro* mediante exposição dos ápices à colchicina (concentrações e tempos variados). Após o processo foram contabilizados os diploides, mixoploides e tetraploides. Após quatro anos, a ploidia dos materiais foi novamente verificada por citometria de fluxo e a anatomia das folhas foi realizada para determinar uma possível relação. A análise estomática e citométrica foram eficientes para verificação de ploidia das plantas tetraploides. As plantas originais tetraploides e a maioria das mixoploides mantiveram-se estáveis geneticamente até o final deste estudo. No entanto, as brotações apresentaram-se diploides e mixoploides.

Palavras-chave: Poliploidia. Citometria de fluxo. Anatomia.

FLOW CYTOMETRY AND LEAF ANATOMY FOR VERIFYING GENOMIC STABILITY OF ARTIFICIAL AUTOPOLYPLOIDS OF *Musa acuminata* Colla

ABSTRACT

This study aimed at verifying the ploidy level of diploid, mixoploid and tetraploid banana plants (*Musa acuminata* Colla) obtained four years ago and its relationship with the leaf anatomy. Banana plantings were submitted to chromosome duplication in *in vitro* conditions by exposure of the apices to colchicine (concentrations and varied times). After the process, diploids, mixoploids and tetraploids were counted. After four years, the ploidy of the materials was again verified by flow cytometry and the anatomy of the leaves was performed to determine a possible relationship. Stomatal and cytometric analysis proved compatible for ploidy verification of tetraploid plants. The original tetraploid plants and most of the mixoploids remained genetically stable until the end of this study. However, the shoots were diploid and mixoploids.

Keywords: Polyploidy. Flow cytometry. Anatomy.

1. INTRODUÇÃO

A banana, além de apresentar relevância social e econômica devido à geração de renda para pequenos produtores, também é um produto que faz parte da balança de exportações agrícolas de muitos países. O Brasil é o quarto maior produtor mundial de bananas com uma produção aproximada de 6,67 milhões de toneladas em 2017 em uma área cultivada de 465,43 mil hectares (FAO, 2019). Entretanto, a produtividade média é considerada baixa, principalmente devido à vulnerabilidade das principais variedades plantadas a certas doenças como sigatoka amarela e sigatoka negra. Devido a isso, a pesquisa com melhoramento de banana procura avançar no sentido de se obter plantas resistentes a doenças (SILVA et al., 2013).

Dentre as diversas técnicas para melhoramento da bananeira, a duplicação de cromossomos utilizando agentes antimetabólicos tem sido empregada visando a obtenção de plantas resistentes a doenças (COSTA et al., 2011). Já é sabido na literatura que bananas triploides e tetraploides são mais vigorosas que as diploides, o que mostra uma relação direta entre vigor e ploidia (SILVA et al., 2013).

Assim como em todas as técnicas, a duplicação de cromossomos também apresenta certas limitações. Nesse caso, obter um poliploide de características favoráveis

nem sempre é fácil, assim como manter a ploidia dos materiais já duplicados (ZHANG et al., 2010). Desse modo, a análise da estabilidade genômica de materiais artificialmente poliploidizados torna-se requisito indispensável em programas de melhoramento que utilizam duplicação cromossômica. Dentre as metodologias utilizadas estão incluídas a análise citogenética de contagem cromossômica que apresenta alta precisão, porém necessita de tempo e experiência consideráveis além do uso de reagentes tóxicos. A análise por citometria de fluxo também apresenta elevada acurácia e tem a vantagem de demandar tempo significativamente menor para sua execução (KRAMER & BAMBERG, 2019).

Muitos estudos propõem novas formas de se avaliar a ploidia das plantas por meio de alguma relação. O estudo anatômico e ultra estrutural foliar, por exemplo, pode ser mais um aliado na inferência de ploidia e vem sendo abordado em muitos trabalhos (ÇELIKER & BILALOGLU, 2001).

Dessa forma, os objetivos deste trabalho consistiram em identificar o nível de ploidia de genótipos resultantes de experimentos de duplicação cromossômica, possibilitando a recomendação precisa e confiável de plantas autotetraploides aos programas de melhoramento, além de verificar a possível relação da ploidia com a anatomia foliar das plantas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi executada na Universidade Federal de Lavras com o apoio da Embrapa Mandioca e Fruticultura (CNPMPF).

Foram utilizados quatro genótipos diploides (AA) de bananeira (Lidi, Malbut, Ouro e Thong Dok Mak) que foram submetidos a experimentos de duplicação cromossômica há quatro anos. Essas plantas foram analisadas no referido ano quanto ao nível de ploidia e neste trabalho foram novamente analisadas para verificação da estabilidade do material genético.

As plantas estudadas se encontram em vasos de 30 L, mantidas em casa de vegetação. A maioria das plantas emitiu brotações que também foram submetidas às avaliações.

Para análise de citometria de fluxo foram coletados aproximadamente 50-60 mg de folhas jovens de cada planta, juntamente com amostra de *Pisum sativum* (padrão de referência interno). Esse material foi triturado com auxílio de bisturi em placa de Petri contendo 1 mL de tampão LB01 gelado para liberação dos núcleos (DOLEZEL et al., 1989). A suspensão de núcleos foi aspirada utilizando pipeta com orifício coberto por duas camadas de gaze e, posteriormente, filtrada em filtros com malha de 50µm. Essa suspensão foi mantida em recipiente com gelo triturado para que não ocorresse

deterioração do material. Posteriormente, os núcleos foram corados pela adição de 25 µL de iodeto de propídeo, sendo adicionado ainda 5 µL de RNase a cada amostra. Foram analisados 5 mil núcleos para cada amostra, com três repetições. A análise foi realizada no citômetro FACSCalibur quatro cores (Becton Dickinson) e os histogramas foram obtidos com o software Cell Quest e analisados estatisticamente no software WinMDI 2.8 (disponível em <http://facs.scripps.edu/software.html>). O conteúdo de DNA nuclear (pg) das plantas foi estimado por comparação com a posição em relação ao pico G1 do padrão interno de referência.

Para a execução das análises anatômicas, retirou-se uma amostra de aproximadamente 10x5 cm da folha número 1 (folha mais nova totalmente expandida) de cada planta-mãe e suas respectivas brotações.

Secções paradérmicas da face adaxial foram realizadas à mão livre. Utilizando lâminas de barbear, as secções foram colocadas em placas de Petri contendo hipoclorito de sódio 1% durante 10 minutos para clarificarem seguido de lavagem em água destilada por 10 minutos. As secções foram coradas com safranina 1% e lâminas semipermanentes foram montadas utilizando água glicerinada para manutenção das secções. Todas as lâminas foram fotografadas em microscópio óptico. Foram avaliadas a densidade e os diâmetros polar e

equatorial dos estômatos por meio do software Image Tool 3.0 (UTHSCSA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 encontram-se resumidos os resultados das análises da citometria de fluxo das plantas no primeiro ano e após quatro anos, juntamente com suas respectivas brotações.

Para a maioria das plantas analisadas nas duas épocas, a ploidia não se alterou,

exceto para as plantas de número 7, 16 e 18 que eram inicialmente mixoploides e foram classificadas como diploides posteriormente. Essas mudanças possivelmente devem ter ocorrido devido ao fenômeno de eliminação cromossômica, isto é, a eliminação dos cromossomos de uma das variedades devido à falta de compatibilidade entre os mesmos, e/ou à maior taxa de multiplicação de células diploides em relação às poliploides. Em relação às brotações ocorreram muitas mudanças no conteúdo de DNA.

Tabela 1 – Avaliação da ploidia das plantas e de suas respectivas brotações no início e após quatro anos.

Genótipo	Primeira análise da ploidia	Segunda análise da ploidia	Nº brotos	Ploidia dos brotos	Código da planta
Lidi	Mixo	Mixo	3	2 Di 1 Mixo	2
Lidi	Tetra	Tetra	0	-	4
Lidi	Mixo	Mixo	0	-	6
Lidi	Mixo	Mixo	1	Mixo	9
Lidi	Mixo	Mixo	1	Mixo	12
Lidi	Mixo	Mixo	5	Mixo	15
TDM	Mixo	Mixo	5	Mixo	5
TDM	Mixo	Di	1	Di	7
TDM	Mixo	Mixo	3	1Di 2 Mixo	8
TDM	Mixo	Mixo	4	Mixo	11
TDM	Tetra	Tetra	1	Mixo	13
TDM	Mixo	Mixo	6	3 Di e 3 Mixo	14
Malbut	Tetra	Tetra	6	2 Di e 4 Mixo	1
Malbut	Mixo	Di	1	Di	16
Malbut	Mixo	Mixo	5	1 Mixo e 4 Di	17
Ouro	Mixo	Di	1	Di	18

Mixo = mixoploide; Tetra = tetraploide; Di = diploide.

Fonte: Os autores.

As plantas do genótipo Lidi apresentaram diferentes ploidias. Uma planta tetraploide, identificada na Tabela 2 como planta 4, apresentou estabilidade genética, porém não emitiu nenhuma brotação. A análise estomática não foi realizada porque essa planta não apresentou nenhum estômato

nas amostras de tecidos obtidas, evidenciando que o “efeito gigas” observado em plantas poliploides causa a diminuição da densidade estomática (WAN et al., 1989; SOUZA & QUEIROZ, 2004).

A planta 2A foi identificada como mixoploide e apresentou 3 brotações (2B, 2C

e 2D), sendo estas 2 diploides e uma mixoploide. A planta 9A que também foi identificada como mixoploide anteriormente permaneceu mixoploide, mas também apresentou uma brotação diploide. As plantas mixoploides 12A e 15A, com suas respectivas brotações, permaneceram mixoploides.

Em relação às análises estomáticas para esse genótipo não foi possível fazer uma correlação satisfatória entre o número e tamanho de estômatos com o resultado da análise de citometria de fluxo. Apenas para as plantas 12A e 12B e 15C, 15D e 15E foi possível uma correlação entre estômatos maiores e menos frequentes (“efeito gigas”) relacionados com a mixoploidia.

Para o genótipo Thong Dok Mak a planta tetraploide manteve a estabilidade genética, permanecendo tetraploide. Esta planta denominada 13 A emitiu uma brotação que foi avaliada como mixoploide neste trabalho (Tabela 3).

Tabela 2 - Análises estomáticas e de citometria de fluxo para as plantas do genótipo Lidi.

Genótipo	Análise Estomática			Análise de citometria
	Diâmetro polar (µm)	Diâmetro equatorial (µm)	Densidade (nº estômatos mm ⁻²)	
2 A	23.73 c	11.70 b	116,23 c	Mixo
2 B	22.37 b	12.77 c	53,50 a	Di
2 C	25.73 c	13.16 c	55,35 a	Di
2 D	26.07 c	14.39 c	60,88 b	Mixo
4	-	-	-	Tetra
6	22.20 b	12.81 c	62,73 b	Mixo
9 A	25.07 c	12.30 b	44,28 a	Mixo
9 B	26.32 c	11.51 b	44,28 a	Di
12 A	29.85 e	15.96 b	46,12 b	Mixo
12 B	28.35 e	11.94 a	42,43 b	Mixo
15 A	18.57 a	9.49 a	71,95 b	Mixo
15 B	19.27 a	12.34 b	77,49 b	Mixo
15 C	24.81 c	13.58 c	40,59 a	Mixo
15 D	24.87 c	13.89 c	47,97 a	Mixo
15 E	25.32 c	12.01 b	47,97 a	Mixo
15 F	18.78 a	11.56 b	46,13 a	Mixo

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical pertencem ao mesmo grupo e não diferem estatisticamente, pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Tabela 3 - Análises estomáticas e de citometria de fluxo para as plantas do genótipo Thong Dok Mak.

Genótipo	Análise Estomática			Análise de citometria
	Diâmetro polar (µm)	Diâmetro equatorial (µm)	Densidade (estômatos mm ⁻²)	
5 A	25.15 d	14.59 b	73,80 c	Mixo
5 B	22.41 b	12.87 b	83,03 d	Mixo
5 C	24.17 c	12.23 a	57,19 c	Mixo
5 D	18.60 a	10.58 a	64,57 c	Mixo
5 E	27.19 e	13.63 b	27,67 a	Mixo
7 A	22.94 b	8.59 a	83,03 d	Di
7 B	25.59 d	11.68 a	60,88 c	Di
8 A	28.63 e	14.56 b	38,74 b	Mixo
8 B	27.64 e	14.39 b	38,74 b	Mixo
8 C	27.29 e	14.00 b	38,74 b	Di
8 D	26.00 d	13.80 b	22,14 a	Mixo
11 A	22.44 b	14.79 b	71,95 c	Mixo
11 B	19.50 a	11.11 a	79,33 d	Mixo
11 C	24.46 c	11.90 a	46,12 b	Mixo
11 D	28.18 e	15.18 b	36,90 b	Mixo
11 E	22.02 b	11.33 a	92,25 d	Mixo
13 A	26.22 d	15.13 b	47,97 b	Tetra
13 B	24.32 c	13.14 b	68,26 c	Mixo
14 A	26.85 d	12.89 b	81,18 d	Mixo
14 B	25.16 d	11.04 a	84,87 d	Di
14 C	24.54 c	13.17 b	64,57 c	Mixo
14 D	23.19 b	10.41 a	68,26 c	Di
14 E	24.51 c	13.94 b	42,43 b	Mixo
14 F	25.91 d	12.92 b	31,36 a	Mixo
14 G	22.21 b	10.54 a	70,11 c	Di

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical pertencem ao mesmo grupo e não diferem estatisticamente, pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Em relação à análise estomática para a planta tetraploide os resultados foram compatíveis com a citometria de fluxo, apresentando estômatos maiores e menos frequentes. A planta 5A mixoploide emitiu 4 brotações e foi verificado que todas elas também são mixoploides (B, C, D e E). Apenas para a planta 5E a análise de estômatos foi compatível com a análise de citometria. A planta 8A mixoploide emitiu 3 brotações, sendo 1 diploide e duas mixoploides. As análises estomáticas foram compatíveis com a análise de citometria de fluxo para as plantas 8A, B e D. A planta 11A mixoploide apresentou todas as suas brotações também mixoploides, porém pela análise estomática não foi possível a identificação da ploidia. Já a planta 14A mixoploide emitiu 6 brotações, sendo 3 diploides. A análise estomática também não foi compatível com citometria para essas plantas.

Para o genótipo Malbut a planta tetraploide (1A) permaneceu com o genoma estável. Entretanto suas brotações foram tanto diploides e mixoploides. As análises estomáticas foram compatíveis com os resultados da citometria, apresentado estômatos maiores e menos frequentes para as plantas tetraploides e mixoploides e o inverso foi observado para as diploides,

conforme a Tabela 4. A planta 17 A, mixoploide emitiu 5 brotações, sendo que apenas uma permaneceu mixoploide.

Tabela 4 - Análises estomáticas e de citometria de fluxo para as plantas do genótipo Malbut.

Genótipo	Análise Estomática			Análise de citometria
	Diâmetro polar (µm)	Diâmetro equatorial (µm)	Densidade (estômatos /mm ²)	
1 A	24.86 c	13.61 b	36,90 a	Tetra
1 B	24.08 b	11.46 a	138,37 c	Di
1 C	29.85 e	14.97 b	40,59 a	Mixo
1 D	27.75 d	13.87 b	36,90 a	Mixo
1 E	21.01 a	11.06 a	180,81 d	Di
1 F	26.20 c	14.21 b	36,90 a	Mixo
1 G	24.89 c	13.13 b	40,59 a	Mixo
16 A	23.47 b	12.21 a	23,98 a	Di
16 B	25.68 c	11.37 a	46,12 a	Di
16 C	26.13 c	12.79 a	90,40 b	Di
17 A	21.24 a	11.52 a	46,12 a	Mixo
17 B	25.44 c	12.53 a	77,49 b	Di
17 C	25.73 c	12.32 a	47,97 a	Di
17 D	23.56 b	13.83 b	46,12 a	Di
17 E	27.63 d	12.25 a	33,21 a	Di
17 F	23.23 b	13.92 b	36,90 a	Mixo

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical pertencem ao mesmo grupo e não diferem estatisticamente, pelo teste Scott Knott, a 5% de probabilidade.

Para o genótipo Ouro, apenas uma planta foi analisada e verificou-se que era diplóide, bem como sua única brotação (Figura 16). Por ser apenas 2 plantas a avaliação estomática não foi passível de comparação (Tabela 5).

Tabela 5 - Análises estomáticas e de citometria de fluxo para as plantas do genótipo Ouro.

Genótipo	Análise Estomática			Análise de citometria
	Diâmetro polar (µm)	Diâmetro equatorial (µm)	Densidade (estômatos /mm ²)	
18 A	24.26 a	12.32 a	38,74 a	Di
18 B	25.80 a	13.06 a	40,59 a	Di

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical pertencem ao mesmo grupo e não diferem estatisticamente, pelo teste Scott Knott, a 5% de probabilidade.

A Figura 1 mostra um resumo dos histogramas obtidos para todos os genótipos.

A maioria dos trabalhos de duplicação cromossômica sugere que as análises anatômicas, em especial a estomática, são úteis para verificação de ploidia (VAKILI, 1962 citado por SILVA et al., 2008; SOUZA & QUEIROZ, 2004). Neste trabalho, apenas para as plantas tetraploides foi possível obter resultados compatíveis entre análise estomática e de citometria de fluxo, sendo que os estômatos maiores e menos frequentes são indício do “efeito gigas” que ocorre nos materiais poliploides. Para plantas mixoploides era esperado um resultado semelhante ao do tetraploide, porém para a maioria dos materiais analisados neste trabalho não foi possível fazer uma correlação satisfatória entre essas duas análises. Isso pode ter ocorrido porque as plantas analisadas apresentaram brotações com diferentes tamanhos e estágios de

desenvolvimento, sendo, portanto, uma população heterogênea.

Alguns autores enfatizam que a análise estomática nem sempre é eficiente e segura, devido aos efeitos genéticos e da análise individual de algumas variáveis, que podem ocasionar a classificação equivocada de determinados genótipos em relação ao nível de ploidia (VAN DUREN et al., 1996; SOUZA & QUEIROZ, 2004; MADON et al., 2005). Neste trabalho, a face adaxial escolhida para a análise estomática pode ter sido a causa da incompatibilidade observada entre as duas análises, pois a maioria dos autores sugere que tais análises sejam feitas na face abaxial das folhas. Pela citometria de fluxo, a ploidia de grande quantidade de plantas pode ser medida por dia, produzindo resultados confiáveis pois o conteúdo de DNA não é influenciado por fatores externos, tais como intensidade luminosa, desenvolvimento de lâmina foliar e conteúdo de água no tecido da planta.

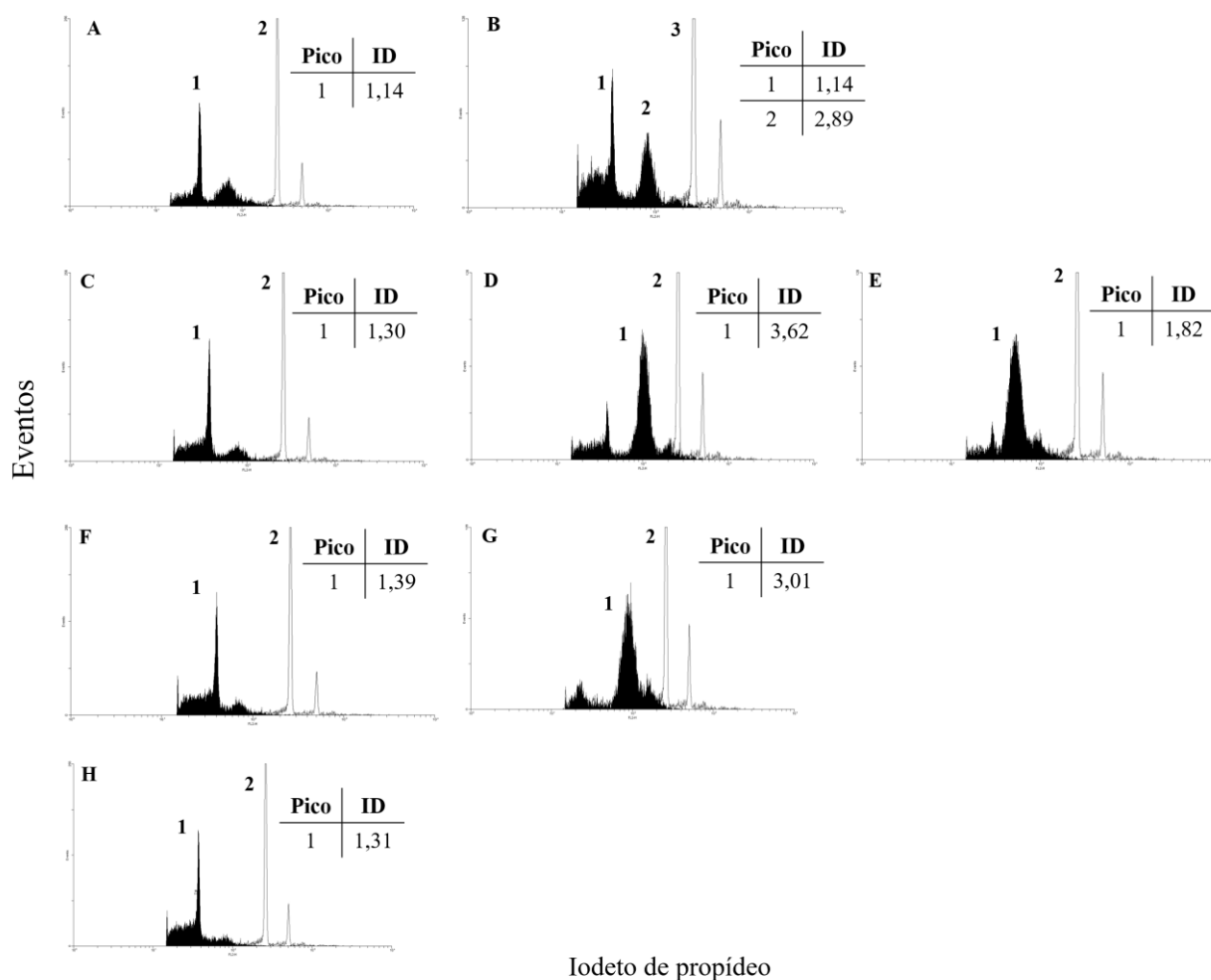


Figura 1 - Histogramas obtidos pela análise de citometria de fluxo para determinação do conteúdo de DNA em pg (ID). A e B: genótipo Lidi diploide e mixoploide, respectivamente; C, D e E: genótipo Thong Dok Mak diploide, tetraploide e mixoploide, respectivamente; F e G: genótipo Malbut diploide e tetraploide, respectivamente; H) genótipo Ouro diploide. O pico 1 refere-se à planta avaliada e o pico 2 ao padrão utilizado (*Pisum sativum* com ID = 9,09 pg). Apenas em B tem-se um terceiro pico que é referente ao padrão.

Contudo, diante de todas as análises realizadas, foi possível concluir que há muitas discrepâncias em relação à ploidia das brotações. Foi verificado que plantas tetraploides davam origem a brotações mixoploides e diploides, plantas mixoploides com brotações apenas mixoploides e, também, plantas mixoploides com brotações mixoploides e diploides. Essas diferenças provavelmente são devido ao fato do

antimitótico aplicado anteriormente não ter atingido todas as áreas do material tratado. Logo, as regiões de uma planta poliploide que não receberam efetivamente o tratamento podem ter dado origem às brotações diploides.

No presente trabalho observou-se uma tendência das plantas a se tornarem diploides. Como em plantas tetraploides e mixoploides a mitose é mais lenta devido ao maior número de cromossomos, as células

diploides tendem a se multiplicar mais rápido e, provavelmente por esse motivo, a planta possui tendência de voltar à condição diploide.

5. CONCLUSÃO

As análises estomáticas e de citometria de fluxo são compatíveis para a verificação de ploidia de plantas tetraploides, mas não são eficientes para plantas diploides e mixoploides.

As plantas originais tetraploides e a maioria das mixoploides artificiais obtidas há quatro anos se mantêm estáveis geneticamente. Porém, as brotações apresentam-se diploides e mixoploides.

6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Embrapa Mandioca e Fruticultura pela doação das plantas e à Fapemig pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

ÇELIKLER, S.; BILALOGLU, R. Nucleotipic effects in different genotypes of *Vicia faba* L. **Turkish Journal of Biology**, v.25, n.4, p.205-219, 2001.

COSTA, F. H. S.; PASQUAL, M.; SILVA, S. O.; NETO, H. P. S.; AMORIM, E. P.; SANTOS-SEREJO, J. A. Poliploidização em ápices caulinares de bananeira e seus efeitos morfofisiológicos *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, p.805-813, 2011.

DOLEZEL, J. BINAROVA, P.; LUCRETTI, S. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. **Biologia Plantarum**, v.31, n.2, p.113-120, 1989.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. FaoStats – Banana. 2019. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acesso em: 16 setembro de 2019.

KRAMER, L. J.; BAMBERG, J. Comparing methods of ploidy estimation in potato (*Solanum*) species. **American Journal of Potato Research**, s/v, p.1-8, 2019.

MADON, M.; CLYDE, M. M.; HASMIM, H.; MOHD YUSUF, Y.; MAT, H.; SARATHA, S. Poliploidy induction of oil palm through colchicine and oryzalin treatments. **Journal of Oil Palm Research**, v.17, p.110-123, 2005.

SILVA, S. O.; ALVES, E. J.; LIMA, M. B.; SILVEIRA, J. R. S. **Bananeira**. In: BRUCKNER, C. H. Melhoramento de fruteiras tropicais. Viçosa: UFV, 2008. p.107-113.

SILVA, S. O.; AMORIM, E. P.; SANTOS-SEREJO, J. A.; FERREIRA, C. F.; RODRIGUEZ, M. A. D. Melhoramento genético da bananeira: estratégias e tecnologias disponíveis. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.35, n.3, p.919-931, 2013.

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

VAN DUREN, M.; MORPURGO, R.; DOLEZEL, J.; AFZA, R. Induction and verification of autotetraploids in diploid banana (*Musa accuminata*) by *in vitro* techniques. **Euphytica**, v.88, n.1, p. 25-34, 1996.

WAN, Y.; PETOLINO, J. F.; WIDHOLM, J. M. Efficient production of doubled haploid plants through colchicine treatment of anther-derived Maize callus. **Theoretical and Applied Genetics**, v.77, n.6, p.889-892, 1989.

ZHANG, Q. Y.; LUO, F. X.; LIU, L.; GUO, F. C. *In vitro* induction of tetraploids in crape myrtle (*Lagerstroemia indica* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.101, p.41-47, 2010.

Renata Alves Lara Silva Rezende

Doutora em Agronomia/Fitotecnia pela Universidade Federal de Lavras.

Leila Aparecida Salles Pio

Doutora em Agronomia/Fitotecnia pela Universidade Federal de Lavras (UFLA). Professora de Fruticultura do Departamento de Agricultura da UFLA.

Filipe Almendagna Rodrigues

Doutor em Agronomia/Fitotecnia pela Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Moacir Pasqual

Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas pela Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ – USP). Professor de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura da UFLA.

Ramiro Machado Rezende

Doutor em Agronomia/Fitotecnia pela Universidade Federal de Lavras (UFLA). Professor e coordenador do curso de Agronomia da Universidade Vale do Rio Verde (UninCor).

Sebastião de Oliveira e Silva

Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas pela Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ – USP). Pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura.
