

INDUÇÃO E IDENTIFICACAO DE POLIPLOIDIA EM
Hymenaea courbaril L. var. *stilbocarpa* (Hayne) Lee et Lang.

POLYPLOIDY INDUCTION AND IDENTIFICATION IN
Hymenaea courbaril L. var. *stilbocarpa* (Hayne) Lee et Lang.

Diego Antonio Ottonelli Bona¹ Isane Vera Karsburg² Ricardo Gallo³

RESUMO

A madeira *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* apresenta alta densidade sendo empregada em construção civil, marcenaria e laminados. O caule exsuda uma resina, rica em terpenos que pode ser utilizada na fabricação de vernizes. O endocarpo do fruto é comestível, podendo ser consumido *in natura*. A duplicação cromossômica de espécies florestais busca maximizar características de interesse econômico, como características relacionadas ao desenvolvimento e ganho florestal. O estudo teve como objetivo induzir e verificar a poliploidia em células de meristemas radiculares de *Hymenaea courbaril* por meio de características morfológicas e citológicas. Para induzir a poliploidia, os meristemas radiculares foram submetidos à exposição ao herbicida trifluralin na concentração de 3 µM a 4°C por 14 (controle), 24, 48, 72 e 96 h (tratamentos). Em seguida, as radículas foram armazenadas por 24 h em um frasco fechado sob refrigeração em solução de metanol: ácido acético PA na proporção 3:1 a -4°C. Os meristemas radiculares foram digeridos em enzima pectinase Sigma®. As células mitóticas foram obtidas por dissociação celular, secagem ao ar e em placa aquecedora. As células foram coradas com Giemsa 5% sendo analisadas 30 células em estágio de metáfase. Os estômatos foram obtidos de plântulas jovens de cada tratamento sob mesmas condições físicas e químicas. Para a análise dos estômatos foi utilizada a técnica de impressão epidérmica da folha adaxial, com adesivo instantâneo universal (Super Bonder®). Analisaram-se 200 estômatos de cada tratamento. Dentre os quatro tratamentos avaliados, a exposição dos meristemas radiculares por 96 h no herbicida trifluralin 3 µM a 4°C, resultou na duplicação do genoma de *Hymenaea courbaril* L. var. *stilbocarpa* com $2n = 4x = 48$ cromossomos e o tamanho médio dos estômatos foi de 0,215 mm estatisticamente superior aos demais tratamentos.

Palavras-chave: duplicação cromossômica; jatobá; poliploidização; herbicida.

ABSTRACT

The *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* wood has a high density being employed in construction, carpentry and laminate. The stem exudes a rich terpene resin which can be used in the varnish industry. The endocarp of the fruit is edible and can be eaten raw. The chromosomal duplication of forest species aims to maximize economic interest features, such as those related to the development and forest gain. This study aimed to induce and verify polyploidy in root meristem cells of *Hymenaea courbaril* through morphological and cytological features. To induce polyploidy, the root meristems were exposed to the trifluralin herbicide at a concentration of 3 µM at 4 °C for 14 (control), 24, 48, 72 and 96 h. Then, the rootlets were stored for 24 h in a closed flask and refrigerated in methanol: acetic acid solution (high purity) in the ratio 3:1, at -4 °C. Root meristems were digested in pectinase enzyme (SigmaTM). Mitotic cells were obtained by cell dissociation,

1 Engenheiro Florestal, Mestre em Engenharia Florestal, Universidade Federal do Espírito Santo, Rua Nicanor Santos, Centro, CEP 29550-000, Jerônimo Monteiro (ES), Brasil. diego_ottonelli@hotmail.com

2 Bióloga, Dra., Professora Adjunta do Departamento de Ciências Biológicas, Universidade do Estado de Mato Grosso, Perimetral Rogerio Silva, 4930, Bairro Flamboyant, Caixa Postal 324, CEP 78580-000, Alta Floresta (MT), Brasil. isane9@yahoo.com.br

3 Engenheiro Florestal, Doutorando em Engenharia Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Av. Peter Henry Holfs, s/n, Campus Universitario, CEP 36570-000, Viçosa (MG), Brasil. etrom_gallo@hotmail.com

air drying and hotplate. 30 cells in metaphase were colored with Giemsa 5% and analyzed. The stomata were obtained from young plantlets of each treatment under the same physical and chemical conditions. For stomata analysis, was used epidermal print of adaxial leaf, with universal instant adhesive (Super Bonder™). 200 stomata were analyzed of each treatment. Among the four treatments evaluated, the exposure of root meristem for 96 h in 3 μ M trifluralin, at 4 °C, induced genome duplication in *Hymenaea courbaril* L. var. stilbocarpa with $2n = 4x = 48$ chromosomes and stomata average size of 0.215 mm, being superior to the other treatments.

Keywords: chromosome duplication; jatoba; polyploidization; herbicide.

INTRODUÇÃO

O jatobá (*Hymenaea courbaril* L. var. stilbocarpa (Hayne) Lee et Lang.) é espécie clímax da família Fabaceae com elevado potencial de absorção de carbono, planta semidecídua, que ocorre desde o México, passando pela América Central, ocorrendo com maior frequência na Amazônia, atingindo o estado de São Paulo, Brasil (LOUREIRO, 1979; LORENZI, 2008). Encontrado em matas de terra firme sob solo argiloso, pouco exigente em fertilidade, atinge altura de 15 a 20 metros, com tronco de até 1 metro de diâmetro (BARBIERI JUNIOR et al., 2007). *Hymenaea courbaril* tem grande potencial medicinal, as cascas e folhas são utilizadas no tratamento de diarreias, cólicas intestinais, cistite, tosses, bronquite e asma (AMOROZO, 2002; BEZERRA et al., 2013). E muito apreciados os frutos por vários roedores que auxiliam na dispersão das sementes (ASQUITH et al., 1999; LIMA et al. 2010). A madeira é de densidade 0,96 g.cm⁻³, muito dura ao corte, de média resistência ao ataque de organismos xilófagos sob condições naturais e empregada na construção civil e naval na forma serrada ou roliça (JENRICH, 1989; LORENZI, 2008). A polpa farinácea dos frutos é utilizada na alimentação humana (MACEDO, 1992; BEZERRA et al., 2013) e a resina que exsuda do seu tronco serve para fabricação de vernizes (CARVALHO, 2003). A espécie apresenta ainda grande potencial melífero, paisagístico urbano e na recuperação de áreas degradadas (LORENZI, 2008).

Em relação ao aspecto citogenético, *Hymenaea courbaril* apresenta conjunto cromossômico de $2n = 2x = 24$ (WATSON; DALLWITZ, 1993). O desenvolvimento de variantes de ploidia, podem apresentar características úteis, dobrando o número de produtos gênicos (THAO et al., 2003) que teriam um avanço no mercado florestal como por exemplo aumento do diâmetro do tronco (MADON et al., 2005).

A indução da duplicação cromossômica é

de interesse para os programas de melhoramento genético de plantas, sendo empregada com distintas finalidades para várias espécies. Metodologias eficientes de duplicação cromossômica podem contribuir para acelerar etapas dos programas de melhoramento e viabilizar o emprego de estratégias que não são possíveis naturalmente (PEREIRA et al., 2012).

A poliploidização pode ser feita utilizando substâncias antimitóticas, as quais atuam sobre as fibras do fuso acromático durante a divisão celular, impedindo sua polimerização ou promovendo a sua fragmentação e, assim, não permitem a separação dos cromossomos na anáfase. Consequentemente, as células iniciam o ciclo celular seguinte com a quantidade de DNA duplicado (PEREIRA et al., 2012).

Agentes químicos como a colchicina, e os herbicidas oryzalina e trifluralin ou $\alpha\alpha\alpha$ -trifluoro- 2,6-dinitro-N, Ndipropyl-p-toluidine comercializado com o nome de Treflan®, são utilizados na poliploidização de plantas. Estes produtos químicos têm sido aplicados com sucesso em diversas plantas ornamentais (HORN, 2002) para obter novos genótipos com variações de tamanho e/ou a cor das flores e folhas (NOTSUKA; TSURU; SHIRAIISHI, 2000). O herbicida trifluralina tem demonstrado maior afinidade pela tubulina das fibras do fuso das plantas em relação às células animais (BARTELS; HILTON, 1973).

O herbicida trifluralin forma um complexo herbicida-tubulina que inibe a polimerização dos microtúbulos, levando à desconfiguração física e perda de função. Em consequência, o fuso mitótico não ocorre, causando a falta de alinhamento e separação dos cromossomos durante a mitose. Além disto, a chamada placa equatorial não se forma. Os microtúbulos também possuem função na formação da parede celular. A perda de microtúbulos induzida pela presença de herbicidas pode causar o sintoma de intumescimento de extremidades de raízes, que ocorre nos tecidos meristemáticos, uma vez que

eles não se dividem nem conseguem se alongar (SENSEMAN, 2007).

Existem diferentes métodos para a indução de poliploidia em plantas como o tratamento de sementes (HANZELKA; KOBZA, 2001; QUAN. et al., 2004), botão floral (WU. et al., 2007.), meristema radicular, que consiste na submissão das radículas às substâncias químicas em diferentes concentrações e tempos (LAVANIA; SRIVASTAVA, 1991; SAHARKHIZ, 2007), em técnicas de cultura de tecidos *in vitro* (ROY et al. 2001).

Nos programas de melhoramento, é importante a determinação do nível de ploidia em diferentes estágios de desenvolvimento da planta (CAMPOS et al., 2009). A contagem do número de cromossomos em células mitóticas de meristemas radiculares é um procedimento preciso para determinar o nível de ploidia, mas é demorado e requer muita experiência (CARVALHO; SARAIVA, 1993).

Métodos indiretos para determinação da ploidia podem ser utilizados de forma satisfatória. Em muitas espécies de plantas, não há correlação entre o nível de ploidia e as características citogenéticas tais como tamanho das células dos estômatos, porém, na avaliação de híbridos de *Viola x wittrockiana* Gams, o tamanho dos estômatos foi útil na triagem primária para verificar o nível de ploidia (AJALIN et al. 2002).

O presente estudo teve como objetivo induzir e verificar a poliploidia em células de meristemas radiculares de *Hymenaea courbaril* (jatobá) por meio de características morfológicas e citológicas.

MATERIAL E MÉTODO

O experimento foi realizado no Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade do Estado de Mato Grosso - Campus de Alta Floresta - MT. As sementes foram adquiridas de viveiro particular no município de Alta Floresta - MT, localizado a S -09°53'54.804" W -57°55'16.943", obtidas a partir de uma única matriz, utilizaram-se 250 sementes de *Hymenaea courbaril* L. var. *stilbocarpa* (Hayne) Lee et Lang para cada tratamento.

As sementes foram escarificadas em lixa nº 40 do lado oposto ao hilo e colocadas em um *becker* com 1 L de água destilada por um período de 24 h para superação de dormência. Posteriormente, as sementes foram postas em placas de petri com papel-

filtro umedecido em água destilada e acondicionadas em câmara de germinação a 25°C e fotoperíodo de 12 h por 15 dias. Após 15 dias, as radículas atingiram entre 1,0 a 1,5 cm de comprimento. Estas foram imersas em solução bloqueadora com herbicida antimitótico trifluralin ($\alpha\alpha\alpha$ - trifluoro-2,6-dinitro-N, Ndipropyl-p-toluidine) à concentração de 3 μ M.

Foram realizados os seguintes tratamentos: 14 a 19 h (controle), segundo Barella e Karsburg (2007), Karsburg, Carvalho e Clarindo (2009), Mergonar, Karsburg e Bona (2010) e Lima, Miranda e Karsburg (2012), 24, 48, 72 e 96 h de exposição ao herbicida à temperatura de 4°C. Ao término do tratamento, com a solução antimitótica foram retirados da solução os meristemas radiculares de cada tratamento. Em seguida, as radículas foram seccionadas e lavadas três vezes durante 10 min e, posteriormente, com solução fixadora constituída de metanol ácido: acético P.A. na proporção 3:1 a -4°C três vezes durante 10 min, sendo que, após a última lavagem, as radículas permaneceram sob refrigeração em um frasco fechado com solução fixadora. Para cada tratamento foram analisadas 30 células em estágio de metáfase.

Os meristemas radiculares permaneceram por 12 h na solução fixadora, antes da digestão enzimática que consistiu na maceração com enzima pectinase (Sigma®). Para o processo de digestão, as radículas foram retiradas da solução fixadora, seccionada em quatro partes e lavadas três vezes em intervalos de 10 min cada, com água destilada.

Em seguida, foram transferidas para tubos do tipo Eppendorf® com capacidade de 1,5 mL contendo 300 μ L de enzima pectinase (Sigma®), permanecendo em banho-maria por 2h30min a 34°C. Concluída a digestão enzimática, o material foi lavado novamente três vezes com água destilada. Depois da última lavagem foi vertido fixador completando-se o volume de 5 mL do Eppendorf®, que, na sequência, permaneceu no mínimo 24 h sob refrigeração antes da confecção das lâminas, para análise cromossômica do material. Sendo analisadas 30 células em estágio de metáfase para cada tratamento.

Seguindo-se a metodologia descrita por Carvalho e Saraiva (1993), os meristemas radiculares foram submetidos à dissociação celular, secagem ao ar e secagem em placa aquecedora a 50°C. Em seguida, foram coradas com Giemsa a 5% por 3 min, lavadas com água destilada, secadas ao ar e em placa aquecedora. Foram analisadas 20 lâminas de cada tratamento, sendo que, em cada um,

foram observadas, em média, 30 células.

As sementes dos tratamentos com diferentes tempos de exposição ao trifluralin foram semeadas em copos plásticos com capacidade para 300 mL contendo substrato composto por casca de café (10%), esterco (15%) e solo (75%) para se efetuar a análise do tamanho dos estômatos. Para a visualização dos estômatos foi utilizada a técnica de impressão epidérmica da folha do lado adaxial, colando-se a folha na lâmina com adesivo instantâneo universal éster de cianoacrilato (Super-Bonder®) em uma lâmina histológica (SEGATTO et al., 2004). Após a secagem, retirou-se, rapidamente, a folha, deixando-se somente a impressão da epiderme. Em cada tratamento foram medidos (em mm), entre uma crista e outra, 200 estômatos empregando-se o programa Corel Photo Paint X3.

As imagens (de metáfases e estômatos) de interesse foram fotografadas com o uso de um microscópio fotômico binocular (Leica ICC 50) acoplado a um computador com *software* LAZ EZ V1. 7.0.

As médias dos tamanhos dos estômatos avaliados em cada tratamento foram submetidas à análise de variância e, para as causas de variação significativas, utilizou-se o teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade empregando-se o programa Sisvar® (FERREIRA, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com a utilização do herbicida trifluralin 3 μ M em meristemas radiculares de *Hymenaea courbaril* durante 24, 48 e 72 h, foram observadas diferenças quanto à compactação dos cromossomos, sem alteração do conjunto genômico original $2n = 2x = 24$ cromossomos (Figuras 1B, 1C e 1D). O uso do herbicida trifluralin inibe a formação das fibras do fuso mitótico que são constituídas pelas proteínas tubulinas, quando os meristemas radiculares são expostos a concentrações baixas (3 a 6 μ M) por diferentes períodos, dependendo da duração do ciclo celular de cada espécie, são obtidos cromossomos com maior ou menor condensação da cromatina (KARSBURG et al., 2009). Isso permite obter cromossomos metafásicos bem distribuídos na placa equatorial.

Os meristemas radiculares expostos a 96 h no herbicida trifluralin 3 μ M apresentaram $2n = 4x = 48$ cromossomos (Figura 1E), os quais se apresentaram bem condensados. A duplicação dos cromossomos, provavelmente, ocorreu pela não

disjunção dos cromossomos durante a divisão, o que pode estar associado a não formação do fuso mitótico e a duplicação do material genético (GUPTA; TSUCHIYA, 1991; OTTO, 2007). Petersen, Hagberg e Kristiansen (2003) e Madon et al. (2005) verificaram que a colchicina foi mais eficiente que herbicidas na indução de duplicação cromossômica em *Miscanthus sinensis* e *Elaeis guineensis* respectivamente. Contudo, Hansen e Andersen (1996) que conduziram experimento comparando os efeitos da colchicina e mais três herbicidas, entre eles o trifluralin, utilizando *Brassica napus*, constataram que todos os tratamentos eram semelhantes à colchicina, tanto na regeneração de embriões, quanto na poliploidização dos cromossomos. Os embriões tratados com trifluralin a 30 μ M por 12 horas atingiram 65% de regeneração de poliploidização, com a vantagem do trifluralin ser menos tóxico que a colchicina.

Um comportamento comum aos poliploides estabelecidos é sua diploidização, ou seja, apesar de terem mais de dois genomas, iguais ou semelhantes, a tendência é que, ao longo do tempo, passem a comportar-se como diploides. Isto tanto ao nível da herança gênica, que tende a passar de multissômica a dissômica, como ao nível do pareamento cromossômico na meiose: enquanto que, em poliploides jovens, é comum a formação de autopoliploides, é a regularização do pareamento, com formação exclusiva, ou quase, de bivalentes. O genoma do poliploide é reestruturado e passa a comportar-se como diploide (RAMSEY; SCHEMSKE, 2002).

Pela análise do tamanho estomático obtido dos diferentes tratamentos (Figuras 1G, 1H, 1I e 1J), o comprimento entre uma crista a outra variou de forma crescente conforme o tempo de exposição dos meristemas radiculares, diferenciando significativamente o tratamento de 96 h de exposição em relação aos demais com tamanho médio do estômato de 0,215 mm (Tabela 1). Organismos que apresentam variação quanto à ploidia normalmente apresentam ainda variação quanto ao tamanho de diferentes estruturas, frutos, folhas, quantidade de determinadas substâncias, estômatos e número de cloroplastos presentes nos estômatos (SINGH, 1993). A análise através dos estômatos nem sempre pode ser eficiente, já que a folha está em constante modificação em resposta as alterações ambientais, e o resultado em sua pesquisa mostrou que o tamanho dos estômatos de *Dendrobium nobile* é inversamente proporcional ao nível de ploidia (VICHATO et al.,

2006). O tamanho dos estômatos em *Hemarthria altissima* apresentou diferenciação em relação à ploidia (TEDESCO et al., 1999).

O aumento das dimensões do estômato das plantas tratadas por 96 h no herbicida trifluralin, provavelmente ocorreu porque as células com um maior complemento de cromossomos cresceram

para manter uma relação constante de citoplasma de volume nuclear, e expressam maior quantidade de proteínas com a presença de mais genes.

CONCLUSÕES

Com base nesses resultados preliminares

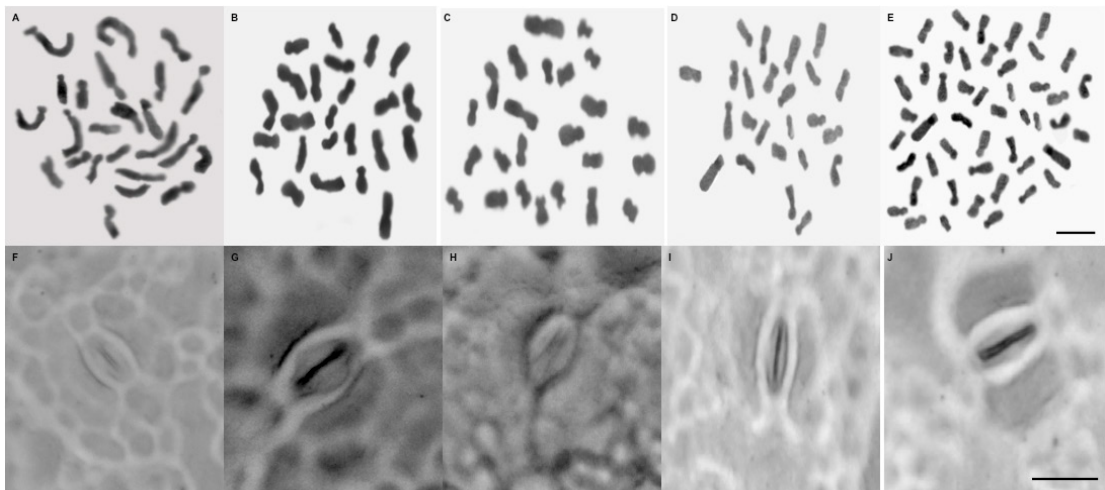


FIGURA 1: Células metafásicas e estômatos de *Hymenaea coubaril* obtidos a partir de tratamentos que consistiram de diferentes tempos de exposição no herbicida trifluralin com 3µM à temperatura de 4°C. Metáfases com 2n = 2x = 24 cromossomos expostos a: A) controle, B) 24 h C) 48 h, D) 72 h, E) Metáfase com 2n = 4x = 48 cromossomos com exposição de 96 h. Estômatos de diferentes tempos de exposição, F) controle, G) 24 h, H) 48 h, I) 72 h. J) 96 h. Barra = 10 µm.

FIGURE 1: *Hymenaea coubaril* metaphase cells and stomata obtained from different exposure times in 3 µM trifluralin herbicide at 4 °C. Metaphase with 2n = 2 x = 24 chromosomes exposed to: A) control, B) 24 h, C) 48 h, D) 72 h, E) Metaphase with 2n = 4 x = 48 chromosomes exposed to 96 h. Stomata of different exposure times: F) control, G) 24 h, H) 48 h, 72 h, J) 96 h. Bar = 10 µm.

TABELA 1: Valores médios do tamanho dos estômatos de *Hymenaea coubaril*: controle, 24, 48, 72 e 96 h de exposição no herbicida trifluralin a 3µM de concentração.

TABLE 1: *Hymenaea coubaril* stomata size mean values: control, 24, 48, 72 and 96 h in 3 µM trifluralin herbicide.

Tratamentos	Total de estômatos analisados	Média dos estômatos (mm)
Controle (14 h)	200	0,165b
24 h	200	0,174b
48 h	200	0,180b
72 h	200	0,187b
96 h	200	0,215a
Média		0,185
CV (%)		3,76

Em que: Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

conclui-se que a concentração de 3 μ M de trifluralin por 96 h a 4°C foi eficiente na indução da poliploidia, entretanto, outros produtos químicos, cujo efeito é semelhante ao do trifluralin, devem ser testados, como a orizalina, APM (amiprofós-metil) e colchicina, visando à obtenção de um número maior de plântulas. Porém, por meio dos estudos citogenéticos clássicos mesmo que eficientes, o trabalho se torna bastante laborioso, sugerindo estudos com uso da citometria de fluxo pela agilidade das avaliações dentro de programas de melhoramentos. Avaliações em campo dos indivíduos poliploidizados para verificação de quais estruturas apresentam modificações, informação que para espécies florestais pode depender de longos prazos, pelo seu ciclo vegetativo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FAPEMAT pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AJALIN, I.; KOBZA, F.; DOLZEL, J. Ploidy identification of double chromosome number plants in *Viola x wittrockiana* Gams. M1-generation. **Horticultural Science**, Czech Republic, v. 29, n. 1, p. 35-40, 2002.
- AMOROZO, M. C. M. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antonio do Leverger, MT, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 16, n. 2, p. 189-203, 2002.
- ASQUITH, N. M. et al. The fruits the agouti ate: *Hymenaea courbaril* seed fate when its disperser is absent. **Journal of Tropical Ecology**, Cambridge, Inglaterra, v. 15, p. 229-235, 1999.
- BARBIERI JUNIOR, D. et al. Análise de crescimento de *Hymenaea courbaril* L. sob efeito da inoculação micorrizica e adubação fosfatada. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, Alta Floresta, v. 5, n. 1, p. 1-15, 2007.
- BARELLA, A. P. W.; KARSBURG, I. V. Caracterização morfológica dos cromossomos mitóticos de *Parkia pendula* (WILLD.) BENTH ex WALP. *eDinizia excelsa* DUCKE (Fabaceae, Mimosoideae). **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, Alta Floresta, v. 5, n. 1, p. 85-93, 2007.
- BARTELS, P. G.; HILTON, J. L. Comparison of trifluralin, oryzalin, pronamide, protham and colchicine treatments on microtubules. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 3, n. 4, p. 462-472, 1973.
- BEZERRA, G. P. et al. Phytochemical study guided by the myorelaxant activity of the crude extract, fractions and constituent from stem bark of *Hymenaea courbaril* L. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, n. 149, p. 62-69, 2013.
- CAMPOS, J. M. S. et al. *In vitro* induction of hexaploid plants from triploid hybrids of *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum*. **Plant Breeding**, Berlin, v.128, n. 1, p. 101-104, 2009.
- CARVALHO, C. R.; SARAIVA, L. S. An air drying technique for maize chromosomes without enzymatic maceration. **Biotechnic & Histochemistry**, London, v. 68, n. 3, p. 142-145, 1993.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies Arbóreas Brasileiras**. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas; Colombo: Embrapa Florestas, 2003. 1040 p.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.
- GUPTA, P. K.; TSUCHIYA, T. (Ed.). **Chromosome Engineering in Plants: genetics, breeding, evolution**. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 1991. 653 p.
- HANSEN, N. J. P.; ANDERSEN, S. B. In vitro chromosome doubling potential of colchicine, oryzalin, trifluralin, and APM in *Brassica napus* microspore culture. **Euphytica**, Netherlands, v. 88, n. 2, p. 159-164, 1996.
- HANZELKA, P.; KOBZA, F. Genome induced mutation in *Challistephus chinensis* Nees-1. effect of colchicine application on the early plant development. **Horticultural Science**, Czech Republic, v. 28, n. 1, p. 15-20, 2001.
- HORN, W. Breeding for Ornamentals. In: VAINSTEIN, A. (Ed.). **Classical and Molecular Approaches**. Netherlands: Kluwer Academic Publisher, 2002. p. 47-83.
- JENRICH, H. **Vegetação arbórea e arbustiva nos altiplanos das chapadas do Piauí central: características, ocorrência e empregos**. Teresina: GTZ, 1989. 70 p.
- KARSBURG, I. V.; CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R. Identification of chromosomal deficiency by flow cytometry and cytogenetics in mutant tomato (*Solanum lycopersicum*, Solanaceae) plants. **Australian Journal of Botany**, Australian, v. 57, n. 5, p. 444-449, 2009.
- LAVANIA, U. C.; SRIVASTAVA, S. Enhanced productivity of tropane alkaloids and fertility in

- artificial autotetraploids of *Hyoscyamusniger*L. **Euphytica**, Netherlands, v. 52, n. 2, p. 73-77, 1991.
- LIMA, A. L. S.; ZENELLA, F.; CASTRO, L. D. M. Crescimento de *Hymenaea courbaril* L. var. *stilbocarpa* (Hayne) Lee et Lang. e *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong (Leguminosae) sob diferentes níveis de sombreamento. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 40, n. 1, p. 43-48, 2010.
- LIMA, M. F. D.; MIRANDA, D. P.; KARSBURG, I. V. Caracterização dos cromossomos de *Pachiraaquatica*AUBL. (Malvaceae). **Estudos**, Goiânia, v. 39, n. 3, p. 337-343, 2012.
- LORENZI, H. Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 5. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 1 v. 384 p.
- LOUREIRO, A. A.; SILVA, M. F.; ALENCAR, J. C. **Essências madeireiras da Amazônia**. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 1979. 245 p.
- MACEDO, J. F. Frutos brasileiros comercializados na Região Metropolitana de Belo Horizonte, MG. **Daphne**, Belo Horizonte, v. 2, n. 2, p. 53-56, 1992.
- MADON, M. et al. Poliploidy induction of oil palm though colchicine and oryzalin treatments. **Journal of OilPalm Research**, Kuala Lumpur, v. 17, n. 1, p. 110-123, 2005.
- MERGONAR, M. A. S.; KARSBURG, I. V.; BONA, D. A. O. Identificação da Região Organizadora Nucleolar de *Jatropha curcas* L. **Estudos**, Goiânia, v. 37, n. 9/10, p. 755-766, 2010.
- NOTSUKA, K.; TSURU, T.; SHIRAIISHI, M. Induced polyploidy in grapes via in vitro chromosome doubling. **Journal of Japan Society of the Horticulture Science**, Japão, v. 69, n. 5, p. 543-551, 2000.
- OTTO, S. The Evolutionary Consequences of Polyploidy. **Cell**, New York, v. 131, n. 2, p. 452-462, 2007.
- PEREIRA, R. C. et al. Duplicação cromossômica de gramíneas forrageiras: uma alternativa para programas de melhoramento genético. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 7, p. 1278-1285. 2012.
- PETERSEN, K. K.; HAGBERG, P.; KRISTIANSEN, K. Colchicine and oryzalin mediated chromosome doubling in different genotypes of *Miscanthus sinensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 73, n. 2, p. 137-146, 2003.
- QUAN, K. et al. Polyploid induction of *Arctiumlappaby* colchicine. **Plant physiology communication**, Shanghai, v. 40, n. 1, p. 157-158, 2004.
- RAMSEY, J.; SCHEMSKE, D. W. Neopolyploidy in flowering plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 33, n. 1, p. 589-639, 2002.
- ROY, A. T.; LEGGETT, G.; KOUTOULIS, A. In vitro tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in hop (*Humulus lupulus*L.). **Plant Cell Reports**, Germantown, v. 20, n. 6, p. 489-495, 2001.
- SAHARKHIZ, M. J. **The effects of some environmental factors and ploidy level on morphological and physiological characteristics of feverfew (*Tanacetum parthenium*L.) medicinal ornamental plant**. 2007. 173 f. Thesis (Ph.D.) – TarbiatModares University, Iran, 2007.
- SEGATTO, F. B. et al. Técnica para estudo da anatomia da epiderme foliar de batata. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 5, p. 1597-1601, 2004.
- SENSEMAN, S. A. (Ed.). **Herbicide Handbook**. 9. ed. Lawrence, EUA: Weed Science Society of America, 2007. 458 p.
- SINGH, D. Adaptive significance of female physical attractiveness: Role of waist-to-hip ratio. **Journal of Personality and Social Psychology**, Washington, v. 65, n. 2, p. 293-307, 1993.
- TEDESCO, S. B.; BATTISTIN, A.; VALLS, J. F. M. Diâmetro dos grãos de pólen e tamanho dos estômatos em acessos diplóides e tetraplóides de *Hemarthriaaltissima* (poiret) stapf&hubbard (Gramineae). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 2, p. 273-276, 1999.
- THAO, N. T. P. et al. Induction of tetraploids in ornamental *Alocasiathrough* colchicine and oryzalin treatments. **Plant cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 72, n. 1, p. 19-25, 2003.
- VICHIATO, M. R. M. et al. Análises estomática e morfométrica de folhas de plantas diplóides e tetraplóides de *Dendrobiumnobile* Lindl. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 53, n. 310, p. 541-548, 2006.
- WATSON, L.; DALLWITZ, M. J. **The genera of Leguminosae-Caesalpinioideae and Swartzieae: descriptions, identification, and information retrieval**. Institute of Botany: Chinese Academy of Sciences, 1993.
- WU, H. Z. et al. Diploid female gametes induced by colchicine in oriental Lilies. **Scientia Horticulturae**, Western Australia, v. 114, n. 1, p. 50-53, 2007.