

ALEX JUNIOR DA SILVA

INDUÇÃO DE POLIPLOIDIA EM *Eucalyptus grandis* HILL (EX MAIDEN)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do Título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S586i
2016 Silva, Alex Junior da, 1991-
Indução de poliploidia em *Eucalyptus grandis* Hill
(Ex Maiden) / Alex Junior da Silva. - Viçosa, MG, 2016.
ix, 25f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador : Carlos Roberto de Carvalho.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referências bibliográficas: f.21-25.

1. Eucalipto - Melhoramento genético.
2. Poliploidia. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-
graduação em Genética e Melhoramento. II. Título.

CDO adapt. CDD 634.91653

ALEX JUNIOR DA SILVA

INDUÇÃO DE POLIPLOIDIA EM *Eucalyptus grandis* HILL (EX MAIDEN)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do Título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 13 de outubro de 2016.

Wellington Ronildo Clarindo

Milene Miranda Praça Fontes

Carlos Roberto de Carvalho (Orientador)

Aos meus pais Erci e Janeti da Silva. À
minha irmã Karen da Silva. Ao meu primeiro
professor de Genética, Prof. Dr. Nilton César
Mantovani, por onde tudo começou.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, pelo incentivo à pesquisa, extensão e excelência em ensino. Pela oportunidade de realização do curso e estrutura oferecida para que eu pudesse prosseguir na formação como pesquisador e formador de recursos humanos.

Ao Programa e à coordenação do Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, pelo apoio, suporte e preocupação com a excelência do corpo discente.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo suporte financeiro.

À Sociedade de Investigações Florestais (SIF), pela gentileza e fornecimento de material vegetal para a realização desse trabalho.

Ao meu orientador, Professor Dr. Carlos Roberto de Carvalho, que pacientemente soube ver e trabalhar meu potencial, me ensinar ciência, colaborar e me orientar profissionalmente. Grato pela confiança, transparência e diálogos produtivos ao longo desses anos.

Ao Professor Dr. Wellington Ronildo Clarindo, pela contribuição nas discussões, pelo incentivo nos caminhos da ciência e seus questionamentos, pela amizade.

À Professora Dr^a. Milene Miranda Praça Fontes pela colaboração no delineamento do trabalho.

Aos meus pais Erci Natalício da Silva e Janeti Strada da Silva, à minha irmã Karen da Silva, por toda confiança, orgulho, educação e amor sem igual. Eu consegui!

Às minhas amigas Cassia, Ana, Daiana, e Angélica por todo companheirismo, amor, lutas e superação. Sem o apoio de vocês eu não teria conseguido.

Às amigas Fernanda Soares, Jéssica Coutinho e Tallita Rocha, pelo cuidado, confidencialidade, amor, zelo e amizade ímpares. Vocês fizeram a jornada muito mais leve, me ajudaram a caminhar quando não consegui. Palavras são poucas para agradecer.

Aos amigos do Laboratório de Citogenética e Citometria da UFV, Ana, Daniel, Natália, Mariana e Paulo, por toda ajuda na realização desse trabalho, companheirismo e sorrisos compartilhados. Muito obrigado!

Aos meus amigos de república, Luiz, Diego, Matheus, Gabriel e Altair, por toda ajuda, parceria e cumplicidade de irmãos.

A todos aqueles que passaram na minha vida e acreditaram em mim. Aos que permaneceram.

A Deus, meu pai, meu irmão, meu confidente e companheiro nas horas boas e daquelas em que a esperança falhou. Pela vida, conhecimento, discernimento e sabedoria. A Ti todas as coisas.

“The world is full of magic things, patiently waiting for our senses to grow sharper.”

W. B. Yeats

SUMÁRIO

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
1. REVISÃO DE LITERATURA	1
1.1. O gênero <i>Eucalyptus</i> e sua importância na silvicultura brasileira	1
1.2. Poliploidia: origem, classificação e implicações no genoma	2
1.3. Poliploidia em espécies florestais	3
2. OBJETIVOS	5
2.1. Objetivo Geral	5
2.2. Objetivos Específicos	5
3. MATERIAL E MÉTODOS	6
3.1. Material Biológico	6
3.2. Germinação <i>in vitro</i> e assepsia de sementes	6
3.3. Poliploidização de plântulas (via meristemas apicais)	6
3.4. Avaliação da ploidia de DNA por Citometria de Fluxo	7
3.5. Pré-tratamento e preparação de lâminas	8
3.6. Análise de imagem	9
3.7. Multiplicação e Aclimatização	9
4. RESULTADOS	10
4.1. Estabelecimento da cultura <i>in vitro</i>	10
4.2. Poliploidização de plântulas (via meristemas apicais)	10
4.3. Identificação de poliploides	11
4.4. Propagação de plantas induzidas e aclimatização	14
5. DISCUSSÃO	16
5.1. Estabelecimento da cultura <i>in vitro</i>	16
5.2. Poliploidização de plântulas	16

5.3. Indução e identificação de indivíduos poliploides	17
6. CONCLUSÃO	20
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21

RESUMO

SILVA, Alex Junior da, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2016. **Indução de Poliploidia em *Eucalyptus grandis* Hill (Ex Maiden)**. Orientador: Carlos Roberto de Carvalho.

O gênero *Eucalyptus* compreende espécies de angiospermas lenhosas mais amplamente cultivadas no mundo. No Brasil, espécies cultivadas de eucalipto têm sido alvo de programas de melhoramento principalmente em virtude do seu alto valor como fonte de matéria-prima para produção de madeira, celulose, papel, óleos essenciais e energia. Para suprir novas demandas de plantas com valor a ser agregado dentro do setor da silvicultura, a poliploidia tem sido uma estratégia biotecnológica alternativa com grande potencial da geração de plantas mais robustas dentro de programas de melhoramento. Além do efeito “giga” característicos de poliploides, incrementos em biomassa, taxa de crescimento e tolerância a estresses bióticos e abióticos, são efeitos conhecidos advindos da poliploidia. Considerando a ausência de poliploides naturais, o objetivo desse estudo foi desenvolver protocolos para indução de poliploidização *in vitro* em plântulas de *Eucalyptus grandis*, visando a obtenção de plantas tetraploides. Após estabelecimento da cultura *in vitro*, plântulas de 1,0 e 1,5 cm foram submetidas a diferentes concentrações de colchicina e tempos de exposição. Decorridos 40 dias após os tratamentos, foi realizada a análise de sobrevivência dos materiais e coleta de amostras para análise da ploidia de DNA via citometria de fluxo. Os resultados demonstram 73,8 % e 77,7 % de sobrevivência para explantes de 1,0 e 1,5 cm, respectivamente. Para explantes de 1,0 cm, obteve-se 38 % de tetraploides na concentração de 0,5 mM por 96 horas, e em explante de 1,5 cm, 68 % de tetraploides na concentração de 1,5 mM por 120 horas. Embora seja possível obter 68 % de tetraploides com concentração de 1,5 mM por 120 horas, os resultados sugerem que o sucesso da poliploidização pode não estar relacionado a doses elevadas de colchicina, mas a tempos ótimos de exposição ao antitubulínico. A citometria de fluxo possibilitou o diagnóstico precoce da ploidia de DNA em plântulas. A metodologia estabelecida nesse estudo tem potencial para ser empregada na obtenção de poliploides sintéticos em larga escala em campos experimentais e em programas de melhoramento de eucalipto.

ABSTRACT

SILVA, Alex Junior da, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2016. **Polyploidy Induction in *Eucalyptus grandis* Hill (Ex Maiden)**. Advisor: Carlos Roberto de Carvalho.

Eucalyptus genus comprises woody angiosperms species most cultivated in the world. In Brazil, cultivated species of eucalyptus have been the subject of breeding programs mainly because of their high value as a source of raw material for production of wood, pulp, paper, essential oils and energy. To supply new demands of plants with value to be added in the forestry sector, polyploidy has been an alternative biotechnological strategy with great potential of generating more robust plants in breeding programs. Besides the "giga" effect characteristic of polyploid, increases in biomass, growth rate and tolerance to biotic and abiotic stresses are known effects from polyploidy. Considering the absence of natural polyploids, the aim of this study was to develop protocols to induce *in vitro* polyploidy in *Eucalyptus grandis* seedlings, in order to obtain tetraploid plants. After *in vitro* culture establishment, plantlets with 1.0 and 1.5 cm were submitted to different concentrations of colchicine and exposure times. Forty days after treatment, the survival analysis was performed of materials and collection of samples for analysis of DNA ploidy via flow cytometry. The results showed 73, 8 and 77.7% of survival for explants with 1.0 and 1.5 cm, respectively. For explants 1.0 cm, 38% of tetraploid were obtained at a concentration of 0.5 mM for 96 hours, and the explant 1.5 cm, 68% of tetraploid in a concentration of 1.5 mM for 120 hours. Although it is possible to obtain 68% of tetraploid with a concentration of 1.5 mM for 120 hours, the results suggest that the success of polyploidy may not be related to high doses of colchicine, but the optimal time of exposure to antimicrotubular. Flow cytometry enabled the early diagnosis of DNA ploidy in seedlings. The established methodology in this study has the potential to be used in large-scale to obtain synthetic polyploid in experimental fields and eucalyptus breeding programs.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. O gênero *Eucalyptus* e sua importância na silvicultura brasileira

O gênero *Eucalyptus* pertencente à família Myrtaceae, compreende mais de 800 espécies arbóreas e arbustivas, com centro de origem na Austrália a regiões próximas, são as espécies de angiospermas lenhosas mais amplamente cultivadas no mundo (LADIGES et al., 2003). Assim que introduzidos na Europa, África do Sul, Brasil, Chile e Índia, o gênero foi rapidamente adotado pela silvicultura pelo notável crescimento e adaptação (DOUGHTY, 2000; GRATTAPAGLIA; KIRST, 2008). Vários países mantêm bancos de germoplasma com diversas espécies do gênero, sendo *Eucalyptus grandis*, *E. calmaldulensis*, *E. globulus* e *E. urophylla* as espécies mais plantadas (GRATTAPAGLIA; KIRST, 2008).

Além da importância ecológica, a cultura do eucalipto no Brasil representa a principal fonte de matéria-prima para a produção de madeira, celulose, papel, óleos essenciais e energia (GRATTAPAGLIA; KIRST, 2008; ALVARENGA et al., 2014). No setor florestal, dos 7,74 milhões de hectares de florestas plantadas, cerca de 5,56 milhões são florestas de eucaliptos. Isso representa um montante de 71,9 % do total, principalmente distribuídos nos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul e Bahia (IBÁ, 2015).

O Brasil é líder mundial na produtividade em relação ao incremento médio anual (m³/ha/ano), graças à condução de programas de melhoramento genético de eucalipto, desde sua adoção pelas indústrias, principalmente de papel e celulose (NETO, 2012; IBÁ, 2015). Embora muitos clones sejam altamente produtivos em madeira e celulose, ainda carecem em outras características como conteúdo excessivo de lignina (entre 22 % e 30 %), teores de extrativos, características físico-mecânicas e anatômicas, densidade básica da madeira, etc. Esses aspectos influenciam nas tensões de crescimento e refletem no processamento da madeira e a sua utilização como matéria-prima (FILHO; SANTOS, 2011). Nesse sentido, a descoberta e caracterização de genes, bem como a construção de mapas genéticos, o emprego de marcadores moleculares, a transformação genética e a indução de poliploides sintéticos possibilitam novos estudos e enriquecimento dos

programas de melhoramento genético de eucalipto visando suprir as novas demandas tecnológicas (GRATTAPAGLIA; KIRST, 2008; MARITZ, 2008).

1.2. Poliploidia: origem, classificação e implicações no genoma

A poliploidia é um fenômeno natural e se refere à presença de geralmente mais de dois conjuntos cromossômicos presentes nas células de um organismo (WENDEL, 2000). Estudos genômicos apontam que todas as plantas com sementes tenham passado por pelo menos um evento de duplicação do genoma durante o curso evolutivo (RENNY-BYEFIELD; WENDEL, 2014; WENDEL et al., 2016). Além disso, os táxons com o genoma duplicado podem ter tido maiores chances de sobrevivência durante a extinção de espécies no Cretáceo-Terciário (FAWCETT et al., 2009).

Com papel importante durante a evolução, a poliploidia fornece uma rota relativamente rápida para diversificação e especiação de plantas. Esse processo é favorecido em populações naturais por meio de mudanças gênicas ou isolamento reprodutivo ocasionado por diferenças no número cromossômico e dissimilaridades de genomas híbridos (OTTO; WHITTON, 2000; ADAMS; WENDEL, 2005; FAWCETT et al., 2009).

Organismos poliploides podem ocorrer naturalmente pela duplicação (endorreduplicação ou endomitose) do genoma na mesma planta, ou pelo cruzamento de espécies distintas, sendo classificado como autopoliploide e alopoliploide respectivamente (HASLOP-HARRISON; SCHWARZACHER, 2011). Outra forma é o cruzamento espontâneo pela fusão de gametas não reduzidos, podendo originar poliploides bilaterais (pela união de dois gametas não reduzidos) ou poliploides unilaterais (formados a partir da fusão de um gameta reduzido com outro gameta não reduzido) (SATTLER et al., 2016).

De maneira artificial, a poliploidia pode ser induzida em plantas por métodos físicos, químicos ou biotecnológicos. Pelos métodos físicos, pode-se citar os tratamentos que envolvem choques de temperatura envolvendo frio e calor (RANDOLPH, 1932). Nos métodos biotecnológicos, tem-se empregado os sistemas *in vitro* cultivando massas celulares de calos pelo surgimento de células variantes (PHILLIPS et al., 1994), e por meio de protoplastos fusionados química ou mecanicamente (SLATER et al., 2003). Em plantas a colchicina (LEHRER et al., 2008) e dos herbicidas orizalina (HUGDAHL;

MOREJOHN, 1993) e trifluralina (EECKHAUT et al., 2002), têm sido utilizados como indutores químicos que impedem a formação dos microtúbulos durante a divisão celular.

A obtenção desses poliploides sintéticos tem chamado atenção dos melhoristas como uma importante ferramenta a ser utilizada no melhoramento genético vegetal. Dentre as espécies cultivadas que possuem genoma poliploide tem sido destacado o trigo, a aveia, amendoim, soja, morango, repolho, batata-doce, tabaco, melancia, banana, citros, pêsego, café, dentre outras. (AVERSANO et al., 2012).

De maneira geral, a consequência mais amplamente conhecida da poliploidização é o efeito “giga” que se trata do incremento nos órgãos de plantas, causado pelo aumento no número de cópias de genes (SATTLER et al., 2016). Em autopoliploides, apesar da redução da fertilidade em virtude da formação de multivalentes e irregularidades meióticas (STEBBINS, 1971), essas plantas podem apresentar maior resistência a fatores bióticos e abióticos, como temperatura, déficit hídrico, salinidade e inclusive resistência à pragas e doenças (LEVIN, 2002). Nos indivíduos alopoliploides, a hibridação interespecífica provoca maior vigor (similar ao efeito da heterose) em relação aos parentais diploides, geralmente com incremento na biomassa, taxa de crescimento, estatura e tolerância à estresses (CHEN, 2010).

Ao nível molecular, estudos demonstram que a poliploidia é a fusão de dois ou mais genomas que interagem em ajustes complexos e extensivos denominados de arranjos genômicos (ADAMS; WENDEL, 2005). Dentre os principais arranjos genômicos, pode-se citar perdas de sequências de DNA, amplificação ou redução de sequências repetitivas e alterações cromossômicas estruturais (TAYALÉ; PARISOD, 2013). Além destes ajustes moleculares, modificações no padrão da expressão gênica, ativação de elementos de transposição, mudanças de formas alélicas e epigenéticas também têm sido reportadas (WENDEL, 2005; HEGARTY; HISCOCK, 2008; ADAMS; TAYALÉ; PARISOD, 2013).

1.3. Poliploidia em espécies florestais

Em coníferas, a poliploidia tem sido induzida em espécies comerciais como *Pinus silvestres*, *P. contortia*, *Picea abis* e *Larix sibirica* com uso de colchicina em diferentes concentrações. Por serem trabalhos pioneiros iniciados na década de 40, ainda não dispunham das tecnologias *in vitro*, a alta mortalidade era um fator limitante para obtenção de indivíduos tetraploides. A tetraploidia foi verificada por análises citológicas

de meristemas radiculares em casa de vegetação, em folhas e em grãos de pólen, onde manteve-se estável nos indivíduos analisados (JOHNSSON, 1975). Anos mais tarde em folhosas, como a *Bétula* europeia, a mesma estratégia empregada resultou em maior número de poliploides com baixas concentrações de colchicina, onde autotetraploides obtidos puderam ser propagados em condições estéreis gerando novas plântulas (SÄRKILAHITI; VALANNE, 1990).

A indução de tetraploides em acácias tem sido estudada com finalidade de incorporação de poliploides em programas de melhoramento, com vista à obtenção de plantas com baixa fertilidade e até estéreis quando cruzadas com indivíduos diploides. Sementes tratadas com colchicina geraram mais indivíduos tetraploides que as tratadas com orizalina, que demonstrou ser tóxica às plântulas. A determinação do nível de ploidia e seleção dos poliploides foram facilitadas pela citometria de fluxo e confirmada por meio de preparações citológicas (BLAKESLEY, et al., 2002; HARBARD, et al., 2012; LAM, et al., 2014).

Em eucaliptos, Tracy (2008) tem avaliado o potencial de indução em sementes e gemas axilares, destacando diferenças fenotípicas após tratamento com colchicina. Raízes curtas, hipocótilos finos e folhas mais escuras, tanto em indivíduos tetraploides como mixoploides também foram identificadas por esse autor. Lin et al. (2010), utilizando ápices *Eucalyptus globulus*, reportaram que concentrações em torno de 0,4 a 0,5% de colchicina geram maiores taxas de poliploides, embora a mortalidade seja um fator limitante (cerca de 60% dos explantes), dificultando a eficiência do processo.

Em *E. grandis*, Han et al. (2011) desenvolveram uma equação para prever a indução máxima e a concentração a ser utilizada, levando em conta uma série de fatores que podem influenciar durante a poliploidização. Esses autores, consideraram também que apesar da predição poder alcançar 51% na taxa de indução, indivíduos mixoploides ainda permanecem como entraves durante todo o processo e manutenção das culturas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O presente estudo teve como objetivo induzir poliploidização *in vitro* em plântulas de *Eucalyptus grandis*, visando a obtenção de plantas tetraploides;

2.2. Objetivos Específicos

- I. Estabelecer a cultura *in vitro*, obter plântulas de *E. grandis* como fonte de explantes para poliploidização;
- II. Induzir a poliploidia em plântulas com diferentes concentrações de colchicina e tempos de exposição.
- III. Identificar indivíduos poliploides por seleção assistida usando técnicas de citometria de fluxo e citogenética.
- IV. Propagar plantas induzidas *in vitro* via organogênese;
- V. Aclimatizar plantas tetraploides;
- VI. Publicação dos resultados obtidos em jornais e revistas científicas;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material biológico

O experimento foi desenvolvido com plântulas de *E. grandis* ($2n = 2x = 22$) germinadas de sementes de origem de polinização aberta, coletadas de estações experimentais e fornecidas pela Sociedade de Investigações Florestais (SIF). Todos os procedimentos foram realizados no Laboratório de Citogenética e Citometria do Departamento de Biologia Geral (DBG) da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

3.2. Germinação *in vitro* e assepsia de sementes

A assepsia das sementes de *E. grandis* foi realizada em etanol 70 % (v/v) por um minuto, seguido de lavagem em solução de hipoclorito de sódio 2,5 % e água deionizada autoclavada (H₂O_d) acrescidos de duas gotas de Tween 20 (Sigma[®]), durante 20 minutos. Em seguida, as sementes foram lavadas 3 vezes em H₂O_d durante 5 minutos.

Para a germinação *in vitro*, as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio com meio de germinação M1 (Tabela 1), e mantidas em sala de crescimento à temperatura de 24 °C (± 2 °C) e fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro, respectivamente) até o momento da coleta dos explantes.

3.3. Poliploidização de plântulas via meristemas apicais do caule

Após a germinação, dois tipos de explantes foram selecionados a partir de plântulas com comprimentos: a) plântulas de 1,0 cm (10 dias após a germinação) e b) plântulas de 1,5 cm (15 dias após a germinação). A indução de poliploidia foi realizada em Erlenmeyer, cada um contendo até 5 plântulas submersas em 10 mL de meio de cultura de poliploidização líquido, M2 (Tabela 1). Após autoclavagem, foram adicionados ao meio de poliploidização 0,5, 1,0 e 1,5 mM de colchicina (Sigma[®]) filtro esterilizada e 0,5 % de dimethyl sulphoxide (Sigma[®] - DMSO). Cada frasco foi incubado por 48, 72, 96, 120 e 144 horas, agitados constantemente em shaker a 60 rpm e mantidos em sala de crescimento com temperatura de 24 °C (± 2 °C) e fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro, respectivamente). Todos os explantes foram inoculados às 18:00 horas. Após a indução, os explantes foram lavados 3x por 5 min em H₂O_d autoclavada, para remoção da solução

de poliploidização e do agente antitubulínico. Em seguida, os explantes foram inoculados em meio de proliferação M3 para crescimento e indução de brotações. Todos os procedimentos foram manipulados sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar.

Foram analisados os efeitos da dosagem do antitubulínico, tempo de exposição dos explantes ao antitubulínico e a influência do comprimento da plântula. A partir desses parâmetros, avaliou-se a eficiência do método na obtenção de indivíduos tetraploides e a sobrevivência do material pós-tratamento.

Tabela 1: Composição dos meios de cultura.

Composto	M1*	M2*	M3*
Sais MS (Sigma®)	2,15 g l ⁻¹	2,15 g l ⁻¹	4,3 g l ⁻¹
Vitaminas MS**	10 m l ⁻¹	10 m l ⁻¹	10 m l ⁻¹
Myo-inositol (Sigma®)	0,1 g l ⁻¹	0,1 g l ⁻¹	0,1 g l ⁻¹
Cysteine (Sigma®)	-	0,04 g l ⁻¹	0,04 g l ⁻¹
BAP (Sigma®)	-	-	0,5 mg l ⁻¹
ANA (Sigma®)	-	-	0,05 mg l ⁻¹
Sucrose (Sigma®)	30 g l ⁻¹	30 g l ⁻¹	30 g l ⁻¹
Agar Type A (Sigma®)	6,5 g l ⁻¹	-	6,5 g l ⁻¹
pH	5,8	5,8	5,8

M1 meio de germinação, M2 meio de poliploidização líquido, M3 meio de proliferação.

* seguido de autoclavagem por 20 min a 121 °C, 121 kPa.

** solução estoque: 0,2 g l⁻¹ glicina, 0,05 g l⁻¹ ácido nicotínico, 0,05 g l⁻¹ piridoxina e 0,01 g l⁻¹ tiamina.

3.4. Avaliação da ploidia de DNA por citometria de fluxo

Após 40 dias de cultivo *in vitro*, a terceira ou quarta folha de cada planta foi coletada para análise da ploidia via CF. O material coletado foi acondicionado por até 24 horas em microtubos contendo 1,5 mL de H₂O_d, mantidos em geladeira a 5 °C para posterior análise.

A etapa de extração dos núcleos foi conduzida de acordo com o método de Galbraith et al. (1983), e o procedimento de *chopping* das folhas feito em placa de Petri contendo 200 µL de solução tampão de extração nuclear OTTO-I (OTTO, 1990), acrescido de 2,0

mM de dithiothreitol (DDT; Sigma®) e 7 % de Polyethilenglycol 2000 (PEG; Merck®). Após 4 minutos, 200 µL de solução do mesmo tampão e 1,5 mL do tampão de coloração OTTO-II (contendo 4' 6' -diamino-2-fenilindol), foram adicionados sobre o material. Em seguida a suspensão foi filtrada em filtros de nylon (Partec®) de 30 µm e posteriormente 20 µm de diâmetro. Os tubos de análise foram mantidos no escuro até o momento da leitura e análise pelo citômetro de fluxo Partec-PAS® (Partec®).

O citômetro é equipado com lâmpada HBO de arco de mercúrio de 100 W para excitação em UV e laser de íon argônio, 488 nm, 20 mW com filtros KG1, BG38, UG1, GG435. O equipamento foi cuidadosamente alinhado e calibrado pelo uso de microbeads e soluções padrão seguindo as recomendações do fabricante. As amostras foram analisadas em histogramas com ferramentas de auxílio do programa FlowMax® (Partec®) para a determinação do conteúdo de DNA nuclear e ploidia relativa de cada amostra, comparadas à planta padrão diploide ($2n = 2x = 22$).

3.5. Pré-tratamento e preparação de lâminas

Para a obtenção de cromossomos metafásicos, as lâminas foram preparadas de acordo com o procedimento citogenético descrito por Abreu *et al.* (2008) e Carvalho *et al.* (2008). Raízes obtidas de plantas tetraploides cultivadas *in vitro* foram incubadas em solução contendo 3 mM de amiprofos-metil (APM), para obtenção das metáfases. A fixação foi realizada com solução de Carnoy (metanol: ácido acético, 3:1), com três trocas de 10 minutos cada. Posteriormente, o material foi estocado na mesma solução a -20 °C até sua utilização.

A maceração das raízes foi realizada por digestão enzimática de 2 horas e 30 minutos a 35 °C em pool enzimático (0,5% celulase Yakult + 2% celulase Sigma®, C1184 + 0,5% hemicelulase Sigma®, H0771 + 0,5 % macerozyme orozuka R10 Yakult), diluído em 50 – 120 µl de tampão citrato (10 mM de ácido cítrico e 10 mM de citrato de sódio tribásico) e, após, acrescentado 1 – 5 µL de pectinase (Sigma®, P2736). Após digestão enzimática, as raízes foram cuidadosamente lavadas 3x em H₂O por 10 min e então novamente fixadas e estocadas como descrito acima. Este procedimento foi realizado como forma de validação da ploidia obtida por técnica citogenética.

3.6. Análise de imagem

Cromossomos metafásicos foram capturados por uma vídeo-câmera CCD (DP71 Olympus), acoplada a um microscópio Olympus BX-60 equipada com: fonte de luz estabilizada, objetiva de imersão de 100 x, um condensador (aplanat achromat) com diafragma 1.4, e filtro de densidade neutra (ND6). A digitalização e a análise morfométrica das imagens foram realizadas em um sistema de análise (Image Pro-Plus® 6.1, Media Cybernetics®).

3.7. Multiplicação e aclimatização

Após a validação da ploidia, plantas tetraploides foram multiplicadas em meio de proliferação M3, e enraizadas *in vitro* para fins de monitoramento e manutenção dessas plantas como um padrão interno. Ao atingirem 4 a 5 cm de comprimento, procedeu-se a etapa de aclimatização das mesmas em potes de plástico contendo substrato comercial. Em seguida, foram mantidas em sala de crescimento sob temperatura, fotoperíodo e irrigação controlados.

4. RESULTADOS

4.1. Estabelecimento da cultura *in vitro*

A metodologia empregada para assepsia do material promoveu a desinfestação das sementes, onde contaminações microbianas foram incidentes em apenas 2 % dos materiais inoculados. O meio de germinação M1 e as condições pré-estabelecidas da sala de crescimento proporcionaram 95 % de germinação das sementes. O crescimento das plântulas de *E. grandis* foi aparentemente normal e nenhuma anomalia foi reportada. Até o momento da coleta, as mesmas possuíam cotilédones, primeiro par de folhas em emergência e sistema radicular com comprimento variando de 1,5 a 2,0 cm de comprimento.

A quantidade e composição do meio de poliploidização líquido M2, acrescido de DMSO e colchicina nas suas diferentes concentrações, permitiu recobrimento de todos explantes. Não houve contaminação aparente durante o processo de transferência e poliploidização dos explantes (até 144 horas).

O meio de proliferação M3 suplementado com os reguladores de crescimento BAP e ANA, possibilitou a formação de brotações tanto no material recém tratado quanto em materiais poliploides identificados e multiplicados.

4.2. Poliploidização de plântulas via meristemas apical do caule

A sobrevivência de indivíduos ao longo do tempo de exposição e nas diferentes concentrações de colchicina foi decrescente nos tratamentos para ambos os tipos de explantes (Figura 1). Das 480 plantas inoculadas para explantes com 1,0 cm de comprimento, 354 sobreviveram às diversas concentrações e tempo, representando uma taxa de sobrevivência de 73,8 %. Em explantes de 1,5 cm de comprimento, 345 dos 444 inoculados sobreviveram, tendo uma taxa de sobrevivência de 77,7 %.

Até o período de 72 horas, materiais com 1,0 cm mantiveram sobrevivência em torno de 73 a 100 % (Figura 1a), sendo que em tratamentos posteriores decresceram até o menor percentual de sobreviventes de 36 % (1,5 mM/144 horas). Em explantes com 1,5 cm (Figura 1b), durante as primeiras 72 horas de tratamento, a sobrevivência de indivíduos oscilou em torno de 85 a 100%, também apresentando decréscimo na taxa após esse período, sendo 17% o menor percentual de sobreviventes (1,5 mM/ 144 horas).

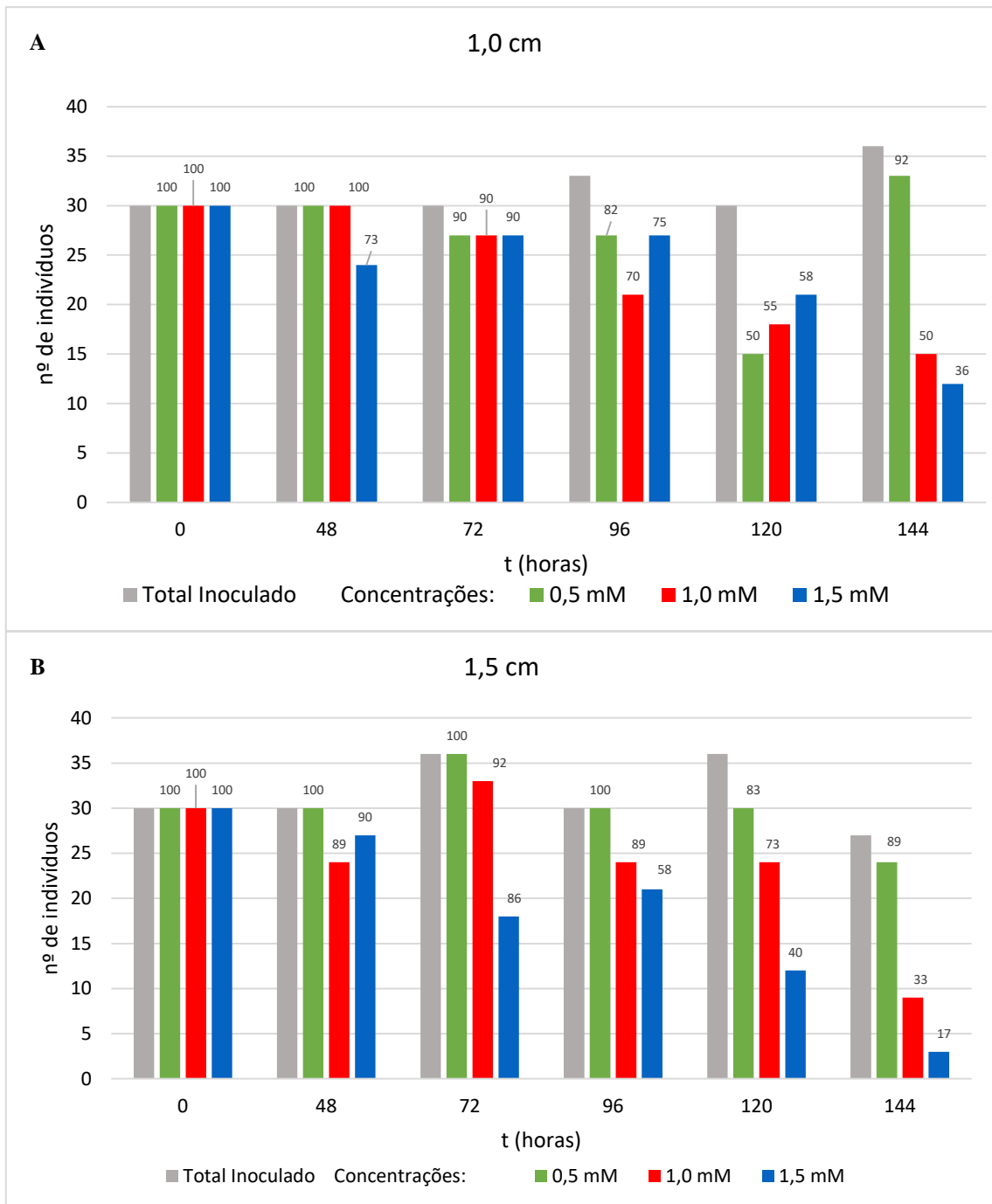


Figura 1: Sobrevivência de plântulas submetidas a diferentes doses de colchicina (mM) e tempos de duração do tratamento (*t*, horas). Em (A) plântulas com 1,0 cm de comprimento e em (B) plântulas com 1,5 cm de comprimento. Valores acima das colunas são representados em percentuais (%).

4.3. Identificação de poliploides

Para a seleção assistida dos poliploides, a identificação da ploidia foi realizada via CF considerando apenas plantas que emitiram três ou mais folhas. Entendendo que a

partir deste critério, os tecidos originados pelo meristema apical apresentem a real ploidia após o evento de poliploidização. Foram analisadas 309 das 354 plantas vivas em explantes de 1,0 cm, e 294 das 345 plantas vivas em explantes com 1,5 cm de comprimento. Esse diferencial representou 12,8 e 14,8 % (para explantes de 1,0 e 1,5 cm de comprimento, respectivamente) de plantas que não atenderam aos pré-requisitos de coleta.

Em todos tratamentos delineados para ambos os tipos de explantes houve mudança no nível da ploidia de DNA (Figura 2), gerando indivíduos tetraploides e/ou mosaicos. No entanto, também houve manutenção dos indivíduos diploides exceto em explantes de 1,5 cm de comprimento nos tratamentos de 1,5 mM por 48 e 72 horas (Figura 2f).

Em explantes de 1,0 cm de comprimento, a maior ocorrência de indivíduos tetraploides deu-se na concentração de 0,5 mM (Figura 2a), sendo que ao tempo de 96 horas obteve-se 9 tetraploides de 24 indivíduos analisados (representando uma eficiência de 38 %). Nas três doses de colchicina testadas houve indivíduos mosaicos, no entanto, em maior quantidade nas concentrações de 1,0 e 1,5 mM, respectivamente (Figura 2b,c).

Em explantes de 1,5 cm de comprimento, o maior número de tetraploides deu-se na concentração de 0,5 mM de colchicina (Figura 2d), onde 30 dos 135 indivíduos analisados ao longo dos diversos tempos foram tetraploides. Nos tratamentos de 0,5 mM/ 120 horas e 1,5 mM/ 48 horas, metade dos indivíduos analisados foram tetraploides. No tratamento de 1,5 mM/ 120 horas (Figura 2f), 6 das 9 plantas foram tetraploides (representando 67 % de eficiência).

Considerando todas as concentrações e tempos testados, obteve-se 27 tetraploides das 309 plantas analisadas provenientes de explantes com 1,0 cm (representando eficiência de 8,7 %). Utilizando explantes de 1,5 cm e considerando as mesmas situações acima descritas, 60 das 294 plantas analisadas foram tetraploides (representando eficiência de 20,4 %). Dentro das condições experimentadas em todos os tratamentos, obteve-se 87 indivíduos tetraploides de 603 plantas analisadas, definindo como 14,4 % de eficiência geral do estudo realizado.

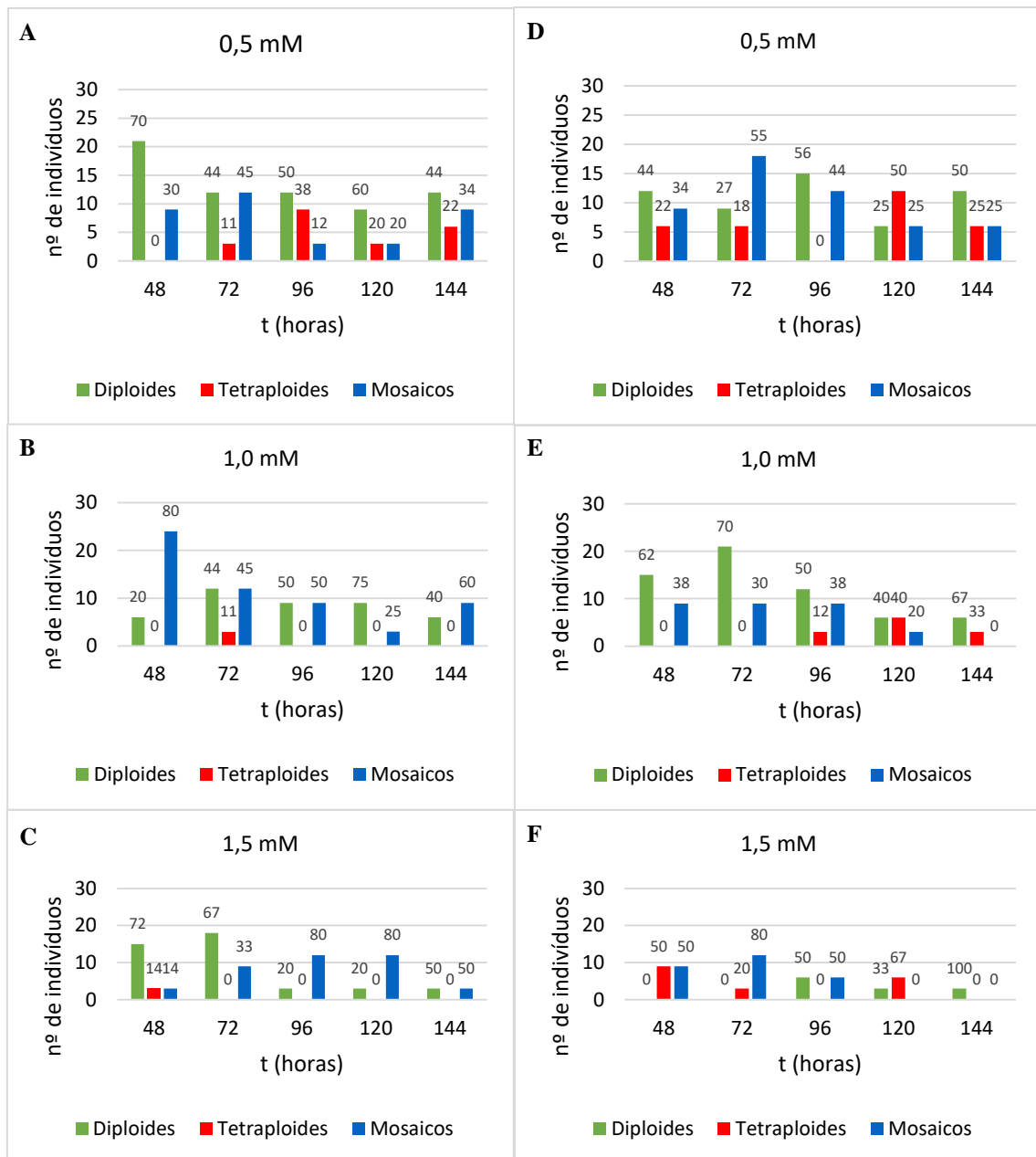


Figura 2: Poliploidia em meristemas apicais. Em (A, B, e C) explantes com 1,0 cm e em (D, E e F) explantes com 1,5 cm de comprimento. Valores acima das colunas são representados em percentuais (%).

A identificação da ploidia de DNA dos núcleos isolados foi dada pela leitura de dois picos referentes à fase G_0/G_1 , no canal 200 (Figura 3a) calibrado como referência a quantidade de DNA padrão diploide. Desta forma, indivíduos tetraploides tiveram leituras no canal 400 (Figura 3b).

As preparações citogenéticas utilizando tratamento com 3 mM de APM possibilitou a obtenção de cromossomos metafásicos em raízes de plantas diploides ($2n = 2x = 22$) e tetraploides ($2n = 2x = 44$) conforme Figura 3c e 3d, respectivamente.

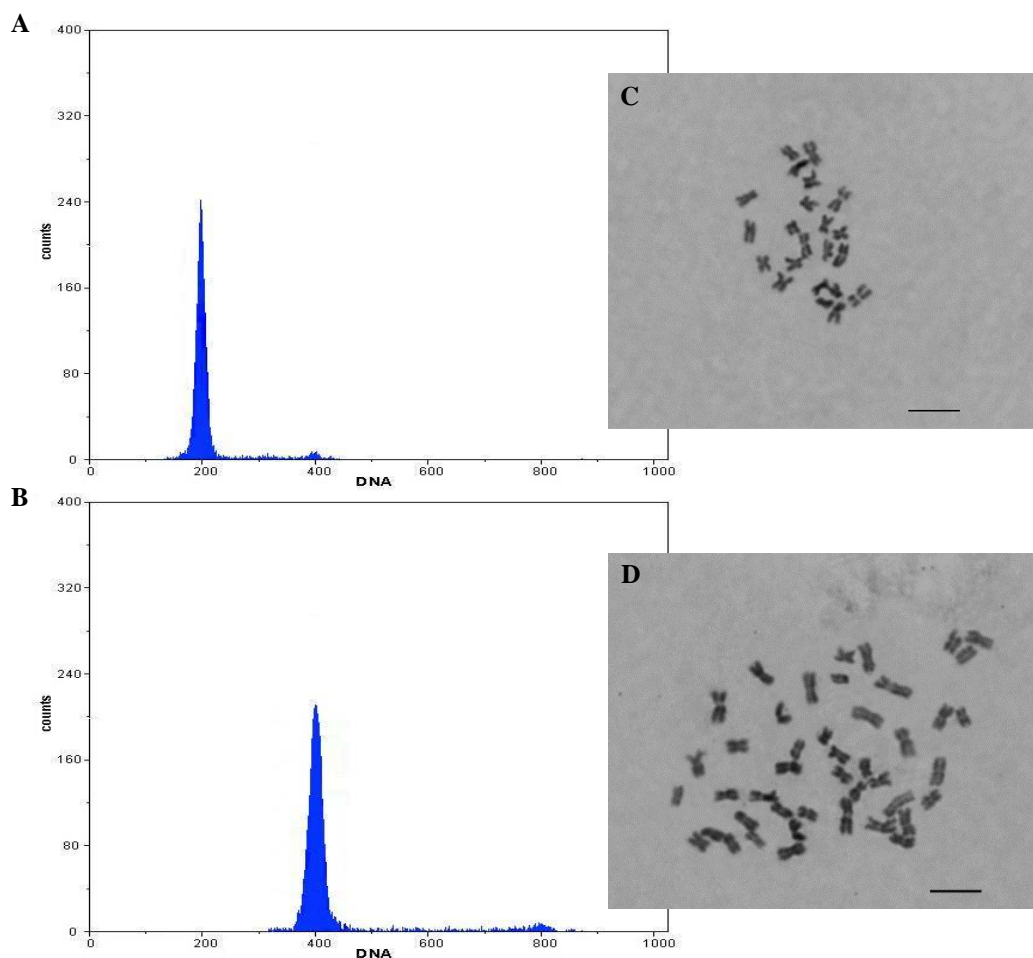


Figura 3: Histograma representativo referente à ploidia relativa de DNA nuclear de *E. grandis*. No canal 200 o pico G_1/G_0 da planta padrão diploide (a) e no canal 400 o pico G_1/G_0 referente à planta tetraploide induzida (b), CV= 4,1 e 4,8 %, respectivamente. Em (c) cromossomos metafásicos da planta padrão diploide ($2n = 2x = 22$) e em (d) cromossomos metafásicos de uma planta tetraploide ($2n = 4x = 44$). Barra = 5 μ m.

4.4. Propagação de plantas induzidas e aclimatização

Após identificação, plantas tetraploides foram multiplicadas em meio M3 e mantidas *in vitro* como padrão de referência ($2n = 4x$). Para o enraizamento *in vitro*, as mesmas foram transferidas para meio de cultura M1 até ocorrência de pelo menos uma raiz. Durante a etapa de aclimatização, dos 87 tetraploides obtidos, 40 permaneceram vivos com crescimento normal (Figura 4).

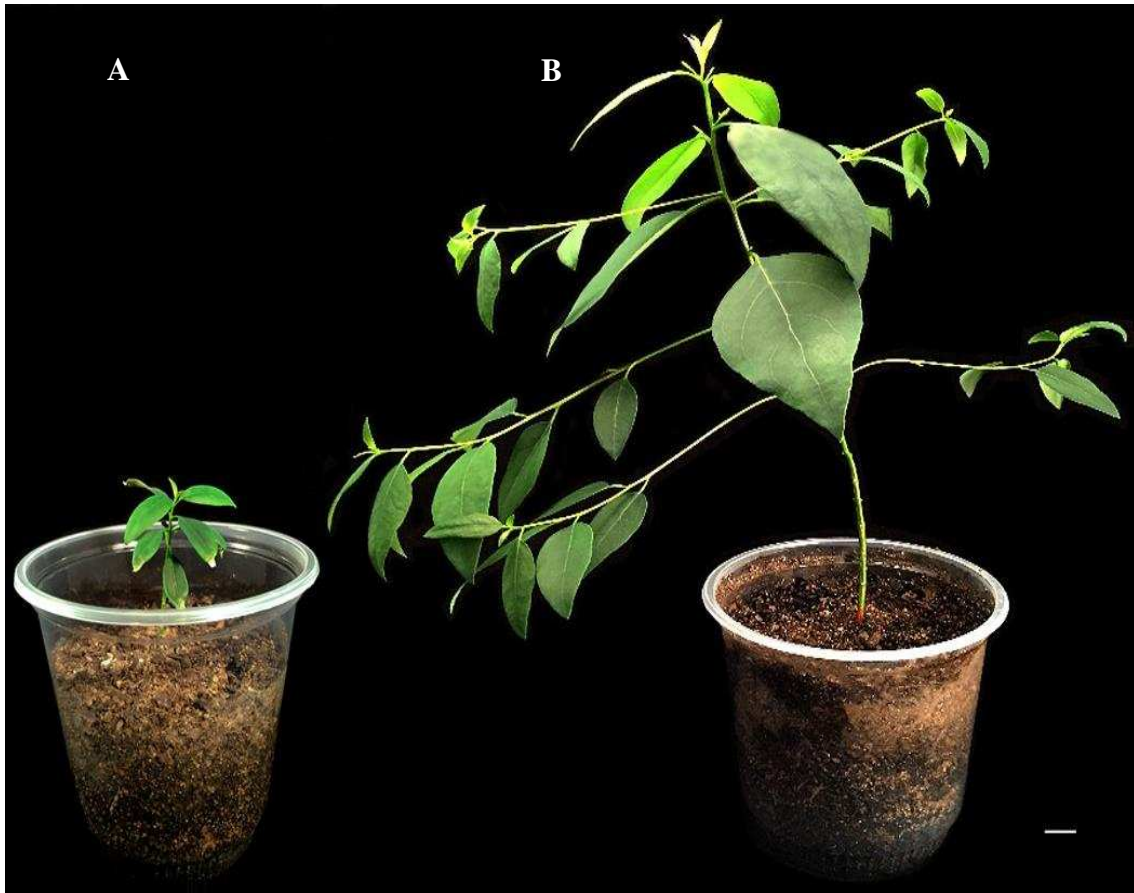


Figura 4: Planta tetraploide após 10 dias (a), em (b) planta tetraploide após 45 dias de aclimatização. Barra = 1 cm.

5. DISCUSSÃO

5.1. Estabelecimento da cultura *in vitro*

A metodologia adotada para assepsia das sementes mostrou-se eficiente, considerando o baixo percentual de contaminação. O meio de cultura M1 e as condições pré-estabelecidas da sala de crescimento, proporcionaram condições de germinação, desenvolvimento e estabelecimento da cultura adequados para fornecimento de explantes para o processo de poliploidização.

De maneira geral, os procedimentos de assepsia *in vitro* para sementes de eucalipto seguem a mesma metodologia descrita, com ligeiras variações quanto às concentrações de cada reagente utilizado, o que depende do tamanho da semente e características da casca (McCOMB; BENNETT, 1986). Alcântara et al. (2011), testando métodos de assepsia e germinação em sementes de *E. grandis*, relatou 87,5 % de estabelecimento (sendo 12,5 % de contaminações microbianas) utilizando as mesmas concentrações e reagentes descritos neste trabalho, adicionando ainda 1 % de fungicida *benomyl*. O sucesso da baixa taxa de contaminação em nosso trabalho, pode ser explicado pela manipulação adequada de todos os procedimentos em condições assépticas em câmara de fluxo laminar.

Para o estabelecimento *in vitro* de lenhosas como o eucalipto, meios ½ MS são comumente utilizados, uma vez que essas não possuem alta demanda por nutrientes (DUTRA et al., 2009). As concentrações de 0,5 mg l⁻¹ de BAP e 0,05 mg l⁻¹ de ANA foram adicionados ao meio de proliferação M3, de forma a atuarem como propulsores na indução de brotações dos explantes pós-tratamento. Combinações de BAP e ANA como esta, são comumente aplicadas para proliferação de gemas em eucalipto (ALFENAS et al., 2004; DUTRA et al., 2009).

5.2. Poliploidização de plântulas

Embora não foi possível estabelecer linearidade no decréscimo da taxa de sobrevivência de ambos tipos de explantes nos tratamentos delineados, nota-se uma relação inversa entre a sobrevivência dos indivíduos e a concentração de colchicina. Essa relação tem sido descrita com experimentos *in vitro* usando diversas plantas como astragalos (CHEN; GAO, 2007), aspargos (REGALADO et al., 2015), amoras

(CHAKRABORTI et al., 1998), citros (ALEZA et al., 2012), acácias (HARBARD et al., 2012) e em eucalipto (LIN et al., 2010).

Até o período de 72 horas, ambos os tipos de explantes parecem suportar às condições impostas pelo antitubulínico, e então, o número de sobreviventes decresce esporadicamente para as concentrações de 1,0 e 1,5 mM. Apesar de interferir no ciclo celular impedindo a polimerização de dímeros α e β – tubulinas que compõem os microtúbulos (DHOOGHE et al., 2011), a colchicina pode apresentar efeitos citotóxicos para o ambiente celular e com o aumento do tempo e concentração resultar em maior mortalidade de plântulas (LIN et al., 2010).

5.3. Indução e identificação de indivíduos poliploides

O critério de coleta da terceira ou quarta folha no sentido do ápice proporcionou análise do material e o entendimento da poliploidização no centro meristemático. Os meristemas apicais em angiospermas são corpos complexos organizados em *layers* teóricos, dos quais dão origem à diferentes linhagens celulares que formam os órgãos (NOZAWA; HIRATA, 2002). A não poliplodização de todas as células meristemáticas pode ter acarretado a formação de mosaicismo nos tecidos foliares, o que explica a presença dos mesmos em todos os tratamentos. Em híbridos de *Grandularia*, a terceira folha foi considerada adequada para coleta e mensurações fenotípicas afim de caracterizar indivíduos poliploides (GONZÁLEZ et al., 2015).

O diferencial de plantas vivas e analisadas, cerca 12,8 e 14,8 % de plantas (para explantes de 1,0 e 1,5 cm, respectivamente) que não atenderam aos critério de coleta, refletem a recalcitrância do material pós-tratamento, em virtude da exposição à colchicina. Além dos efeitos citotóxicos descritos anteriormente, são ainda esperados efeitos adversos como dificuldades no enraizamento (REGALADO et al., 2015), redução na taxa de crescimento em função de distúrbios fisiológicos (YEMETS; BLUME, 2008) e folhas enrugadas com margens irregulares (TRACY, 2008).

Na concentração de 0,5 mM por 96 horas, foi possível a obtenção de 38 % de indivíduos tetraploides para explantes de 1,0 cm, sendo que houve mortalidade em apenas 18 % das plantas inoculadas. Han et al. (2011) trabalhando com gemas axilares de 1,0 cm em *E. grandis*, demonstrou que a uma concentração de 5,5 mM por 26 horas, é possível obter cerca de 51 % de explantes tetraploides, embora relata que a mortalidade em tratamentos como este podem alcançar até 100% dos materiais. Lin et al. (2010)

utilizando ápices de *E. globulus* em exposição ao mesmo tempo e dose de 12,5 mM de colchicina, obteve sucesso de 36,7 %, seguido de uma mortalidade de 43,3 % dos indivíduos.

Em ambos explantes não foi possível estabelecer linearidade entre o aumento da concentração e do tempo com a eficiência de tetraploides obtidos, o mesmo efeito tem sido reportado para diversas plantas (GU et al., 2005; STANYIS et al., 2006; LIU et al., 2007; MOGHBEL et al., 2015). O fato de tratamentos como 0,5 mM/ 120 h e 1,5 mM/ 48 h utilizando explantes de 1,5 cm de comprimento, resultarem em eficiências de até 50 %, indicam que diferentes concentrações e tempos de exposição podem originar o mesmo percentual de sucesso. As disparidades evidenciadas, apontam que a poliploidização pode não estar envolvida com doses superiores de colchicina mas sim, com tempos ótimos de exposição dos materiais ao antitubulínico. A mesma constatação foi reportada por González et al. (2015) utilizando doses de 0,025 mM e 0,25 mM em *Glandularia* obteve-se o mesmo número de tetraploides, sugerindo que o tempo de exposição prevalece sobre a concentração do alcalóide em casos como este.

Embora resultados como 1,5 mM/ 120 horas possam fornecer uma eficiência de até 67 % na obtenção de tetraploides, o mesmo tratamento pode incidir mortalidade de até 60 % dos explantes, sendo que destes, nem todos podem atender os quesitos de análise para CF. O notável número de tetraploides obtidos nas concentrações de 0,5 mM (21 em 123 plântulas tratadas para explantes de 1,0 cm, e 30 em 135 plântulas tratadas em explantes de 1,5 cm), pode ser uma alternativa viável para indução de poliploides. Em eucaliptos, mesmo que em concentrações mais baixas é possível obter tetraploides em torno de 15 % utilizando ápices (LIN et al., 2010), 30 % em gemas axilares (HAN et al., 2011) e 4,2 % em sementes (TRACY, 2008).

A análise da ploidia de DNA por CF facilitou *screening* de todas as plântulas de forma rápida e eficiente, proporcionando diagnóstico precoce do efeito da poliploidização *in vitro*. A validação de indivíduos tetraploides foi confirmada pela contagem cromossômica por meio da preparação citogenética. Embora a contagem cromossômica seja o método mais acurado, a análise por CF é o método mais rápido e também confiável para inferir a ploidia de DNA (DOLEŽEL et al., 2007; CLARINDO et al., 2008).

O meio M1 (sem reguladores de crescimento) proporcionou enraizamento espontâneo de algumas plantas tetraploides, etapa a qual normalmente tem sido reportada

com adição de reguladores como AIB por 7 a 15 dias (ALFENAS et al., 2004), ou ainda apenas alongando os explantes *in vitro* e os fazendo enraizar em condições *ex vitro* (XAVIER; COMÉRIO, 1997). Durante a aclimatização *ex vitro* de tetraploides, houve mais de 50 % de perdas das plantas em virtude dos procedimentos realizados. A literatura ainda carece de estudos de aclimatização e sobrevivência de eucaliptos de sistemas *in vitro* para *ex vitro*.

6. CONCLUSÃO

No presente estudo, poliploides sintéticos foram obtidos com sucesso em plântulas de *E. grandis* com 1,0 e 1,5 cm. Os melhores tratamentos para obtenção de tetraploides utilizando colchicina foram 0,5 mM por 96 horas (explantes de 1,0 cm) e 1,5 mM por 120 horas (explantes de 1,5 cm), apresentando taxas de 38 e 67 %, respectivamente. No entanto, visando maior número de poliploides a serem obtidos e evitando altas taxas de mortalidade, experimentos com concentrações de 0,5 mM sob diversos tempos, podem fornecer quantidades satisfatórias de poliploides induzidos.

Sob as condições experimentais, a não linearidade nas taxas de sobrevivência e na indução de poliploides sugerem alta especificidade quanto ao tipo de material a ser tratado, podendo ser indivíduo-específico. Dessa forma, implicações quanto ao genótipo e até mesmo características morfológicas dos meristemas apicais durante o desenvolvimento vegetativo, podem implicar no processo de poliploidização. Os resultados apresentados também sugerem que a poliploidização dos materiais pode ser melhor explorada dentro de parâmetros de tempo de exposição à colchicina. O tempo de exposição que melhor responderia às induções, pode ser compreendido por meio de estudos do ciclo celular da cultura *in vitro*, uma vez que estes forneceriam o melhor período de início e término de tratamentos para indução de poliploidização para cada indivíduo.

A análise da ploidia de DNA por CF de fluxo viabiliza o diagnóstico precoce de plantas poliploides, reduzindo o tempo de manejo e cultivo das plantas *in vitro*, bem como evitando a ocorrência e propagação de plantas mosaicos. Os procedimentos estabelecidos no presente estudo, para indução de poliploidização *in vitro* de plântulas de *E. grandis*, podem ser aplicados com sucesso se as doses de antitubulínico e tempo ideais forem bem estabelecidos para cada tipo de amostragem de eucalipto.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, I.S.; CARVALHO, C.R.; CLARINDO, W.R. Chromosomal DNA content of sweet pepper determined by association of cytogenetic and cytometric tools. *Plant Cell Reports*, v. 27, p. 1227-1233, 2008.

ADAMS, K. L.; WENDEL, J. F. Polyploidy and genome evolution in plants. *Current Opinion in Plant Biology*. v. 8, p. 135-141, 2005.

ALEZA, P.; JUÁREZ, J.; CUENCA, J.; OLLITRAULT, P.; NAVARRO, L. Extensive citrus triploid hybrid production by 2x X 4x sexual hybridizations and parent-effect on the length of the juvenile phase. *Plant Cell Reports*. v. 31, p. 1723-1735, 2012.

ALVARENGA, R. F.; WAN, B.; INUI, T.; FRANZBLAU, S. G.; PAULI, G. F.; JAKI, B. U. Airborne antituberculosis activity of *Eucalyptus citriodora* essential oil. *Journal of Natural Products*, v. 77, p. 603-10, 2014.

ALCÂNTARA, B. K.; BRONDANI, G. E.; GONÇALVES, A. N.; ALMEIDA, M. de; AZEVEDO, R. A. Methods of asepsis for in vitro establishment and germination of *Eucalyptus grandis*. *Jornal of Biotechnology and Biodiversity*. v. 2, n. 3, p. 7-13, 2011.

AVERSANO, R.; ERCOLANO, M. R.; CARUSO, I.; FASANO, C.; ROSELLINI, D.; CARPUTO, D. Molecular tools for exploring polyploid genomes in plants. *Int. J. Mol. Sci*. v. 13, p. 10316-10335, 2012.

BLAKESLEY, D.; ALLEN, A.; PELLNY, T. K.; ROBERTS, A. V. Natural and induced polyploidy in *Acacia dealbata* Link. and *Acacia mangium* Willd. *Annals of Botany*, v. 90, p. 391-398, 2002.

BURGE, G. K.; MORGAN, E. R.; SEELYE, J. F. Opportunities for synthetic plant chimeral breeding: Past and future. *Plant Cell Tiss Organ*. v. 70, p. 13-21, 2002.

CARVALHO, C.R.; CLARINDO, W.R.; PRAÇA, M.M.; ARAÚJO, F.S.; CARELS, N. Genome size, base composition and karyotype of *Jatropha curcas* L., an important biofuel plant. *Plant Science*, v. 174, p. 613-617, 2008.

CHAKRABORTI, S. P.; VIJAYAN, K.; ROY, B. N.; QADRI, S. M. H. In vitro induction of tetraploidy in mulberry (*Morus alba* L.). *Plant Cell Reports*. v. 17, p. 799-803, 1998.

- CHEN, L. L.; GAO, S. L. In vitro tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in *Astragalus membranaceus*. *Scientia Horticulturae*. vol. 112, p. 339-344, 2007.
- CHEN, Z. J. Molecular mechanisms of polyploidy and hybrid vigor. *Trends Plant Sci*, v. 15, p. 57-72, 2010.
- DHOOGHE, E.; VAN LAERE, K.; EECKHAUT, T.; LEUS, L.; VAN HUYLENBROECK, J. Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro. *Plant Cell Tiss Organ*. v. 104, p. 359-373, 2011.
- DOUGHTY, R. W. The eucalyptus: a natural and commercial history of the gum tree. Baltimore, MD, USA: The Johns Hopkins University Press, 2000.
- DUTRA, L. F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. E. A micropropagação do eucalipto. *Pesquisa Florestal Brasileira*, v. 58, p. 49-59, 2009.
- EECKHAUT, T., SAMYN, G. & VAN BOCKSTAELE, E. In vitro polyploidy induction in *Rhododendron simsii* hybrids. *Acta Horticulturae* v. 572, p. 43-49, 2002.
- FAWCETT, J. A.; MAERE, S.; PEER, Y. V. de. Plants with double genomes might have had a better chance to survive the Cretaceous-Tertiary extinction event. *PNAS*, vol. 106, n. 14, p. 5737-5742, 2009.
- FILHO, E. P.; SANTOS, P. E. T. Programa de melhoramento genético da Embrapa Florestas [recurso eletrônico]. Colombo: Embrapa Florestas, 68 p. 2011.
- GALBRAITH, D. W.; HARKINS, K. R.; MADDOX, J. R.; AYRES, N. M.; SHARMA, D. P.; FIRROZABADY, E. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science*, v.220, p.1049–1051, 1983.
- GONZÁLEZ, L. R.; IANNICELLI, J.; COVIELLA, A.; BUGALLO, V.; BOLOGNA, P.; PITTA-ÁLVAREZ, S.; ESCANDÓN, A. A protocol for the *in vitro* propagation and polyploidization of an interspecific hybrid of *Grandularia* (*G. peruviana* x *G. scrobiculata*). *Scientia Horticulturae*, v. 184, p. 46-53, 2015.
- GRATTAPAGLIA, D.; KIRST, M. Eucalyptus applied genomics: from gene sequences to breeding tools. *New Phytologist*, v. 179, p. 911-29, 2008.

- GU, X. F.; YANG, A. F.; MENG, H.; ZHANG, J. R. In vitro induction of tetraploid plants from diploid *Zizyphus jujuba* Mill. cv. Zhanhua. *Plant Cell Rep.* v. 24, p. 671–676, 2005.
- HAN, C.; XU, J. M.; DU, Z. H.; LI, G. Y.; ZENG, B. S.; WU, S. J.; WANG, W. Polyploidy induction of clone of *Eucalyptus grandis* with colchicine. *African Journal of Biotechnology*, vol. 10, n. 66, p. 14711-14717, 2011.
- HESLOP-HARRISON, J. S.; SCHWARZACHER, T. The plant genome: an evolutionary view on structure and function organization of the plant genome in chromosomes. *The Plant Journal*. v. 66, p. 18-33, 2011.
- HEGARTY, M. J.; HISCOCK, S. J. Genomic clues to the evolutionary success of polyploid plants. *Current Biology*. v. 18, p. 435-444, 2008.
- HUGDAHL, J. D.; MOREJOHN, L. C. Rapid and reversible high-affinity binding of the dinitroaniline herbicide oryzalin to tubulin from *Zea mays* L. *Plant Physiology*. v.102, p. 725-740, 1993.
- IBÁ. Relatório anual. p. 1-80, 2015.
- JOHNSON, H. Observations on induced polyploidy in some conifers. v. 24 (2-3), p. 62-68, 1975.
- HARBARD, J. L.; GRIFFIN, A. R.; FOSTER, S.; BROOKER, C.; KHA, L. D.; KOUTOULIS, A. Production of colchicine-induced autotetraploids as a basis for sterility breeding in *Acacia mangium* Willd. *Forestry*, vol 85, n. 3, p. 427-436, 2012.
- LADIGES, P. Y.; UDOVICIC, F.; NELSON, G. Australian biogeographical connections and the phylogeny of large genera in the plant family Myrtaceae. *Journal of Biogeography*. v. 30, p. 989–998, 2003.
- LAM, H. K.; HARBARD, J. L.; KOUTOULIS, A. Tetraploid induction of *Acacia crassicarpa* using colchicine and oryzalin. *Journal of Tropical Forest Science*. v. 26, n. 3, p. 347-354, 2014.
- LEHRER, J. M., BRAND, M. H.; LUBELL, J. D. Induction of tetraploidy in meristematically active seeds of Japanese barberry (*Berberis thunbergii* var. *atropurpurea*) through exposure to colchicine and oryzalin. *Scientia Horticulturae*. v. 119, p. 67–71, 2008.

- LEVIN, D. A. The role of chromosomal change in plant evolution. Oxford University Press, Oxford, 2002.
- LIN, H.; JIAN, M.; LIANG, L. Y.; PEI, W. J.; LIU, X. Z.; ZHANG, H. Y. Production of polyploids from cultured shoot tips of *Eucalyptus globulus* Labill by treatment with colchicine. African Journal of Biotechnology. v. 9, n. 15, p. 2252-2255, 2010.
- LIU, G.; LI, Z.; BAO, M. Colchicine-induced chromosome doubling in *Platanus acerifolia* and its effect on plant morphology. Euphytica. vol. 157, p. 145-154, 2007.
- MARITZ, T. Induction of polyploidy in *Eucalyptus* species and interspecific hybrids; 128f. Dissertação (Mestrado na Escola de Bioquímica, Genética, Microbiologia e Fitopatologia), Universidade de KwaZulu-Natal - Pietermaritzburg, 2008.
- McCOMB, J. A.; BENNETT, I. J. Eucalypts (*Eucalyptus* spp.). In: BAJAJ, Y. P. S. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Trees 1. Berlin: Springer-Verlag, v. 1, p. 340-362, 1986.
- MOGHBEL, N.; BORUJENI, M. K.; BERNARD, F. Colchicine effect on the DNA content and stomata size of *Glycyrrhiza glabra* var. glandulifera and *Carthamus tinctorius* L. cultured in vitro. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. vol. 13, p. 1-6, 2015.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, v. 15, p. 473-479, 1962.
- NETO, H.S. Qualidade de madeira de eucalipto para produção de celulose kraft. 105f. Tese (Doutorado em Ciência Florestal), Viçosa – Minas Gerais, 2012.
- NOZAWA, G. T.; HIRATA, Y. Synthesis and utilization of in vitro artificially synthesized chimeras. Combined Proceedings International Plant Propagators' Society. v. 52, p. 346-353, 2002.
- OTTO, F. J. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. In: Methods in Cell Biology 33. Academic Press, San Diego, p.105–110, 1990.
- OTTO, S. P.; WHITTON, J. Polyploid incidence and evolution. Annu Rev Genet. v. 34, p. 401-437, 2000.

PHILLIPS, R. L., KAEPLER, S. M.; OLHOFT, P. Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. v. 91, n. 12, p. 5222-5226, 1994.

REGALADO, J. J.; MARTÍN, E. C.; CASTRO, P.; MORENO, R.; GIL, J.; ENCINA, C. L. Study of the somaclonal variation produced by different methods of polyploidization in *Asparagus officinalis* L. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. vol. 122, p. 31-44, 2015.

RANDOLPH, L. F. Some effects of high temperatures on polyploidy and other variations in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. v. 18, p. 222-229, 1932.

RENNY-BYEFIELD, S.; WENDEL, J. F. Doubling down on genomes: polyploidy and crop plants. *American Journal of Botany*. v. 101, n. 10, p. 1711-1725, 2014.

SÄRKILAHTI, E.; VALANNE, T. Induced polyploidy in *Betula*. *Silva Fennica*, v. 24 (2), p. 227-234, 1990.

SATTLER, M. C.; CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R. The polyploidy and its key role in plant breeding. *Planta*. v. 243, p. 281-296, 2016.

SLATER, A., SCOTT, N. W.; FOWLER, M. R. *Plant biotechnology: the genetic manipulation of plants*. Oxford University Press Inc., New York, 2003.

STANYS V, WECKMAN A, STANIENE G, DUCHOVSKIS P. In vitro induction of polyploidy in Japanese quince (*Chaenomeles japonica*). *Plant Cell Tiss Organ Cult*. v. 84, p. 263–268, 2006.

STEBBINS, G. L. *Chromosomal evolution in higher plants*. Addison-Wesley. London, 1971.

XAVIER, A.; COMÉRIO, J. Enraizamento “*ex vitro*” de gemas de *Eucalyptus* spp. multiplicadas e alongadas “*in vitro*”. *Scientia Florestalis*, n. 51, p. 29-36, 1997.

YEMETS, A. I.; BLUME, YA. B. Progress in plant polyploidization based on antimicrotubular drugs. *The Open Horticulture Journal*. v. 1, p. 15-20, 2008.

WENDEL, J. F. Genome evolution in polyploids. *Plant. Mol. Biol.*, v. 42, p. 225-249, 2000.

WENDEL, J. F.; JACKSON, S. A.; MEYERS, B. C.; WING, R. A. Evolution of plant genome architecture. *Genome Biology*. v. 17, n. 37, p. 1-14, 2016.

