Universidade Superior de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Poliploidização induzida *in vitro*, como estratégia biotecnológica para a otimização
da cultura de eucalipto

Rafaella Zanetti Dias

Dissertação apresentada para obtenção de título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e
Bioquímica de Plantas

Piracicaba
2016

Rafaella Zanetti Dias
Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas

Poliploidização induzida *in vitro*, como estratégia biotecnológica para a otimização da cultura de eucalipto

Orientador:
Prof. Dr. **MARCÍLIO DE ALMEIDA**

Dissertação apresentada para obtenção de título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e
Bioquímica de Plantas

Piracicaba
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Dias, Rafaella Zanetti

Poliploidização induzida *in vitro*, como estratégia biotecnológica para otimização da cultura de eucalipto/ Rafaella Zanetti Dias. - - Piracicaba, 2016.

65 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Poliploidia 2. Mixoploides 3. Colchicina 4. Micropropagação I. Título

*Aos meus pais, Márcia e Marcílio,
e ao meu noivo, Cristiano*

Dedico

*À querida Família Morfogênese
E aos amigos da Gloriosa*

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Ao professor Marcílio de Almeida, sou grata pela orientação e a oportunidade de estar no laboratório, o qual me proporcionou tanto crescimento e aprendizagem! Obrigada pela confiança depositada, pelos conselhos, paciência e compreensão em todos os momentos!

À Dra. Cristina Vieira de Almeida, obrigada pela sua amizade, confiança, carinho, conselhos, pelas correções e por todo conhecimento compartilhado, que foi muito além do científico!

À Dra. Katherine Piotto e ao Dr. Fernando Piotto, meus pais científicos, muito obrigada pela paciência e auxílio nas análises anatômicas e estatísticas e também pelos conselhos, amizade e carinho!

Ao Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF), pelo apoio técnico, científico e financeiro ao longo do projeto e em especial ao Dr. Paulo Henrique Müller da Silva, pelas contribuições feitas para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Rodrigo Rocha Latado, obrigada pela cooperação nas análises de citometria de fluxo no laboratório de Biotecnologia do Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Citros “Sylvio Moreira” (IAC), pelos conhecimentos compartilhados e contribuições.

Ao professor Dr. Antônio Natal Gonçalves pela disponibilização do espaço de seu laboratório (Fisiologia das Árvores/LCF) e ao técnico José Roberto Romanini (Beto) pela ajuda durante os experimentos.

Às técnicas do Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas, Aline Borges e Eveline Meneghetti, por toda ajuda prestada ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/USP, ao PPG em Fisiologia e Bioquímica de Plantas pela oportunidade concedida e os professores do programa pela contribuição para a minha formação.

À Solizete, secretária do PPG em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, pela gentileza e prontidão com que sempre me atendeu.

À *InVitroPalm* Consultoria, Estudo e Desenvolvimento Biológico por todo auxílio prestado.

À Capes e ao CNPq pela bolsa de mestrado concedida.

À querida Família Morfogênese, a começar pelos patriarcas, meus avós adotivos (e científicos) Cris e Marcílio, pelo carinho paternal, pela compreensão e pela sensibilidade de estarem ao meu lado em momentos tão delicados! À Gabi, Eveline, Aline, Érika, Matheus, Rodrigo, Gabriel, Dreyphus, Eloísa e Gabrielle pela ajuda dária e em diferentes etapas deste trabalho, pela convivência maravilhosa de todos os dias, pela amizade, pelas refeições compartilhadas, conselhos, conversas sobre todos os assuntos, risadas...enfim, pelos momentos que não (não, vão não!) ser esquecidos! Amo vocês, ‘caras’! E também, aos que passaram pelo laboratório: Livia, Chico, Kathy, Renan, Leandro, Germana, Fabi, Naná, Marília, Raquel, com quem pude aprender muito e que mesmo distantes continuam deixando um pouco de si!

Às minhas irmãs do coração, Arena e Nathy por todos os anos de convivência, compartilhando experiências e momentos que me ensinaram como é não ser filha única!

Às amigas irmãs Gabi, Livia (Liloca), Carol e Eveline pela amizade e por compartilhar os momentos difíceis e de diversão! E também às novas amigas que conquistei, em especial à Ágatha, Antônio e Livia (Bicudo).

Aos amigos da VIII turma da Biologia de ESALQ, em especial ao Precoce, Virgulinha, Bife, Bobs, Kumpady que estiveram presente nesses anos de pós-graduação.

Aos amigos de Rio Claro, Fer, Will, Xandy, Mateus e Léo pela amizade, desabafos e refúgio aos finais de semana!

Aos meus pais, Márcia e Marcílio, pelo amor incondicional, por me proporcionarem o estudo, o sustento, pelo apoio em minhas decisões e por estarem presentes e firmes nos momentos difíceis. Sem vocês nada disso seria possível! Amo vocês!

Ao meu noivo, que apesar da distância, sempre foi muito mais do que presente em momentos importantes da minha vida! Pelo companheirismo, por me ajudar a me descobrir a cada dia mais, por me apoiar e incentivar a cada passo. Te amo!

E por último, porém não menos importante, a Deus, que colocou em meu caminho pessoas tão maravilhosas que me deram forças para concluir este trabalho e me proporcionaram crescimento, momentos de alegrias e superação e sensações inesquecíveis!

Muito Obrigada!

*“O desejo profundo da humanidade pelo conhecimento é
justificativa suficiente para nossa busca contínua.”*

Stephen Hawking

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	15
2.1. OBJETIVO GERAL	15
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3. REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1. SETOR FLORESTAL BRASILEIRO.....	17
3.2. <i>EUCALYPTUS</i> X MELHORAMENTO FLORESTAL.....	18
3.3. POLIPLOIDIA	21
3.4. INDUÇÃO DE POLIPLOIDIA	22
3.5. IDENTIFICAÇÃO DE POLIPLOIDES.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1. LOCAL DE EXECUÇÃO DO TRABALHO.....	25
4.2. MATERIAL VEGETAL	25
4.3. OBTENÇÃO DOS EXPLANTES	25
4.4. INDUÇÃO À POLIPLOIDIZAÇÃO.....	26
4.5. DETECÇÃO DE POLIPLOIDES.....	27
4.6. MICROPROPAGAÇÃO DOS EXPLANTES POLIPLOIDIZADOS.....	27
4.6.1. <i>Multiplificação</i>	27
4.6.2. <i>Alongamento</i>	28
4.6.3. <i>Aclimatização das microestacas</i>	28
4.7. COMPARAÇÃO MORFOLÓGICA EXTERNA E INTERNA	29
4.7.1. <i>Análises morfológicas</i>	30
4.7.2. <i>Análises estomáticas</i>	30
4.7.3. <i>Análise da anatomia foliar</i>	31
4.7.4. <i>Análises estatísticas</i>	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	55
REFERÊNCIAS	57

RESUMO

Poliploidização induzida *in vitro*, como estratégia biotecnológica para a otimização da cultura de eucalipto

A poliploidia induzida é uma ferramenta valiosa para o melhoramento genético de plantas, resultando em genótipos com características superiores aos diploides correspondentes. Considerando a importância da cultura de eucalipto para o setor florestal e para a economia brasileira, o presente trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo de poliploidização *in vitro* para eucalipto, utilizando a espécie *Eucalyptus urophylla* ST Blake. Segmentos nodais contendo gemas laterais de plântulas desenvolvidas *in vitro* foram utilizados como explantes para os testes de indução. Os tratamentos avaliados consistiram na imersão e agitação dos explantes em soluções de colchicina nas concentrações: 0; 0,125% e 0,250% em tempos de exposição de 12 e 24 horas e posterior inoculação *in vitro* em meio de cultura para multiplicação. Após 60 dias, as brotações emitidas foram analisadas por citometria de fluxo e constatou-se indivíduos diploides, tetraploides e mixoploides. Estas foram micropropagadas para a obtenção de mudas clonais ao final do processo. As mudas obtidas foram avaliadas por meio de análises morfológicas organográficas e anatômicas para verificar possíveis alterações resultantes da poliploidização *in vitro*. Os tratamentos promoveram a indução de 16 poliploides, sendo 11 mixoploides, quatro tetraploides e um octaplóide. A eficiência máxima de indução obtida foi de 28% de poliploides no tratamento com 0,125% de colchicina por 12 horas sob agitação, com a obtenção tanto de mixoploides como de tetraploides puros. O protocolo geral de micropropagação utilizado, apesar de algumas perdas durante as etapas, garantiu a obtenção de altos percentuais de mudas clonais inteiramente tetraploides, comprovando a eficiência da técnica no isolamento de setores poliploides. A análise morfo-anatômica das mudas mostrou diferenças significativas em relação às características estomáticas, apontando este tipo de análise como indicador de poliploidização na separação preliminar dos indivíduos. A estrutura anatômica das folhas, no entanto, não sofreu modificações significativas, com exceção da espessura e área foliar da epiderme adaxial. A análise de componentes principais realizada para algumas variáveis morfo-anatômicas demonstrou que, apesar da análise estatística não ter apontado diferenças significativas, existe uma tendência em agrupar os genótipos diploides e tetraploides, diferenciando-os principalmente em relação às características estomáticas, espessura foliar, área do mesófilo, parênquimas paliádico e lacunoso e espaço intercelular. Os resultados obtidos neste trabalho instigam a continuidade do estudo em diversas possibilidades de abordagens, como o estudo do desenvolvimento das mudas em condições de campos, anatomia da madeira e avaliação do comportamento meiótico.

Palavras-chave: Poliploidia; Colchicina; Mixoploides; Micropropagação

ABSTRACT

***In vitro* induced polyploidization as a biotechnology strategy for the optimization of eucalypt culture**

The induced polyploidy is a valuable tool for genetic improvement of plants, resulting in genotypes with superior characteristics to their corresponding diploid. Considering the *Eucalyptus* culture importance to the forest sector and Brazilian economy, the aim of this study was establish an *in vitro* polyploidy protocol for eucalyptus, using the species *Eucalyptus urophylla* ST Blake. Nodal segments containing lateral buds developed from *in vitro* seedlings were used as explants for induction tests. The treatments tested consisted of soak and shake the explants in colchicine solutions at the concentrations: 0; 0.125% and 0.250% in soaking by periods of 12 or 24 hours and subsequent *in vitro* inoculation in culture medium for multiplication. After 60 days, the emitted shoots were classified by flow cytometry in levels of ploidy (diploid, tetraploid and mixoploids) and were subsequently micropropagated to obtain clonal seedlings at the end of the process. The clonal seedlings were evaluated using morphological and anatomical analysis to check the possible changes resulting from the *in vitro* polyploidy. The treatments promoted the induction of sixteen polyploids, being eleven mixoploids, four tetraploid and one octaploid. The maximum induction efficiency was obtained in 28% of polyploidy in the treatment with 0.125% of colchicine by soaking period of 12 hours, having obtained both mixoploids and pure tetraploids. The general protocol of micropropagation used, although presenting some losses during the steps, guaranteed the inducing of high percentages of enterelly tetraploid, proving the efficiency of micropropagation in the isolation of polyploid sectors. The morpho-anatomical analysis of the poliploidy seedlings showed significant differences in relation to stomatal characteristics, indicating this type of analysis as polyploidy indicator in the preliminary separation of individuals. The anatomical structure of the leaves, however, did not change significantly, except for the thickness and leaf area of the adaxial epidermis. The principal component analysis (PCA) performed for some morphological and anatomical variables demonstrated that despite the statistical analysis did not have pointed out significant differences, there is a tendency to group the diploid and tetraploid genotypes, differentiating them mainly in relation to stomatal characteristics, leaf thickness, mesophyll area, palisade and spongy parenchyma areas and intercellular space. The results of this work instigate to continue the study in several possibilities of approaches, such as the study of the development of seedlings in fields conditions, wood anatomy and study of meiotic behavior.

Keywords: Polyploidy; Colchicine; Mixoploids; Micropropagation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas do experimento de indução de poliploidia em *Eucalyptus urophylla*. A. Sementes germinadas *in vitro*; B. Microplântula individualizada; C. Segmentos nodais contendo gemas axilares (explantes); D. Erlenmeyers contendo as soluções de colchicina e envoltos em papel alumínio; E. Agitação em *shaker*; F. Explante exposto ao tratamento e inoculado em meio de cultura WPM suplementado com fitorreguladores para multiplicação.26

Figura 2. Etapas da micropropagação de *E. urophylla* poliploidizado. A. Explante com brotações poliploidizadas; B. Microcepa estabelecida na fase de multiplicação *in vitro*; C. Microcepa em início da fase de alongamento *in vitro*, evidenciando as folhas das microestacas utilizadas na segunda análise de citometria de fluxo (setas vermelhas).28

Figura 3. Etapas da aclimatização de *E. urophylla* poliploidizados. A. Miniestufas armazenadas em sala de crescimento; B. Transplante para tubete com manutenção do sistema de miniestufa; D. Mudanças em fase de rusticificação, em casa de sombra; E. Mudanças a pleno sol.29

Figura 4. Delineamento experimental das análises morfológicas e anatômicas realizadas nas mudas de *E. urophylla* para a comparação entre as ploidias, com relação aos caracteres morfológicos (conforme item 4.7.1), às características estomáticas (conforme item 4.7.2) e anatômicas (conforme item 4.7.3). Legendas: comprimento das mudas (CM); comprimento dos entrenós (CE); comprimento foliar (CF); largura foliar (LF); relação largura/comprimento foliar (LF/CF); área foliar (AF); diâmetro polar (DPI); diâmetro equatorial (DEq); relação diâmetro polar e diâmetro equatorial (DP/DE).30

Figura 5. Fragmentos da segunda folha de mudas de *E. urophylla* coletados e utilizados para obter as impressões epidérmicas (TME) e os cortes histológicos (TMD).31

Figura 6. Histogramas do conteúdo de DNA nuclear gerados pela análise de citometria de fluxo em amostras de explantes diploides, 2C (A), mixoploides, 2C+4C (B), tetraploides, 4C (C) e octaploide, 8C (D) de *E. urophylla*.34

Figura 7. Histogramas do conteúdo de DNA nuclear gerados pela análise de citometria de fluxo de amostras de explantes mixoploides de *E. urophylla* evidenciando as diferentes proporções de células diploides e tetraploides. A. proporção equilibrada de células diploides e tetraploides observada em dois dos mixoploides; B. maior proporção de células diploides observada na maioria dos mixoploides.35

Figura 8. Microcepas dos clones 1 (A-C), 2 (D-F), 12 (G-H), 14 (J-L) e 16 (M-O) ao longo do 3º, 6º e 9º subcultivos, respectivamente.38

Figura 9. Microcepas dos clones 3 (A-C), 4 (D-F), 6 (G-H) e 13 (J-L) ao longo do 3º, 6º e 9º subcultivos, respectivamente.39

Figura 10. Clones descartados. Clone 5 em 3º e 6º subcultivo (A e B) e clones 7 (C), 8 (D), 9 (E), 10 (F) e 15 (G) ao 3º subcultivo.39

Figura 11. Desenvolvimento do clone 11 ao longo do 3º (A), 6º (B) e 9º (C) subcultivos, evidenciando a necrose da microcepa (D).40

Figura 12. Diagrama da organização do meristema apical em quimeras setoriais (A), periclinais (B) e mericlinais (C) e em meristemas totalmente mutados (D). A área azul representa a área de células geneticamente diferentes das demais e os círculos representam cada camada (L1, L2 e L3). Adaptado de: Burge et al. 2002.42

Figura 13. Mudanças aclimatizadas de *E. urophylla*. A. Clone 2: mudas diploides à esquerda e mudas tetraploides à direita; B. Folha diploide do clone 2; C. Folha tetraploide do clone 2; D. Clone 13: mudas diploides à esquerda e mudas tetraploides à direita; E. Folha diploide do clone 13; F. Folha tetraploide do clone 13; G. Mudanças do clone controle; H. Folha do clone controle; I. Mudanças do clone 14 mixoploide; J. Folha do clone 14.46

Figura 14. Impressões epidérmicas de folhas de *E. urophylla*. A. Estômatos do tipo anomocítico (Es); B. Cavidade secretora (CS); C. Epiderme adaxial evidenciando as cavidades secretoras (CS) e D. Epiderme abaxial evidenciando as cavidades secretoras (CS) e estômatos (Es).47

Figura 15. Comparação das impressões epidérmicas das folhas diploides (à esquerda) e poliploides (à direita) no clone 2 (A e B), clone 13 (C e D), clone controle (E) e clone 14 mixoploide (F).48

Figura 16. Impressões epidérmicas da primeira (A), segunda (B) e terceira(C) folha de uma mesma muda do Clone 14, mixoploide.50

Figura 17. Cortes transversais das folhas diploides (à esquerda) e poliploides (à direita) de *E. urophylla*. A e B. Clone 2; C e D. Clone 13; E. Clone controle e F. Clone 14. Barras = 100µm.52

Figura 18. Análise de componentes principais correlacionando os genótipos: Clone 2 diploide (C2-2x), Clone 2 tetraploide (C2-4x), Clone 13 diploide (C13-2x), Clone 13 tetraploide (C13-4x) e clone 14 mixoploide (C14-mix) às variáveis densidade estomática (DEs), diâmetro equatorial (DEq), diâmetro polar (DPl), espessura foliar (EF), área do mesofilo (AMeso), área dos parênquimas paliçádico (APP) e lacunoso (APL) e área do espaço intercelular do parênquima lacunoso (EI).54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tratamentos para indução de poliploidia	26
Tabela 2. Dados referentes aos tratamentos de indução de poliploidia	33
Tabela 3. Nomenclatura das brotações classificadas de acordo sua ploidia e seu tratamento de origem; nomenclatura adotada ao conjunto de microcepas formadas a partir de cada brotação durante a micropropagação.....	37
Tabela 4. Número de brotações analisadas e identificadas como diploides (2x), mixoploides (2x+4x) e tetraploides (4x) na segunda citometria de fluxo, de cada clone.....	41
Tabela 5. Número de mudas clonais obtidas e suas confirmadas pela 3ª citometria de fluxo, em cada clone.	44
Tabela 6. Dados referentes aos caracteres morfológicos das mudas de cada genótipo.	45
Tabela 7. Dados referentes à análise estomática de cada genótipo.....	49
Tabela 8. Matriz de Correlação de Pearson das variáveis estomáticas.....	49
Tabela 9. Espessura foliar total e de cada tecido, em μm , da secção anatômica de cada genótipo.	51
Tabela 10. Área, em μm^2 , dos tecidos foliares ocupados na secção anatômica de cada genótipo.	51
Tabela 11. Matriz de correlação de Pearson das variáveis de espessura foliar.	52
Tabela 12. Matriz de correlação de Pearson das variáveis de área dos tecidos foliares.....	53

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Eucalyptus* é composto por espécies com elevada adaptabilidade, rápido crescimento e propriedades superiores da madeira, sendo desta forma, considerado o gênero mais cultivado no mundo para produção de celulose e papel, madeira para produção de lenha, carvão e serraria, além de óleos essenciais utilizados na indústria farmacêutica e o uso de inúmeras espécies comercializadas como ornamentais.

No Brasil, as áreas de florestas plantadas de eucalipto crescem a cada ano e são responsáveis pela maior parte da produção de madeira para fins industriais, contribuindo de forma significativa no setor florestal brasileiro que, por sua vez apresenta expressiva representatividade na economia brasileira, justificando dessa forma, a busca para a otimização do cultivo por meio de programas de melhoramento.

Tradicionalmente, os programas de melhoramento genético do eucalipto fundamentam-se no cruzamento controlado, na seleção de progênies e de indivíduos genotipicamente superiores, com posterior clonagem (estaquia e miniestaquia convencional), bem como a produção de híbridos interespecíficos. Adicionalmente, novas estratégias biotecnológicas vem sendo implementadas para otimizar a eucaliptocultura. Dentre os métodos aplicados para maximizar os programas de melhoramento, destacam-se: (i) a micropropagação, técnica que proporciona a multiplicação maciça de indivíduos selecionados (clonagem por obtenção de microestacas), e a busca para resolução de problemas relacionados ao enraizamento; (ii) o desenvolvimento de marcadores moleculares, os quais permitem rastrear características de interesse e prever o desempenho da progênie e (iii) a criação de variedades transgênicas.

Além das técnicas supracitadas, a poliploidização também é destacada entre as bases genéticas do melhoramento de espécies cultivadas. Fundamentada na duplicação do conjunto cromossômico e consequentemente dos genes, a poliploidia resulta na produção de uma série de efeitos morfofisiológicos sobre as células e consequentemente sobre os órgãos vegetais, tornando-os maiores, mais vigorosos e produtivos (efeito giga) em relação a seus diploides correspondentes. Quando desejada, a duplicação cromossômica somática pode ser induzida por tratamentos químicos apropriados, sendo a colchicina, de acordo com a literatura vigente, o agente indutor tradicionalmente mais utilizado. Dessa forma, este trabalho tem como objetivo principal, estabelecer protocolo para poliploidização *in vitro* de *Eucalyptus urophylla*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolver protocolo para poliploidização *in vitro* de *E. urophylla* ST Blake.

2.2. Objetivos específicos

- i. Testar diferentes concentrações e tempo de exposição ao agente anti-mitótico colchicina, para estabelecer o tratamento mais adequado para induzir a poliploidização em *E. urophylla*;
- ii. Avaliar pelo método de citometria de fluxo a eficiência dos tratamentos na indução de poliploidia e certificar-se da estabilidade dos indivíduos poliploidizados, ao longo do cultivo *in vitro* e *ex vitro*;
- iii. Realizar análises morfológicas e anatômicas das folhas de indivíduos diploides, tetraploides e mixoploides, para verificar possíveis alterações resultantes da poliploidização *in vitro*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Setor Florestal Brasileiro

O Brasil apresenta grande competitividade no mercado de produtos florestais, devido principalmente às suas características edafoclimáticas e do desenvolvimento tecnológico obtido na área de silvicultura (Juvenal e Mattos 2002). De acordo com Valverde e colaboradores (2012), a atividade florestal no Brasil possui fortes características que a diferenciam das demais atividades econômicas, sendo uma delas a fonte da matéria-prima, a qual pode advir tanto de florestas plantadas, quanto de florestas nativas manejadas.

O destaque do setor florestal no país ocorreu após a aprovação da legislação de incentivos fiscais ao reflorestamento em 1966, o que permitiu as empresas abaterem até 50% do valor do imposto de renda devido para aplicar em projetos florestais (Sousa et al. 2010). Até antes desse momento, o Brasil importava papel e o carvão vegetal consumido vinha integralmente de matas nativas e possuía somente 500 mil hectares de plantações (Valverde et al. 2012).

Atualmente, a área ocupada por florestas plantadas no Brasil é de 7,8 milhões de hectares (apenas 0,9% de todo o território brasileiro) e é responsável pela produção de 91% de toda a madeira produzida para fins industriais (IBÁ 2016). Este fato manteve o país na liderança no ranking global de produtividade florestal no ano de 2015, com produtividade média de 36 m³/ha.ano para plantios de *Eucalyptus* e 31 m³/ha.ano para plantios de *Pinus* (IBÁ 2016).

O setor de árvores plantadas envolve diversas empresas, investidores e empreendedores que atuam desde o fornecimento de insumos para a atividade florestal, passando pela prestação de serviços, como a produção e plantio de mudas, colheita florestal e transporte até a transformação da madeira nos seus mais variados produtos intermediários e finais. Dentre estes produtos, os principais são a celulose, diversos tipos de papéis, painéis de madeira, pisos laminados, compensados, móveis e demais produtos sólidos de madeira, bem como carvão vegetal e outras biomassas (como a lenha) para fins energéticos (IBÁ 2015).

Especialistas do setor ressaltam a enorme relevância econômica, social e ambiental do setor florestal para o desenvolvimento sustentável do país (Carvalho et al. 2006). Sua considerável importância na economia brasileira pode ser comprovada pela análise do setor no ano de 2015, pela Indústria Brasileira de Árvores (IBÁ 2016), no qual sua participação representou 1,2% de toda a riqueza gerada no país e 6,0% do PIB industrial. O seu produto interno bruto alcançou R\$ 69,1 bilhões, correspondente a um crescimento de 3,0% em relação ao ano de 2014 e quando comparado ao PIB de outros setores produtivos da economia brasileira no mesmo período, apresentou excelente desempenho (IBÁ 2016).

A atividade florestal destaca-se ainda, em função da capacidade de geração de emprego e renda (Juvenal e Mattos 2002). Em 2015, 540 mil pessoas foram empregadas diretamente, gerando uma renda de R\$ 10,0 bilhões, estimando-se ainda que o número de postos de trabalho diretos, indiretos e resultantes do efeito renda da atividade florestal seja da ordem de 3,8 milhões (IBÁ 2016).

Do ponto de vista sustentável, o setor de árvores plantadas contribui de forma significativa para a preservação e recuperação de ecossistemas ao proteger 5,6 milhões de hectares de áreas naturais na forma de áreas de preservação permanente, reserva legal e reservas particulares de patrimônio natural, uma vez que as florestas plantadas têm sido implantadas em áreas já antropizadas e pastagens degradadas (Valverde et al. 2012; IBÁ 2016). Assim, além de não ser necessário converter florestas nativas em plantações, o reflorestamento comercial protege os remanescentes de nativa (Valverde et al. 2012) e diminui a pressão do extrativismo sobre as florestas naturais.

Segundo o relatório da IBÁ (2015), para cada hectare plantado com árvores para fins industriais, cerca de 0,65 hectare é destinado à preservação.

Ainda no aspecto ambiental, o setor é capaz de contribuir para o combate às mudanças climáticas, uma vez que os 7,8 bilhões de hectares de árvores plantadas, bem como os 5,6 bilhões de hectares de área preservada pelas empresas são responsáveis pelo estoque de aproximadamente 4,18 bilhões de toneladas de CO₂ equivalente (IBÁ 2016).

3.2. *Eucalyptus* x melhoramento florestal

O gênero *Eucalyptus* da família Myrtaceae é originário da região da Australásia, que inclui a Austrália, Nova Zelândia, Nova Guiné e algumas ilhas menores da Indonésia oriental e possui aproximadamente 700 espécies conhecidas (Delaporte et al. 2001; Potts 2004). A adaptabilidade das espécies de eucalipto, somada ao seu rápido crescimento e propriedades superiores da madeira, elegeram em 2009, esse gênero o mais cultivado no mundo, com mais de 20 milhões de hectares de floresta plantada em mais de 100 países (Iglesias e Wiltermann 2009).

No Brasil, o eucalipto foi introduzido na segunda metade do século XIX, com a finalidade de fornecer madeira para construção ferroviária (Santos et al. 2001) e atualmente, a área plantada no país corresponde a aproximadamente 5,63 milhões de hectares, representando 72% do total de florestas plantadas e contribuindo de forma expressiva para o setor florestal brasileiro (IBÁ 2016).

Além da já informada importância do eucalipto para o abastecimento de matéria-prima às indústrias de papel e celulose, seu cultivo atual destina-se principalmente à geração de energia obtida pela queima de carvão, lenha e outras estratégias complementares como bio-óleo, celulignina catalítica, gases de síntese e álcool a partir de celulose, bem como para a manufatura de painéis à base de madeira reconstituída (aglomerados e chapas de fibra), obtenção de madeira roliça para utilização como postes e dormentes, produção de sólidos madeiráveis a partir de serrados e laminados como móveis, pisos, esquadrias, portas e chapas de compensado (Paludzyszyn Filho e Santos 2011). Ainda, algumas espécies são consideradas com potencial produtivo do pasto apícola, produção de óleos essenciais para a indústria farmacêutica e ornamentação (Santos et al. 2001).

Dada a sua expressiva importância para o setor, programas de melhoramento de espécies de *Eucalyptus* vêm sendo desenvolvidos, principalmente por empresas do segmento de celulose e papel, bem como por instituições federais e centros universitários, visando à otimização do cultivo do gênero no país (Assis e Resende 2011; Paludzyszyn Filho e Santos 2011).

Dentre as características economicamente importantes buscadas nos programas de melhoramento, destaca-se o aumento no rendimento de celulose por hectare em plantios comerciais, no qual se busca a obtenção de indivíduos que apresentem madeira com menor teor de ligninas não reativas no processo de polpação (Paludzyszyn Filho e Santos 2011). Outras características buscadas incluem o incremento do crescimento, o comprimento e ângulo das fibras, linearidade do caule, altura do fuste, bem como resistência a doenças e tolerância a estresses abióticos como geada, seca e salinidade (Eldridge et al. 1993; Aguiar et al. 2007).

Tradicionalmente, o melhoramento genético florestal baseia-se na seleção de procedências, seleção individual dentro das populações-base, utilizando-se a variabilidade existente naturalmente dentro das populações e entre os indivíduos. Seleção de progênes e indivíduos de genótipos superiores com posterior propagação através da clonagem, a qual é feita principalmente por meio de técnicas de estaquia e miniestaquia, adotada por grande parte das empresas florestais (Alfenas et al. 2004). O melhoramento do eucalipto no Brasil tem apresentado enorme sucesso, o

qual foi obtido, principalmente, pela seleção massal, seguida da obtenção de clones das plantas superiores visando a obtenção de populações melhoradas, contribuindo assim, com o expressivo aumento da produtividade de celulose e carvão vegetal (Gonçalves et al. 2001).

O melhoramento tradicional é um processo tipicamente lento, podendo levar décadas para obter as características desejadas (Fossey 2005), isso porque, a seleção de genótipos superiores ocorre geralmente na fase adulta, o que acaba limitando a posterior propagação clonal de alguns genótipos selecionados, devido ao envelhecimento ontogenético das plantas matrizes, a qual leva a perda gradual da capacidade de enraizamento dos propágulos (Eldridge et al. 1993; Díaz-Sala 2016; Rasmussen et al. 2015). Assim, novas estratégias biotecnológicas como a cultura de tecidos vegetais, a utilização de marcadores moleculares e a transformação genética uniram-se ao melhoramento convencional, para possibilitar a obtenção de genótipos com maior produtividade e qualidade e vêm sendo consideradas para maximizar os programas de melhoramento (Sartoretto et al. 2008).

A cultura de tecidos vegetais abrange diversas técnicas, dentre as quais a micropropagação representa a aplicação de maior impacto (Golle et al. 2009), possibilitando a obtenção maciça de propágulos, em reduzido intervalo de tempo e espaço, bem como de plantas livres de patógenos e praticamente idênticas à original, sendo utilizada como alternativa à propagação tradicional de espécies florestais (Grattapaglia e Machado 1998). Assis e Máfia (2007) afirmaram que os sucessivos subcultivos da micropropagação proporcionam um aumento no potencial de enraizamento adventício e qualidade do sistema radicular dos propágulos, uma vez que promovem o rejuvenescimento e homogeneização fisiológica dos tecidos vegetais. Dessa forma, esta técnica é amplamente utilizada na propagação de clones considerados recalcitrantes ao enraizamento (Titon et al. 2002).

Neste contexto, desde o final da década de 60 (Dutra et al. 2009) estudos vêm sendo desenvolvidos visando o estabelecimento de protocolos de micropropagação de espécies de eucaliptos de interesse comercial e considerados de difícil enraizamento, tais como o *E. citriodora* (Aneja e Atal 1969; Almeida 2012), o *E. benthamii* (Brondani 2012; Brondani et al. 2012; Baccarin 2012; Baccarin et al. 2015), *E. globulus* (Del Ponte 2001; Cordeiro et al. 2014), *E. cloeziana* (Oliveira 2014) e *E. dunni* (Oberschelp 2014). Além desses, uma linha de pesquisa envolve estudos sobre a complexa interação entre eucaliptos cultivados *in vitro* e seus microrganismos endofíticos, a qual favorece o desenvolvimento dos propágulos e contribui para otimização dos protocolos (Piotto 2013; Leone 2013; Polesi 2015; Esposito-Polesi et al. 2015).

O desenvolvimento de marcadores moleculares e as transformações genéticas também se inserem dentre as estratégias biotecnológicas utilizadas no melhoramento do cultivo de eucalipto (Golle et al. 2009). A utilização de marcadores moleculares em plantas possibilita a criação de mapas que caracterizam o genoma das espécies permitindo o reconhecimento de certas regiões responsáveis pela expressão de determinados caracteres fenotípicos, denominados QTLs (quantitative trait loci), e permitem prever com precisão o desempenho da progênie (Grattapaglia 2001; Potts 2004; Varshney et al. 2005; Aguiar et al. 2007). Por meio desta técnica já foram identificadas características de crescimento, densidade da madeira, linearidade do caule e florescimento precoce de espécies de eucaliptos (Grattapaglia 2004; Potts 2004; Domingues et al. 2006).

A transformação genética do eucalipto, por sua vez, enfrenta algumas dificuldades, como a recalcitrância de algumas espécies à manipulação genética, considerada o fator mais limitante da aplicação desta técnica no eucalipto (Dutra et al. 2009). A falta de protocolos eficientes de regeneração mantém a técnica ainda restrita a poucas espécies e genótipos (Girijashankar 2011; Teulieres e Marque 2007). Além disso, o alto custo de produção, obtenção de patentes e variações nos padrões de expressão através da idade e tecidos, também é apontado como alguns dos entraves na aplicação desta técnica (Girijashankar 2011). Entretanto, para Pasquali e Zanettini (2007), a

transformação genética, quando bem sucedida, pode proporcionar a redução do tempo necessário para a introdução de novas características de interesse. O aumento da biomassa, redução nos teores de lignina, biossíntese de celulose, conferência de resistência a doenças e estresses abióticos, bem como o aprimoramento da rizogênese (considerado um gargalo na estaquia de eucaliptos), são algumas das características desejadas e buscadas com a aplicação dessa técnica (Quoirin e Quisen 2006; Girijashankar 2011).

Tounier e colaboradores (2003) obtiveram plantas transgênicas do híbrido *E.grandis* x *E.urophylla* sendo observada a inibição de 58% da atividade dos genes de lignificação. A transformação genética também foi utilizada em *E. camaldulensis* visando a utilização da espécie na fitorremediação (Quisen 2007) e em *E. saligna*, para aumentar a tolerância ao frio (Dibax et al. 2010).

A natureza estável das células das espécies de eucaliptos também desempenha papel importante no melhoramento. Dentro do gênero, o conjunto cromossômico é relativamente uniforme (Eldridge et al. 1993), com a maioria das espécies apresentando um conjunto diploide constituído por 22 cromossomos (Haque 1984; Oudjehih e Abdellah 2006), enquanto que, uma pequena proporção apresenta conjunto cromossômico formado por 24 cromossomos (Rye 1979). Esse padrão permite a combinação de traços de diversos genótipos através da hibridização interespecífica (Zobel e Talbert 1984) e assim, a obtenção de características desejáveis em uma única espécie. Os híbridos de *E.grandis* x *E. urophylla* por exemplo, possuem o rápido crescimento, típico da espécie *E. grandis* e aumento de resistência a patógenos, oriundos do *E. urophylla* (Eldridge et al. 1993), que faz destes híbridos os mais indicados para obtenção de celulose e para a produção de madeira maciça em regiões tropicais e subtropicais (Potts e Dungey 2004).

Em adição às técnicas moleculares, outra estratégia utilizada para a produção de novos fenótipos no melhoramento genético de espécies arbóreas é a poliploidização (Eeckhaut et al. 2004), pois espera-se que a duplicação do número de cromossomos possa acarretar no aumento do tamanho das células e consequentemente, maior produção de biomassa. Em uma espécie da família Salicaceae, *Populus tremula*, foram identificados indivíduos triploides e com características economicamente desejáveis (Müntzing, 1936) despertando o interesse em estudos de indução de poliploidia em espécies arbóreas. Estudos mais recentes sugerem que as árvores triploides de *Populus* apresentam enormes vantagens em relação a seus diploides correspondentes, como maior taxa de crescimento, melhor qualidade da madeira, além de aumentada resistência a estresses (Einspahr 1984; Weisgerber et al. 1980; Zhu et al. 1998 apud Yang et al. 2016). Desde então, esta estratégia vem sendo aplicada em espécies arbóreas, tais como *Pinus* spp. (Mergen 1959), *Eucalyptus* spp. (Janaki et al. 1969; Roth 1984; Kampoor e Sharma 1985; Lin et al. 2010; Oda et al. 2009; Han et al. 2011), *Acacia* spp. (Moffet e Nixon 1960; Blakesley et al. 2002; Ewald et al. 2009), e espécies ornamentais como *Robinia pseudoacacia* (Ewald et al. 2009) e *Lagerstroemia indica* (Zhang et al. 2010).

Em eucalipto, a poliploidia já foi aplicada *in vivo* para investigar a produção de citronelal em *E. citriodora* (Janaki et al. 1969) e em um híbrido de *E. grandis* com *E. tereticornis* visando o aumento na produção de madeira (Kampoor e Sharma 1985). Estudos preliminares de duplicação cromossômica *in vitro* já foram realizados utilizando clones específicos de *E. globulus* (Lin et al. 2010) e *E. grandis* (Han et al. 2011), bem como estudos de variação genética em *E. globulus* poliploide (Liu et al. 2009). Em *E. urophylla*, a poliploidia foi induzida por Roth (1984) em plantas *ex vitro* com a obtenção de indivíduos quimericos, sugerindo que a espécie *E. urophylla* não oferece maiores dificuldades para a indução de poliploidia. Recentemente, a duplicação cromossômica também foi induzida durante a microsporogênese de *E. urophylla* visando a obtenção de pólenes 2n viáveis para posterior obtenção de indivíduos triploides (Yang et al. 2016). Outros relatos de trabalhos com poliploidia de eucaliptos limitam-se a resumos de anais de congressos (Oda et al. 2009; Dias et al. 2013).

3.3. Poliploidia

A poliploidia é definida como a existência de dois ou mais genomas em um mesmo núcleo, sendo considerada um importante fator no processo evolutivo dos organismos eucariotos e evidente em muitos animais, fungos e plantas (Grant 1981; Hovav et al. 2008; Wood et al. 2009).

Os indivíduos poliploides são tradicionalmente classificados de acordo com a sua origem em autopoliploides e alopoliploides (Chen 2010). Autopoliploides são aqueles originados pela duplicação de um mesmo genoma, enquanto que os alopoliploides são gerados pela duplicação de genomas diferentes, normalmente após um evento de hibridação (Stebbins 1971). Além disso, os poliploides podem ser classificados de acordo com número de conjuntos cromossômicos (x) que possuem, ou seja, em triploides ($3x$), tetraploides ($4x$) e assim por diante (Darlington 1973).

Nos vegetais, a poliploidia é uma característica bastante comum. Estima-se que 95% das pteridófitas e 80% das angiospermas sejam poliploides (Leitch e Bennet 1997), porém, entre as gimnospermas, esse fenômeno é raro. Segundo Otto e Whitton (2000) a maioria das espécies de angiospermas, se não todas, já passou por um aumento do número do conjunto cromossômico em algum momento de suas histórias evolutivas. Considerando as espécies cultivadas, cerca de 40% são poliploides (Simmonds, 1980), entre elas a alfafa, a batata, o fumo e o algodão (tetraploides), as aveias (tetraploides e hexaploides), os trigos tetraploides (trigo duro) e hexaploides (trigo de pão, *Triticum aestivum*), o morango e cana-de-açúcar (octaploides), entre outras (Schifino-Wittmann e Agnol 2003).

A proporção de espécies poliploides vem crescendo ao longo do tempo, como indicado pelo aumento do tamanho de células-guardas (característica correlacionada ao nível de ploidia) em espécies das famílias Lauraceae, Magnoliaceae e Platanaceae ao longo dos últimos cem milhões de anos (Masterson 1994). Segundo Otto e Whitton (2000), cerca de 2 a 4% dos eventos de especiação envolvem a poliploidização, fazendo da poliploidia um processo ativo e contínuo que contribui para o aumento da porcentagem de poliploides.

A abundância de poliploides existentes indica que a posse de múltiplos genomas confere uma vantagem evolutiva, provavelmente devido a fixação da heterozigiosidade e da existência de um maior número de genes e alelos disponíveis para seleção (Hegarty e Hiscock 2007). Adams e Wendel (2005) afirmaram que a duplicação do genoma, e consequentemente dos genes, pode ter consequências evolutivas como: a aquisição de novas funções pelos genes; “silenciamento” de uma ou de ambas as cópias duplicadas; interação entre os genes duplicados, causando efeito de dose (mais alelos, mais produtos); bem como interações negativas de uma cópia gênica com produtos de outros genes essenciais. No quadro adaptativo, heterozigiosidade e mudanças genéticas e epigenéticas rápidas, constituem a base da habilidade dos poliploides de se adaptarem a ambientes mais extremos. A heterozigiosidade pode levar ao aumento na variação da expressão gênica, resultando em maior vigor e adaptação mais rápida a novas condições (Rieseberg 2007). Dessa forma, poliploides em geral são bons colonizadores, podendo ocupar habitats pioneiros nos quais os ancestrais diploides não são bem sucedidos (De Wet 1980).

A poliploidização produz ainda, uma série de efeitos morfofisiológicos sobre os órgãos vegetais, causando neles um efeito “giga”, tornando-os mais vigorosos em relação a seus diploides correspondentes (Allard 1971). O efeito imediato é o aumento do tamanho das células devido ao aumento do volume do núcleo, acarretando a redução do número de divisões celulares durante o desenvolvimento (Otto 2007).

Jellings e Leech (1984) estudando a variação de caracteres morfológicos, anatômicos e celulares de nove genótipos de trigo em três níveis de ploidia (diploides, tetraploides e hexaploides), verificaram o tamanho celular como a característica mais fortemente influenciada pelo nível de ploidia, devido ao aumento do tamanho do núcleo.

A significância desse aumento proporcional foi discutida posteriormente por Cavalier-Smith (1985) que atribuiu essa relação à necessidade de haver um raio constante entre o volume nuclear, dedicado à transcrição e o volume citoplasmático dedicado a síntese protéica.

Dentre as características gerais apresentadas pelas plantas poliploides incluem-se folhas mais espessas, firmes e de coloração mais intensa (Lin et al. 2010). Vyas e colaboradores (2007) relataram aumento no volume das células do mesófilo de folhas de *Phlox drummondii* tetraploides, refletindo no aumento da espessura foliar. Neste caso, a duplicação cromossômica alterou também outras propriedades anatômicas da folha (como a área de cloroplastos exposto ao espaço intercelular, espessura da parede celular), bem como propriedades bioquímicas (como conteúdo de Rubisco e de clorofila) levando, adicionalmente, a alterações na capacidade fotossintética de indivíduos poliploides. Os autores ressaltam ainda que, os efeitos da poliploidização na taxa fotossintética podem variar de espécie para espécie, com plantas tetraploides demonstrando valores maiores, similares ou até mesmo menores que seus correspondentes diploides.

Em decorrência do aumento do tamanho das células das folhas, a densidade estomática e o tamanho dos estômatos podem sofrer alterações com a poliploidização, de modo que plantas poliploides geralmente exibem baixa densidade estomática, porém com estômatos maiores (Hodgson et al. 2010). A fase vegetativa bem como o período de floração, podem ser prolongadas (Elliot 1958; Levin 1983). Eeckhaut e colaboradores (2004) afirmam ainda que, poliploides podem ter um aumento na atividade de alguns metabólitos contra pestes e patógenos, conferindo aumento de resistência a doenças.

A poliploidia pode ainda, surtir efeitos sobre a anatomia caulinar, como observado por Hashimoto (2009) que comparou diploides e tetraploides de uma variedade híbrida de mandioca. Ainda segundo o autor, as plantas poliploidizadas apresentaram tecido medular mais desenvolvido e maior número de elementos de vasos, além de diâmetro caulinar aumentado, bem como aumento nas dimensões de estruturas e órgãos, em termos de número de camadas celulares e tamanho das células, características estas que foram relacionadas ao grau de tolerância da planta à seca. Em eucalipto, Fantuzzi Neto (2012) demonstrou que clones derivados de poliploides resultados de cruzamentos de *E. grandis* poliploides x *E. urophylla* apresentam fibras mais longas, densidades básicas superiores, menores teores de lignina refletindo no aumento da qualidade da madeira para a produção de celulose kraft.

A presença de múltiplos conjuntos cromossômicos, contudo, frequentemente causa complicações no pareamento dos cromossomos durante a meiose, resultando na sua segregação desigual e consequentemente, formação de gametas não balanceados (Stebbins 1950; Darlington 1973). Dessa forma, em muitos casos, a poliploidização causa infertilidade, devendo-se recorrer a diferentes métodos de propagação para a sua reprodução. A infertilidade em alguns poliploides se manifesta na ausência de sementes com a formação de frutos partenocárpicos (Elliot 1958), o que pode representar uma vantagem no caso de melhoramento de algumas culturas. Por outro lado, a poliploidização induzida também pode atuar na restauração da fertilidade de híbridos estéreis, uma vez que regulariza o pareamento dos cromossomos na meiose (Stebbins 1971; Schifino-Wittmann 2004).

3.4. Indução de poliploidia

A poliploidia induzida pode ser uma ferramenta valiosa para o melhoramento genético (Schifino-Wittmann, 2004), utilizada de três maneiras básicas: 1) poliploidização na espécie, para obtenção de plantas maiores e melhores; 2) poliploidização de um híbrido, para restaurar a fertilidade do híbrido estéril, sintetizar uma nova espécie ou ressintetizar uma já existente e 3) como uma ponte para transferir genes de interesse entre níveis de ploidia diferentes, intra ou interespecíficos (Dewey 1980).

Nos vegetais, a duplicação dos cromossomos pode ser induzida por diversos métodos, incluindo alterações de temperatura, fusão de protoplastos e tratamentos com agentes químicos. A utilização de choques térmicos é um dos métodos de indução mais antigos e foi utilizado na poliploidização de milho (Randolph 1932), cevada e trigo (Dermen 1940). A fusão de protoplastos, por sua vez, consiste na fusão de células sem parede celular por ação de agentes químicos ou eletrofusão e foi utilizada com sucesso para induzir poliploidia em tabaco, *Datura innoxia* e chicória (Rambaud et al. 1992). Entretanto, os métodos de indução com agentes químicos inibidores do fuso mitótico são os mais utilizados por apresentarem maior sucesso.

Dentre os agentes anti-mitóticos utilizados, a colchicina, um alcalóide extraído de *Colchicum autumnale* (Liliaceae), tem sido a substância mais amplamente empregada em programas de melhoramento genético de culturas agrícolas, de espécies florestais e plantas ornamentais (Roth 1984; Silva et al. 2000, Dhooghe et al. 2011). Utilizada desde a sua descoberta em 1937 (Blakeslee e Avery 1937), seu mecanismo de ação envolve a ligação irreversível aos dímeros de tubulina, causando uma mudança conformacional e impedindo a polimerização do fuso mitótico, e como consequência, os cromossomos recém duplicados, não se separam e o núcleo se reorganiza com o número de cromossomos duplicados (Eeckhaut et al. 2002). Entretanto, nem sempre todas as células do tecido tratado se poliploidizam, o que pode levar à formação de quimeras, ou seja, tecidos ou plantas com setores duplicados e outros não duplicados (Schifino-Wittmann e Agnol 2003), denominados mixoploides.

Como alternativa ao uso da colchicina, outros agentes anti-mitóticos podem ser utilizados na duplicação cromossômica de algumas espécies, como o óxido nitroso, e mais frequentemente os herbicidas orizalina e trifluralina (Dhooghe et al. 2011).

Murashige e Nakano (1966) reportaram o primeiro experimento de poliploidização *in vitro* em calos de tabaco. A propagação *in vitro* apresenta enorme potencial para melhorar a eficiência da duplicação cromossômica, uma vez que a técnica oferece condições ambientais padronizadas e controladas que casas de vegetação (Dhooghe et al. 2011). Entretanto, o sucesso de um procedimento de poliploidização *in vitro* depende de diversos fatores, como a existência de protocolos de regeneração bem estabelecidos para a espécie que se deseja a duplicação cromossômica, tipo de explante, tipo e concentração do anti-mitótico a ser utilizado, tempo de exposição e método de aplicação (Dhooghe et al. 2011, Sattler et al. 2016).

3.5. Identificação de poliploides

Vários são os métodos para certificação do sucesso da poliploidização, sendo a citometria de fluxo o mais utilizado, seguido da contagem de cromossomos (mais concreto por determinar efetivamente o número dos cromossomos), além de avaliações de parâmetros morfo-anatômicos (Dhooghe et al. 2011). Há de se considerar que, a contagem de cromossomos é um método demorado e laborioso, por envolver tratamentos específicos e análises de microscopia em células de ponta de raízes ou de ápices caulinares, as quais se mantêm em divisão celular, limitando o número e tipo de células que podem ser analisadas (Bohanec, 2003; Dolezel et al. 2007). Além disso, podem ocorrer erros de contagem no caso de cromossomos muito pequenos (Dhooghe et al. 2011).

Já a citometria de fluxo é um método confiável e rápido, pois permite a análise de um grande número de células e de diferentes tecidos (Leus et al. 2009). Esta técnica consiste na coloração do DNA seguida da análise em citômetro de fluxo, que utiliza uma fonte de luz para iluminar o núcleo corado e detectar a fluorescência emitida. A quantidade de fluorescência em cada núcleo é correlacionada com o seu conteúdo de DNA e este, diretamente ao número de ploidia (Dhooghe et al. 2011).

A citometria de fluxo apresenta vantagens em relação à contagem dos cromossomos em especial para análises da poliploidização *in vitro*, pois não requer raízes ou plantas aclimatizadas e ainda permite a análise das amostras em estádios de desenvolvimento precoces, importante para economizar tempo e espaço (Väinölä 2000).

Como o aumento do volume celular é um dos primeiros efeitos da poliploidização, caracteres morfológicos como tamanho e espessura de órgãos e tecidos, tamanho das células-guardas dos estômatos, densidade de estômatos por área, bem como o número de plastídios nas células dos estômatos, podem ser utilizados para verificar o sucesso do protocolo de poliploidização (Schifino-Wittmann e Agnol 2003). Inúmeros trabalhos relatam que os poliploides tendem a apresentar variações no tamanho do grão de pólen, estômatos maiores, elevado número de cloroplastos nas células-guarda e menor densidade estomática que seus diploides correspondentes (Kadota e Niimi 2002; Aryavand et al. 2003; Souza e Queiróz 2004; Gu et al. 2005; Stanys et al. 2006; Yang et al. 2006; Dewitte et al. 2009; Sun et al. 2009; Ewald et al. 2009; Shiga et al. 2009; Campos et al. 2009; Zhang et al. 2010).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local de execução do trabalho

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas, no departamento de Ciências Biológicas da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ESALQ/UP - Piracicaba, SP.

4.2. Material Vegetal

Foram utilizadas para execução deste trabalho, sementes provenientes de variedade de polinização aberta de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake, designadas T8A32, procedentes da Estação Experimental de Ciências Florestais de Anhembi, SP, ESALQ/USP, gentilmente cedidas pelo Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF), Piracicaba, SP.

4.3. Obtenção dos explantes

As sementes de *E. urophylla* foram submetidas a assepsia superficial com lavagem em água corrente por 15 minutos. Em câmara de fluxo, estas foram imersas em solução de hipoclorito de sódio comercial 30% (v/v), por 10 segundos e em seguida enxaguadas por três vezes com água destilada autoclavada.

Após a assepsia, as sementes foram dispostas em placas de Petri contendo meio de cultura ágar-água e acondicionadas em sala de crescimento com temperatura e luminosidade controladas ($25 \pm 2^\circ\text{C}$; irradiância de $42 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de radiação fotossinteticamente ativa (PAR), fotoperíodo de 16 horas) até a germinação.

As plântulas obtidas *in vitro* (microplântulas - figura 1A) foram transferidas individualmente para tubos de ensaio contendo meio de cultura WPM (Lloyd e McCown 1980) isento de reguladores de crescimento (figura 1B). Após 30 dias foram seccionadas em segmentos nodais, os quais foram utilizados como explantes dando início ao experimento de indução à poliploidia (figura 1C).

Figura 1. Etapas do experimento de indução de poliploidia em *Eucalyptus urophylla*. A. Sementes germinadas *in vitro*; B. Microplântula individualizada; C. Segmentos nodais contendo gemas axilares (explantes); D. Erlenmeyers contendo as soluções de colchicina e envoltos em papel alumínio; E. Agitação em *shaker*; F. Explante exposto ao tratamento e inoculado em meio de cultura WPM suplementado com fitorreguladores para multiplicação.

4.4. Indução à Poliploidização

Os explantes (segmentos nodais) foram imersos em soluções de colchicina nas concentrações 0,125% e 0,250% (p/v), por 12 e 24 horas sob agitação em condições de escuro (envoltos em papel alumínio) (Figuras 1D e E). Os tratamentos controles consistiram na agitação em água destilada e autoclavada pelos mesmos períodos e nas mesmas condições (tabela 1). Acrescentou-se a todas as soluções uma gota de agente surfactante Tween (20%). Para cada tratamento foram realizadas 25 repetições.

Tabela 1. Tratamentos para indução de poliploidia

Tratamento	Concentração de colchicina (%)	Tempo de exposição (h)
T1	0	12
T2	0,125	12
T3	0,25	12
T4	0	24
T5	0,125	24
T6	0,25	24

Após exposição à colchicina, os explantes foram enxaguados por três vezes em água destilada autoclavada e inoculados em meio de cultura WPM (Lloyd e McCown 1980) suplementado com 0,5mg.L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP), 0,05mg.L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA) e 30g.L⁻¹ de sacarose (Brondani 2012) (Figura 1F). Os explantes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura e luminosidade controladas (25±2°C; irradiância de 42 µmol.m⁻².s⁻¹ de radiação fotossinteticamente ativa (PAR), fotoperíodo de 16 horas) por 60 dias e as transferências para renovação dos meios de cultura foram realizadas a cada 30 dias. Após este período, avaliou-se a sobrevivência e regeneração dos explantes (emissão de brotações).

4.5. Detecção de poliploides

Para a primeira identificação dos explantes poliploizados, pelo menos duas folhas das brotações emitidas pelos explantes submetidos aos tratamentos com colchicina foram analisadas por citometria de fluxo para detectar as possíveis alterações no nível de ploidia. Esta análise foi realizada no Laboratório de Bioctenologia do Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Citros “Sylvio Moreira” (IAC), em Cordeirópolis – SP.

Para tanto, as suspensões nucleares foram preparadas de acordo com o seguinte procedimento: segmentos de folha foram macerados de 30 a 50 vezes com auxílio de uma lâmina de aço afiada (lâmina de barbear), em uma placa de Petri de vidro contendo 300 µL de tampão de extração Marie's (50 mM glucose, 15 mM NaCl, 15 mM KCl, 5 mM EDTA Na₂, 50 mM sodium citrate, 0.5% Tween 20, 50 mM HEPES, pH 7.2; Marie e Brown 1993), acrescido de 1% de polivinilpirrolidona (PVP). Em seguida, acrescentou-se 600 µL de tampão de coloração Cy Stain UV precise P (PARTEC GmbH.), que usa DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) como fluorocromo. Após a adição de 300 µL de água ultrapura, toda a solução foi filtrada em filtro 30 µm. O filtrado foi mantido no gelo e escuro por um período mínimo de 15 min.

As leituras foram feitas em citômetro CyFlow Ploidy Analyser (Partec GmbH, Alemanha) que utiliza a luz UV-LED (365 nm), ajustado para detecção de fluorescência com ganho de 580 e Low Level (LL) igual a 0,70. Um mínimo de 1.000 núcleos foram avaliados em cada amostra, com análise no software CyView (PARTEC GmbH, Germany). Nos histogramas obtidos, a ploidia de cada amostra foi determinada comparando-se o pico G1 da amostra em função do pico G1 da amostra-controle, não tratada com colchicina.

Para as análises de monitoramento da ploidia durante o cultivo *in vitro* (durante a etapa de alongamento *in vitro* - item 4.6.2) e confirmação da ploidia das mudas aclimatizadas (item 4.6.3), os mesmos procedimentos foram adotados.

4.6. Micropropagação dos explantes poliploidizados

4.6.1. Multiplicação

Os explantes poliploidizados foram micropropagados para a obtenção de mudas individualizadas ao final do processo, seguindo protocolo de micropropagação estabelecido para outras espécies de eucaliptos no Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas, com modificações (Brondani, 2012). Para tanto, as brotações poliploides foram numeradas de 1 a 16, para facilitar a identificação durante o cultivo *in vitro*, sendo que o conjunto de microcepas estabelecidas a partir do respectivo explante, foi posteriormente denominado “clone”.

A fase de multiplicação *in vitro* consistiu no subcultivo das brotações poliploidizadas (figura 2A) em meio de cultura WPM (Lloyd e McCown 1980) suplementado com $0,5\text{mg.L}^{-1}$ de BAP, $0,05\text{mg.L}^{-1}$ de ANA e 30g.L^{-1} de sacarose para formação de microcepas (figura 2B), com transferências para a renovação do meio de cultura a cada 28 dias (Brondani 2012).

Figura 2. Etapas da micropropagação de *E. urophylla* poliploidizado. A. Explante com brotações poliploidizadas; B. Microcepa estabelecida na fase de multiplicação *in vitro*; C. Microcepa em início da fase de alongamento *in vitro*, evidenciando as folhas das microestacas utilizadas na segunda análise de citometria de fluxo (setas vermelhas).

4.6.2. Alongamento

Ao décimo subcultivo (280 dias), as microcepas estabelecidas foram transferidas para meio de cultura WPM (Lloyd e McCown 1980) suplementado com $0,05\text{mg.L}^{-1}$ de BAP, $0,1\text{mg.L}^{-1}$ de ANA e 30g.L^{-1} de sacarose para indução de alongamento das brotações (microestacas).

Após um subcultivo neste meio, microestacas (figura 2C) de cada clone foram selecionadas aleatoriamente e novamente analisadas por citometria de fluxo. O número de microestacas analisadas variou entre os clones devido ao seu desempenho durante o cultivo *in vitro*. Nesta análise, foram utilizadas duas folhas de nós consecutivos de cada microestaca (setas vermelhas, figura 2C), as quais foram processadas e analisadas conforme descrito no item 4.5.

4.6.3. Aclimatização das microestacas

As microcepas que apresentaram brotações tetraploides e mixoploides foram mantidas, por mais quatro subcultivos, em meio de cultura de alongamento ($0,05\text{mg.L}^{-1}$ de BAP, $0,1\text{mg.L}^{-1}$ de ANA e 30g.L^{-1} de sacarose) para a obtenção de mais microestacas a serem coletadas para aclimatização.

Estas foram coletadas com aproximadamente 1,5 cm e plantadas em bandejas de células ($12\text{ cm}^3/\text{célula}$) contendo substrato composto pela mistura de substrato comercial (Basaplant Florestal®) e vermiculita expandida (2:1) autoclavado por 30 minutos a pressão de 1 atm (ou 120°C) e armazenadas em embalagens plásticas com tampa transparente, consistindo um sistema de miniestufa (figura 3A). As miniestufas foram mantidas em sala de crescimento sob temperatura, fotoperíodo e luminosidade controladas, por 30 dias, com irrigação manual diária.

Posteriormente, as microestacas enraizadas foram transferidas para tubetes plásticos (55 cm³) e conduzidas à casa de sombra, dentro de potes plásticos e envoltas em saco plástico, mantendo o sistema de miniestufa por mais 30 dias (figura 3B). Durante este período, os tubetes receberam fertirrigação manual semanal. Decorridos os 30 dias, os sacos plásticos foram retirados e os tubetes foram mantidos em casa de sombra com sistema de irrigação por aspersão por mais 30 dias (figura 3C). Após este período, as mudas obtidas foram dispostas em bandejas e levadas a pleno sol, no viveiro pertencente ao Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais/ IPEF, em Piracicaba (figura 3D).

Uma vez aclimatizadas, as mudas foram submetidas à nova análise de citometria de fluxo (item 4.5) para a confirmação individual do nível de ploidia. Nesta análise, foram consideradas as quatro primeiras folhas, a contar do ápice para a base do ramo de cada muda.

Figura 3. Etapas da aclimatização de *E. urophylla* poliploidizados. A. Miniestufas armazenadas em sala de crescimento; B. Transplante para tubete com manutenção do sistema de miniestufa; D. Mudanças em fase de rustificação, em casa de sombra; E. Mudanças a pleno sol.

4.7. Comparação morfológica externa e interna

Após três meses em condições de pleno sol, mudas identificadas como diploides, tetraploides e mixoploides foram utilizadas para fazer a comparação de parâmetros morfológicos e anatômicos entre as ploidias. Para tanto, utilizou-se quatro mudas diploides e quatro tetraploides pertencentes a dois clones (clones 2 e 13), quatro mudas diploides de um clone controle e quatro mudas mixoploides do clone 14 (figura 4). A escolha destes genótipos para a comparação foi baseada nos resultados obtidos ao longo da micropropagação, conforme item 5.3.

Figura 4. Delineamento experimental das análises morfológicas e anatômicas realizadas nas mudas de *E. urophylla* para a comparação entre as ploidias, com relação aos caracteres morfológicos (conforme item 4.7.1), às características estomáticas (conforme item 4.7.2) e anatômicas (conforme item 4.7.3). Legenda: comprimento das mudas (CM); comprimento dos entrenós (CE); comprimento foliar (CF); largura foliar (LF); relação largura/comprimento foliar (LF/CF); área foliar (AF); diâmetro polar (DPl); diâmetro equatorial (DEq); relação diâmetro polar e diâmetro equatorial (DP/DE).

4.7.1. Análises morfológicas

Para as análises morfológicas, foram mensurados o comprimento das mudas (CM) e comprimento dos entrenós (CE), bem como o comprimento foliar (CF), largura foliar (LF), sendo posteriormente calculada a relação largura/comprimento foliar (LF/CF) das três folhas totalmente expandidas das quatro mudas de cada genótipo, a contar do ápice para a base do ramo. As folhas foram fotografadas e as fotos utilizadas para obter a área foliar (AF) utilizando o programa Quant® (Vale et al. 2003).

4.7.2. Análises estomáticas

A análise dos estômatos foi realizada através da técnica de impressão epidérmica (Segatto et al. 2004). Para tanto, utilizou-se o terço mediano esquerdo (TME) sem a nervura principal, das primeiras três folhas totalmente expandidas (figura 5) a contar do ápice para a base dos ramos. Cada folha ou fragmento foi impresso sobre películas de éster de cianoacrilato (Adesivo Instantâneo Universal – Loctite®) e pressionados por aproximadamente dez segundos, tempo necessário para o adesivo se espalhar e moldar a superfície da folha (Segatto et al. 2004).

As lâminas foram analisadas e fotomicrografadas em microscópio de luz (ZEISS-JENEMED2®) sendo todas as imagens capturadas na mesma escala com câmera Premiere® MA88-300.

Para a determinação da densidade estomática (Des) das folhas, foram fotografados, aleatoriamente, cinco campos de cada impressão epidérmica, com área foliar correspondente a 0,04 mm², dentro dos quais foram mensurados o número de estômatos (6 genótipos x 4 mudas x 3 folhas por muda x 5 campos de visão por folha), sendo posteriormente, calculado o número de estômatos por 1 mm². Para a mensuração do tamanho dos estômatos, foram medidos os diâmetros polar (DPl) e equatorial (Deq) de três estômatos aleatórios dentro de um campo de visão de cada folha (6 genótipos x 4 mudas x 3 folhas por muda x 3 estômatos por folha), sendo posteriormente calculada a relação entre o diâmetro polar e o diâmetro equatorial (DP/DE).

Figura 5. Fragmentos da segunda folha de mudas de *E. urophylla* coletados e utilizados para obter as impressões epidérmicas (TME) e os cortes histológicos (TMD).

4.7.3. Análise da anatomia foliar

Para a confecção das lâminas hitológicas, utilizou-se o terço mediano direito (TMD) com a nervura principal (figura 5) exclusivamente da segunda folha totalmente expandida, a contar do ápice para a base dos ramos.

Para tanto, as amostras foram coletadas e fixadas em solução de Karnovsky (1965), posteriormente desidratados em série etílica crescente (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 80, 90 e 100% v/v) e inclusas em resina de hidroxietilmetacrilato (LEICA-HISTORESIN®), conforme recomendações do fabricante.

Os blocos contendo os fragmentos foram cortados em secções transversais com aproximadamente 5µm utilizando micrótomo manual. Os cortes obtidos foram submetidos à dupla coloração com ácido periódico de Shiff (PAS) e naftol blue-black (Fisher 1968; Almeida et al. 2012) e dispostos em lâminas histológicas com resina sintética (Entellan®).

As lâminas histológicas foram fotomicrografadas em microscópio de luz (ZEISS-JENEMED2®) sendo as imagens capturadas na mesma escala com câmera Premiere® MA88-300.

As fotomicrografias obtidas foram utilizadas para quantificar a espessura total da lâmina foliar (EFT), bem como a espessura de cada tecido componente: mesofilo total (Meso), epiderme adaxial (EpAd), parênquima paliçádico (PP), parênquima lacunoso (PL) e epiderme abaxial (EpAb); e também para o cálculo da área ocupada pelos tecidos nas secções foliares, por meio de adaptações da técnica usual do programa Quant® (Vale et al. 2003). Para tanto, utilizou-se um fragmento das fotomicrografias correspondente a 200 µm de comprimento em uma região do limbo foliar ausente de feixes vasculares; e um fragmento de 1000 µm na região da nervura central para o cálculo da área dos tecidos vasculares. Os tecidos foliares quantificados foram: epiderme adaxial (EpAd), parênquima paliçádico (PP), parênquima lacunoso (PL), o espaço intercelular do parênquima lacunoso (EI) e epiderme abaxial

(EpAb), bem como o xilema (Xi), floema (Fl) presente na nervura central. Uma folha de cada muda de cada genótipo foi analisada (6 genótipos x 4 mudas x 1 folha por muda).

4.7.4. Análises estatísticas

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o programa R, comparando-se as médias pelo teste LSD (Least significant difference) a 5% de probabilidade de erro. Para verificar as correlações entre as variáveis avaliadas foi realizada uma análise do coeficiente de Pearson.

Para as variáveis de densidade estomática (DEs), diâmetro equatorial (DEq), diâmetro polar (DPl), espessura foliar (EF), área do mesófilo (AMeso), área dos parênquimas paliçádico (APP) e lacunoso (APL) e área do espaço intercelular do parênquima lacunoso (EI) foi realizada uma análise de componentes principais.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Elevadas taxas de mortalidade são esperadas em experimentos utilizando colchicina, alcalóide tóxico que, se utilizado por tempo prolongado e em elevadas concentrações, pode ser letal (Hamill et al. 1992, Dhooghe et al. 2011), variando de acordo com a espécie. Como observado por diversos autores, estas podem ultrapassar os 70%, quando utilizadas diferentes concentrações e diferentes períodos de exposição. Silva (2014) induzindo poliploidia *in vitro* em segmentos nodais de mandioca, verificou percentual de mortalidade de 86% utilizando a concentração de 0,15% de colchicina por 48 horas. Sajjad e colaboradores (2013) obtiveram taxa de mortalidade de 72,74% tratando segmentos nodais de cravo (*Tagetes erecta*) com concentração de 0,05% de colchicina durante 12 horas. Xie e colaboradores (2015) verificaram máxima de 71% de mortalidade quando utilizaram a concentração de 0,05% por 72 horas em gemas apicais de um híbrido interespecífico de uva. Em alguns casos, a mortalidade pode atingir 100% quando se utiliza concentrações muito elevadas, como observado por Gantait e colaboradores (2011), que aplicaram a concentração de 1% de colchicina em brotações de *Gerbera jamesonii*; por Zhang e colaboradores (2010) em *Lagerstroemia indica*, uma espécie arbórea ornamental, utilizando concentrações de 0,6% e 0,8% de colchicina e por Aleza e colaboradores (2009) ao aplicar 0,5% de colchicina em explantes de citros.

Neste experimento, a colchicina demonstrou ser tóxica aos explantes de *E. urophylla*, uma vez que as taxas de mortalidade aumentaram conforme o aumento da concentração de colchicina e tempo de exposição (tabela 2). Nos tratamentos com exposição de 12 horas, por exemplo, a taxa de mortalidade passou de 40% no tratamento de menor concentração (0,125%) para 72% no tratamento de maior concentração (0,250%). Nos tratamentos de 24 horas, a taxa de mortalidade passou de 84% na menor concentração, para 88% na maior.

Tabela 2. Dados referentes aos tratamentos de indução de poliploidia.

Tratamento	Concentração (%)	Tempo (horas)	Explantes tratados	Explantes regenerados	Mortalidade ¹ (%)	Explantes poliploidizados			Eficiência ² (%)
						2x+4x	4x	8x	
T1	0	12	25	20	20	0	0	0	0
T2	0,125	12	25	15	40	5	2	0	28
T3	0,250	12	25	7	72	1	2	1	16
T4	0	24	25	18	28	0	0	0	0
T5	0,125	24	25	4	84	3	0	0	12
T6	0,250	24	25	3	88	2	0	0	8
Subtotais			150			11	4	1	10,7

¹ Mortalidade = (Número de explantes tratados - Número de explantes regenerados) / número de explantes tratados × 100

² Eficiência = Número de explantes tratados / número de explantes poliploidizados × 100

Essa relação proporcional entre a taxa de mortalidade, concentração e o tempo de exposição ao agente anti-mitótico é comumente relatada nos trabalhos de indução *in vitro* de poliploidia de diversas culturas, tais como *Lagerstroemia indica* (Zhang et al. 2010), *Paulownia tomentosa* (Tang et al. 2010); *Eucalyptus globulus* (Lin et al. 2010), *Gerbera jamesonii* (Gantait et al. 2011) *Centella asiatica* (Kaensaksiri et al. 2011), *Anthurium andraeanum* (Chen et al. 2011), *Asparagus officinalis* (Carmona-Martín et al. 2015), o híbrido *Vitis × Muscadinia* (Xie et al. 2015), *Thymus persicus* (Tavan et al. 2015), o que é coerente com a ação tóxica da colchicina.

Na indução à poliploidia *in vitro* de *E. globulus*, por exemplo, as taxas de mortalidade variaram de 10 a 60% conforme o aumento da concentração e tempo de exposição (Lin et al. 2010). Neste caso, os autores utilizaram concentrações e tempos de exposição bastante superiores aos avaliados neste trabalho (0,2; 0,3; 0,4 e 0,5% de colchicina durante 2, 3, 4 e 5 dias), principalmente em relação à escala do tempo de exposição (em dias) e ainda assim obtiveram uma taxa de mortalidade máxima inferior a encontrada neste experimento (88%). Ao induzir poliploidia em *Paulownia tomentosa*, uma espécie lenhosa ornamental, Tang e colaboradores (2010) também verificaram essa relação, na qual as taxas de mortalidade variaram de 9,2%, quando utilizaram menores concentrações colchicina por menores períodos de tempo, a 100%, quando utilizaram maiores concentrações durante longos períodos.

Além da concentração e tempo de exposição das plantas em colchicina, o tipo do explante utilizado também deve ser considerado como uma importante variável nos procedimentos de indução de poliploidia *in vitro*. Inúmeros explantes tem sido avaliados para a indução de poliploidia em diversas espécies, como revisado por Dooghe e colaboradores (2011), que respondem de diferentes formas com relação às taxas de mortalidade, regeneração e eficiência de duplicação cromossômica. Lin e colaboradores (2010) compararam a toxicidade dos tratamentos com colchicina em aglomerados de brotações (microcepas) e em brotações isoladas de *E. globulus*, verificando taxas de mortalidade menores e melhor regeneração para os aglomerados.

Todavia, neste trabalho, mesmo nos tratamentos isentos de colchicina, ocorreu mortalidade de explantes, que variando de 20% no tratamento controle por 12 horas, a 28% no mesmo tratamento por 24 horas (tabela 2). Taxas similares foram encontradas por Silva (2014) em tratamentos controle sob agitação, conduzindo a ideia de que a mortalidade ocorreu em função do estresse mecânico que os explantes foram submetidos.

A comprovação da indução de poliploidia pode ser feita por meio de diferentes métodos, sendo a citometria de fluxo o mais utilizado, seguida da contagem dos cromossomos (Dooghe et al. 2011). A citometria de fluxo apresenta vantagens em relação à contagem dos cromossomos em especial para análises da poliploidização *in vitro*, pois não requer raízes ou plantas aclimatizadas, permitindo a análise das amostras em estádios de desenvolvimento precoces, importante para economizar tempo e espaço (Väinölä 2000). Esta é uma técnica comum nas análises de ploidia de plantas (Dolezel et al. 2007; Eeckhaut et al. 2005) e até 2010 foi utilizada como método de identificação de poliploides em 63% dos trabalhos desta natureza (Dooghe et al. 2011). Neste trabalho, as brotações com 60 dias, ainda apresentavam tamanho reduzido e ausência de raízes, impossibilitando dessa forma, a certificação da indução pela contagem de cromossomos. Assim, citometria de fluxo representou a forma mais adequada para a identificação dos explantes poliploidizados neste estágio de desenvolvimento e possibilitou a classificação em diploides, poliploides puros e mixoploides (figura 6). Como resultado, obteve-se a identificação de 16 explantes poliploidizados, sendo 11 mixoploides, quatro tetraploides e um octaplóide (tabela 2).

Figura 6. Histogramas do conteúdo de DNA nuclear gerados pela análise de citometria de fluxo em amostras de explantes diploides, 2C (A), mixoploides, 2C+4C (B), tetraploides, 4C (C) e octaplóide, 8C (D) de *E. urophylla*.

No caso dos mixoploides, diferentes proporções de células diploides e tetraploides foram detectadas. Nos histogramas gerados pelo citometro de fluxo, o tamanho dos picos formados mostra esta proporção (figura 7). Dois dos explantes mixoploides apresentaram um número equilibrado de células diploides e tetraploides (figura 7A), com histograma apresentando dois picos de tamanhos similares, enquanto que nos nove restantes, esta proporção foi predominantemente de células diploides (figura 7B), com pico diploide maior que o pico tetraploide.

Figura 7. Histogramas do conteúdo de DNA nuclear gerados pela análise de citometria de fluxo de amostras de explantes mixoploides de *E. urophylla* evidenciando as diferentes proporções de células diploides e tetraploides. A. proporção equilibrada de células diploides e tetraploides observada em dois dos mixoploides; B. maior proporção de células diploides observada na maioria dos mixoploides.

O sucesso de um procedimento de indução de poliploidia *in vitro* se encontra no limite entre a toxicidade e a eficácia da duplicação cromossômica (Dooghe et al. 2011). A aplicação de tratamentos com concentrações reduzidas ou por períodos curtos de exposição podem resultar em elevadas taxas de sobrevivência, entretanto, não promovem a duplicação cromossômica (Dooghe et al. 2011; Gantait et al. 2011). Por outro lado, elevadas concentrações e períodos de exposição, além de resultarem em letalidade, também podem causar a reduplicação dos cromossomos, ocasionando a formação de células com níveis de ploidia maiores que o desejado (Allum et al. 2007; Dooghe et al. 2011), assim como observado no tratamento T3, o qual promoveu a indução de um explante octaplóide (tabela 2).

Não existe na literatura um consenso para a definição do tratamento mais adequado para a indução, ocorrendo divergências na realização do cálculo da eficiência dos tratamentos. Enquanto alguns grupos de pesquisa consideram a eficiência como a porcentagem do número de explantes induzidos em relação ao número de explantes sobreviventes ou regenerados (Tang et al. 2010; Silva 2014; Xie et al. 2015), outros, da mesma forma que optamos neste trabalho, consideram o número de plantas induzidas em relação ao número de plantas tratadas (Notsuka et al. 2000; Dooghe et al. 2011; Gantait et al. 2011).

Portanto, neste trabalho, ao considerarmos o número de poliploides obtidos e o número de explantes tratados, observamos a eficiência máxima de 28% (tabela 2) no tratamento T2 (0,125% por 12 horas de exposição). Em sua revisão sobre indução de duplicação cromossômica *in vitro*, Dooghe e colaboradores (2011) ressaltaram que as taxas de eficiência dos tratamentos encontradas nos diversos trabalhos variam entre 15 e 55%, um intervalo amplo que se deve principalmente às diferenças nas formas de avaliação pelos pesquisadores.

Cabe aqui ressaltar que, o tratamento T5 (0,125% por 24 horas de exposição) promoveu a indução de três poliploides em quatro dos explantes regenerados, o que resultaria em uma eficiência de 75% deste tratamento, se

apenas explantes regenerados fossem considerados no cálculo da eficiência. Entretanto, este tratamento também resultou em elevada taxa de mortalidade (84%), representando uma desvantagem em relação ao tratamento T2. Isso significa que, para se obter o mesmo número de explantes poliploidizados pela aplicação do tratamento T2, seria necessário iniciar o procedimento de indução com um número de explantes muito maior, utilizando a combinação do tratamento T5.

A eficiência de indução dos tratamentos também pode variar de acordo com as espécies. Considerando outros trabalhos de indução de poliploidia *in vitro* em outras espécies de eucalipto, Han e colaboradores (2011) obtiveram uma máxima de 51% de indução em um clone de *E. grandis* quando utilizaram tratamento com 0,21% de colchicina por 26,2 horas de exposição sob agitação, valores que inspiraram a determinação das concentrações e tempo de exposição testados neste trabalho. Para *E. globulus*, no entanto, uma taxa de indução de 36,7% foi obtida utilizando a combinação de 0,5% de colchicina por quatro dias de exposição (Lin et al. 2010), concentração e tempo de exposição muito superiores aos utilizados neste trabalho.

Vale salientar também que, além da variação entre as espécies, a eficiência dos procedimentos de indução de poliploidia *in vitro* é genótipo-dependente, como já observado em outras espécies, como mandioca (Silva 2014), orquídea (Silva et al. 2000), rosa (Khosravi et al. 2008), tulipa (Chauvin 2005), inferindo que toda cultura requer testes preliminares para a determinação do tratamento adequado.

Outro fator que gera dúvidas no cálculo da eficiência dos tratamentos é a inclusão ou não do número de mixoploides obtidos (Dooghe et al. 2011). Adaniya e Shirai (2001) separaram os mixoploides de gengibre em dois tipos: aqueles que apresentaram células diploides e tetraploides em um mesmo primórdio foliar, daqueles que apresentaram ramos completamente diploides e ramos completamente tetraploides em uma mesma planta (denominadas quimeras setoriais). Dessa forma, para o cálculo da eficiência dos tratamentos, os autores consideraram quimeras setoriais como explantes induzidos e mixoploides como explantes não induzidos. Neste trabalho, entretanto, os resultados obtidos, não possibilitaram fazer a separação inicial das quimeras, uma vez que as brotações apresentavam tamanho bastante reduzido. Além disso, o número de mixoploides foi superior ao de poliploides puros, sendo que, em alguns tratamentos apenas mixoploides foram gerados (tabela 2). Dessa forma, tanto poliploides puros quanto mixoploides foram considerados no cálculo da eficiência dos tratamentos, uma vez que a partir de uma microcepa mixoploide, o cultivo *in vitro* permitiu de forma rápida, selecionar e isolar novas brotações, facilitando a separação entre os ramos diploides e tetraploides, quando existentes.

Apesar da efetividade do método, é de conhecimento que a utilização de colchicina na indução de poliploidia gera grande quantidade de material mixoploide (Pei 1985). Além disso, a colchicina e outros agentes anti-mitóticos agem de forma eficiente somente em células que estão em divisão, e consequentemente, pode não agir de forma uniforme em todas as células ou camadas de células que constituem o tecido meristemático do material tratado (Dolezel et al. 1994; Carvalho et al. 2005). Por esse motivo, as plantas mixoploides podem sofrer reversão parcial ou total da condição diploide após alguns ciclos de divisão, devido à proliferação das células diploides remanescentes que se multiplicam a taxas superiores às poliploides (Pio 2008).

A estabilização dos setores poliploidizados e a obtenção de plantas completamente tetraploides, muitas vezes só é alcançada após a realização de propagações clonais sucessivas da planta quimérica (Medri e Lleras 1981). Para obtenção de indivíduos totalmente poliploides, devem-se isolar as gemas laterais de folhas comprovadamente poliploides, eliminando-se todos os demais crescimentos no ramo examinado (Dermen e Diller 1962).

As brotações, após serem classificadas em tetraploides e mixoploides foram isoladas e submetidas à multiplicação *in vitro*, para obtenção de microcepas e posterior produção de mudas. A nomenclatura adotada para sua

identificação e do conjunto de microcepas estabelecidas durante a micropropagação (clones) está relacionada na tabela 3.

Tabela 3. Nomenclatura das brotações classificadas de acordo sua ploidia e seu tratamento de origem; nomenclatura adotada ao conjunto de microcepas formadas a partir de cada brotação durante a micropropagação.

Identificação	Tratamento de origem	Ploidia	Clones
Brotação 1	T2 0,125% / 12horas	mixoploide	Clone 1
Brotação 2		mixoploide	Clone 2
Brotação 3		mixoploide	Clone 3
Brotação 4		mixoploide	Clone 4
Brotação 5		tetraploide	Clone 5 ^(†)
Brotação 6		mixoploide	Clone 6
Brotação 7		tetraploide	Clone 7 ^(†)
Brotação 8	T3 0,250% / 12 horas	mixoploide	Clone 8 ^(†)
Brotação 9		tetraploide	Clone 9 ^(†)
Brotação 10		octaplóide	Clone 10 ^(†)
Brotação 11		tetraploide	Clone 11
Brotação 12	T5 0,125% / 24 horas	mixoploide	Clone 12
Brotação 13		mixoploide	Clone 13
Brotação 14		mixoploide	Clone 14
Brotação 15	T6 0,250% / 24horas	mixoploide	Clone 15 ^(†)
Brotação 16		mixoploide	Clone 16

O símbolo ^(†) representa os clones que não sobreviveram ao longo dos subcultivos *in vitro*.

As figuras 8-11 mostram o desenvolvimento das microcepas de cada um dos clones poliploidizados ao longo dos 3º, 6º e 9º subcultivo. Nota-se que, alguns clones apresentaram microcepas mais densas, formadas predominantemente por brotações com entrenós curtos e de tamanho reduzido, como observado nos clones 1, 2, 12, 14 e 16 (figura 8) enquanto que os clones 3, 4, 6 e 13 (figura 9) apresentaram brotações maiores com entrenós mais alongados. É provável que essa variação seja decorrente da variabilidade genética devido a sua origem seminal, do que sua ploidia.

Embora o protocolo de micropropagação adotado neste trabalho garanta boas respostas do material durante o cultivo *in vitro*, algumas perdas ocorreram ao longo dos subcultivos. Os explantes 7, 8, 9, 10 e 15 foram descartados logo após o terceiro subcultivo devido à necrose do tecido e manifestações bacterianas; o clone 5 por sua vez, permaneceu em multiplicação até o sexto subcultivo *in vitro*, porém, também foi descartado após contaminação bacteriana (figura 10).

Figura 8. Microcepas dos clones 1 (A-C), 2 (D-F), 12 (G-H), 14 (J-L) e 16 (M-O) ao longo do 3º, 6º e 9º subcultivos, respectivamente.

Figura 9. Microcepas dos clones 3 (A-C), 4 (D-F), 6 (G-I) e 13 (J-L) ao longo do 3º, 6º e 9º subcultivos, respectivamente.

Figura 10. Clones descartados. Clone 5 em 3º e 6º subcultivo (A e B) e clones 7 (C), 8 (D), 9 (E), 10 (F) e 15 (G) ao 3º subcultivo.

Alguns clones multiplicaram mais que outros, evidenciando que cada genótipo responde diferentemente às condições estabelecidas, conduzindo-nos a acreditar que são necessários ajustes para otimização do protocolo de cada um dos genótipos, corroborando, dessa maneira, com Almeida (2012), Brondani (2012), Cordeiro et al (2014) e Oliveira (2014), que afirmam a genótipo-dependência dos protocolos de micropropagação de espécies eucaliptos. A micropropagação é definida de forma ampla, como a técnica que proporciona a obtenção maciça de indivíduos, facilitando, sobremaneira, o desenvolvimento de protocolos para os mais diferentes objetivos. Entretanto, há de se saber que, apesar de apresentar enorme potencial, muitas espécies, ou mesmo clones de uma mesma espécie, apresentam-se recalcitrantes à técnica *in vitro*, o que pode tornar o processo lento e oneroso. Em função disso, recomenda-se que antes de se iniciar um projeto que envolva a micropropagação, deve-se determinar, em primeira mão, o protocolo para obtenção de propágulos da espécie ou mais especificamente do clone estudado.

As condições de cultivo *in vitro* são padronizadas e controladas (Dhooghe et al. 2011), o que facilita estabelecer a eficiência da duplicação cromossômica ou poliploidização dos propágulos. O sucesso da poliploidização, como comentado anteriormente, depende da concentração e do tempo de exposição ao anti-mitótico, do tipo de explante (estádio de desenvolvimento da planta que será submetida aos tratamentos) e dos genótipos, que poderão ou não responder aos tratamentos aplicados (Dhooghe et al. 2011; Slatter et al. 2016).

A poliploidia pode induzir um desenvolvimento fisiológico lento da planta (Allard 1971) e devido ao próprio aumento do tamanho das células decorrente do aumento do volume do núcleo, pode acarretar a redução do número de divisões celulares durante o desenvolvimento (Otto, 2007). Esta característica foi observada no desenvolvimento do clone 11, identificado como tetraploide (figura 11), que apresentou um comportamento atípico durante a fase de multiplicação ao longo dos subcultivos quando comparado aos demais. Observou-se uma regeneração lenta das gemas, acarretando no aumento de subcultivos para se desenvolverem, não atingindo os resultados observados nos outros clones. Além disso, ainda em relação ao clone 11, quando uma pequena microcepa se estabelecia, parte dela apresentava necrose (figura 11D) entre um e outro subcultivo, restando poucas partes vivas que foram transferidas para novo meio de cultura, na tentativa de reestabelecimento das mesmas, semelhantemente ao relatado por Gmitter e colaboradores (1991) em seu trabalho com variedades de *Citrus*, no qual observaram que a maioria das culturas de calos tratados com colchicina cessou sua proliferação e tornou-se gradualmente de cor marrom escuro, conseguindo recuperar algumas partes que se localizavam nas superfícies aérea e bordas dos calos. Desse modo, até o final da etapa de multiplicação o clone 11 gerou apenas duas brotações, não sendo possível também a produção de mudas deste material.

Figura 11. Desenvolvimento do clone 11 ao longo do 3º (A), 6º (B) e 9º (C) subcultivos, evidenciando a necrose da microcepa (D).

Os resultados obtidos neste trabalho não permitiram visualizar diferenças morfológicas *in vitro* entre as plantas diploides e tetraploides, diferentemente do observado por Lin e colaboradores (2010), que, apesar de não

terem realizado nenhum tipo de avaliação quantitativa para mensurar os resultados obtidos, afirmaram que plantas tetraploides e diploides *in vitro* de *E. globulus*, apresentavam diferenças evidentes entre elas, como tamanho, espessura e coloração mais intensa das folhas das microcepas tetraploides em relação às diploides.

Apesar de simples, avaliações morfológicas e anatômicas que demonstrem a duplicação cromossômica são frequentemente imprecisas (Zlesak et al. 2005 *apud* Dooghe et al. 2011) e, embora parâmetros morfológicos possam ser utilizados como um critério preliminar de seleção de poliploides, como utilizado em diversos trabalhos de indução, a confirmação sempre se faz necessária (Dooghe et al. 2011). Na indução de poliploidia *in vitro* de *Lagerstroemia indica*, por exemplo, somente metade das plantas selecionadas por meio de caracteres morfológicos foi confirmada serem tetraploides; a outra metade consistia apenas de mixoploides (Zhang et al. 2010).

Neste trabalho, a separação baseada na comparação das características morfológicas das microcepas estabelecidas a partir de explantes diploides (obtidos nos tratamentos controle) não seria viável, uma vez que os explantes utilizados foram provenientes de sementes e as diferenças poderiam ser dadas em função da variabilidade genética e não do nível de ploidia.

Dessa forma, ao longo do décimo subcultivo, após passarem por um subcultivo de alongamento, os conjuntos de microcepas foram analisados, mais uma vez, por citometria de fluxo para o monitoramento das ploidias obtidas no explante original, através da seleção de microestacas desenvolvidas a partir de cada clone. O número de microestacas analisadas por clone variou devido à variação da quantidade de microcepas estabelecidas e do número de microestacas alongadas até o momento.

Com os resultados (tabela 4), verificou-se que: o clone 11 manteve-se tetraploide ao longo dos subcultivos, o que explica a sua multiplicação mais lenta e difícil estabelecimento da microcepa; os clones 3, 14 e 16 mantiveram-se mixoploides ao longo dos subcultivos *in vitro*; houve uma reversão da condição de mixoploide para diploide nos clones 1 e 6; nos clones 4 e 12, foram isolados setores tetraploides após a micropropagação do material mixoploide; e nos clones 2 e 13, obteve-se tanto setores diploides quanto tetraploides, a partir de um mesmo material mixoploide.

Tabela 4. Número de brotações analisadas e identificadas como diploides (2x), mixoploides (2x+4x) e tetraploides (4x) na segunda citometria de fluxo, de cada clone.

Clone	1ª citometria (explante)	2ª citometria (brotações)			
		Nº de brotações analisadas	Ploidia		
			2x	2x+4x	4x
clone 1	mixoploide	1	1	0	0
clone 2	mixoploide	4	1	1	2
clone 3	mixoploide	5	0	5	0
clone 4	mixoploide	4	0	0	4
clone 6	mixoploide	2	2	0	0
clone 11	tetraploide	2	0	0	2
clone 12	mixoploide	1	0	0	1
clone 13	mixoploide	14	2	8	4
clone 14	mixoploide	3	0	3	0
clone 16	mixoploide	1	0	1	0

Os mixoploides (ou quimeras) são motivos de estudo de diversos grupos de pesquisa que trabalham no desenvolvimento de protocolos de regeneração, para a obtenção de poliploides puros a partir de plantas quiméricas,

como já visto em *Musa* spp. (Roux et al. 2001), *Humulus lupulus* (Roy et al. 2001) e *Astragalus membranaceus* (Chen e Gao 2007).

Três tipos de quimeras são conhecidos: setoriais, periclinais e mericlinais (Marcotrigiano 1997 *apud* Burge et al. 2002). Para melhor compreender essa divisão, primeiramente é necessário recordar que nas plantas superiores, os meristemas caulinares são formados por três camadas de células (L1, L2 e L3). As camadas L1 e L2 compõem a túnica e originam, através de divisões predominantemente anticlinais, a epiderme e os tecidos sub-epidérmicos, respectivamente; a camada L3 compõe o corpo, que por divisões celulares orientadas em todos os planos, formam os tecidos centrais (Savaldi-Goldstein e Chory 2008; Dickison 2016). A primeira prova de que as três camadas do meristema são mantidas como entidades separadas e que as células derivadas de cada uma são encontradas no meristema veio do estudo de quimeras induzidas com colchicina em *Datura* (Savaldi-Goldstein e Chory 2008; Dickison, 2016).

A classificação das quimeras é baseada no arranjo espacial das células geneticamente diferentes em cada camada. Assim, quimeras setoriais apresentam apenas um setor do meristema apical (abrangendo as três camadas) formado por células com genoma diferente do restante da planta (figura 12A). No caso das periclinais, apenas uma ou duas das camadas apresentam-se inteiramente compostas por células geneticamente diferentes (figura 12B). As quimeras mericlinais, por sua vez, possuem parte de apenas uma ou duas camadas com células geneticamente diferentes (figura 12C) (Burge et al. 2002).

No caso de quimeras na indução de poliploides, a colchicina pode ter penetração completa, até atingir a camada L3 formando poliploides puros (figura 12D), ou parcial, levando à formação dos diferentes tipos de quimeras.

Figura 12. Diagrama da organização do meristema apical em quimeras setoriais (A), periclinais (B) e mericlinais (C) e em meristemas totalmente mutados (D). A área azul representa a área de células geneticamente diferentes das demais e os círculos representam cada camada (L1, L2 e L3). Adaptado de: Burge et al. 2002.

Segundo Burge e colaboradores (2002), a estabilidade é fator chave para qualquer variedade de importância econômica. Dentre as três formas de quimeras, a considerada mais estável é a periclinial, pois todos os propágulos produzidos por ela apresentam a mesma organização do meristema apical a partir do qual foram originadas, podendo assim, serem propagadas sem haver alteração da condição mixoploide (Burge et al. 2002).

As quimeras setoriais por sua vez, não são estáveis, pois podem gerar, a cada ciclo de propagação, ramos inteiramente tetraploides e ramos inteiramente diploides, podendo haver a reversão total ou parcial das plantas mixoploides para a condição diploide. Entretanto, quando se deseja a obtenção de propágulos inteiramente poliploides, a obtenção de quimeras setoriais pode ser fundamental.

No caso do eucalipto, cujo melhoramento é voltado principalmente à qualidade da madeira, a obtenção de quimeras periclinais com alteração apenas nas camadas superiores não seria tão interessante. Entretanto, se considerarmos que alterações nas camadas L1 e L2 podem levar a alterações na anatomia foliar (uma vez que estas camadas dão origem a epiderme e os tecidos sub-epidérmicos) e que alterações na anatomia foliar podem alterar propriedades fotossintéticas, como demonstrado por Vyas e colaboradores (2007) em *Phlox drummondii*, a obtenção de quimeras periclinais poderia representar uma estratégia alternativa para o melhoramento.

Considerando estas informações e os resultados obtidos na segunda análise de citometria, pode-se especular a cerca da natureza dos mixoploides obtidos na fase de indução. Nos clones 2 e 13, por exemplo, após os subcultivos de propagação foi possível isolar tanto brotações diploides como tetraploides, sugerindo que estes tratam-se de uma quimera setorial. Da mesma forma, os clones 1 e 6, também podem tratar-se de quimeras setoriais com reversão, uma vez que foi possível isolar apenas brotações inteiramente diploides; bem como o clone 4 se referir a uma quimera setorial, em que apenas os setores tetraploides foram selecionados. Os clones 3, 14 e 16, pelo fato de permanecerem mixoploides após os subcultivos, podem se tratar de quimeras periclinais. Entretanto são apenas especulações, que não podem ser confirmadas, uma vez que somente uma parcela das brotações desenvolvidas foram analisadas.

A etapa de alongamento *in vitro* apresentou sucesso para a maioria dos clones (2, 3, 4, 6, 12, 13 e 14), que tiveram suas brotações alongadas quando foram transferidas para meio de cultura apropriado, com exceção do clone 11, que não seguiu para esta etapa devido ao não estabelecimento de uma microcepa; e dos clones 1 e 16, cujas microcepas morreram ao serem transferidas para este meio de cultura. Fatos esses que evidenciam mais uma vez a necessidade dos ajustes de protocolo para cada genótipo.

Após a etapa de alongamento as plantas foram submetidas às fases de enraizamento e aclimatização e novamente desafios foram encontrados, considerando-se que essas são etapas consideradas “gargalos” na micropropagação de eucalipto (Aggarwal et al. 2012; Arya et al. 2009), pois podem limitar o emprego dessa técnica para determinados genótipos (Mankessi et al. 2009; Nehra et al. 2005). Entretanto, neste trabalho, estes dois processos foram, de modo geral, bem sucedidos. O enraizamento das microestacas ocorreu *ex vitro* no ambiente de miniestufa e a metodologia de aclimatização utilizada, associada ao fato de ser um material jovem (proveniente de semente), garantiu a obtenção de mudas, assim como obtido em outras espécies de eucalipto (Oliveira 2014; Brondani 2012).

Após a aclimatização, as mudas produzidas foram individualmente analisadas por citometria de fluxo para a confirmação da sua ploidia. Os resultados, demonstrados na tabela 5, reforçam algumas das especulações a cerca da natureza setorial das quimeras produzidas, uma vez que foi possível obter mudas inteiramente diploides (clones 3 e 9), inteiramente tetraploides (clones 4 e 12) ou mudas de ambas as ploidias a partir do mesmo mixoploide (clones 2 e 13). No caso das quimeras anteriormente apontadas como periclinais, observa-se que no clone 3 houve produção predominantemente de mudas diploides e apenas um mixoploide, colocando-o agora como setorial; já no clone 14, apenas mudas mixoploides foram produzidas, reforçando a hipótese de tratar-se de quimeras periclinais. A confirmação da natureza periclinal deste material, entretanto, requer análises mais aprofundadas, que apenas poderá ser confirmada mediante análise de citometria de cada folha separadamente, no qual as proporções de células diploides e tetraploides devem ser semelhantes.

Observa-se que a técnica de micropropagação dos clones poliploidizados, permitiu a obtenção final de altos percentuais de mudas tetraploides (tabela 5), demonstrando a eficiência da técnica em isolar poliploides puros.

Nas condições de cultivo utilizadas neste trabalho, nove subcultivos de fase de multiplicação foram suficientes para o isolamento de setores tetraploides puros.

Tabela 5. Número de mudas clonais obtidas e suas confirmadas pela 3ª citometria de fluxo, em cada clone.

Clone	Número de mudas clonais	Ploidias			Percentual de tetraplóides
		2x	2x+4x	4x	
Clone 2	10	4	0	6	60
Clone 3	8	7	1	0	0
Clone 4	61	0	1	60	98
Clone 6	9	9	0	0	0
Clone 12	13	0	3	10	77
Clone 13	92	5	45	42	46
Clone 14	7	0	7	0	0

Para avaliar as características morfológicas das plantas tetraploides e diploides de *E. urophylla* obtidas, foram utilizadas as mudas dos clones 2 e 13, que produziram indivíduos de ambas as ploidias, mudas de um clone controle, originadas a partir do tratamento isento de colchicina no experimento de indução e por fim mudas mixoploides do clone 14, o qual acredita-se tratar de uma quimera periclinal.

A escolha da utilização destes clones baseou-se nas considerações de que: i) na comparação entre diploides e tetraploides de clones diferentes, as possíveis diferenças poderiam ser decorrentes do genótipo e não necessariamente da ploidia, dessa forma uma comparação dentro do mesmo genótipo seria mais apropriada; ii) mesmo confirmadas como diploides as mudas obtidas a partir dos clones 2 e 13 foram originadas a partir de gemas tratadas com colchicina e podem ter sofrido, de alguma forma, alterações no seu conjunto cromossômico não evidenciadas pela análise de citometria de fluxo; iii) tratando-se de uma quimera periclinal deve-se encontrar estabilidade nas características estomáticas nas folhas analisadas.

Com relação à morfologia externa observou-se diferenças significativas entre as mudas diploides e tetraploides do clone 2 (figura 13A). Ao contrário do que geralmente se espera de indivíduos poliploides, as mudas tetraploides apresentaram-se menores, menos vigorosas e com folhas deformadas, sendo essas anormalidades também observadas por Roth (1984) em plantas de *E. urophylla* tratadas com colchicina. Em limoeiro Cravo, Allario e colaboradores (2011) também registraram crescimento menos vigoroso em plantas tetraploides quando comparadas às diploides, assim como Vichiato e colaboradores (2007) também verificaram desenvolvimento mais lento e pouco vigoroso das plantas tetraploides induzidas em relação às plantas diploides de *Dendrobium nobile*.

A análise estatística dos dados, mostrou que as mudas de tetraploides deste clone apresentam entrenós mais curtos e folhas menores (figuras 13B e C) que suas correspondentes diploides, bem como em relação às mudas diploides do clone 13 e do clone controle (tabela 6).

O clone 13 (figura 13D), por sua vez, apresentou mudas tetraploides bastante semelhantes às suas correspondentes diploides e não diferiram estatisticamente em suas medidas (tabela 6). Apesar da diferença não ter sido significativa, observa-se um pequeno aumento na relação LF/CF das folhas tetraploides, indicando que estas são ligeiramente mais arredondadas em relação às diploides, como se observa na figuras 13E e F.

Já o clone 14 mixoploide (figura 13I) apresentou valores intermediários, sendo estatisticamente diferente dos outros clones apenas na relação LF/CF (tabela 6), evidenciando que as folhas deste clone são mais estreitas (figura 13J), característica esta que se deve principalmente ao genótipo e não necessariamente à condição mixoploide.

Tabela 6. Dados referentes aos caracteres morfológicos das mudas de cada genótipo.

Clone	Ploidia	CM	DE	CF	LF	LF/CF	AF
Controle	Diploide	22,00 ab	1,74 a	6,94 ab	2,95 a	0,44 ab	13,03 a
Clone 2	Diploide	20,25 bc	1,64 ab	6,43 ab	2,74 a	0,42 b	12,18 a
Clone 13	Diploide	25,12 a	1,83 a	7,28 a	3,16 a	0,44 ab	16,27 a
Clone 14	Mixoploide	17,88 c	1,42 b	5,99 b	1,50 b	0,25 c	7,18 b
Clone 2	Tetraploide	14,00 d	0,88 c	3,52 b	1,49 b	0,42 b	4,05 b
Clone 13	Tetraploide	25,00 a	1,68 ab	6,94 ab	3,24 a	0,47 a	15,34 a
CV (%)		12,21	13,54	11,31	13,99	6,89	24,98

Letras diferentes na mesma coluna indicam que as médias diferem significativamente pelo teste LSD ao nível de 5% de probabilidade de erro. Legendas: CM - comprimento da muda, DE - distância dos entrenós, CF - comprimento foliar, LF - largura foliar, LF/CF - relação largura/comprimento foliar e AF - área foliar.

As características estomáticas estão altamente correlacionadas ao nível de ploidia e por isso, são amplamente utilizadas para separar plantas poliploides putativas de diploides. Dhooghe e colaboradores (2011) relataram que 33% dos trabalhos de indução de poliploidia publicados até 2010 utilizaram a análise estomática, sendo que 81% deles associou esta análise a análise de citometria de fluxo ou contagem cromossômica para confirmar a ploidia.

Devido ao aumento do tamanho das células das folhas, a densidade estomática tende a diminuir e o tamanho dos estômatos a aumentar nas plantas poliploides (Hodgson et al. 2010). Esse padrão já foi observado em diversas espécies como *Morus alba* (Chakraborti et al. 1998), *Cattleya intermedia* (Silva et al. 2000), *Vitis vinifera* (Yang et al. 2006), *Pennisetum* (Campos et al. 2009), *Paulownia tomentosa* (Tang et al. 2010), *Gerbera jamesonii* (Gantait et al. 2011), *Heliconia bibai* (Cavalcante Filho 2011), *Lagerstroemia indica* (Zhang et al. 2010), *Vitis x Muscadinia* (Xie et al. 2015), *Manibot esculenta* (Silva 2014), *Tagetes erecta* (Sajjad et al. 2013), *Thymus persicus* (Tavan et al. 2015), *Dioscorea rotundata* e *Dioscorea cayenensis* (Babil et al. 2016). Na orquídea *Dendrobium nobile*, entretanto, Vichiato e colaboradores (2006) verificaram um padrão inverso, ou seja, um aumento na densidade estomática e redução do tamanho dos estômatos em plantas tetraploides, sendo este padrão também observado parcialmente em crisântemo (Motonobu et al. 1997).

A análise dos estômatos pode ser feita por diversas técnicas, que compreendem desde as mais trabalhosas, envolvendo a submissão das folhas à agente químicos e corantes (Segatto et al. 2004), a realização de cortes paradérmicos (Macedo 1997) ou a utilização de microscopia eletrônica de varredura (Costa et al. 2004), até as mais simples, como a técnica de impressão epidérmica, considerada por Segatto e colaboradores (2004), uma técnica muito rápida, de baixo custo e de fácil execução. Neste trabalho optou-se pela utilização desta última, que além de mostrar-se eficiente, garantiu também boas impressões da superfície da epiderme das folhas das mudas de *E. urophylla*, para a mensuração do tamanho e contagem dos estômatos.

Figura 13. Mudras aclimatizadas de *E. urophylla*. A. Clone 2: mudras diploides à esquerda e mudras tetraploides à direita; B. Folha diploide do clone 2; C. Folha tetraploide do clone 2; D. Clone 13: mudras diploides à esquerda e mudras tetraploides à direita; E. Folha diploide do clone 13; F. Folha tetraploide do clone 13; G. Mudras do clone controle; H. Folha do clone controle; I. Mudras do clone 14 mixoploide; J. Folha do clone 14.

As impressões epidérmicas das folhas das mudas de *E. urophylla* (figura 14) evidenciaram os estômatos do tipo amonocítico (figura 14A) e cavidades secretoras (figura 14B) no mesmo nível das células epidérmicas, confirmando os dados obtidos por Santos e colaboradores (2008) ao estudar a anatomia foliar de sete espécies de *Eucalyptus*. De acordo com estes autores, as folhas de *Eucalyptus urophylla* são anfihipoestomáticas, ou seja, apresentam estômatos em ambas as superfícies, porém, com maior densidade na face abaxial, entretanto, em nossos resultados as plantas analisadas apresentaram raríssimos casos de estômatos na face adaxial (figura 14C e D). Dessa forma, para a comparação das ploidias somente a densidade estomática da face abaxial foi considerada.

Figura 14. Impressões epidérmicas de folhas de *E. urophylla*. A. Estômatos do tipo anomocítico (Es); B. Cavidade secretora (CS); C. Epiderme adaxial evidenciando as cavidades secretoras (CS) e D. Epiderme abaxial evidenciando as cavidades secretoras (CS) e estômatos (Es).

As diferenças no número e tamanho dos estômatos nas folhas tetraploides podem ser visualmente observadas quando comparadas às impressões epidérmicas das folhas diploides (figura 15).

Figura 15. Comparação das impressões epidérmicas das folhas diploides (à esquerda) e poliploides (à direita) no clone 2 (A e B), clone 13 (C e D), clone controle (E) e clone 14 mixoploide (F).

A análise estatística dos dados, utilizando o teste LSD (Least-Significance Difference), confirmou as observações realizadas visualmente e revelou diferenças significativas na densidade estomática e tamanho dos estômatos entre as ploidias das mudas de *E. urophylla* (tabela 7). Os clones diploides apresentaram densidade estomática maior que os clones tetraploides, enquanto que o clone mixoploide apresentou valor intermediário, evidenciando maior semelhança ao Clone 2 diploide.

Tabela 7. Dados referentes à análise estomática de cada genótipo.

Clone	Ploidia	DEs	DEq	DPI	DEq/DPI
Controle	Diploide	808,8 a	5,9 c	11,2 d	0,53 a
Clone 2	Diploide	623,1 bc	6,4 c	11,3 d	0,55 a
Clone 13	Diploide	792,3 a	5,9 c	10,9 d	0,55 a
Clone 14	Mixoploide	648,3 b	7,6 b	13,5 c	0,57 a
Clone 2	Tetraploide	405,4 d	8,7 a	16,8 a	0,52 a
Clone 13	Tetraploide	501,6 cd	8,1 ab	14,8 a	0,55 a
CV (%)		13,86	8,17	6,79	4,89

Letras diferentes na mesma coluna indicam que as médias diferem significativamente pelo teste LSD ao nível de 5% de probabilidade de erro. Legendas: DEs - densidade estomática, DEq - diâmetro equatorial, DPI - diâmetro polar e DEq/ DPI - relação diâmetro equatorial/diâmetro polar.

Nota-se que houve sobreposição das letras nas médias do Clone 2 diploide e Clone 13 tetraploide, entretanto, os valores mostram que ocorreu de fato uma redução na densidade estomática do tetraploide, apesar da diferença não ter sido estatisticamente significativa. É provável que essa aproximação das médias seja decorrente da variabilidade genética existente entre os clones. Assim, ao analisar cada clone separadamente, observa-se que a densidade estomática reduziu estatisticamente nos tetraploides, sendo em todo caso, um pouco maior no clone 13.

Os diâmetros equatoriais e polares apresentaram-se maiores nos tetraploides confirmando o aumento do tamanho dos estômatos, enquanto que a relação entre eles não foi alterada, indicando que o aumento do tamanho foi proporcional, não causando alterações em seu formato.

A análise do coeficiente de correlação de Pearson (tabela 8) mostra uma relação inversamente proporcional entre densidade estomática e diâmetros equatorial e polar dos estômatos, ou seja, quando a densidade de estômatos aumenta, os diâmetros equatorial e polar destes tendem a diminuir e quando a densidade estomática diminui, os diâmetros tendem a aumentar. Esta relação corrobora, como comentado anteriormente, com os dados encontrados na literatura para outras espécies e confirmam que a análise estomática pode ser utilizada como indicativo de poliploidização na separação preliminar em mudas de *E. urophylla*. Considerando o fato de poder haver semelhanças entre diploides e tetraploides de clones diferentes, recomenda-se que a separação preliminar através desta análise seja realizada entre mudas de um mesmo clone.

Tabela 8. Matriz de Correlação de Pearson das variáveis estomáticas.

	DEs	DEq	DPI	DEq / DPI
DEs	-	> 0,01	> 0,01	0,26
DEq	<u>-0,79</u>	-	> 0,01	0,59
DPI	<u>-0,84</u>	<u>0,96</u>	-	0,42
DEq / DPI	0,24	0,12	-0,17	-

Legendas: DEs - densidade estomática, DEq - diâmetro equatorial, DPI - diâmetro polar e DEq/ DPI - relação diâmetro equatorial/ diâmetro polar.

Analisando separadamente as folhas de uma mesma muda mixoploide do clone 14, nota-se que não existe um padrão quanto ao número e tamanho dos estômatos (figura 16). Algumas folhas apresentaram características tipicamente tetraploides e outras tipicamente diploides, bem como apresentaram estômatos maiores e menores na mesma folha, o que nos faz desconsiderar a hipótese deste mixoploide tratar-se de uma quimera periclinal, visto a estabilidade que este tipo de quimera apresenta (Burge et al, 2002), como dito anteriormente.

Figura 16. Impressões epidérmicas da primeira (A), segunda (B) e terceira (C) folha de uma mesma muda do Clone 14, mixoploide.

Os cortes histológicos das folhas de *E. urophylla* (figura 18) evidenciaram a mesma estrutura anatômica básica em todas as folhas analisadas para as diferentes ploidias e clones: epiderme uniestratificada e mesofilo dorsiventral, com parênquima paliçádico voltado para a face adaxial e o parênquima lacunoso para a face abaxial, não diferindo da descrição para o gênero *Eucalyptus* (Metcalf e Chalk 1979) e também observado por Santos e colaboradores (2008) para sete espécies do gênero.

Variações anatômicas e morfológicas geralmente levam à mudanças fisiológicas e à tolerâncias ecológicas (Xiong et al. 2006). É de conhecimento que a poliploidia tem como principais efeitos na anatomia foliar, o aumento do volume das células do mesofilo e consequentemente da espessura foliar. Vyas e colaboradores (2007) observaram um aumento das células do mesofilo, bem como na espessura das folhas tetraploides de *Phlox drummondii*, além da alteração de outros parâmetros anatômicos e bioquímicos que proporcionaram o aumento na capacidade fotossintética dessas plantas. Em um poliploide espontâneo de *Pennisetum americanum*, as folhas tetraploides apresentaram-se 16% mais espessas que as folhas diploides, sendo que as células do mesofilo e da bainha do feixe foram 16 µm maiores (Warner e Edwards 1988). Em limoeiro Cravo (*Citrus limonia*), as folhas, bem como caules e raízes das plantas tetraploides, com seis meses de idade apresentaram-se mais grossos e com células maiores que as plantas diploides, o que segundo os autores, pode representar um grande impacto sobre as trocas de água de célula para célula (Allario et al. 2011).

Entretanto, nas folhas avaliadas de *E. urophylla* em nossos experimentos, a análise estatística dos dados não mostrou diferenças significativas na espessura e na área ocupada pelos tecidos entre as folhas diploides e tetraploides, com exceção da espessura e área da epiderme adaxial que apresentou-se significativamente maior nas folhas tetraploides quando comparadas às suas correspondentes diploides (tabelas 8 e 9).

Epidermes mais espessas podem representar vantagens quando se foca as relações hídricas, uma vez que podem atuar como um maior obstáculo para a perda de água pela folha. Em *Lonicera japonica*, pesquisadores verificaram que a duplicação cromossômica proporciona maior resistência a estresse hídrico (Li et al. 2009). Análises morfológicas e anatômicas comparando as variedades diploides e tetraploides revelaram que as tetraploides possuíam além de uma redução na área foliar e maior massa foliar por unidade de área, epiderme e tecido paliçádico mais espessos, o que pode explicar a sua maior capacidade em lidar com estresse hídrico (Li et al 2009).

Tabela 9. Espessura foliar total e de cada tecido, em μm , da secção anatômica de cada genótipo.

Clone	Ploidia	EFT	EpAd	Meso	PP	PL	EpAb
Controle	Diploide	283,0 a	19,21abc	255,0 a	117,1 a	143,4 a	14,81 a
Clone 2	Diploide	250,5 a	15,20 c	224,7 a	85,8 a	138,3 a	12,38 a
Clone 13	Diploide	280,9 a	17,78 bc	252,2 a	98,9 a	158,3 a	13,41 a
Clone 14	Mixoploide	240,0 a	15,51c	222,9 a	106,1 a	113,7 a	14,01 a
Clone 2	Tetraploide	282,8 a	21,74 ab	242,9 a	99,7 a	142,1 a	17,34 a
Clone 13	Tetraploide	311,2 a	23,79 c	273,3 a	126,1 a	149,4 a	15,91 a
CV (%)		12,37	21,05	12,83	20,33	17,66	17,72

Letras diferentes na mesma coluna indicam que as médias diferem significativamente pelo teste LSD ao nível de 5% de probabilidade de erro. Legendas: EFT - Espessura foliar total, EpAd - epiderme adaxial, Meso - mesofilo, PP -parênquima paliçádico, PL - parênquima lacunoso, EpAb - epiderme abaxial.

Tabela 10. Área, em μm^2 , dos tecidos foliares ocupados na secção anatômica de cada genótipo.

Clone	Ploidia	EpAd	PP	PL	EI	EpAb	Xi	Fl
Controle	Diploide	3049,8 bc	22470,1 a	22123,7 a	10310,1 d	2358,4 cd	28497,2 c	26226,48 c
Clone 2	Diploide	2708,8c	17803,1 a	22983,4 a	11102,1 cd	1994,0 d	38212,98 bc	43791,47 abc
Clone 13	Diploide	3257,2 abc	20375,6 a	27596,1 a	14600,6 ab	2504,4 bc	51755,6 ab	51263,64 ab
Clone 14	Mixoploide	3691,2 ab	19889,4 a	29252,2 a	15886,8 ab	2357,6 cd	44297,43 abc	41552,71 bc
Clone 2	Tetraploide	4078,0 a	19161,2 a	28031,7 a	13834,3 bc	2976,997 a	30560,72 c	37662,31 bc
Clone 13	Tetraploide	4020,1 a	23321,1 a	29510,8 a	16848,5 a	2817,838 ab	61175,85 a	63561,65 a
CV (%)		18,46	14,66	14,87	14,58	11,31	29,41	32,05

Letras diferentes na mesma coluna indicam que as médias diferem significativamente pelo teste LSD ao nível de 5% de probabilidade de erro. Legendas: EpAd - epiderme adaxial, PP - parênquima paliçádico, PL - parênquima lacunoso, EI - espaço intercelular do parênquima lacunoso, EpAb - epiderme abaxial, Xi - xilema e Fl - floema (Fl).

Ao analisar as secções anatômicas das folhas, o maior tamanho das células da epiderme adaxial é perceptível em ambos os clones tetraploides (figuras 17B e D).

Em relação às outras variáveis avaliadas, apesar da análise estatística não ter mostrado diferenças significativas, observa-se um aumento na espessura da folha tetraploide do clone 2 (figuras 17A e B), sendo este aumento mais sutil no clone 13. O aumento do tamanho também é perceptível nas células da epiderme abaxial e do parênquima paliçádico das folhas tetraploides de ambos os clones quando comparadas às suas correspondentes diploides e ao diploide controle.

Figura 17. Cortes transversais das folhas diploides (à esquerda) e poliploides (à direita) de *E. urophylla*. A e B. Clone 2; C e D. Clone 13; E. Clone controle e F. Clone 14. Barras = 100µm.

A análise de correlação de Pearson das variáveis de espessura (tabela 11) apontou uma correlação positiva entre a espessura foliar total (EFT) e a espessura do mesofilo (Meso), parênquima lacunoso (PP) e epiderme adaxial (EpAd), indicando que o aumento da espessura foliar total ocorre quando há o aumento da espessura dessas três variáveis. Observa-se ainda, uma relação positiva entre a espessura do mesofilo e do parênquima lacunoso.

Tabela 11. Matriz de correlação de Pearson das variáveis de espessura foliar.

	EFT	Meso	PP	PL	EpAd	EpAb
EFT	-	> 0,01	0,06	> 0,01	> 0,01	0,07
Meso	<u>0,96</u>	-	0,04	> 0,01	> 0,01	0,19
PP	0,39	0,42	-	0,32	0,28	0,27
PL	<u>0,76</u>	<u>0,75</u>	-0,21	-	0,01	0,49
EpAd	<u>0,77</u>	0,62	0,23	0,52	-	> 0,01
EpAb	0,38	0,28	0,23	0,15	0,68	-

Legendas: EFT - espessura foliar total, EpAd - espessura da epiderme adaxial, Meso - espessura do mesofilo, PP - espessura do parênquima palicádico, PL - espessura do parênquima lacunoso, espessura da epiderme abaxial (EpAb).

A matriz de correlação de Pearson das variáveis de área dos tecidos foliares (tabela 12) apontou correlações moderadas entre as áreas da epiderme adaxial e abaxial e entre a área da epiderme e a área do parênquima

lacunoso, mostrando que quando a área da epiderme adaxial aumenta, as outras tendem a aumentar também; assim como existe uma correlação entre sua área total do parênquima paliçádico e a área do espaço intercelular.

Tabela 12. Matriz de correlação de Pearson das variáveis de área dos tecidos foliares.

	EpAd	PP	PL	EI	EpAb	Xi	Fl
EpAd	-	0,08	> 0,01	0,02	> 0,01	0,68	0,48
PP	0,37	-	0,62	0,23	0,27	0,98	0,94
PL	<u>0,60</u>	0,11	-	> 0,01	0,24	0,39	0,48
EI	0,48	0,26	<u>0,72</u>	-	0,12	0,18	0,35
EpAb	<u>0,66</u>	0,24	0,25	0,32	-	0,61	0,70
Xi	-0,09	-0,01	0,19	0,28	0,11	-	> 0,01
Fl	-0,15	0,02	0,15	0,20	0,08	<u>0,84</u>	-

Legendas: EpAd - epiderme adaxial, PP - parênquima paliçádico, PL - parênquima lacunoso, EI - espaço intercelular do parênquima lacunoso, EpAb - epiderme abaxial, Xi - xilema e Fl - Floema.

Analisando a relação dos clones e suas ploidias com algumas das variáveis morfo-anatômicas, por meio da análise de componentes principais (figura 18), observa-se uma coerência ao agrupar os genótipos: genótipos diploides e tetraploides estão posicionados de forma oposta, mostrando uma tendência em separar diploides dos tetraploides, diferenciando-os pelas variáveis analisadas. Como esperado, mixoploides se posicionam entre diploides e tetraploides.

Com relação aos diploides, nota-se que o clone controle e clone 13 estão mais próximos, mostrando que estes são mais semelhantes entre eles que os diploides do clone 2.

Os vetores representam as variáveis e como elas estão correlacionadas aos grupos de genótipos (se positiva ou negativamente). Como se observa, a variável densidade estomática (DEs) está positivamente relacionada aos genótipos diploides e negativamente relacionada aos genótipos tetraploides, enquanto que os diâmetros equatorial e polar (DEq e DPl) estão negativamente relacionados aos diploides e positivamente aos tetraploides, assim como foi demonstrado nas análises estomáticas.

As variáveis de espessura foliar (EF), área ocupada pelo mesofilo (AMeso) e pelos parênquimas paliçádico (APP) e lacunoso (APL) e área do espaço intercelular do parênquima lacunoso (EI), as quais é esperado que se correlacionem mais aos genótipos tetraploides, apresentou vetores voltados, principalmente para o genótipo tetraploide do clone 13, mostrando que apesar do teste LSD não ter demonstrado diferenças estatísticas significativas, existe uma tendência dessas variáveis estarem mais relacionadas ao tetraploide.

A análise ainda, posicionou o clone 2 diploide distante dos outros diploides, bem como seu tetraploide distante do tetraploide do clone 13, mostrando que este clone foge do padrão encontrado nos tetraploides do clone 13 e até mesmo dos diploides, o que pode ser decorrente da sua própria genética diferente dos outros dois clones.

Figura 18. Análise de componentes principais correlacionando os genótipos: Clone 2 diploide (C2-2x), Clone 2 tetraploide (C2-4x), Clone 13 diploide (C13-2x), Clone 13 tetraploide (C13-4x) e clone 14 mixoploide (C14-mix) às variáveis densidade estomática (DEs), diâmetro equatorial (DEq), diâmetro polar (DPI), espessura foliar (EF), área do mesófilo (AMeso), área dos parênquimas paliçádico (APP) e lacunoso (APL) e área do espaço intercelular do parênquima lacunoso (EI).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estabelecimento de um protocolo geral de poliploidização mostrou ser bastante complexo, uma vez que requer a integração de vários fatores (concentração e tipo do anti-mitótico, tempo de exposição, tipo de explante e modos de exposição) para a obtenção de taxas satisfatórias de eficiência. Nas condições testadas neste trabalho para a indução de poliploidia em *E. urophylla*, o tratamento de concentração de 0,125% de colchicina por 12 horas de exposição foi o mais eficiente para a indução de poliploides.

O protocolo estabelecido utilizou como explantes gemas laterais desenvolvidas *in vitro*, o que implica na necessidade do estabelecimento prévio de protocolos de regeneração *in vitro* para a obtenção de explantes adequados para a indução, bem como para a posterior micropropagação eficiente do material poliploidizado, quando se deseja realizar a indução em clones de interesse.

A técnica de micropropagação demonstrou ser um método eficiente no isolamento de setores totalmente poliploidizados a partir de meristemas apicais mixoploides e proporcionou o isolamento e a obtenção de mudas tetraploides ao final do processo.

A análise estomática realizada pela técnica de impressão epidérmica pode ser utilizada como indicativo de poliploidização, em mudas aclimatizadas de *E. urophylla*, sendo útil na separação preliminar de indivíduos tetraploides.

Com relação às alterações morfológicas, a poliploidia teve efeitos sutis na anatomia foliar das mudas de *E. urophylla*, o que nos impede de afirmar, neste momento, que possa ter causado alterações adaptativas vantajosas ou não em relação às plantas diploides. Dessa forma, o acompanhamento do desenvolvimento das mudas e análises anatômicas (não só das folhas, como também de caules e raízes) posteriores podem ser realizados visando observar possíveis potenciais fisiológicos dos indivíduos poliploides obtidos.

Os resultados obtidos neste trabalho estimulam a continuidade do estudo, uma vez que levanta hipóteses para diversas possibilidades de pesquisa como o estudo do desenvolvimento das mudas poliploides em condições adversas de campo, visando reconhecer o desempenho dos indivíduos; a caracterização da anatomia da madeira dos indivíduos tetraploides; bem como o estudo do comportamento meiótico visando à obtenção de gametas diploides viáveis para a fecundação de gametas haplóides e posterior obtenção de indivíduos triploides, objetivo almejado em alguns programas de melhoramento florestal.

REFERÊNCIAS

- Adams KL, Wendel JF (2005) Polyploidy and genome evolution in plants. *Curr Opin Plant Biol* 8(2):135-41
- Adaniya S, Shirai D (2001) *In vitro* induction of tetraploid ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and its pollen fertility and germinability. *Sci Hortic* 88:277–287
- Aguiar MS, Ferreira DF, Aguiar AM, Bison O, Rezende GDSP, Grattapaglia D (2007) Potencial de híbridos entre clones-elite de eucalipto por meio de marcadores microssatélites. *Pesq. Agropec Bras* 42(7): 1007-1012
- Aggarwal D, Kumar A, Sharma J, Reddy Ms (2012) Factos affecting micropropagation and acclimatization of an elite clone of *Eucalyptus tereticornis* Sm. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 48(5): 521-529
- Aleza P, Juarez J, Ollitrault P, Navarro L (2009) Production of tetraploid plants of non apomictic citrus genotypes. *Plant Cell Rep* 28:1837–1846
- Alfenas AC, Zauza AAV, Mafia RG, Assis TF (2004) Clonagem e doenças do eucalipto. Viçosa: Editora UFV, 442 p.
- Allard RW (1971) Princípios do melhoramento genético das plantas. São Paulo: Edgard Blücher, 381p.
- Allario T, Brumos J, Colmenero-Flores JM, Tadeo F, Froelicher Y, Talon M, Navarro L, Ollitrault P, Morillon R (2011) Large changes in anatomy and physiology between diploid Rangpur lime (*Citrus limonia*) and its autotetraploid are not associated with large changes in leaf gene expression. *J Exp Bot* 62: 2507-2519
- Allum JF, Bringloe DH, Roberts AV (2007) Chromosome doubling in a *Rosa rugosa* Thunb. hybrid by exposure of *in vitro* nodes to oryzalin: the effects of node length, oryzalin concentration and exposure time. *Plant Cell Rep* 26:1977–1984
- Almeida LV (2012) Técnicas para otimização da produção de mudas clonais de *Corymbia citriodora*. 2012. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Instituto de Pesquisas Florestais, Piracicaba, 106p.
- Almeida M, Almeida CV, Graner EM, Brondani GE, Abreu-Tarazi MF (2012) Pre-procambial cells are niches for pluripotent and totipotent stem-like cells for organogenesis and somatic embryogenesis in the peach palm: a histological study. *Plant Cell Rep* 31(8): 1495-1515
- Aneja D, Atal C (1969) Plantlet formation in tissue culture from lignotubers of *Eucalyptus citriodora* (Hook). *Curr Sci* 38:69-70
- Aryavand A, Ehdaie B, Tran B, Waines JG (2003) Stomatal frequency and size differentiate ploidy levels in *Aegilops neglecta*. *Genet Resour Crop Evol* 50:175–182
- Arya ID, Sharma S, Chauhan S, Arya S (2009) Micropropagation of superior *Eucalyptus* hybrids FRI-5 (*Eucalyptus camaldulensis* Dehn x *E. tereticornis* Sm) and FRI-14 (*Eucalyptus torelliana* F.V Muell x *E. citriodora* Hook): a commercial multiplication and field evaluation. *Afr J Biotechnol* 8(21): 5718-5726
- Assis TF, Mafia RG (2007) Híbridação e clonagem. In: Borém A. (Ed.) Biotecnologia florestal. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora pp. 93-121
- Assis TF, Resende MDV (2011) Genetic improvement of forest tree species. *Crop Breed Appl Biotechnol* S1: 44-49
- Babil P, Iino M, Kashihara Y, Matsumoto R, Kikuno H, Lopez-Montes A, Shiwachi H (2016) Somatic polyploidization and characterization of induced polyploids of *Dioscorea rotundata* and *Dioscorea cayenensis*. *Afr J Biotechnol* 15(38): 2098-2105
- Baccarin FJB (2012) Métodos para resgate, conservação e multiplicação em larga de matrizes de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 78p

- Baccarin FJB, Brondani GE, de Almeida LV, Vieira IG, de Oliveira LS, de Almeida M (2015) Vegetative rescue and cloning of *Eucalyptus benthamii* selected adult trees. *New Forest* 46:465–483
- Brondani GE (2012) Aspectos morfofisiológicos na clonagem de *Eucalyptus benthamii*. Tese (Doutorado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 184p
- Brondani GE, Ondas HW, Baccarin FJB, de Almeida M (2012) Micropropagation of *Eucalyptus benthamii* to form a clonal micro-garden. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 48(5): 35-48
- Blakeslee AF, Avery AG (1937) Methods of inducing doubling of chromosomes in plants. *J Hered* 28:393-411
- Blakesley D, Allen A, Pellny TK, Roberts AV (2002) Natural and induced polyploidy in *Acacia dealbata* Link. and *Acacia mangium* Willd. *Ann Bot-London* 90:391-398
- Bohanec B (2003) Ploidy determination using flow cytometry. In: Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP, Szorejko I (eds) Doubled haploid production in crop plants. Kluwer, Dordrecht, p397–403
- Burge GK, Morgan ER, Seelye JF (2002) Opportunities for synthetic plant chimeral breeding: Past and future. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 70: 13–21
- Campos JMS, Davide LC, Slagado CC, Costa PN, Silva PS, Alves CCS, Viccini LF, Pereira AV (2009) *In vitro* induction of hexaploid plants from triploid híbridos of *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum*. *Plant Breed* 128: 101-104
- Carmona-Martín E, Regalado JJ, Raghavan L, Encina CL (2015) *In vitro* induction of autooctoploid asparagus genotypes. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 121:249–254
- Carvalho JFP, Carvalho CR, Otoni WC (2005) *In vitro* induction of polyploidy in annatto (*Bixa orellana* L.). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 80:69–75
- Carvalho RMMA, Soares TS, Valverde SR (2006) Setor florestal é destaque na economia brasileira. Remade Disponível em http://www.remade.com.br/br/artigos_tecnicos.hp?sub=43&categoria=&subcategoria=Economia Acesso em: 10/05/2016
- Cavalier-Smith T (1985) Cell volume and the evolution of eukaryotic genome size. In: Cavalier-Smith T (ed.) The evolution of genome size. John Wiley & Sons, Chichester, p105-184
- Cavalcante Filho, GJF (2011) Indução de poliploidia *in vitro* com aplicação de *Heliconia bihail*. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Recife, 63f
- Chakraborti SP, Vijayan K, Roy B, Qadri S (1998) *In vitro* induction of tetraploidy in mulberry (*Morus alba* L.). *Plant Cell Rep* 17:799–803
- Chauvin JE, Label A, Kermarrec MP (2005) *In vitro* chromosome doubling in tulip (*Tulipa gesneriana* L.). *J Hortic Sci Biotech* 80:693–698
- Chen C, Hou X, Zhang H, Wang G, Tian L (2011) Induction of *Anthurium andraeanum* “Arizona” tetraploid by colchicine *in vitro*. *Euphytica* 181:137–145
- Chen LL, Gao SL (2007) *In vitro* tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in *Astragalus membranaceus*. *Sci Hortic* 112: 339–344
- Chen ZJ (2010) Molecular mechanisms of polyploid and híbrid vigor. *Trends Plant Sci* 15:57-71
- Cordeiro GM, Oliveira LS, Brondani GE, Almeida M (2014) Multiplicação *in vitro* de clones *Eucalyptus globulus* Labill. *Sci For* 142: 142-149
- Costa MAPC, Almeida WAB, Mourão-Filho FAA, Mendes BMJ, Rodriguez APM (2004) Stomatal analysis of citrus somatic hybrids obtained by protoplast fusion. *Pesq agropec bras* 39(3):297-300

- Darlington CD (1973) Chromosome botany and the origins of cultivated plants (3rd ed). George Allen & Unwin Ltd., London
- Delaport KL, Conran JG, Sedgley M (2001) Interspecific hybridization within *Eucalyptus* (Myrtaceae): subgenus *Symphyomyrtus*, sections *Bisectae* and *Adnataria*. Int J Biol Sci 162(6):1317-1326
- Del Ponte EM (2001) Multiplicação e Enraizamento *in vitro* de *Eucalyptus globulus* subsp. *globulus* Labill. Rev Árvore 25(1): 1-8
- Dermen, H (1940) Colchicine polyploidy and technique. Bot Rev 6:599-635
- Dermen H, Diller JD (1962) Colchicoidy of Chestnuts. Forest Sci 8(1): 43-50
- De Wet JMJ (1980) Origins of polyploids. In: Lewis WH (eds) Polyploidy: biological relevance. New York, Plenum, p. 3 -15
- Dewey DR (1980) Some applications and misapplications of induced polyploidy to plant breeding. In: Lewis WH Polyploidy: biological relevance. New York: Plenum, p445 -469
- Dewitte A, Eeckhaut T, Van Huylenbroeck J, Van Bockstaele E (2009) Occurrence of viable unreduced pollen in a *Begonia* collection. Euphytica 168: 81–94
- Dias RZ, Almeida LV, Almeida CV, Almeida M (2013) Estabelecimento de protocolo para a poliploidização de eucaliptos. In: 21º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, Piracicaba.
- Dhooghe E, Van Laere K, Eeckhaut T, Leus L, Van Huylenbroeck J (2011) Mitotic chromosome doubling of plant tissues *in vitro*. Plant Cell Tiss Organ Cult 104: 359–373
- Díaz-Sala C (2016) Physiological, cellular, molecular and genomic analysis of the effect of maturation on propagation capacity. In: Yill-Sung Park, Jan M Bonga, Heung-Kyu Moon (eds) Vegetative Propagation of Forest Trees, National Institute of Forest Science (NIFoS), Seoul, Korea, pp 75-96
- Dibax R, Deschamps C, Bessalho Filho JC, Vieira LGE, Molinari HBC, Campos MKF, Quoirin M (2010) Organogenesis and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Eucalyptus saligna* with P5CS gene. Biol Plantarum 54:6-12
- Dickson WC (2016) Integrative plant anatomy. Academic Press: San Diego, CA
- Dolezel J, Greilhuber J, Suda J (2007) Flow cytometry with plants: an overview. In: Dolezel J, Greilhuber J, Suda J (eds) Flow cytometry with plant cells. Wiley, Weinheim, pp 41–65
- Dolezel J, Lucretti S, Schubert Y (1994) Plant chromosome analysis and sorting by flow cytometry. Crit Rev Plant Sci 13(3): 275-309
- Domingues DS, Farro APC, Coscrato VE, de Mello EJ, Oda S, Marino CL (2006) Identificação de marcador RAPD e SCAR relacionados ao caractere florescimento precoce em *Eucalyptus grandis*. Cienc Florest 16(3): 251-260
- Dutra LF, Wendling I, Brondani GE (2009) A Micropropagação do Eucalipto. Pesqui Florest Bras 58: 49-59
- Eeckhaut T, Samyn G, Van Bockstaele E (2002) *In vitro* polyploidy induction in *Rhododendron simsii* hybrids. Acta Hort 572:43-49
- Eeckhaut T, Leus L, Van Huylenbroeck J (2005) Exploitation of flow cytometry for plant breeding. Acta Physiol Plant 27:743–750
- Eeckhaut, TGR, Werbrouck SPO, Leus LWH, Van Bockstaele EJ, Debergh PC (2004) Chemically induced polyploidization in *Spathiphyllum wallisii* Regal through somatic embryogenesis. Plant Cell Tiss Organ Cult 78:241-246
- Eldridge K, Davidson J, Harwood, C, Van Wyk G (1993) Eucalypt domestication and breeding. Clarendon Press, Oxford

- Elliott FC (1958) Plant breeding and cytogenetics. McGraw–Hill Book Company, Inc., New York
- Esposito-Polesi NP, de Andrade PAM, de Almeida CV, Andreote FD, de Almeida M (2015) Endophytic bacterial communities associated with two explant sources of *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage. World J Microbiol Biotechnol 31: 1737-1746
- Ewald D, Ulrich K, Naujoks G, Schröder MB (2009) Induction of tetraploid poplar and black locust plants using colchicines: chloroplast number as an early marker for selecting polyploids *in vitro*. Plant Cell Tiss Organ Cult 99: 353-357
- Fisher DB (1968) Protein staining of ribboned epon section for light microscopy. Histochemie 16:92–96
- Fossey A (2005) Agricultural biotechnology: plant biotechnology and animal biotechnology. In: Van Niekerk, A. Springer Verlag (ed) Ethics of biotechnology in agriculture: an African perspective, pp. 103-142.
- Gantait S, Mandal N, Bhattacharyya S, Das PK (2011) Induction and identification of tetraploids using *in vitro* colchicine treatment of *Gerbera jamesonii* Bolus cv. Sciella. Plant Cell Tiss Organ Cult 106:485–493
- Gmitter FG, Ling X, Cai C, Grosser JW (1991) Colchicine induced polyploidy in *Citrus* embryogenic cultures, somatic embryos, and regenerated plantlets. Plant Sci 74:135-141
- Grant V (1981) Plant speciation. Columbia University Press, New York.
- Grattapaglia D (2001) Marcadores moleculares em espécies florestais: *Eucalyptus* como modelo. In: Nass LL, Valois ACC, Melo IS, Valadares-Ilgis MC Recursos genéticos e melhoramento: plantas. Rondonópolis: Fundação MT, p.967-1010
- Grattapaglia D (2004) Integrating genomics into *Eucalyptus* breeding. Genet Mol Res 3(3):369-379
- Grattapaglia D, Machado MA (1998) Micropropagação. In: Torres AC, Caldas LS, Buso, JA Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq p.183-260
- Girijashankar V (2011) Genetic transformation of *Eucalyptus*. Physiol Mol Biol Plants 17(1):9-23
- Golle DP, Reiniger LRS, Curti AR, Bevilacqua CB (2009) Melhoramento florestal: ênfase na aplicação da biotecnologia. Ciênc Rural 39(5): 1606-1613
- Gonçalves FMA, Rezende GDSP, Bertolucci FLG, Ramalho MAP (2001) Progresso genético por meio de seleção de clones de eucalipto em plantios comerciais. Rev Árvore 25(3): 295-301
- Gu XF, Yang AF, Meng H, Zhang JR (2005) *In vitro* induction of tetraploid plants from diploid *Zizyphus jujuba* Mill. Cv. Zhanhua. Plant Cell Rep 24:671–676
- Hamill SD, Smith MK, Dodd WA (1992) *In vitro* induction of banana autotetraploid by colchicine treatment of micropropagated diploids. Aust J Bot 40(6): 887-896
- Haque MS (1984) Chromosome Morphology in 4 Species of *Eucalyptus* L. Her Cytologia 49: 547-550
- Hamill S, Smith M, Dodd W (1992) *In vitro* induction of banana autotetraploids by colchicine treatment of micropropagated diploids. Aust J Bot 40:887–896
- Han C, Xu JM, Du ZH, Li GY, Zeng BS, Wu SJ, Wang W (2011) Polyploidy induction of clone of *Eucalyptus grandis* with colchicines. Afr J Biotechnol 10(66): 14711-14717
- Hashimoto DYC (2009) Estudo comparativo entre híbridos diploides e tetraploides de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz): citogenética, apomixia e anatomia caulinar. Dissertação (Mestrado em Botânica)-Universidade de Brasília, Brasília, 74f
- Hegarty M, Hiscock S (2007) Polyploidy: doubling up for evolutionary success. Curr. Biol 17:R927–R929
- Hodgson JG, Sharafi M, Jalili A, Díaz S, Montserrat-Martí G, Palmer C, Cerabolini B, Pierce S, Hamzehee B, Asri Y, Jamzad Z, Wilson P, Raven JA, Band SR, Basconcelo S, Bogard A, Carter G, Charles M, Castro-Díez P,

- Cornelissen JHC, Funes G, Jones G, Khoshnevis M, Pérez-Harguindeguy N, Pérez-Rontomé MC, Shirvany FA, Vendramini F, Yazdani S, Abbas-Azimi R, Boustani S, Dehghan M, Guerrero-Campo J, Hynd A, Kowsary E, Kazemi-Saeed F, Siavash B, Villar-Salvador P, Craigie R, Naqinezhad A, Romo-Díez A, de Torres Espuny L, Simmons E (2010) Stomatal vs. genome size in angiosperms: the somatic tail wagging the genomic dog? *Ann Bot* 105:573–584
- Hovav R, Udall JA, Chaudhary B, Rapp R, Flagel L, Wendel JF (2008) Partitioned expression of duplicated genes during development and evolution of a single cell in a polyploid plant. *P Natl Acad Sci USA* 105:6191–6195
- IBÁ (2015) Indústria Brasileira de Árvores. Relatório IBÁ 2015, Brasília, 61p.
- IBÁ (2016) Indústria Brasileira de Árvores Relatório IBÁ 2016, Brasília, 96p.
- Iglesias I, Wiltermann D (2009) In Eucalyptologies Information Resources on Eucalypt Cultivation Worldwide <http://www.git-forestry.com> (GIT Forestry Consulting, retrieved, 29 March 2009)
- Janaki EK, Ammal FASC, Khosla SN (1969) Breaking the barrier to polyploidy in the genus *Eucalyptus*. *P Indian Acad Sci B* 70(5): 248-249
- Jellings AJ, Leech RM (1984). Anatomical variation in first leaves of nine *Triticum* genotypes and its relationship to photosynthetic capacity. *New Phytol* 96: 371-382
- Juvenal TL, Mattos RLG (2002) O setor florestal no Brasil e a importância do reflorestamento. *BNDES Setorial* 16:3-30
- Kadota M, Niimi Y (2002) *In vitro* induction of tetraploid plants from a diploid Japanese pear cultivar (*Pyrus pyrifolia* N. cv. Hosui). *Plant Cell Rep* 21:282–286
- Kaensaksiri T, Soontornchainaksaeng P, Soonthornchareonnon N, Prathanturarug S (2011) *In vitro* induction of polyploidy in *Centella asiatica* (L.) Urban. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 107:187–194
- Kampoor ML, Sharma VK (1985) Experimentally synthesized allotetraploids in *Eucalyptus*. *Silvae Genet* 34(1):19-22
- Karnovsky MJA (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electro microscopy. *J Cell Biol* 27(2): 137-138
- Khosravi P, Kermani MJ, Nematzadeh GA, Bihanta MR, Yokoya K (2008) Role of mitotic inhibitors and genotype on chromosome doubling of *Rosa*. *Euphytica* 160:267–275
- Leitch IJ, Bennet MD (1997) Polyploidy in angiosperms. *Trends Plant Sci* 2: 470-476
- Leone GF (2013) Estabelecimento de protocolo para controlar a manifestação de bactérias endofíticas no processo de multiplicação *in vitro* de eucalipto. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 99p
- Levin DA (1983) Polyploidy and novelty in flowering plants. *Am Nat* 122(1):1-25
- Leus L, Van Laere K, Dewitte A, Van Huylenbroeck J (2009) Flow cytometry for plant breeding. *Acta Horti* 836:221–226
- Li WD, Biswas DK, Xu H, Xu CQ, Wang XZ, Liu JK, Jiang GM (2009) Photosynthetic responses to chromosome doubling in relation to leaf anatomy in *Lonicera japonica* subjected to water stress. *Funct Plant Biol* 36:783–792.
- Lin H, Jian M, Liang LY, Pei WJ, Liu XZ, Zhang HY (2010) Production of polyploids from cultured shoot tips of *Eucalyptus globulus* Labill by treatment with colchicine. *Afr J Biotechnol* 9(15): 2252-2255
- Liu XZ, Lin H, Mo XY, Long T, Zhang HY (2009) Genetic variation in colchicine-treated regenerated plants of *Eucalyptus globulus* Labill. *J Genet* 88(3): 345-348
- Lloyd G, McCown B (1980) Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Combined Proceedings of the International Plant Propagators Society* 30: 421-427

- Macedo NA (1997) Manual de técnicas em histologia vegetal. Feira de Santana : Universidade Estadual Feira de Santana, 96p.
- Mankessi F, Saya A, Baptiste C, Nourissier S, Monteuiis O (2009) *In vitro* rooting of genetically related *Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus grandis* clones in relation to the time spent in culture. Trees Struct Funct 23(5): 931-940
- Marie D, Brown S (1993) A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. Biol Cell 78:41–51
- Masterson J (1994) Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of flowering plants. Science 264: 421–424
- Medri ME, Llers E (1981) Comparação anatômica entre folhas de um clone diploide (IAN 873) e dois clones poliploides (IAC 207, 222) de *Hevea brasiliensis* Mull. Arg. Acta Amaz 11(1): 35-47
- Mergen F (1959) Colchicine-induced polyploidy in pines. J Forest 57(3):180-190
- Metcalf CR, Chalk L (1979) Anatomy of the dicotyledons: systematic anatomy of leaf and stem, with a brief history of the subject (vol.1) Claredon Press, Oxford. 1500p
- Moffett AA, Nixon KM (1960) Induced tetraploidy in black wattle (*Acacia mearnsii* de Willd) Wattle Research Institute Report p32-38
- Motonobu E, Kim JS, Inada I (1997) Production and characteristics of chromosome doubled plants of small flowered garden Chrysanthemum, *Dendranthema* × *grandiflorum* Ramat. Kitam. cv. YS by colchicine treatment of cultured shoot tips. J Japan Soc Hort Sci 65(4):825-833
- Müntzing A (1936) The evolutionary significance of autopolyploidy. Hereditas 21:263– 378
- Murashige T, Nakano R (1966) Tissue culture as a potential tool in obtaining polyploid plants. J Hered 57:114–118
- Nehra NS, Becwar MR, Rottmann WH, Pearson L, Chowdhury K, Chang S, Wilde HD, Kodrzycki RJ, Zhang C, Gause KC, Parks DW, Hinchey MA (2005) Forest biotechnology: innovative methods, emerging opportunities. In Vitro Cell Dev Biol Plant 41(6): 701-717
- Notsuka K, Tsuru T, Shiraishi M (2000) Induced Polyploid Grapes via *in vitro* Chromosome Doubling. J Jpn Soc Hortic Sci 69(5): 543-551
- Oberschelp GPJ (2014) Propagação *in vitro* de *Eucalyptus dunnii* Maiden: desenvolvimento de um novo meio basal e estimação de parâmetros genéticos para características morfofisiológicas. Tese (Doutorado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 160p
- Oda S, Mello EJ, Menk ALM, Gonzalez ER, Andrade LM, Mondin M (2009) Induction and identification of polyploid *Eucalyptus grandis* plants Abstrats: 2009 IUFRO Tree Biotechnology Conference, Whistler, BC, Canada, 45P – 75
- Oudjehih B, Abdellah B (2006) Chromosome numbers of the 59 species of *Eucalyptus* L'Herit. (Myrtaceae). Caryologia 59(3): 207-212
- Oliveira LS (2014) Propagação de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. Tese (Doutorado em Recursos Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 144p
- Otto SP, Whitton J (2000) Polyploidy incidence and evolution. Annu Rev Genet 34:401-437
- Otto SP (2007) The evolutionary consequences of polyploidy. Cell 131:452-462
- Paludzyszyn Filho E, Santos PET (2011) Programa de melhoramento genético de eucalipto da Embrapa Florestas: resultados e perspectivas. (Embrapa Florestas. Documentos, 214). Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/898045/1/Doc214.pdf>>. Acesso em: 12 abril 2016.

- Pasquali G, Zanettini MHB (2007) Transgênese florestal. In: Borém A (ed.) Biotecnologia florestal. Viçosa: UFV, pp.317-334.
- Pei XS (1985) Polyploidy induction and breeding. Shangai Science and Technology Press, Shanghai, pp 95–98
- Piotto KDB (2013) Atuação da manifestação bacteriana no desenvolvimento *in vitro* de clones de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 157p
- Pio LAS (2008) Indução e identificação de poliploidia em bananeira (*Musa acuminata*, Colla). Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 72 p
- Polesi NPE (2015) Estudo da comunidade bacteriana endofítica e de sua manifestação na micropropagação de *Eucalyptus benthamii*. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 151p
- Potts BM (2004) Genetic improvement of eucalypts. In: Encyclopedia of forest sciences. Elsevier. Oxford, UK.
- Potts BM, Dungey HS (2004) Interspecific hybridization of *Eucalyptus*: key issues for breeders and geneticists. New For 27:115-138
- Quisen RC (2007) Transformação genética de *Eucalyptus camaldulensis* via co-cultivo com *Agrobacterium tumefaciens*. Tese (Doutorado em Agronomia) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 125f
- Quoirin M, Quisen RC (2006) Advances in genetic transformation of *Eucalyptus* species. In: Franche C (eds) Mol Biol Trop Pl. Research Signpost, Kerala, pp 41–56
- Rambaud C, Dubois J, Vasseur J (1992) The induction of tetraploidy in chicory (*Cichorium intybus* L. var. Magdebourg) by protoplast fusion. Euphytica 62:63-67
- Randolph LF (1932) Some effects of high temperatures on polyploidy and other variations in maize. Proc Natl Acad Sci USA 18:222-229
- Rasmussen A, Hosseini SA, Hajirezaei M, Druege U, Geelen D (2015) Adventitious rooting declines with the vegetative to reproductive switch and involves a changed auxin homeostasis. J Exp Bot 66(5):1437–1452
- Rieseberg LH (2001) Polyploid evolution: Keeping the peace at genomic reunions. Curr Biol 11:925-928
- Roth SP (1984) Indução de poliploidia em clones de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake. Dissertação (Mestre em Engenharia Florestal) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 79f
- Roux N, Dolezel J, Swennen R, Zapata-Arias FJ (2001) Effectiveness of three micropropagation techniques to dissociate cytochimera in *Musa* spp. Plant Cell Tiss Organ Cult 66: 189-197
- Roy AT, Leggett G, Koutoulis A (2001) *In vitro* tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in hop (*Humulus lupulus* L.). Plant Cell Rep 20:489–495
- Rye BL (1979) Chromosome number variation in the Myrtaceae and its taxonomic implications. Austral J Bot 27:547-573
- Sanguthai O, Sanguthai S, Kamemoto H (1973) Chromosome doubling of a *Dendrobium* hybrid with colchicine in meristem culture. Na Pua Okika O Hawaii Nei 12:12–16
- Sajjad Y, Jaskani, MJ, Mehmood A, Ahmad I, Abbas H (2013) Effect of colchicine on *in vitro* polyploidy induction in african marigold (*Tagetes erecta*) Pak J Bot 45(3): 1255-1258
- Santos AF, Auer CG, Gricoleti Jr A (2001) Doenças do eucalipto no sul do Brasil: identificação e controle. Circular Técnica 45, Embrapa Florestas, 20p.
- Santos LDT, Thadeo M, Iarema L, Meira RMSA, Ferreira FA (2008) Foliar anatomy and histochemistry in seven species of *Eucalyptus*. R Árvore 32(4): 769-779

- Sartoretto LM, Saldanha CW, Corder MPM (2008) Transformação genética: estratégias e aplicações para o melhoramento genético de espécies florestais. *Cienc Rural* 38(3): 861-871
- Savaldi-Goldstein S, Chory J (2008) Growth coordination and the shoot epidermis. *Curr Opin Plant Biol* 11(1): 42–48
- Schifino-Wittmann M (2004) Poliploidia e seu impacto na origem e evolução das plantas silvestres e cultivadas. *Rev Bras Agrociência* 10(2): 151-157
- Schifino Wittmann MT, Agnol MD (2003) Indução de poliploidia no melhoramento de plantas. *Pesq Agropec Gau* 9(1-2): 155-164
- Segatto FB, Bisognin DA, Benedetti M (2004) Técnica para o estudo da anatomia da epiderme foliar de batata. *Cienc Rural* 34(5): 1597-1601
- Shiga I, Uno Y, Kanechi M, Inagaki N (2009) Identification of polyploidy of *in vitro* anther-derived shoots of *Asparagus officinalis* L. by flow cytometric analysis and measurement of stomatal length. *J Jpn Soc Hortic Sci* 78(1):103–108
- Silva PAKXM (2014) Indução de poliploidia em mandioca. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 71p
- Silva PAKXM, Callegari-Jacques S, Bodanese-Zanettini MH (2000) Induction and identification of polyploids in *Cattleya intermedia* Lindl. (Orchidaceae) by *in vitro* techniques. *Cienc Rural* 30(1): 105-111
- Simmonds NW (1980) Polyploidy in plant breeding. *Span, London* 23: 73-75
- Sattler MC, Carvalho CR, Clarindo WR (2016) The polyploidy and its key role in plant breeding. *Planta* 243:281–296
- Sousa EP, Soares NS, da Silva ML, Valverde, SR (2010) Desempenho do setor florestal para a economia brasileira: uma abordagem da Matriz Insumo-Produto. *Rev Árvore* 34(6): 1129-1138
- Souza FF, de Queiroz MA (2004) Avaliação de caracteres morfológicos úteis na identificação de plantas poliploides de melancia. *Hortic bras* 22(3): 516-520
- Stanys V, Weckman A, Staniene G, Duchovskis P (2006) *In vitro* induction of polyploidy in japanese quince (*Chaenomeles japonica*). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 84:263–268
- Stebbins GL (1950) Variation and evolution in plants. Columbia University Press, New York
- Stebbins GL (1971) Chromosomal evolution in higher plants. Reading: Addison-Wesley
- Sun QR, Sun HS, Li LG, Bell RL (2009) *In vitro* colchicine-induced polyploid plantlet production and regeneration from leaf explants of the diploid pear (*Pyrus communis* L.) cultivar 'Fertility'. *J Hortic Sci Biotechnol* 84(5):548–552
- Tang ZQ, Chen DL, Song ZJ, He YC, Cai DT (2010) *In vitro* induction and identification of tetraploid plants of *Paulownia tomentosa*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 102: 213–220
- Tavan M, Mirjalili MH, Karimzadeh G (2015) *In vitro* polyploidy induction: changes in morphological, anatomical and phytochemical characteristics of *Thymus persicus* (Lamiaceae). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 122:573–583
- Teulieres C, Marque C (2007) *Eucalyptus*. In: Pua EC, Davey MR (eds) *Biotechnology in agriculture and forestry* 60, Transgenic Crops V. Springer, New York, pp 387–402
- Titon M, Xavier A, Otoni WC (2002) Dinâmica do enraizamento de microestacas e miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis*. *Rev Árvore* 26(6): 665-673
- Tournier V, Grat S, Marque C, El Kayal W, Penchel R, Andrade DG, Boudet AM, Teulieres C (2003) An efficient procedure to stably introduce genes into an economically important pulp tree (*Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla*). *Trans Res* 12:403–411

- Väinölä A (2000) Polyploidization and early screening of *Rhododendron* hybrids. *Euphytica* 112:239–244
- Vale FXR, Fernandes Filho EI, Liberato JR (2003) Quant: a software plant disease severity assessment. 8th International Congress of Plant Pathology, Christchurch New Zealand, p105.
- Valverde SR, Mafra JWA, Miranda MA, Souza CS, Vasconcelos DC (2012) Silvicultura brasileira – oportunidades e desafios da economia verde. Fundação Brasileira para o Desenvolvimento Sustentável – FBDS
- Varshney RK, Graner A, Sorrells ME (2005) Genomics-assisted breeding for crop improvement. *Trends Plant Sci* 10(12):621-630
- Vichiato MRM, Vichiato M, Pasqual M, de Castro DM, Dutra, LF (2007) Indução e identificação de tetraploides em *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) *Rev Ciên Agron* 38(4): 385-390
- Vichiato MRM, Vichiato M, de Castro DM, Dutra LF, Pasqual M, Marchiori Júnior W, Lima CDF, Salgado CC (2006) Análises estomática e morfométrica de folhas de plantas diplóides e tetraplóides de *Dendrobium nobile* Lindl. *Rev Ceres* 53(310): 541-548
- Vyas P, Bisht MS, Miyazawa SI, Yano S, Noguchi K, Terashima I, Funayama- Noguchi S (2007) Effects of polyploidy on photosynthetic properties and anatomy in leaves of *Phlox drummondii*. *Funct Plant Biol* 34: 673–682.
- Warner DA, Edwards GE (1988) C4 photosynthesis and leaf anatomy in diploid and autotetraploid *Pennisetum Americanum* (Pearl Millet) *Plant Sci* 56: 85-92
- Wood TE, Takebayashi N, Barker MS, Mayrose I, Greenspoon PB, Rieseberg, LH (2009) The frequency of polyploid speciation in vascular plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:13875–13879
- Xie X, Aguero CB, Wang Y, Walker MA (2015) *In vitro* induction of tetraploids in *Vitis x Muscadinia* hybrids *Plant Cell Tiss Organ Cult* 122:675–683
- Xiong YC, Li FM, Zhang T (2006) Performance of wheat crops with different chromosome ploidy: root-sourced signals, drought tolerance, and yield performance. *Planta* 224:710–718
- Yang X, Cao Z, An L, Wang Y, Fang X (2006) *In vitro* tetraploid induction via colchicine treatment from diploid somatic embryos in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Euphytica* 152:217–224
- Yang J, Yao P, Li Y, Mo J, Wang J, Kang X (2016) Induction of 2n pollen with colchicine during microsporogenesis in *Eucalyptus*. *Euphytica* 210:69–78
- Zhang Q, Luo F, Liu LI, Guo F (2010) *In vitro* induction of tetraploids in crape myrtle (*Lagerstroemia indica* L.). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 101: 41-47
- Zobel B, Talbert J (1984) *Applied Forest Tree Improvement*. John Wiley & Sons, New York.