INDUÇÃO DE POLIPLOIDIA EM CLONES DE
Eucalyptus urophylla S.T. BLAKE

PETRA SYLVIA ROTH

Orientador: Prof. Dr. ANTONIO NATAL GONÇALVES

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Engenharia Florestal.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Setembro - 1984

Para

Hedwig e Heinz,
Pauline e Eugen,
e Hilde.

AGRADECIMENTOS

Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves, pela orientação e dedicação;

Prof. Dr. Mário Ferreira, pela orientação inicial;

Prof. Dr. Hilton Thadeu Zarate do Couto, pela valiosa colaboração na parte estatística;

Prof. Dr. Mário Tomazello Filho, pelas valiosas sugestões e fotografia;

José Roberto Romanini, pela valiosa colaboração na fase de laboratório;

Ao Sr. José Maria Soares de Godoy, pelos cuidados dispensados às plantas na fase de casa-de-vegetação;

À Bibliotecária Marialice Metzker Poggiani, pela colaboração prestada;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMO.....	
SUMMARY.....	
I - INTRODUÇÃO.....	1
II - REVISÃO DE LITERATURA.....	3
A - O <i>Eucalyptus urophylla</i> S.T. Blake.....	3
B - Clonagem "in vitro".....	4
C - Poliploidia.....	6
1. Aspectos evolutivos.....	6
2. Poliploidia no melhoramento florestal.....	11
3. Obtenção de poliploides artificiais.....	14
a) Indução.....	14
b) Determinação do nível de ploidia.....	18
III - MATERIAL E MÉTODOS.....	20
A - Clonagem "in vitro".....	20
1. Origens dos explantes.....	20
2. Esterilização dos explantes.....	23
3. Meio de cultura.....	24
4. Condições ambientais de cultura.....	24
5. Avaliações.....	25
B - Indução de poliploidia.....	25
C - Acompanhamento e Avaliações.....	28
IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30

A - Clonagem "in vitro".....	30
B - Indução de poliploidia.....	32
1. Sobrevivência.....	32
2. Caracterização morfológica das plantas tra- tadas.....	35
3. Contagem de estômatos.....	39
C Considerações Gerais.....	44
V - CONCLUSÕES.....	49
VI - LITERATURA CITADA.....	51
VII - APÊNDICES.....	64

INDUÇÃO DE POLIPLOIDIA EM CLONES DE
Eucalyptus urophylla S.T. BLAKE

PETRA SYLVIA ROTH

ANTONIO NATAL GONÇALVES

- ORIENTADOR -

RESUMO

Os objetivos do presente trabalho foram o desenvolvimento de uma metodologia de indução de poliploidia em clones de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake, produzidos "in vitro" e a verificação de possíveis modificações nas plantas tratadas. Os resultados indicam que:

a. A indução de poliploidia em *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake é viável;

b. O tratamento com colchicina, até um período máximo de imersão de 30 horas, não afetou a sobrevivência e o desenvolvimento das plantas tratadas em relação às testemunhas; não há diferenças entre períodos de imersão testados em relação a estes dois parâmetros;

c. As plantas tratadas apresentam anormalidades morfológicas e uma redução do número de estômatos por unidade de área foliar, indicando uma poliploidização pelo menos parcial.

Com base nos resultados obtidos ainda se discutiu o possível efeito da iluminação durante o período de imersão sobre a sobrevivência e desenvolvimento das plântulas e a superioridade do método testado comparado a outros conhecidos, em relação a estes parâmetros, além da boa eficiência alcançada. Sugestões para a interpretação dos resultados e para a continuidade do trabalho foram apresentadas.

INDUCTION OF POLYPLOIDY IN *Eucalyptus*
urophylla S.T. BLAKE CLONES

PETRA SYLVIA ROTH

ANTONIO NATAL GONÇALVES

- ADVISER -

SUMMARY

The objectives of this study were the development of a methodology for induction of polyploidy in test-tube produced clones of *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake and checking the possible effects on treated plants. From the analysis of the results of this study, the following conclusions were drawn:

a. Induction of polyploidy in *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake is feasible;

b. The colchicine treatment did not affect survival and development of treated plants, there were no differences for these two variables between the several immersion periods tested;

c. Treated plants showed some morphological

abnormalities and reduction of the number of stomates per leaf area unit, strongly suggesting an at least partial polyploidization.

Based on the results obtained, the possible effect of light during immersion on survival and development of plantlets and superiority of the method tested compared to other methods known were discussed, as well as the high efficiency achieved here. Suggestions for data interpretation and further work were made.

I. INTRODUÇÃO

As pesquisas no campo do melhoramento genético de essências florestais vêm se intensificando na última década como mais um instrumento a incrementar a produtividade florestal, além das técnicas de manejo silvicultural.

Ao lado das técnicas tradicionais baseadas na seleção e produção de sementes melhoradas surgem diversas outras, até agora pouco exploradas, sendo que os métodos mais simples e diretos fornecem resultados ainda satisfatórios, devido à grande variabilidade natural das espécies arbóreas disponíveis.

Existe, porém, a necessidade de desenvolver estudos básicos sobre outros métodos de melhoramento, visando a acrescentar informações gerais a cerca das espécies utilizadas e abrir novas perspectivas para o melhoramento florestal no futuro.

Uma opção interessante é o estudo da poliploidia, natural ou induzida, conforme revelam pesquisas envolvendo espécies agronômicas, bem como algumas espécies florestais.

Devido às escassas informações existentes sobre a indução da poliploidia em espécies de *Eucalyptus*, um gênero amplamente empregado nos reflorestamentos, o presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de uma metodologia para a indução de poliploidia em *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake, verificando a eficiência do tratamento e as modificações decorrentes da poliploidização.

II. REVISÃO DE LITERATURA

A. *Eucalyptus urophylla* S.T. BLAKE

O *Eucalyptus urophylla* é uma espécie de árvores de grande porte, com fuste bastante reto, devido à forte dominância apical, casca rugosa e boa desrama natural até cerca de dois terços da altura. Em regiões mais áridas, as árvores se apresentam mais baixas, com troncos tortuosos e dominância apical bem menos pronunciada ou ausente. A altitude acima de 2.200 metros as árvores são pequenas e de má forma (MARTIN e COSSALTER, 1975).

A espécie ocorre particularmente no arquipélago das Ilhas da Sonda, na província indonésia de Nusa Tenggara Timur, englobando as Ilhas de Timor, Flores, Adonara, Lomblen, Pantar e Alor, estendendo-se por uma faixa latitudinal de 8°30' a 10°S, em altitudes de 350 a 2.960 m. Pode ocorrer

uma associação com *E. alba*, com a qual ocasionalmente forma híbridos naturais na zona de contato.

Os primeiros exemplares da espécie foram introduzidos no Brasil, em Rio Claro, SP, sob o nome de *E. alba*, no ano de 1919, por Navarro de Andrade. Despertou grande interesse para o uso nos reflorestamentos em razão de sua rusticidade, altos incrementos volumétricos, boa qualidade da madeira para carvão, celulose e serraria e resistência a pragas e doenças, principalmente ao cancro causado pelo fungo *Cryphonectria* (*Diaporthe* Bruner) *cubensis* Hodges. Espécie de grande potencial adaptativo, é passível de cultivo sob condições ambientais diversas, abrangendo amplas faixas climáticas (HODGES e REIS, 1976; TOMAZELLO FILHO, 1976; CAMPINHOS e IKEMORI, 1977; MORA e FERREIRA, 1980; VIEIRA, 1980).

A cultura in vitro desta espécie vem sendo realizada com sucesso há vários anos (GONÇALVES, 1980 e 1982).

B. CLONAGEM "IN VITRO"

Nos programas de melhoramento de árvores, a propagação vegetativa permite a manutenção de características superiores, obtendo-se clones, ou seja, material geneticamente uniforme, constituindo uma base conveniente para os trabalhos. Nos casos em que os métodos de propagação vegetativa como a estaquia (DELWAULLE, LAPLACE e QUILLET, 1980; QUIJADA, 1980) se tornam difíceis ou impraticáveis, abriram-se novas

perspectivas com a cultura de células, tecidos ou órgãos (BONGA, 1974; DURZAN e CAMPBELL, 1974).

Encontram-se na literatura, numerosos trabalhos versando sobre o estudo e o emprego da cultura "in vitro" de essências florestais, utilizando diferentes espécies, diversos tipos de explantes, meios de cultura e condições de crescimento, relatando sucesso variável na reconstituição de plantas inteiras a partir dos calos cultivados (WINTON, 1968, 1970 e 1971 - em *Populus*; FOSSARD *et alii*, 1974; LEE e FOSSARD, 1974; GONÇALVES *et al.*, 1979; GUPTA *et al.*, 1981 - em *Eucalyptus* spp.).

ANEJA e ATAL (1969) foram os primeiros a relatarem êxito na regeneração de plantas de eucalipto através da cultura de células e de tecido, trabalhando com explantes de "lignotuber" de *E. citriodora*. Seguiram-se outros trabalhos com diferentes espécies, como o de BLAKE (1972 - citado por GONÇALVES, 1982) com *E. obliqua*; de Winton (1972) com *E. nova angelica*, sem sucesso; CRESSWELL e FOSSARD (1974) e FOSSARD *et alii* (1974) em *E. grandis* KITAHARA e CALDAS (1975) em *E. alba* e GONÇALVES (1975 e 1980) em *E. grandis*, *E. robusta*, *E. camaldulensis* e *E. urophylla*; utilizando explantes diversos como de "lignotuber", de hipocôtilo e nodais.

Entre as diversas dificuldades enfrentadas na obtenção de plantas a partir das culturas "in vitro", como oxidação fenólica de calos e meios de cultura, no caso particular do gênero *Eucalyptus* a idade da matriz constitui um dos fatores mais críticos, influenciando fortemente sobre a capacidade

morfogenética do material cultivado (GONÇALVES, 1975). Existem porém, tentativas bem-sucedidas de reversão à juvenilidade, i. e. a recuperação da capacidade morfogenética, permitindo a utilização de material adulto (CRESSWELL e NITSCH, 1975; DURAND-CRESSWELL e NITSCH, 1977; BARKER *et al.*, 1977; GONÇALVES, 1980 e 1982; GUPTA *et al.*, 1981).

C. POLIPLOIDIA

1. Aspectos evolutivos

STEBBINS (1971) refere-se à poliploidia, i.e. a multiplicação de complementos cromossômicos inteiros, como sendo o processo citogenético mais difundido e mais distintivo que afetou a evolução das plantas superiores. 30 a 35% das espécies de angiospermas e uma porcentagem ainda maior nas fanerógamas possuem números cromossômicos que são múltiplos do número básico diplóide encontrado em seu gênero.

A poliploidização produz uma série de efeitos morfo-e fisiológicos. O efeito imediato é o aumento do tamanho das células devido ao volume nuclear maior, conduzindo a uma redução do número de divisões celulares durante o desenvolvimento. O conhecido efeito "gigas" encontra-se comumente em órgãos de padrão de crescimento altamente determinado como flores e sementes. As características gerais apresen-

tadas por plantas autopoliploides incluem folhas e pétalas mais grossas e firmes e de coloração mais escura; folhas e outros órgãos geralmente mais curtos e largos; aumento das fibras de madeira nos sentidos equatorial e longitudinal; estômatos maiores e menos frequentes, menor ramificação (RHOADES, 1955; MERGEN, 1959; HYNN e KIM, 1963; SEKAWIN, 1963; ARMSTRONG, 1980), retardamento no ciclo mitótico e conseqüente retardamento de floração e frutificação e, enfim, uma redução da fertilidade e da produção de sementes devido a duas causas - a meiose irregular (formação quadri-, tri- e univalentes, conduzindo a uma segregação cromossômica irregular e conseqüente formação de gametas com número de cromossomos não-balanceado, SYBENGA (1972) e distúrbios fisiológicos decorrentes da dosagem gênica dobrada.

MORRISON e RAJHATHY (1960), estudando o comportamento meiótico de autotetraplóides de plantas em geral, encontraram que dois terços dos cromossomos foram quadrivalentes na meiose.

JOHNSSON (1953) apresenta uma lista bastante ilustrativa de características morfológicas e fisiológicas comparativa entre diplóides e triplóides de *Populus tremula*, evidenciando o crescimento inferior dos triplóides durante o primeiro ano, devido a uma conversão menos eficiente do CO₂ em matéria seca e taxa de transpiração mais elevada. Registra ainda um aumento das dimensões das fibras de madeira nos triplóides, bem como maior conteúdo de celulose na madeira.

Complementando estes dados, BORDEAU e MERGEN (1959), citando ainda outros autores, estudando as consequências fisiológicas da poliploidização, mediante as taxas de fotossíntese e respiração em plântulas poliplóides de *Pinus elliptii*, verificaram uma diminuição da eficiência fotossintética, manutenção da taxa de respiração e conseqüente diminuição do ritmo de crescimento das plantas poliplóides.

No caso de uma autoduplicação espontânea, os tetraplóides recém-formados apresentam as características acima que os distinguem de seus progenitores diplóides e que contribuem para sua inferioridade adaptativa expressa em menor produção de biomassa por unidade de tempo, menor produção de sementes e menor competitividade em relação aos diplóides. Logo a duplicação do número de cromossomos "per se" constitui uma desvantagem; o sucesso da poliploidia na evolução das plantas é devido à ação de outros processos genético-evolucionários, postulados como modificação gradual de genótipos por mutação, recombinação genética e seleção, e modificação em massa por hibridação (precedendo ou sucedendo à duplicação do complemento cromossômico) sempre seguido pela seleção natural, favorecendo os segregantes adaptativos (STEBBINS, 1971).

Os principais fatores internos que promovem a poliploidia são o hábito de crescimento e o modo de reprodução. Assim, plantas perenes estabelecerão mais facilmente plantas e colônias poliplóides do que plantas anuais, e suas chances aumentam se forem autógamas (GRANT, 1963). A possibilida-

de da propagação vegetativa em algumas espécies também favoreceu o estabelecimento da poliploidia nestas espécies (ILLIES, 1976).

A poliploidia reduz a probabilidade do estabelecimento de mutantes recessivos devido à herança tetrasômica (SYBENGA, 1972) e diminui a variabilidade. Os poliplóides podem, a longo prazo, adquirir grande amplitude ecológica através de um efeito "tampão" contra as mudanças climáticas (STEBBINS, 1971). Apoiando-se na distribuição da ocorrência de poliplóides em espécie normalmente diplóide, GUSTAFSSON (1968) sugere uma relação entre poliploidia e condições ecológicas, no sentido de valor adaptativo da poliploidia em condições ambientais adversas.

Esta hipótese é sustentada por FUNABIKI (1976) que, trabalhando com diversas espécies, demonstrou com estudos evolutivos e em experimentos que poliplóides naturais de muitas espécies surgiram em épocas de "stress" ambiental, como frio ou seca, durante as eras de glaciação.

LLERAS e MEDRI (1978), estudando poliplóides em *Hevea* spp., formularam hipóteses sobre a correlação entre caracteres anatômicos e morfológicos de folhas poliplóides e a capacidade de resistir a condições ambientais extremas, baseando-se em diversos ensaios, envolvendo diplóides versus poliplóides, onde os poliplóides mostraram uma resistência maior à seca.

A poliploidia ocorre naturalmente em essências

arbóreas e desempenha um papel importante na evolução de vários gêneros e espécies.

GUSTAFSSON (1962 e 1968) relaciona, em extensa revisão sobre gimnospermas e angiospermas, a ocorrência frequente de algumas espécies poliplóides naturais, em gêneros arbóreos predominantemente diplóides (por exemplo, *Quercus* e *Ulmus*) bem como o aparecimento de autopoliplóides espontâneos em espécies normalmente diplóides e constantes citologicamente (*Populus* spp., *Abies firma*, *Picea abies*, *Cryptomeria japonica*, *Pinus* spp.).

STAROVA e KOTS (1976) discutem a importância de poliploidia na evolução do gênero *Salix*, tanto por autopoliploidia como por aloploidia resultante de hibridação introgressiva.

A aparente raridade do fenômeno de poliploidia em espécies tropicais quando comparado com espécies temperadas, parece mais devido a um problema de amostragem e não a uma importância evolutiva menor, conforme coloca BAWA (1976), citando famílias tropicais nas quais a poliploidia é frequente, como *Bombaceae*, *Euphorbiaceae*, *Meliaceae*, *Moraceae* e *Rutaceae*.

Poliploidia e hibridação são dois processos evolutivos estreitamente relacionados e sobremaneira importantes na evolução das plantas superiores (STEBBINS, 1949 e 1971).

2. Poliploidia no melhoramento florestal

O interesse dos melhoristas florestais pela poliploidia despertou quando da descoberta do choupo gigante (*Populus tremula* var. *gigas*) por Nilsson - Ehle (1936), identificado como triplóide natural por Müntzing (1936), através de análise citológica.

Este triplóide apresentou desempenho silvicultural superior aos diplóides e tetraplóides, além de maior resistência a doenças. A partir de então iniciou-se uma série tentativas isoladas de indução de poliploidia em diversas espécies florestais e de combinação da poliploidia natural ou induzida com a hibridação intra- ou até interespecífica para fins de melhoramento (GUSTAFSSON, 1962 e 1968).

A ocorrência natural da poliploidia em diversos gêneros como *Populus* (Nilsson - Ehle, 1936; Johnsson, 1953), *Betula* (KONOVALOV e PITCHUGINA, 1976); *Salix* (STAROVA e KOTS, 1976), *Fraxinus* (CLAUSEN, BEY e KUNG, 1980) [e outros] e ainda em algumas famílias tropicais (BAWA, 1976) bem como sua importância no processo evolutivo (GRANT, 1963; STEBBINS, 1971; BAWA, 1976; FUNABIKI, 1976) levaram os pesquisadores aos experimentos de indução de poliploidia também em gêneros de interesse silvicultural nos quais a poliploidia natural é um fenômeno raro ou desconhecido.

Os primeiros autores a obterem sucesso com o tratamento com colchicina em plantas lenhosas provavelmente

foram MIROV e STOCKWELL em 1939, citados por HYUN (1954).

O mesmo autor lista uma série de tentativas de indução em gimnospermas, principalmente, durante os anos quarenta e relata êxito no tratamento de sementes de várias espécies de *Pinus*, obtendo alguns tetraplóides estáveis, entre diversos tipos de mixaplóides e casos de reversão à condição diplóide. O plantio dos poliplóides garantiu-se através da estquia em equietâneos diplóides.

DERMEN e DILLER (1962) produziram, com facilidade, tetraplóides de três espécies de *Castanea*, com o objetivo de empregá-los em programas de hibridação intra-e interespecífica.

SEKAWIN (1963) obteve um choupo (*Populus*) tetraplóide de características silviculturais altamente desfavoráveis; utilizando seu pólen no cruzamento com um diplóide produziu uma descendência triplóide de características muito favoráveis e boa resistência.

HYUN e KIM (1963) produziram tetraplóides de 32 espécies, entre elas, espécies de *Pinus*, *Populus*, *Betula* e *Abies*, observando um aumento das fibras da madeira nos sentidos equatorial e longitudinal, utilizando-os em cruzamentos com diplóides para a obtenção de triplóides, cuja taxa de crescimento é mais satisfatória, mas que preservam as características poliplóides desejáveis.

Reconhecendo as vantagens oferecidas por espécies triplóides de *Populus tremula* e *P. tremuloides*, para a

produção de celulose e papel, EINSPAHR (1965) partiu para o tratamento de embriões recém-germinados de *P. tremuloides*, obtendo matéria-prima tetraplóide para futuros cruzamentos, visando a descendência triplóide.

MERGEN e LESTER (1961) produziram "seedlings" tetraplóides de *Abies*.

JOHNSSON (1975) obteve tetraplóides de *Pinus sylvestris*, *P. contorta*, *Picea abies* e *Larix sibirica* que mantiveram a estabilidade de condição poliplóide até a idade de floração (30 anos), mas falharam na produção da descendência triplóide.

Jã ILLIES (1976) conseguiu híbridos interespecíficos em *Larix*, após poliploidização do material.

KAPOOR e KEDHARNATH (1977) induziram tetraploidia em plântulas de *Eucalyptus* e sândalo que durante o primeiro ano de desenvolvimento apresentaram um crescimento 50% superior às testemunhas diplóides.

Trabalhando com clones de seringueira (*Hevea* spp.) MEDRI e LLERAS (1981) relatam a obtenção de poliplóides altamente produtivos.

GUSTAFSSON (1962) cita três condições favorecendo o uso de poliploidia em uma dada espécie: número de cromossomos baixo; alogamia pronunciada e possibilidade de propagação vegetativa.

Resumindo, as possibilidades de emprego da poliploidia no melhoramento florestal são; obtenção de poliplóides

des com características morfológicas e fisiológicas vantajosas; produção de descendência triplóide altamente produtiva e resistente, a partir de matéria-prima tetraplóide; uso de poliplóides em programas de hibridação intra- e interespecífica.

3. Obtenção de poliplóides artificiais

a) Indução

A duplicação dos cromossomos pode ser induzida de diversas maneiras. Uma das técnicas mais antigas é a de ferimento de tecidos com posterior regeneração (BURNHAM, 1962). Outra envolveu choques de temperatura (elevada) conforme descreve RANDAOLPH (1932) em seu trabalho histórico em milho (*Zea mays* L.).

A centrifugação é outra alternativa, além de a gentes químicos como podofilina, vincalécoblastina (VLB), óxido nitroso (N_2O), hormônios (GUSTAFSSON, 1962); JENSEN, 1974; WRIGHT, 1976; PORTILLO, 1980).

A colchicina, inibidora do fuso acromático, é a substância mais amplamente empregada e melhor estudada, principalmente em culturas agrícolas como *Zea mays*, *Hordeum vulgare*, *Nicotiana tabacum*, *Solanum tuberosum* e plantas ornamentais, mas também em espécies florestais (HYUN, 1954; BORDEAU e MERGEN, 1959; MERGEN, 1959; DERMEN e DILLER, 1962; HYUN e KIM, 1963; SEKAWIN, 1963; EINSPAHR, 1965; MERGEN e LESTER, 1971;

JOHNSSON, 1975; ILLIES, 1976; KAPOOR e KEDHARNATH, 1977).

Trata-se de um alcalóide extraído de plantas do gênero *Colchicum*. A colchicina age estritamente sobre células em divisão, inibindo o fuso acromático; os cromossomos são paralisados na metáfase, não avançando para anáfase, conduzindo a célula a endomitoses sucessivas ocasionando o aumento de seu nível de ploidia. A tolerância à colchicina varia entre espécies; em concentrações elevadas possui efeito tóxico, levando à morte das células e da planta (JENSEN, 1974).

As principais variáveis no tratamento com a colchicina são: a) a concentração, variando de 0,0006% a 3,0% (JENSEN, 1974); b) tempo de exposição à droga, variando de 1 hora a vários dias (HYUN, 1954; EINSPAHR, 1965; BURK *et al.*, 1972) e c) forma de aplicação, desde imersão de sementes e embriões ao tratamento local de meristemas em plantas desenvolvidas (HYUN, 1954; EINSPAHR, 1965; MERGEN e LESTER, 1971; JENSEN, 1974).

A problemática maior da indução via colchicina resulta do fato de que a substância só age efetivamente sobre as células que estão em divisão, de modo que a poliploidização geralmente não atinge todas as células do material tratado, sendo comum o aparecimento de mixaplóides e quimeras (MERGEN, 1959). Em consequência surge o problema relativo à estabilidade da condição poliplóide, sendo frequente a reversão parcial ou total à condição diplóide, após alguns ciclos de divisão, devido principalmente à proliferação das células

diplóides remanescentes que se multiplicam a taxas superiores àquelas das células poliplóides (EINSPAHR, 1965; MERGEN e LESTER, 1971).

Em decorrência dessas dificuldades, têm-se variado bastante a forma de aplicação, buscando uma maior eficiência do tratamento (JENSEN, 1974).

HYUN (1954) tratou sementes de quatro espécies e 2 híbridos estratificados de *Pinus* com solução aquosa de colchicina a 0,2% por 1 a 6 dias, obtendo melhor resultado do que com a germinação de sementes em placas de Petri embebidas com a solução (0,2 a 0,4%).

DERMEN e DILLER (1962) aplicaram colchicina pastosa em gemas de plântulas de *Castanea* spp., com eficiência de poliploidização muito boa.

EINSPAHR (1965) imergiu embriões recém-formados (6, 12, 18, 24 e 30 horas após a polinização) de *Populus tremuloides* em solução aquosa de colchicina a 0,3% por 6 horas, observando melhores resultados do que os obtidos com o tratamento de sementes em germinação ou de "seedlings", devido à intensa divisão das células dos embriões, pouco numerosas, atingindo uma proporção bem maior de células poliploidizadas.

Trabalhando com nove espécies de *Abies*, tratando sementes e partes vegetais com solução aquosa de colchicina de concentração variando de 0,025 a 2,0%. MERGEN e LESTER (1971) obtiveram melhores resultados com "seedlings" re-

cém-germinados, imersos em areia quartzosa fina, umedecida com solução de colchicina 0,4%. Resultaram, além de poliplóides "perfeitos", também mixaplóides que reverteram à condição diplóide, dado que os tecidos poliplóides não foram capazes de competir com os diplóides remanescentes.

Comumente, adicionam-se à solução de colchicina outras substâncias como glicerina (CHASE, 1952; DERMEN e DILLER, 1962), agentes umedecedores como SANTO MERSE¹, DMSO² ou TWEEN¹ (DERMEN e DILLER, 1962; HERVÁS e GIMENEZ-MARTINS, 1973; JENSEN, 1974) visando facilitar a penetração de colchicina nas células e produtos preventivos de contaminação como cristais de timol (DERMEN e DILLER, 1962).

NEUBAUER e THOMAS (1966) estudaram o efeito do pH de solução de colchicina sobre a eficiência do tratamento, alcançando melhores resultados com pH ácido (4,0), no caso de *Trifolium pratense*.

A espécie também é um fator importante no êxito na poliploidização, segundo constataram DERMEN e DILLER (1962) em estudos comparativos.

Segundo HYUN e KIM (1963) a condição fisiológica do material tem influência maior sobre o sucesso do tratamento do que a própria dosagem de colchicina.

---

¹ Marcas comerciais

² Dimethyl sulfoxide (Sulfato de Dimetila)

b) Determinação do nível de ploidia

Estudos citológicos de poliplóides foram conduzidos somente em poucas espécies.

A contagem de cromossomos constituiria o método mais indicado e preciso para a determinação do nível de ploidia. A metodologia básica, em termos gerais, encontra-se em JOHANSEN (1940) e BUECHERL (1972).

Contudo, em muitas espécies florestais depara-se com uma série de dificuldades, não existindo uma metodologia simples e adequada.

EINSPAHR (1965), em seu trabalho, refere-se ao método de fixação e coloração de cromossomos de *Populus*, elaborado por van BUIJTENEN (1959),

Para *Eucalyptus* existe como referência a metodologia empregada por RUGGERI (1960 e 1961) na determinação do cariótipo de várias espécies; a autora frisa os problemas decorrentes da extrema pequenez dos cromossomos neste gênero, tornando difícil uma contagem acurada.

Existem, porém, técnicas alternativas já suficientemente aprimoradas que se aplicam aos estudos de genética florestal, como a microespectrofotometria, também chamada de citofotometria. Permitem a determinação do conteúdo de DNA nuclear nas células, correlacionando-se com o nível de ploidia, porém exigem certa sofisticação em termos de materiais e equipamentos (BERLYN e CECICH, 1976; SAUTER e ULRICH, 1977; SCHAEFER

e MIKSCHE, 1977; SEIBOLD e ZELLES, 1977; WOBUS, 1981).

Na maioria dos experimentos de indução de poliploidia em árvores, o critério inicial empregado é o de contagem e medição comparativa de estômatos nos supostos poliplóides e as testemunhas diplóides do ensaio. Uma alternativa simples, baseada nas alterações morfológicas decorrentes de poliploidização, descritas nas espécies estudadas, tanto de poliplóides naturais como induzidos, é a contagem e medição comparativa de estômatos nos supostos poliplóides, bem como nas testemunhas diplóides. Nos poliplóides ocorre uma redução do número de estômatos por unidade de área foliar, bem como um aumento significativo no tamanho dos mesmos, em relação às plantas diplóides. O percentual desta redução ou incremento varia de espécie para espécie; é, porém, consistente e utilizado como critério inicial para a identificação de poliplóides (HYUN, 1954; DERMEN e DILLER, 1962; HYUN e KIM, 1963; SEKAWIN, 1963; LLERAS e MEDRI, 1978; MEDRI e LLERAS, 1981). Uma variante é a contagem de cloroplastos nas células-guardas de estômatos (FLOH, 1983).

III. MATERIAIS E MÉTODOS

A. CLONAGEM "IN VITRO"

A clonagem "in vitro" constituiu a fase preparatória para o experimento principal, a indução de poliploidia. A metodologia empregada é a descrita por GONÇALVES (1980).

1. Origens dos explantes

Os explantes usados para o estabelecimento da cultura de gemas e subsequente produção de clones originaram-se de segmentos nodais de ramos de crescimento do ano da copa das árvores.

Os explantes foram colhidos de Eucalyptus urophylla S.T.Blake, de diferentes procedências e em diferentes idades, conforme mostra a Tabela 1.

Os clones das árvores de cerca de 1 ano de i-

dade foram denominados de clones BO₁ os clones de árvores com cerca de 4 anos de idade de clones CO₁ e os clones de árvores com cerca de 13 anos de idade de clones DO₁.

Tabela 1 - Idades e origens das árvores de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake, usadas na produção de clones.

Idade	Árvores	Procedência			
		Região	Local	Latitude	Longitude Altitude (m)
B* 1 ano apro- ximadamente	B01	Timor	Fatsumam	9°43'S	123°53'E 1.250
C** 4 anos apro- ximadamente	C01	Timor	Bessi-Lao	ca. 8°37'S	ca. 125°38'E 1.100-1.250
D*** 13 anos apro- ximadamente	D01 (Eu1)	Timor	Csiro 8238	-	- 914

* Procedência introduzida pela Companhia Florestal Rio Doce S/A e cultivada em Anhembi, SP.

** Procedência introduzida pela Aracruz Florestal S/A e cultivada em Anhembi, SP.

*** Procedência introduzida em Rio Claro, SP, e plantada em 1968 com árvores selecionadas pelo IPEF, propagadas vegetativamente através de enxertia em 1974 e cultivadas no "Campus" da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, junto à represa de coleta de água.

2. Esterilização dos explantes

A esterilização dos explantes deu-se segundo o método direto (GONÇALVES, 1982), observando as seguintes etapas:

- a) coleta de ramos do crescimento anual das copas das árvores no campo;
- b) transporte dos ramos ao laboratório, acomodados em sacos plásticos abertos, com água na base;
- c) no laboratório: desfolhamento dos ramos;
- d) lavagem dos ramos desfolhados com detergente comercial;
- e) remoção dos segmentos nodais;
- f) lavagem dos segmentos nodais em água corrente por 30 minutos;
- g) tratamento dos segmentos nodais com fungicida comercial (Benomyl a 250 g/l) em banho com borbulhamento, por 30 minutos;
- h) tratamento dos segmentos nodais com hipoclorito de sódio 1%, por 30 minutos, em câmara asséptica;
- i) lavagem dos segmentos nodais com água destilada esterilizada por três vezes;
- j) lavagem dos segmentos nodais em ácido clorídrico 0,01N esterilizado, por cinco minutos;
- k) lavagem dos segmentos nodais com água destilada esterilizada por três vezes;
- l) inoculação.

3. Meio de cultura

O meio de cultura empregado foi o de GONÇALVES (1980), com 10 ml por tubo de ensaio 18 x 150 ml, vedado com algodão hidrófilo envolto em gase.

A composição do meio de cultura consta do Apêndice 1.

Após a multiplicação das gemas, as culturas foram transferidas para o meio de enraizamento, destituído de 6-Benzilaminopurina (6 - BAP).

Para o estabelecimento da cultura de gemas, a partir dos explantes nodais, o único regulador de crescimento utilizado foi o 6-Benzilaminopurina, 2 mg por litro. Para o enraizamento de gemas, o único regulador de crescimento utilizado foi o ácido indolbutírico, 0,1 mg por litro.

Foram produzidos 420 tubos para enraizamento, para cada um dos três clones, totalizando 1260 tubos nesta etapa.

4. Condições ambientais de cultura

As culturas foram mantidas no laboratório sob um fotoperíodo de 16/8 horas, com luz complementar de 300 lux, fornecida por 50% de lâmpadas Gro-Lux e 50% de lâmpadas fluorescentes luz do dia. Não houve controle de temperatura.

O período de enraizamento foi de outubro a dezembro de 1983.

5. Avaliações

Aos 2 meses de cultura foi feita a avaliação dos seguintes parâmetros: a) contaminação por fungo e/ou bactéria; b) percentagem de enraizamento e c) produção efetiva de plântulas aptas ao tratamento com colchicina, para cada um dos três clones.

B. INDUÇÃO DE POLIPLOIDIA

Devido à produção de plântulas enraizadas em número insatisfatório a partir dos clones BO₁ e DO₁ foram encaminhadas ao tratamento para indução de poliploidia somente plântulas pertencentes ao clone CO₁.

Em dezembro de 1983, ao atingirem aproximadamente 1,5 a 4 cm de comprimento, as plântulas enraizadas do clone CO₁ foram cuidadosamente retiradas dos tubos de ensaio, removendo-se o meio de cultura com um jato d'água.

Logo em seguida, as plântulas foram completamente imersas em solução aquosa de colchicina a 2%, em recipientes com 200 ml da solução, por períodos de 0, 2, 4, 6, 10, 20 e 30 horas, designados nesta ordem de Tratamento 1 a Tratamento 7. Cada tratamento contou com 20 plântulas, perfazendo um total de 140 plântulas no experimento principal. A distribuição temporal dos períodos de imersão consta da Figura 1.

Figura 1 - Distribuição temporal dos tratamentos dos clones de *E. urophylla* com colchicina para 6 períodos distintos de imersão, e a testemunha.

Para aumentar a eficiência da colchicina foi adicionado 1 ml de Tween-80, na diluição aquosa de 1:100, para cada 200 ml de solução de colchicina.

Nos períodos de imersão mais prolongados (10, 20 e 30 horas - Tratamentos 5, 6 e 7, respectivamente) utilizou-se o borbulhamento de ar constante, com objetivo de prevenir danos às plântulas por depleção de oxigênio.

Logo após o tratamento com colchicina, as plântulas foram lavadas com água corrente por 5 minutos, passando em seguida por um banho de fungicida comercial (Benomyl a 250 g/l), por 20 minutos, e então plantadas em recipientes do tipo "fertil-pot", contendo substrato de carvão e vermiculita misturados na proporção de 1:1. A seguir, as plântulas foram transferidas para a casa de vegetação e mantidas sob nebulização intermitente.

Após duas semanas, efetuou-se a repicagem para recipientes maiores, sacos plásticos contendo sub-solo preparado nas dependências do departamento de Silvicultura, mantendo-se as plantas na casa de vegetação, sob as mesmas condições acima.

C. ACOMPANHAMENTO - AVALIAÇÕES

Durante os primeiros seis meses, as plântulas foram avaliadas quanto à sobrevivência, desenvolvimento, as pecto geral e, no final deste período, quanto à eficiência do tratamento, mediante uma verificação primária, a contagem de estômatos nas folhas.

1. Contagem de estômatos

Em junho/julho de 1984, aos seis meses e meio de idade, todas as plantas sobreviventes do experimento fo ram avaliadas, com exceção das plantas dominadas, com poucos pares de folhas, relacionadas abaixo:

Plantas número 13 e 14, do tratamento 1 (tes temunha); plantas número 26 e 27, do tratamento 2; planta n^u mero 33, do tratamento 3; planta número 46, do tratamento 4 e plantas número 73, 74 e 78, do tratamento 7; somando 48 plantas avaliadas, de um total de 57 plantas sobreviventes.

De cada planta coletaram-se duas folhas a uma altura intermediária. Como esta coleta foi efetuada em um es tágio inicial do desenvolvimento das plântulas, uma amostra gem mais intensa, implicando em maior número de folhas removi das, poderia ser prejudicial.

Imediatamente após a coleta, aplicou-se uma fina camada de esmalte cosmético incolor no limbo inferior das folhas. Após um período de secagem de aproximadamente 1

hora, retirou-se cuidadosamente a película formada, procedendo à montagem das lâminas para o exame microscópico.

A imagem microscópica foi projetada numa tela acoplada ao aparelho; nesta tela, delimitou-se um quadrado correspondente a 1 mm^2 , com vinte e cinco sub-divisões de $0,04 \text{ mm}^2$ cada, para facilitar a contagem dos estômatos.

Para cada folha executaram-se contagens em quatro campos distintos de 1 mm^2 , localizados ao acaso. O número de quatro contagens tinha se mostrado satisfatório no ensaio preliminar, realizado em outubro de 1981.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A. CLONAGEM "IN VITRO"

Foram selecionados para o experimento de indução de poliploidia, os três clones anteriormente descritos, a saber: clones BO₁, CO₁ e DO₁ e multiplicados "in vitro" a partir do enraizamento de culturas de gemas.

Aos dois meses após a transferência das culturas para o meio de enraizamento (único regulador de crescimento: ácido indolbutírico, 0,1 mg/l) efetuou-se a avaliação do rendimento da multiplicação dos três clones, em termos de porcentagem de plântulas aptas ao transplante para recipientes de mudas comuns.

Os critérios empregados nesta avaliação, distintas da avaliação da "capacidade enraizamento", foram os seguintes:

- (a) tamanho da plântula, comprimento mínimo da parte aérea - 1,5 cm, comprimento máximo - em torno de 4 cm;
- (b) relação parte aérea e raízes: plântulas com raízes bem desenvolvidas, de comprimento igual ou maior do que a parte aérea;
- (c) vigor da plântula: plântulas não muito tenras, apresentando-se firmes.

Conforme observado no ensaio preliminar, realizado em maio de 1981, confirmou-se no presente experimento que um caule muito alongado, na fase de cultura "in vitro", está quase sempre associado à extrema tenrura dos tecidos. Ambas as características são desfavoráveis à sobrevivência das plântulas ao transplante: caules alongados geralmente sofrem acamamento e tecidos muito tenros não resistem ao "stress" hídrico gerado na ocasião do transplante, o que resulta em murchamento irreversível e morte das plântulas.

Os resultados de avaliação do rendimento em termos de plântulas aptas ao transplante, em meados de dezembro de 1983, foram de:

- . 4,05% para o clone BO₁,
- . 10,24% para o clone DO₁
- . 41,67% para o clone CO₁

Estes resultados, considerados insatisfatórios para os clones BO₁ e DO₁ podem remontar das irregularidades o-

corridas na ocasião da transferência das culturas para o meio de enraizamento (infiltração de água no laboratório). O clone CO₁, transferido poucos dias antes, não foi atingido. Podem ainda ser resultantes da utilização de outros recipientes, além dos suportes de tubos previstos, para a acomodação de parte dos tubos de ensaio, acarretando a possibilidade de diminuição da luminosidade e provocando o estiolamento observado com frequência entre as plântulas dos clones BO₁ e DO₁, porém não observado nas plântulas do clone CO₁, sujeitas às mesmas condições.

A contaminação das culturas por fungo e/ou bactéria foi de 19,5% para o clone BO₁; 18,5% para o clone DO₁ e 0,6% para o clone CO₁.

As taxas de enraizamento das plântulas foram: 61% para o clone DO₁; 69,5% para o clone BO₁ e de 82,5% para o clone CO₁.

B. INDUÇÃO DE POLIPLOIDIA

1. Sobrevivência

A avaliação da sobrevivência das plântulas do clone CO₁ ao experimento de indução de poliploidia, mediante imersão em solução aquosa de colchicina por diferentes períodos, seguida de transplante para recipientes de mudas comuns

(tratamentos 2 a 7), e das plântulas de controle ((tratamento 1 - somente transplante) realizou-se após o primeiro e quinto mês de idade. Os resultados da avaliação constam do Apêndice 2.

A análise estatística dos dados relativos à sobrevivência das plântulas após o primeiro mês, através do teste χ^2 , revela uma diferença entre os tratamentos a um nível mínimo de significância ligeiramente superior a 0,1. O que se observa é um comportamento semelhante dos tratamentos 1, 2, 3, 4, 5 e 7 (períodos de imersão de 0, 2, 4, 6, 10 e 30 horas, respectivamente) com porcentagens de sobrevivência entre 65 a 85% e uma sobrevivência inferior (45%) das plântulas do tratamento 6 (20 horas de imersão).

Os dados relativos à sobrevivência após cinco meses não diferem estatisticamente.

Analizando o experimento como um todo, observa-se que o tratamento das plântulas por imersão em solução de colchicina por períodos até 30 horas não afetou a sobrevivência das plântulas tratadas, em relação às testemunhas.

Como a produção, tratamento e transplante de todas as plântulas no experimento se deram sob as mesmas condições, a mortalidade maior entre as plântulas do tratamento 6 (20 horas de imersão) em relação às demais, ocorrida durante o primeiro mês após o tratamento e transplante, pode ter sido resultante de uma diferença existente na distribuição temporal do período de imersão deste tratamento, conforme ilustra

a Figura 1. Os tratamentos 1 (testemunha) a 5 foram efetuados no período diurno. Os dois tratamentos com os períodos de imersão mais longos (T_6 - 20 horas e T_7 - 30 horas) enfrentavam um período de escuro.

O tratamento 7 (30 horas de imersão) teve uma proporção de períodos diurno/noturno aproximada de 19/11 horas, distribuídos da seguinte maneira: 10 horas diurnas, 11 horas noturnas e novamente 9 horas diurnas. O tratamento 6 (20 horas de imersão) teve uma proporção de período diurno /noturno de aproximadamente 9/11 horas, distribuídos da seguinte maneira: 4 horas diurnas, 11 horas noturnas e 5 horas diurnas.

Os termos "diurno" e "noturno", neste contexto provavelmente poderão ser traduzidos como "período de luz" e "período de escuro". Assim, a maior mortalidade observada entre as plântulas do tratamento 6 pode estar relacionada com a menor proporção de períodos de luz, bem como com a distribuição talvez desfavorável desta luminosidade ao longo do período de imersão.

A ausência de luz pode ter acentuado o stress por falta de oxigênio na quantidade adequada, apesar da aeração artificial, mantida nos três tratamentos de períodos de imersão mais longo (tratamentos 5, 6 e 7, com 10, 20 e 30 horas de imersão, respectivamente).

2. Caracterização morfológica das plantas tratadas

As plantas do experimento todo apresentam um desenvolvimento satisfatório e um quadro homogêneo, em termos de vigor. Algumas plantas, parcialmente dominadas por suas vizinhas melhor desenvolvidas, recuperaram-se facilmente após a ampliação do espaçamento.

Medidas do crescimento em altura foram tomadas aos 5 e 6 meses e meio de idade. Os resultados das medições constam dos Apêndices 3 e 4. As médias dos tratamentos não diferem estatisticamente.

Em cerca de 80% das plantas tratadas com colchicina (T_2 a T_7), observou-se dominância apical pouco pronunciada ou ausente. Algumas plantas apresentaram crescimento acentuado das gemas laterais e sua forma parece uma roseta.

Freqüentemente, observaram-se folhas de forma anômala nas plantas tratadas (T_2 a T_7). Algumas folhas tinham limbo deformado, com orifícios, distorções e reentrâncias, bordas onduladas ou ponta arredondada. Alguns destes aspectos podem ser visualizados na Figura 2.

As folhas das plantas tratadas com colchicina apresentaram coloração mais escura e maior espessura do que as folhas das plantas da testemunha (T_1) e consistência coriácea.

Figura 2 - Ilustração das modificações morfológicas observadas em folhas de plantas tratadas por imersão em solução de colchicina por períodos de 2 a 30 horas (A), em comparação com folhas de plantas diplóides normais, não tratadas (B).

Estas observações conferem com os dados encontrados na literatura. Deformações no limbo foliar, semelhantes às constatadas em *Eucalyptus urophylla* tratado neste ensaio, foram descritas também em *Castanea mollissima* Bl., por DERMEN e DILLER (1962).

SEKAWIN (1963), em *Populus nigra*, relatou folhas mais espessas, de consistência coriácea, nervuras mais grossas e com as bordas do limbo onduladas, em seu exemplar colchiplóide.

A forma de roseta de plântulas tratadas com colchicina foi observada em diversas espécies latifoliadas (HYUN e KIM, 1963), além da produção de folhas mais espessas por estas plantas artificialmente poliploidizadas.

Por outro lado, não foi observado no presente ensaio, até uma idade de sete meses, o desenvolvimento mais lento e pobre de plantas tratadas com colchicina, nem da parte aérea (DERMEN e DILLER, 1963), nem do sistema radicular (HYUN e KIM, 1963). MERGEN e LESTER (1961) relatam um crescimento muito mais lento das radículas, muito atacadas por microrganismos, em plantas colchiplóides oriundas de sementes germinadas em meio contendo colchicina.

O método de tratamento com colchicina neste ensaio, por meio de imersão de plântulas inteiras na solução, apesar da alta concentração empregada (2%), não afetou negativamente a sobrevivência das plântulas tratadas, nem prejudicou o seu desenvolvimento durante os primeiros sete meses de

idade, ao contrário do que se constatou para outros tipos de tratamento.

As anormalidades encontradas são altamente indicativas de poliploidia.

3. Contagem de estômatos

A contagem do número de estômatos por unidade de área foliar, em máscaras das superfícies inferiores dos limbos das folhas amostradas, foi o parâmetro para uma avaliação primária da existência ou não de poliploidização nas plantas tratadas.

Verificou-se a existência de uma variação do número de estômatos por unidade de área foliar entre e dentro de tratamentos. Os resultados das contagens de estômatos por campo e as respectivas médias de folhas e plantas de cada tratamento encontram-se nos Apêndices 5 a 11.

Observa-se maior uniformidade entre folhas e plantas diplóides da testemunha (Tratamento 1) contra uma apreciável variação do número de estômatos entre folhas e entre plantas dos demais tratamentos, conforme ilustra a Figura 3.

Figura 3 - Representação gráfica da distribuição do número de estômatos por mm² em folhas de plântulas de *Eucalyptus wrophylla* S.T. Blake, produzidas "in vitro" e tratadas por imersão em solução de colchicina por diferentes períodos.

(a) Testemunha (T_1); plantas diplóides;

(b) Tratamentos T_2 a T_7 ; plantas tratadas com colchicina.

A análise de variância dos dados teve um coeficiente de variação de 6,36%. Após a transformação dos dados para $\ln x$ (x = número de estômatos por mm^2) (STEEL e TORRIE, 1980, p.234), o coeficiente de variação da análise caiu para 1,21%. A análise detectou uma diferença significativa ao nível de 1% entre os tratamentos. Da comparação das médias dos tratamentos resultou que: as médias dos tratamentos T_2 a T_7 não diferem entre si, porém diferem da média da testemunha T_1 ao nível de 1% de significância. As médias dos tratamentos encontram-se no Apêndice 12 e na Figura 4.

A confrontação das médias das folhas das plantas diplóides da testemunha com as médias das folhas das plantas tratadas com colchicina permitiu a determinação de intervalos de confiança para a média das folhas diplóides (375,43 estômatos/ mm^2) e para a média das folhas de plantas tratadas (235,25 estômatos/ mm^2) indicando que: (1) houve uma redução do número de estômatos por unidade de área foliar nas folhas de plantas tratadas em relação às testemunhas de, em média, 37,34%. A redução do número de estômatos por unidade de área foliar e o aumento de suas dimensões são muito frequentemente observadas em plantas poliplóides obtidas natural- ou artificialmente (HYUN e KIM, 1963; SEKAWIN, 1963; MEDRI e LLERAS, 1981). São dois parâmetros comumente utilizados para a determinação da existência de poliploidia em plantas tratadas, principalmente em material jovem; os resultados somente são conclusivos para a epiderme. A redução do número de estômatos por unidade de á

Figura 4 - Representação gráfica do número médio de estômatos por mm^2 , em plântulas de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake, produzidas "in vitro" e submetidas a tratamentos por imersão em solução de colchicina por diferentes períodos.

rea foliar e um aumento de suas dimensões, encontrado em folha de plantas tratadas, em comparação a folhas diplóides normais, podem ser visualizados no Apêndice 13; (2) as folhas das plantas tratadas podem ser classificadas em três grupos de acordo com o número de estômatos: a) folhas com número de estô

matos correspondente ao das folhas da testemunha diplóide; b) folhas com número de estômatos intermediário; c) folhas com epiderme poliploidizada.

O grupo a (folhas com epiderme diplóide) abrange 5 folhas, de plantas diferentes, pertencentes aos tratamentos T₂, T₃, T₄ e T₅ (períodos de imersão em solução de colchicina de 2; 4; 6 e 10 horas, respectivamente). O grupo b (folhas com número de estômatos intermediário) abrange 20 folhas das quais 4 do tratamento T₂; 4 do tratamento T₃; 8 do tratamento T₅; 3 do tratamento T₆ e 1 do tratamento T₇. As demais folhas pertencem ao grupo c.

A relação das folhas pertencentes aos grupos a e b consta do Apêndice 14.

Observa-se que de 92 folhas amostradas, 68 (73,91%) apresentam epiderme poliploidizada e apenas 6 plantas (12,5%) em 48 plantas examinadas apresentaram as duas folhas com epiderme diplóide. Este resultado é extremamente favorável, contudo convém fazer as seguintes ressalvas para sua interpretação: (1) a amostragem de folhas foi de pouca intensidade (duas folhas por planta), pelo motivo já apresentado. Uma amostragem mais ampla poderia modificar o quadro de resultados; (2) a redução do número de estômatos por unidade de área foliar, sendo conclusiva somente para a poliploidização da epiderme foliar, isoladamente não permite nenhuma inferência sobre o nível de ploidia dos tecidos internos da folha e da planta inteira.

Assim sendo, os resultados anteriores indicam que a eficiência do método de indução de poliploidia testado é altamente satisfatória em termos do número de plantas comprovadamente atingidas, uma vez que todas as plantas tratadas neste ensaio são virtualmente iguais em relação à constituição genética; e que a indução da poliploidia em *Eucalyptus urophylla* é viável e não apresentou maiores dificuldades nesta etapa inicial.

C. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A partir dos dados apresentados neste trabalho, aliando os resultados da contagem de estômatos em folhas de plantas tratadas e de plantas controle às anormalidades morfológicas observadas em plantas tratadas, pode-se afirmar que o tratamento por imersão em solução de colchicina afetou grande parte das plantas, resultando em uma poliploidização pelo menos parcial.

Sabe-se que ramos oriundos de gemas tratadas geralmente são poliplóides apenas setorialmente, podendo apresentar folhas diplóides normais, folhas com setores poliplóides e folhas inteiramente poliploidizadas. Além disso, é muito comum estes ramos serem quimeras periclinais, isto é, possuem uma epiderme normal, mas são poliplóides nos tecidos internos do caule e das folhas, ou são poliplóides na epiderme

e normais internamente. Existem ainda outros tipos de formas quimerais, extremamente complexas (DERMEN e DILLER, 1962).

A colchicina atua principalmente sobre células em divisão ativa. Para que o tratamento tenha efeito, é necessário que a solução de colchicina atinja os pontos de crescimento na gema.

O crescimento e desenvolvimento de uma folha são comandados por vários meristemas, funcionando simultânea- ou sequencialmente (CUTTER, 1971).

É evidente, a dificuldade de se afetar todos estes meristemas, localizados em diferentes pontos topográficos da gema e funcionando em momentos diferentes, mesmo considerando apenas uma gema isolada. O grau de dificuldade aumenta com o número de gemas presentes, em diferentes estágios, na planta tratada.

Em um ensaio como o presente, espera-se obter algumas partes poliploidizadas nas plantas tratadas, para servir de base para os trabalhos subsequentes de identificação e isolamento. Partindo das explanações acima, supõe-se que os tratamentos por períodos prolongados (tratamentos 5, 6 e 7 - 10, 20 e 30 horas de imersão em solução de colchicina) tenham maior probabilidade de poliploidização em folhas e ramos inteiros. Para dar prosseguimento à obtenção de plantas inteiramente poliplóides, é imprescindível uma avaliação citológica detalhada dos tecidos internos das plantas supostamente poliplóides, segundo os parâmetros primários já verificados, para determi-

nar a extensão da poliploidização.

Visando a obtenção de crescimentos totalmente poliplóides, devem-se isolar as gemas axilares de folhas comprovadamente poliplóides, eliminando-se todos demais crescimentos no ramo examinado (DERMEN e DILLER, 1962). Segundo estes autores, as folhas que aparecem mais tarde em um ramo são oriundas de células laterais do ápice do ponto de crescimento das gemas tratadas. Por conseguinte, a verificação da poliploidização se dá nas folhas que se desenvolveram depois das primeiras folhas basais.

Plantas poliplóides estabilizadas podem ser obtidas através de propagações sucessivas dos crescimentos isolados (MEDRI e LLERAS, 1981).

No material obtido no presente ensaio, após a identificação dos crescimentos mais amplamente poliploidizados, oferecem-se duas linhas de trabalho: a remoção destes crescimentos da planta e sua propagação "in vitro" ou vegetativa tradicional; e, segundo, o corte das plantas, no intuito de forçar a brotação das gemas remanescentes na base da planta. Existe a probabilidade dos crescimentos gerados a partir destas gemas, que sofreram o tratamento com colchicina, serem poliploidizados, parcial- ou inteiramente.

Os dados sobre a iniciação de primórdios e seu desenvolvimento em *Eucalyptus* spp. são muito escassos. Necessita-se uma série de informações básicas para melhor compreensão destes e outros acontecimentos na planta e do efeito

dos tratamentos aos quais são submetidos neste tipo de experimento. As pesquisas básicas são importantes para fornecer o grande volume de informações requisitas para estudos mais dirigidos, em todos os campos, como o de melhoramento e de indução de poliploidia, no caso específico deste trabalho.

A metodologia testada no presente ensaio, isto é, a indução de poliploidia em plântulas produzidas "in vitro", por imersão total em solução de colchicina, apresentou resultados satisfatórios em comparação a outros métodos conhecidos, envolvendo a aplicação de colchicina, e descritos na literatura: a eficiência (o alcance) do tratamento, com base nas avaliações primárias, contagem de estômatos e características morfológicas, tende a ser igual ou superior ao de outros tipos de tratamento. Em termos de sobrevivência e desenvolvimento das plantas tratadas, o método apresenta franca vantagem sobre os demais.

O possível efeito da iluminação durante o período de tratamento merece certa atenção, uma vez que uma relação luz/escuro mais desfavorável parece ser a principal responsável pelo comportamento ligeiramente inferior em sobrevivência e desenvolvimento das plantas do tratamento T_6 (20 horas de imersão), em relação às dos demais tratamentos e especialmente do tratamento T_7 (30 horas de imersão). Sugere-se a utilização de iluminação ininterrupta e adequada durante o período de imersão em solução de colchicina.

A análise dos componentes da variância, do ex-

perimento global (SNEDECOR e COCHRAN, 1973), indicam que a maior fonte de variação do número de estômatos por unidade foliar é a diferença existente entre folhas individuais. Para avaliações futuras, o número de folhas amostradas deve ser aumentado, enquanto o número de campos por folha poderia ser reduzido. No presente caso, com quatro campos por folha, o número de folhas amostradas deveria ser de doze folhas por planta, o que não foi viável devido ao estágio de desenvolvimento das plantas. Uma redução do número de campos por folha não é aconselhável, dada a possibilidade de efeitos setoriais nas folhas, conforme explanado acima.

Com base nos resultados deste ensaio e em comparação a outras espécies (DERMEN e DILLER, 1962), o *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake pode ser considerado uma espécie cuja natureza não oferece maiores dificuldades para a indução de poliploidia. A possibilidade de obtenção de poliplóides estabilizados, como por exemplo em *Hevea* spp., ainda deve ser confirmada.

V. CONCLUSÕES

A análise dos resultados permite as seguintes conclusões:

- A - A indução de poliploidia em *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake é viável.
- B - O tratamento com colchicina, até um período máximo de imersão de 30 horas, não afetou a sobrevivência e o desenvolvimento das plantas tratadas, até a idade de sete meses; não há diferenças entre os períodos de imersão testados, em relação a estes dois parâmetros.
- C - As plantas tratadas apresentaram anormalidades morfológicas, características de plantas poliploidizadas.

- D - Ocorreu uma redução do número de estômatos por unidade de área foliar de, em média, 37,34%, das plantas diplóides não tratadas para as plantas tratadas com colchicina.
- E - Existe a indicação de um efeito da luminosidade durante o período de imersão em solução de colchicina sobre a sobrevivência e o desenvolvimento das plantas.
- F - O método de indução de poliploidia testado apresentou vantagens em relação a outros conhecidos, no que diz respeito à boa sobrevivência e desenvolvimento normal das plantas tratadas. A eficiência do método tende a ser igual ou superior aos demais métodos.
- G - Os resultados encorajam a continuação do trabalho, mediante identificação e isolação de crescimentos poliploidizados e sua subsequente propagação para a futura obtenção de material poliplóide estabilizado de *Eucalyptus urophylla*.

VI. LITERATURA CITADA

ANEJA, S. e C.K. ATAL, 1969. Plantlet formation in tissue culture from lignotubers of *Eucalyptus citriodora* (Hook). Current Science, Bangalore, 38: 69-70.

ARMSTRONG, K.C., 1980. The cytology of tetraploid *Bromus inermis* and C_0 colchicine induced octaploid. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 58(5): 582-87.

BARKER, P.K., FOSSARD, R.A.de e R.A. BOURNE, 1977. Progress towards clonal propagation of *Eucalyptus* species by tissue culture techniques. Internat. Plant Propagators Soc. Combined Proc., 27: 546-56.

BAWA, K.S., 1976. Cytogenetics of tropical forest trees :

progress and prospects. In: IUFRO WORLD CONGRESS, 16, Oslo, June 25, 1976. Proceedings. Oslo, 1976. v.2, p.272-78.

BERLYN, G.P. e R.A. CECICH, 1976. Optical techniques for measuring DNA quantity. In: MIKSCHE, J.P. Modern Methods in Foerst Genetics. New York, Springer-Verlag, p. 1-17.

BONGA, J.M., 1974. Vegetative propagation: tissue and organ culture as an alternative to rooting cuttings. Rotorua, New Zealand Forestry Service. 10p.

BONGA, J.M., 1977. Applications of tissue culture in forestry. In: REINERT, J. e BAJAJ, Y.P.S. Applied and fundamental aspects of plant, cell, tissue and organ culture. New York, Springer-Verlag, p. 93-108.

BORDEAU, P.F. e F. MERGEN, 1959. Photosynthesis and respiration in colchicine-induced polyploid seedlings of slash pine. Journal of Forestry, Washington, 56(3): 191-3.

BUECHERL, W., 1972. Introdução às técnicas microscópicas. 4. ed., São Paulo, Polígono. 123p.

van BUIJTENEN, J.P., 1959. A technique for fixing and staining mitotic chromosomes in aspen. Forest Science, Washington, 5(1): 48.

BURK, L.G.; GWYNN, G.R. e J.F. CHAPLIN, 1972. Diploidized haploids from aseptically cultured anthers of *Nicotiana tabacum*. A colchicine method applicable to plant breeding. J. Hereditary, Washington, 63: 355-60.

BURNHAM, C.R., 1962. Discussions in Cytogenetics. Minnesota, Burgess Publ. Co., p.251-70.

CAMPINHOS, E. e Y.K. IKEMORI, 1977. Tree improvement of *Eucalyptus*: preliminary results. In: WORLD CONSULTATION ON FOREST TREE BREEDING, 3, Canberra, 21-26 march, 1977. Proceedings, Canberra, CSIRO, 1978. V.2, p.717-38.

CHASE, S., 1952. Production of homozygous diploids of maize from monoploids. Agronomy Journal, Madison, 44: 263-67.

CLAUSEN, K.E.; C.F. BEY e F.H. KUNG, 1980. Early growth of white ash diploids and polyploids. In: NORTH CENTRAL TREE IMPROVEMENT CONFERENCE, 1, Madison, Aug. 21-23, 1979. Proceedings. p.86-90.

CRESSWELL, R.J. e R.A. de FOSSARD, 1974. Organ culture of *Eucalyptus grandis*. Australian Forestry, Melbourne, 38: 55-69.

CUTTER, E.G., 1971. Plant Anatomy: Experiment and Interpretation Part 2: Organs. Reading Adison.- Werley Publish. Comp., 343p.

- DELWAULLE, J.C.; LAPLACE, Y. e G. QUILLET, 1980. Production massive de boutures d'*Eucalyptus* en Republique Populaire du Congo. In: SYMPOSIUM AND WORKSHOP ON GENETIC IMPROVEMENT AND PRODUCTIVITY OF FAST-GROWING TREE SPECIES. Águas de São Pedro, 25-30 Aug., 1980. 9p.
- DERMEN, H. e J.D. DILLER, 1962. Colchiploidy of Chestnuts. Forest Science, Washington, 8(1): 43-50.
- DURAND-CRESSWELL, R. e C. NITSCH, 1977. Factors influencing the regeneration of *Eucalyptus grandis* by organ culture. Acta Hortic., 78: 149-55.
- DURZAN, D.J. e R.A. CAMPBELL, 1974. Prospects for the mass production of improved stock of forest trees by cell and tissue culture. Canad. J. For. Res., Ottawa, 4: 151-74.
- EINSPAHR, D.W., 1965. Colchicine treatment of newly formed embryos of quaking aspen. Forest Science, Washington, 11(4): 456-9.
- FLOH, E.I.S., 1983. Cultura de tecidos de medula caular de plantas de *Nicotiana tabacum* L. cv. Wisconsin 38 de diferentes níveis de ploidia: aspectos fisiológicos, bioquímicos, genéticos e cito-histológicos. São Paulo, Instituto de Biociências/USP, 183p. [Tese de Doutorado].
- FOSSARD, R.A. de, 1974. Tissue of eucalypts. Australian Forestry, Melbourne, 37(1): 43-54.
- FOSSARD, R.A. de, 1978. Tissue culture propagation of *Eucalyptus ficifolia* F. Mu11. In: SYMPOSIUM ON PLANT TISSUE

CULTURE. Proceedings. Peking, Science Press, p. 425-38.

FOSSARD; R.A.de; C. NITSCH ; P.J. CRESSWELL e E.M.C.LEE,1974.
Tissue and organ culture of *Eucalyptus*. New Zealand Journ.
of For. Sci., Rotorua, 4(2): 267-78.

FUNABIKI, K., 1976. Migration and polyploidization of angiosperms. In: IUFRO WORLD CONGRESS, 16, Oslo, June 25. Proceedings. Oslo, 1976. v.2, p. 279-83.

GONÇALVES, A.N., 1975. Growth and development physiology of *Eucalyptus* in cell and tissue culture systems. Columbus. The Ohio State University. 210p. (Tese-Mestrado-OSU).

GONÇALVES, A.N., 1980. Reversion to juvenility and cloning of *Eucalyptus urophylla* S.T.Blake in cell and tissue culture systems. In: SIMPOSIO IUFRO EM MELHORAMENTO GENÉTICO E PRODUTIVIDADE DE ESPÉCIES FLORESTAIS DE RÁPIDO CRESCIMENTO. Águas de São Pedro, 25-30 Agosto, 1980.

GONÇALVES, A.N., 1982. Reversão à juvenilidade e clonagem de *Eucalyptus urophylla* S.T.Blake "in vitro". Piracicaba, ESALQ/USP. 97p. (Tese-Doutorado-ESALQ).

GONÇALVES, A.N.; M.A.MACHADO; L.S. CALDAS; W.R. SHARP e H.A. MELLO, 1977. Tissue culture of *Eucalyptus*. In: SHARP,

- W.R.; P.O. LARSEN; E.F. PADDOCK e V. RAGHAVAN. Plant cell and tissue culture: principles and applications. Columbus, The Ohio State University Press. p. 509-26.
- GRANT, V., 1963. The origin of adaptations. New York, Columbia University Press. 383p.
- GUPTA, P.K.; A.F. MASCARENHAS e J. JAGANNATHAN, 1981. Tissue culture of forest trees - clonal propagation of mature trees of *Eucalyptus citriodora* Hook by tissue culture. Plant Science Letters, Amsterdam, 20: 195-201.
- GUSTAFSSON, Å., 1962. Polyploidy and mutagenesis in forest tree breeding. In: WORLD FORESTRY CONGRESS, 5, 1960. Proceedings. Seattle, 1962. p. 793-805.
- GUSTAFSSON, Å., 1968. Reproduction mode and crop improvement. Theoretical and Applied Genetics, Berlin, 38: 109-117.
- HARTNEY, V.J., 1980. Vegetative propagation of the eucalypts. Aust. For. Res., Ottawa, 10: 191-211.
- HERVÁS, J.P. e GIMENEZ-MARTIN, G., 1973. Dimethylsulfoxide effect on division cells. Experientia, Basel, 29(12) : 1540-42.

- HODGES, C.S. e M.S. REIS, 1976. A canker disease of *Eucalyptus* in Brazil caused by *Diaporthe cubensis* Bruner. Brasília, PRODEPEF. 6p. (Field Document, 14).
- HYUN, S.K., 1954. Induction of polyploidy in pines by means of colchicine treatment. Silvae Genetica, Frankfurt, 3(2): 25-33.
- HYUN, S.K. e C.S. KIM, 1963. Some characteristics of autotetraploids of tree species induced by colchicine treatment. In: WORLD CONSULTATION ON FOREST GENETICS AND TREE IMPROVEMENT, 1, Stockholm, Aug. 1963. Proceedings, FAO, 1963. v.1, p. 1/3.
- ILLIES, Z.M., 1976. Experiences in doubling and reducing chromosome numbers in woody species for further breeding programmes. In: IUFRO WORLD CONGRESS, 16, Oslo, June 25, 1976. Proceedings, Oslo 1976. p.268-71.
- JENSEN, C.J., 1974. Chromosome doubling techniques in haploids. Haploids in Higher plants: advances and potentials. Guelph, p. 153-92.
- JOHANSEN, D.A., 1940. Plant Microtechnique. New York, MacGraw-Hill, p. 95-7.

- JOHNSSON, H., 1953. Development of triploid and diploid *Populus tremula* during the juvenile period. Zeitschrift für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung, Frankfurt, 2(4) : 73-7.
- JOHNSSON, H., 1975. Observation on induced polyploidy in some conifers. Silvae Genetica, Frankfurt, 24(2-3): 26-8.
- KAPOOR, M.L. e S. KEDHARNATH, 1977. Induced tetraploidy in sandalwood and Eucalyptus. Dehra Dun, For. Gen Branch, FRI e Colleges, p. 408-12.
- KITAHARA, E.H. e L.S. CALDAS, 1975. Shoot and root formation in hypocotyl callus cultures of *Eucalyptus*. Forest Science, Washington, 22(3): 242-3.
- KONOVALOV, N.A. e N.P. PITCHUGINA, 1976. Cytological peculiarities of interspecific birch hybrids. In: IUFRO WORLD CONGRESS, 16, Oslo, June 25, 1976. Proceedings, Oslo, 1976. v.2, p. 298-301.
- LEE, E.C.M. e R.A. de FOSSARD, 1974. The effects of various auxins and cytokinins on the "in vitro" culture of stem and lignotuber tissues of *Eucalyptus bancroftii* Maiden. New Physiologist, Oxford 73(4): 707-717.
- LLERAS, E. e M.E. MEDRI, 1978. Comparação anatômica entre

folhas diplóides e poliplóides do híbrido *Hevea brasiliensis* x *benthiana*. Acta Amazonica, Manaus, 8(4): 565-75.

MARTIN, B. e C. COSSALTER, 1975. Les Eucalyptus des Iles de la Sonde. Bois et Forêts des Tropiques, Nogent-sur-Marne, 163: 3-25.

MEDRI, M.E. e E. LLERAS, 1981. Comparação anatômica entre folhas de um clone diplóide (IAN 873) e dois clones poliplóides (IAC 207, 222) de *Hevea brasiliensis* Mull. Arg.. Acta Amazonica, Manaus, 11(1): 35-47.

MERGEN, F., 1959. Colchicine-induced polyploidy in *Pinus*. Journal of Forestry, Washington, 56(3): 180-90.

MERGEN, F. e D.T. LESTER, 1971. Colchicine induced polyploidy in *Abies*. Forest Science, Washington, 7(4): 314-19.

MORA, A.L. e M. FERREIRA, 1980. Estudo do florescimento em *Eucalyptus urophylla*. Silvicultura, São Paulo, 14: 50-3.

MORRISON, J.W. e T. RAJHATHY, 1960. Frequency of quadrivalents in autotetraploid plants. Nature, Paris, 187: 528-30.

- MÜNTZING, A., 1936. The chromossomes of a giant *Populus tremula*. Hereditas, Lund, 21: 383-93.
- NEUBAUER, J. e H.L. THOMAS, 1966. Effect of various colchicine pH levels of seed treatment on polyploid cells and other cytological variations in root tips of red clover. Crop Science, Madison, 6: 209-10.
- NILSSON-EHLE, H., 1936. Über eine in der Natur gefundene i gasform von *Populus tremula*. Hereditas, Lund, 21: 379-82.
- PORTILLO, R.B., 1980. Variação numérica de cromossomos em milho autotetraplóide (*Zea mays* L.). Piracicaba, ESALQ/USP. 88p. (Tese-Mestrado-ESALQ) .
- QUIJADA, M.R., 1980. Métodos de propagación vegetativa. In: FAO, Mejora Genetica de Arboles Forestales, Roma. p.189-96.
- RANDOLPH, L.F., 1932. Some effects of high temperature on polyploidy and other variations in maize. Proc. Nat. Acad. Sci., Washington, 18: 222-29.
- RUGGERI, C., 1960. Il numero cromossomico di *Eucalyptus flocktoniae* Maiden (Myrtaceae). Publicazioni del Centro di Sperimentazione Agricola e Forestale, Roma, 4: 121-6.

- RUGGERI, C., 1961. Primo Contributo alla Conoscenza cario-
logica del Genere *Eucalyptus* (Myrtaceae). Publicazione
del Centro di Sperimentazione Agricola e Forestale, Roma,
4: 213-6.
- SAUTER, J.J. e H. ULRICH, 1977. Cytophotometric Investi-
gation of DNA and RNA Content in Nuclei of Active Strassbur-
ger Cells in *Pinus nigra* var. *austriaca* (Hoess.) Badoux.,
Planta, Berlin, 137: 5-11.
- SCHAEFER, V.G. e J.P. MIKSCH, 1977. Microphotogrammetric de-
termination of DNA per cell and polyploidy in *Fraxinus a-*
mericana L.. Silvae Genetica, Frankfurt, 25(5/6): 184-92.
- SEIBOLD, H.W. e L. ZELLES, 1977. Microspectrophotometric de-
termination of the relative contents of nucleic acids in
Pinus sylvestris pollen. Planta, Berlin, 137: 45-8.
- SEKAWIN, M., 1963. Study of an artificially obtained poplar
tetraploid and its progeny. In: WORLD CONSULTATION ON FO-
REST GENETICS AND TREE IMPROVEMENT, 1, Stockholm, Aug.1963.
Proceedings, FAO. v.1, p. 1/4.
- SNEDECOR, G.W. e W.G. COCHRAN, 1973. Statistical Methods.
6.ed., Ames, The Iowa State University Press. 593p.

STAROVA, N.V. e S.P. KOTS, 1976. Using of distant hybridization and polyploidy in the selection of wood species. In: IUFRO WORLD CONGRESS, 16, Oslo, June 25, 1975. Proceedings, Oslo. v.2, p. 246-57.

STEBBINS, G.L., 1949. Types of polyploids: their classification and significance. Advances in Genetics, New York, 1: 403-30.

STEBBINS, G.L., 1971. Chromosomal Evolution in Higher Plants. Menlo Park, Addison-Wesley. 216p.

STEEL, R.G.D. e J.H. TORRIE, 1980. Principles and Procedures of Statistics. A biometrical approach. 2.ed., Tokyo, McGraw-Hill-Kogakusha Ltd.. 633 p.

SYBENGA, J., 1972. General Cytogenetics. Amsterdam, North-Holland, cap. 1. 359p.

TOMAZELLO FILHO, M., 1976. Estudos sobre o cancro causado por *Diaporthe cubensis* Bruner: etiologia e resistência em *Eucalyptus* spp. Piracicaba, ESALQ/USP. 106p. (Tese - Mestrado - ESALQ) ..

VIEIRA, F.S., 1980. Procedências de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake. Silvicultura, São Paulo, 8(31): 512-5.

WINTON, L.L., 1968. Plantlets from aspen tissue cultures. Science, Lancaster, 160: 1234-5.

WINTON, L.L., 1970. Shoot and tree production from aspen tis-
sue cultures. American Journal of Botany, New York, 57(8):
904-9.

WINTON, L.L., 1971. Tissue culture propagation of european
aspen. Forest Science, Washington, 17(3): 348-50.

WINTON, L.L., 1972. Bibliography of somatic callus cultures
from deciduous trees. Genetics and Physiology Notes, App
leton, 18: 1-19

WOBUS, U., 1981. Isolierung, Fraktionierung und Hybridisie-
rung von Nukleinsäuren: Eine Einführung und Methodi-
sche Anleitung. Weinheim, Verlag Chemie. 229p.

WRIGHT, J.W., 1976. Introduction to Forest Genetics. New Y-
ork, Acad. Press, p. 400-19.

7. APÊNDICES

Apêndice 1 - Composição do Meio de Cultura.

Meio de Cultura

Soluções estoque	mg/l
1. KNO_3	1.000
2. KH_2PO_4	170
3. $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	236
4. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250
5. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8
Na_2EDTA	37,3
6. H_3BO_3	6,2
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,7
MoO_3	0,144
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,0
KI	0,75
Meso Inositol	100 mg/l
Tiamina	5 mg/l
Piridoxina	0,5 mg/l
Ácido Nicotínico	0,5 mg/l
Pantotenato de Cálcio	1 mg/l
Sacarose	30 g/l
Agar	8 g/l

Gema

6-BAP ..... 2 mg/l

Raiz

AIB ..... 0,1 mg/l

Apêndice 2 - Porcentagem de sobrevivência de plântulas de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake, nas idades de 1 mês e 6 meses, após terem sido submetidas à imersão em solução aquosa de colchicina por diferentes períodos.

Tratamento nº	Período de imersão (horas)	Idade	
		1 mês	6 meses
		% sobrevivência	
1	0	75	45
2	2	85	45
3	4	65	45
4	6	75	35
5	10	70	40
6	20	45	30
7	30	75	45
Média		70	40,71

Número inicial de plântulas por tratamento: 20

Apêndice 3 - Altura (H) em cm, aos 5 meses de idade, de plântulas de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake, produzidas "in vitro" e tratadas por imersão em solução de colchicina, por diferentes períodos.

T/P*	H(cm)	T/P	H(cm)	T/P	H(cm)	T/P	H(cm)	T/P	H(cm)	T/P	H(cm)	T/P	H(cm)	T/P	H(cm)
1 1	17,5	2 1	9,0	3 1	16,0	4 1	12,0	5 1	19,5	6 1	6,0	7 1	16,0		
1 2	14,0	2 2	6,7	3 2	10,7	4 2	11,5	5 2	19,5	6 2	8,7	7 2	22,0		
1 3	11,5	2 3	9,7	3 3	4,5	4 3	9,5	5 3	13,0	6 3	12,5	7 3	2,5		
1 4	7,0	2 4	11,0	3 4	15,5	4 4	13,0	5 4	9,5	6 4	15,5	7 4	7,0		
1 5	19,0	2 5	13,5	3 5	11,5	4 5	13,5	5 5	17,0	6 5	7,5	7 5	13,0		
1 6	12,0	2 6	3,5	3 6	13,0	4 6	5,0	5 6	8,3	6 6	12,5	7 6	26,5		
1 7	11,5	2 7	6,5	3 7	19,5	4 7	14,5	5 7	12,5			7 7	12,0		
1 8	9,5	2 8	6,5	3 8	20,5			5 8	16,0			7 8	6,0		
1 9	6,5	2 9	22,0	3 9	13,4							7 9	17,0		
Média	12,05	Média	9,82	Média	14,3	Média	11,29	Média	14,41	Média	10,45	Média	13,55		

* Código: T - número de identificação do tratamento;

P - número de identificação da planta;

sendo: T₁ = 0 horas de imersão; T₂ = 2 horas de imersão; T₃ = 4 horas de imersão;

T₄ = 6 horas de imersão; T₅ = 10 horas de imersão; T₆ = 20 horas de imersão;

T₇ = 30 horas de imersão.

Apêndice 4 - Altura (H) em cm, aos 6 meses e meio de idade, das plântulas de *Eucalyptus wrophylla* S.T. Blake, produzidas "in vitro" e tratadas por imersão em solução do colchicina, por diferentes períodos.

T/P*	H(cm)	T/P	H(cm)	T/P	H(cm)	T/P	H(cm)	T/P	H(cm)	T/P	H(cm)	T/P	H(cm)	T/P	H(cm)
1 1	22,0	2 1	25,0	3 1	53,0	4 1	20,0	5 1	24,0	6 1	17,0	7 1	23,0		
1 2	25,0	2 2	25,5	3 2	22,0	4 2	21,0	5 2	27,5	6 2	17,5	7 2	25,6		
1 3	18,5	2 3	22,5	3 3	16,5	4 3	21,0	5 3	20,0	6 3	28,0	7 3	10,0		
1 4	15,0	2 4	28,5	3 4	25,0	4 4	18,0	5 4	20,5	6 4	27,5	7 4	17,0		
1 5	25,0	2 5	28,0	3 5	27,0	4 5	23,0	5 5	23,0	6 5	18,0	7 5	25,8		
1 6	22,0	2 6	8,0	3 6	21,0	4 6	8,0	5 6	18,5	6 6	15,0	7 6	32,0		
1 7	20,0	2 7	13,0	3 7	25,5	4 7	22,0	5 7	22,0			7 7	30,0		
1 8	19,0	2 8	13,0	3 8	24,0			5 8	25,0			7 8	22,0		
1 9	15,0	2 9	35,0	3 9	21,0							7 9	24,5		
Média	20,17	Média	22,05	Média	23,89	Média	19,00	Média	22,56	Média	20,5	Média	23,25		

* Código: T - número de identificação do tratamento;

P - número de identificação da planta;

sendo: T₁ = 0 horas de imersão; T₂ = 2 horas de imersão; T₃ = 4 horas de imersão;

T₄ = 6 horas de imersão; T₅ = 10 horas de imersão; T₆ = 20 horas de imersão;

T₇ = 30 horas de imersão.

Apêndice 5 - Resultados da contagem de estômatos em quatro campos de 1 mm² por folha, em duas folhas por planta de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake, produzidas "in vitro", aos seis meses de idade (Tratamento T₁ - testemunha).

Identi- ficação	Estômatos/mm²						Média da folha	Média da planta
	Campos							
T / P / F*	1	2	3	4				
1 1 1	449	397	396	393	408,75		395,87	
1 1 2	363	391	392	385	383,00			
1 2 1	382	385	375	380	380,50		369,13	
1 2 2	351	352	369	359	357,75			
1 3 1	348	356	338	367	352,25		358,00	
1 3 2	377	354	374	350	363,75			
1 6 1	348	365	374	359	361,50		374,00	
1 6 2	382	380	396	388	386,50			
1 7 1	350	338	384	365	359,25		361,75	
1 7 2	368	359	367	363	364,25			
1 8 1	382	348	369	380	369,75		376,00	
1 8 2	380	380	391	378	382,25			
1 9 1	388	366	392	397	385,75		393,25	
1 9 2	418	416	378	391	400,75			

* Código: T = nº do tratamento;

P = nº da planta;

F = nº da folha.

Média geral do tratamento T₁: 375,43 estômatos/mm².

Apêndice 6 - Resultados da contagem de estômatos em quatro campos de 1 mm² de folha, em duas folhas por planta de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake, produzidas "in vitro" e submetidas a tratamento de imersão em solução de colchicina por 2 horas (Tratamento T₂), aos seis meses e meio de idade.

Nº de Identificação	Estômatos/mm²				Média da folha	Média da planta
	Campos					
	1	2	3	4		
T / P / F*						
2 1 1	263	279	283	285	277,50	234,75
2 1 2	212	193	173	187	191,25	
2 2 1	243	245	237	247	243,00	238,13
2 2 2	246	232	240	215	233,25	
2 3 1	291	252	229	256	257,00	238,00
2 3 2	216	234	211	215	219,00	
2 4 1	204	206	229	198	209,25	216,25
2 4 2	228	234	210	221	223,25	
2 5 1	343	317	356	358	343,50	328,87
2 5 2	295	270	338	344	311,75	
2 8 1	257	235	221	231	236,00	209,63
2 8 2	206	186	174	167	183,25	
2 9 1	335	294	277	311	304,25	273,37
2 9 2	244	224	263	239	242,50	

* Código: T = nº do tratamento;

P = nº da planta;

F = nº da folha.

Média geral do tratamento T₂: 248,20 estômatos/mm².

Apêndice 7 - Resultados da contagem de estômatos em quatro campos de 1 mm² por folha, em duas folhas por planta de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake, produzidas "in vitro" e submetidas a tratamento de imersão em solução de colchicina por 4 horas (Tratamento T₃), aos seis meses e meio de idade.

Nº de Identificação	Estômatos/mm²				Média da folha	Média da planta
	Campos					
T / P / F*	1	2	3	4		
3 1 1	193	204	200	205	200,50	203,25
3 1 2	207	198	199	220	206,00	
3 2 1	237	234	187	172	207,50	210,13
3 2 2	184	220	199	248	212,75	
3 4 1	245	247	257	241	247,50	252,25
3 4 2	247	270	256	255	257,00	
3 5 1	231	225	242	212	227,50	222,00
3 5 2	209	214	231	212	216,50	
3 6 1	296	294	306	293	297,25	327,13
3 6 2	331	348	363	386	357,00	
3 7 1	207	206	239	224	219,00	216,75
3 7 2	213	212	217	216	214,50	
3 8 1	268	263	260	234	256,25	233,25
3 8 2	218	213	210	200	210,25	
3 9 1	199	251	278	236	241,00	240,37
3 9 2	249	236	226	248	239,75	

* Código: T = nº do tratamento;

P = nº da planta;

F = nº da folha.

Média geral do tratamento T₃: 238,14 estômatos/mm².

Apêndice 8 - Resultados da contagem de estômatos em quatro campos de 1 mm² por folha, em duas folhas por planta de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake, produzidas "in vitro" e submetidas a tratamento de imersão em solução de colchicina por 6 horas (Tratamento T₄), aos seis meses e meio de idade.

Nº de Identificação	Estômatos/mm²				Média da folha	Média da planta
	Campos					
T / P / F*	1	2	3	4		
4 1 1	228	226	225	209	222,00	314,13
4 1 2	414	381	438	392	406,25	
4 2 1	220	231	278	219	237,00	306,75
4 2 2	359	380	394	373	376,50	
4 3 1	240	230	218	227	228,75	214,00
4 3 2	202	185	206	204	199,25	
4 4 1	229	220	201	210	215,00	223,25
4 4 2	242	205	234	245	231,50	
4 5 1	228	252	233	250	240,75	213,25
4 5 2	183	165	187	208	185,75	
4 7 1	219	209	243	226	224,25	230,13
4 7 2	234	225	245	240	236,00	

* Código: T = nº do tratamento;

P = nº da planta;

F = nº da folha,

Média geral do tratamento T₄: 250,25 estômatos/mm².

Apêndice 9 - Resultados da contagem de estômatos em quatro campos de 1 mm² por folha, em duas folhas por planta de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake, produzidas "in vitro" e submetidas a tratamento de imersão em solução de colchicina por 10 horas (Tratamento T₅), aos seis meses e meio de idade.

Nº de Identificação	Estômatos/mm²					
	Campos				Média da folha	Média da planta
	1	2	3	4		
T / P / F*						
5 1 1	198	174	199	243	203,50	227,29
5 1 2	252	276	250	226	251,00	
5 2 1	221	266	247	246	245,00	263,25
5 2 2	262	269	300	295	281,50	
5 3 1	262	230	251	252	248,75	247,37
5 3 2	257	240	237	250	246,00	
5 4 1	182	180	191	188	185,25	186,00
5 4 2	186	198	174	189	186,75	
5 5 1	301	272	252	261	271,50	268,63
5 5 2	300	296	243	224	265,75	
5 6 1	225	231	176	212	211,00	207,50
5 6 2	209	206	200	201	204,00	
5 7 1	213	220	222	241	224,00	226,37
5 7 2	244	209	228	234	228,75	
5 8 1	312	356	356	337	340,25	277,75
5 8 2	216	215	217	213	215,25	

* Código: T = nº do tratamento;

P = nº da planta;

F = nº da folha,

Média geral do tratamento T₅: 238,01 estômatos/mm².

Apêndice 10- Resultados da contagem de estômatos em quatro campos de 1 mm² por folha, em duas folhas por planta de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake, produzidas "in vitro" e submetidas a tratamento de imersão em solução de colchicina por 20 horas (Tratamento T₆) , aos seis meses e meio de idade.

Nº de Identificação	Estômatos/mm²					
	Campos				Média da folha	Média da planta
	1	2	3	4		
T / P / F*						
6 1 1	214	231	249	210	226,00	229,13
6 1 2	227	237	235	230	232,25	
6 2 1	206	238	243	223	227,50	251,25
6 2 2	261	291	277	271	275,00	
6 3 1	215	201	214	214	211,00	239,37
6 3 2	277	271	257	266	267,75	
6 4 1	246	189	212	232	219,75	263,75
6 4 2	315	289	305	322	307,75	
6 5 1	199	208	182	229	204,50	203,50
6 5 2	204	186	188	232	202,50	
6 6 1	228	250	224	239	235,25	234,13
6 6 2	214	244	250	224	233,00	

*Código: T = nº do tratamento;

P = nº da planta;

F = nº da folha.

Média geral do tratamento T₆: 236,85 estômatos/mm².

Apêndice 11 - Resultados da contagem de estômatos em quatro campos de 1 mm² por folha, em duas folhas por planta de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake, produzidas "in vitro" e submetidas a tratamento de imersão em solução de colchicina por 30 horas (Tratamento 7), aos seis meses e meio de idade.

Nº Identi- ficação	Estômatos/mm²				Média da folha	Média da planta
	Campos					
	1	2	3	4		
T / P / F*						
7 1 1	224	196	193	214	206,75	202,75
7 1 2	194	222	204	175	198,75	
7 2 1	230	228	225	218	225,25	227,00
7 2 2	254	208	233	220	228,75	
7 5 1	181	160	165	190	174,00	184,50
7 5 2	182	188	213	197	195,00	
7 6 1	271	273	254	277	268,75	242,75
7 6 2	219	216	215	217	216,75	
7 7 1	238	222	232	258	237,50	235,25
7 7 2	250	232	218	232	233,00	
7 9 1	233	258	216	224	232,75	234,75
7 9 2	240	235	238	234	236,75	

* Código: T = nº do tratamento;

P = nº da planta;

F = nº da folha.

Média geral do tratamento T₇: 221,17 estômatos/mm².

Apêndice 12 - Número médio de estômatos por unidade de área foliar em plantas de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake, produzidas "in vitro" e submetidas a tratamento de imersão em solução de colchicina por diferentes períodos.

Tratamento nº	Período de imersão (horas)	Número médio de estômatos/mm ²
1*	0*	375,43*
2	2	248,20
3	4	238,14
4	6	250,25
5	10	238,01
6	20	236,85
7	30	221,17

Apêndice 13 - Redução do número de estômatos por unidade de área foliar e aumento das dimensões nas folhas de plantas tratadas, observadas em máscaras obtidas da superfície inferior dos limbos de folhas diplóides normais (a-1 e a-2) e folhas de plantas tratadas, poliploidizadas (b-1 e b-2).

(a-1)

(b-1)

0,1 mm

(a-2)

(b-2)

0,1 mm

Apêndice 14 - Descrição das plantas de *Eucalyptus wrophylla* S.T. Blake tratadas, classificadas nos grupos a) número de estômatos correspondente ao número encontrado em folhas diplóides normais, e b) número de estômatos intermediário entre "diplóide" e "poliplóide", relacionadas segundo os períodos de imersão em solução de colchicina e apresentando o número médio de estômatos por unidade de área foliar encontrado.

PERÍODOS DE IMERSÃO (HORAS)													
		2		4		6		10		20		30	
T/P/F	Nº médio estômatos/ /mm²	T/P/F	Nº médio estômatos/ /mm²	T/P/F	Nº médio estômatos/ /mm²	T/P/F	Nº médio estômatos/ /mm²	T/P/F	Nº médio estômatos/ /mm²	T/P/F	Nº médio estômatos/ /mm²	T/P/F	Nº médio estômatos/ /mm²
GRUPO a													
251	343,50	362	357,00	412	406,25	581	340,25						
				422	376,50								
211	277,50	341	247,50			512	251,00	622	275,00	761	268,75		
231	257,00	342	257,00			521	245,00	632	267,75				
252	311,75	361	297,25			522	281,50	642	307,75				
291	304,25	381	256,25			531	248,75						
						532	246,00						
						551	271,50						
						552	265,75						
GRUPO b													

Código: T - nº de identificação do tratamento;

P - nº de identificação da planta;

F - nº de identificação da folha.