

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO COMPARATIVA DE PARÂMETROS MORFOLÓGICOS,
HISTOLÓGICOS E CITOLÓGICOS DE *Eucalyptus dunnii* MAIDEN
TETRAPLÓIDE EM CONDIÇÕES DE CASA DE VEGETAÇÃO**

CARLA TATIANE GUGLIERMONI DE SOUZA

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da Unesp – Campus
Botucatu, para obtenção do Título de Mestre em
Ciência Florestal

BOTUCATU - SP
Setembro - 2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO COMPARATIVA DE PARÂMETROS MORFOLÓGICOS,
HISTOLÓGICOS E CITOLÓGICOS DE *Eucalyptus dunnii* MAIDEN
TETRAPLÓIDE EM CONDIÇÕES DE CASA DE VEGETAÇÃO**

CARLA TATIANE GUGLIERMONI DE SOUZA

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Furtado
Co-orientador: Prof. Dr. Celso Luiz Marino

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da Unesp – Campus
Botucatu, para obtenção do Título de Mestre em
Ciência Florestal

BOTUCATU - SP
Setembro – 2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

S729c Souza, Carla Tatiane Gugliermoni de, 1981-
Caracterização comparativa de parâmetros morfológicos, histológicos e citológicos de *Eucalyptus dunnii* Maiden tetraplóide em condições de casa de vegetação / Carla Tatiane Gugliermoni de Souza. - Botucatu : [s.n.], 2016
viii, 41 f. : fots. color., grafs. color., tabs.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 2016
Orientador: Edson Luiz Furtado
Coorientador: Celso Luiz Marino
Inclui bibliografia
1. Eucalipto - Morfologia. 2. Eucalipto - Histologia. 3. Eucalipto - Citologia. 4. Cromossomos vegetais. 5. Estufas. I. Furtado, Edson Luiz. II. Marino, Celso Luiz. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônomicas. IV. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "CARACTERIZAÇÃO COMPARATIVA DE PARÂMETROS MORFOLÓGICOS, HISTOLÓGICOS E CITOLÓGICOS DE *Eucalyptus dunnii* MAIDEN TETRAPLÓIDE EM CONDIÇÕES DE CASA DE VEGETAÇÃO"

AUTORA: CARLA TATIANE GUGLIERMONI DE SOUZA

ORIENTADOR: EDSON LUIZ FURTADO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA FLORESTAL, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. EDSON LUIZ FURTADO

Departamento de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu - UNESP

Dr. ESTEBAN ROBERTO GONZÁLEZ
FuturaGene Brasil



Prof. Dr. MARIO TOMAZELLO FILHO

Departamento de Ciências Florestais / ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA

Botucatu, 06 de setembro de 2016.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, pelas graças recebidas a cada dia, pela doce presença transformadora de tudo, pelo hoje e por todo sempre.

Ao meu esposo Marcelo, presente de Deus, por todo cuidado, paciência, perseverança, entendimento, carinho e força que me motivaram a vencer sempre. Te amo!

Ao nosso bebê, presente e sonho de Deus, que mesmo na barriga da mamãe durante o desenvolvimento deste trabalho, já tem nos motivado em tudo, com alegria e amor.

Aos meus amados pais, Antônio e Fátima, fonte de vida, amor, respeito, dedicação e sabedoria. Obrigada por me fazer quem sou. A vocês minha eterna gratidão e amor.

Aos meus irmãos Juanna e Pedro, que sempre tiveram palavras de apoio e carinho para me motivar a sonhar e vencer. Sem vocês eu nada seria.

À minha cunhada Liane e ao nosso príncipe Davi, por todo amor e carinho. Cada sorriso foi fundamental para me animar a seguir.

À Suzano Papel e Celulose e Futuragene, por todo apoio e confiança na realização deste trabalho.

Aos amigos e mestres Shinitiro e Esteban, por todo ensinamento. A presença de vocês foi fundamental.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Edson Luiz Furtado e Prof. Dr. Celso Luiz Marino por todo apoio, ensinamento e carinho.

Aos meus amigos de trabalho, em especial a minha equipe formada pela Bárbara, Claudia, Cristiano, Eduardo, Kátia, Juliane, Juliano, Fernando, Márcio e Maria Eliza que sempre me apoiaram com ações e palavras de força e carinho.

A todos os amigos e familiares que, perto ou distante, torceram e rezaram por mais esta vitória.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma, direta ou indiretamente me ajudaram a vencer mais esta etapa.

A todos, meu muito obrigada!!

*“Nada te perturbe, Nada te espante,
Tudo passa, Deus não muda,
A paciência tudo alcança;
Quem a Deus tem, Nada lhe falta:
Só Deus basta.”*
(Santa Teresa D’Avila)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	03
2 OBJETIVOS.....	06
2.2.....	06
Objetivos Gerais.....	06
2.2 Objetivos Específicos	06
3 REVISÃO DE LITERATURA	07
3.1 <i>Eucalyptus</i>	07
3.2 <i>Eucalyptus dunnii</i>	09
3.3 Evolução e poliploidia em plantas	10
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1 Material Vegetal.....	13
4.2 Experimento em casa-de-vegetação.....	13
4.3 Estabilidade da Ploidia.....	15
4.4 Crescimento.....	15
4.4.1 Altura	15
4.4.2 Diâmetro	16
4.5 Morfologia da planta.....	16
4.5.1 Folha	16
4.5.2 Ramificações.....	18
4.6 Avaliações Citológicas.....	18
4.6.1 Densidade de estômatos.....	18
4.6.2 Comprimento de Fibras.....	19
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5.1 Estabilidade de ploidia	22
5.2 Efeitos pleiotrópicos.....	23
5.3 Crescimento.....	24
5.3.1 Altura	24
5.3.2 Diâmetro	26
5.4 Morfologia da planta.....	28
5.4.1 Ramificações.....	28

5.4.2 Morfologia das folhas	29
5.5 Avaliações anatômicas	31
5.5.1 Densidade de estômatos	31
5.5.2 Comprimento de fibras	33
6 CONCLUSÃO.....	35
7 REFERÊNCIA	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Experimento em casa-de-vegetação.....	14
Figura 2: Medição de altura em experimento com 103 dias.....	15
Figura 3: Corte de folhas para análise morfológica.....	17
Figura 4: Folhas digitalizadas	17
Figura 5: Posição de medição de comprimento, largura e pecíolo	18
Figura 6: Preparo de folhas e lâminas para análise de densidade de estômatos.....	19
Figura 7: Lâminas de estômatos em aumento de 400x.....	19
Figura 8: Plantas cortadas a 50 cm do coleto para retirada das amostras.....	20
Figura 9: Sequência do processamento de amostras de caule para análise de fibras	20
Figura 10: Lâminas de fibras em aumento de 40x	21
Figura 11: Tamanho da planta na coleta para citometria.....	23
Figura 12: Plantas bifurcadas após perda apical.....	24
Figura 13: Análise média linear de altura das plantas avaliadas por período de 3,5 meses	25
Figura 14: Boxplot com a distribuição dos dados das plantas avaliadas com 52 dias	25
Figura 15: Boxplot com a distribuição dos dados das plantas avaliadas com 103 dias	26
Figura 16. Boxplot com a distribuição dos dados do diâmetro das plantas avaliadas com 35 dias.....	27
Figura 17. Boxplot com a distribuição dos dados do diâmetro das plantas avaliadas com 113 dias.....	27
Figura 18. Boxplot com a distribuição dos dados de ramificações das plantas avaliadas com 117	28
Figura 19. Boxplot com a distribuição dos dados de comprimento de folhas.....	30
Figura 20. Boxplot com a distribuição dos dados de largura de folhas.....	30
Figura 21. Boxplot com a distribuição dos dados do pecíolo de folhas	31
Figura 22. Boxplot com a distribuição dos dados densidade de estômatos por mm ²	32
Figura 23. Boxplot com a distribuição dos dados de comprimento de fibras.	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Avaliação de ploidia por citometria de fluxo	23
Tabela 2- Análise de variância de altura do experimento com 52 e 103 dias	26
Tabela 3- Análise de variância do diâmetro do experimento com 35 e 113 dias	28
Tabela 4- Análise de variância de ramificações do experimento com 117 dias	29
Tabela 5. Análise de variância do comprimento e largura de folhas e comprimento do pecíolo	31
Tabela 6. Análise de variância de densidade de estômatos	32
Tabela 7. Análise de variância de comprimento de fibras.....	34

RESUMO

A poliploidia tem sido um importante mecanismo de destaque na história evolutiva das plantas e outros eucariotos. A ocorrência disseminada de poliplóides na natureza sugere que possa existir uma função para a sobrevivência e colonização em novos ambientes. No entanto, até agora foram poucos os estudos que exploraram esses fenômenos em espécies de *Eucalyptus*. Neste trabalho foram caracterizadas e comparadas 25 plantas tetraplóides, 25 diplóides pós contato com colchicina e 12 diplóides sem contato com colchicina de *Eucalyptus dunnii* em casa de vegetação. Foram medidas as alterações morfológicas por um período de seis meses. Concluiu-se que o número de ramos, dimensões de folhas (comprimento, largura e pecíolo), frequência de estômatos e comprimento de fibras mostraram diferenças significativas entre plantas diplóides e tetraplóides. Embora o número de galhos tenha diminuído em plantas tetraplóides, as plantas testadas não apresentaram diferenças significativas na altura e diâmetro. Estes resultados demonstraram que existem diferenças morfológicas entre plantas diplóides e tetraplóides de *Eucalyptus dunnii* e que estas diferenças podem ser usadas para facilitar a identificação de plantas tetraplóides recentemente produzidas.

Palavras-chave: Poliploidia, *Eucalyptus*, caracterização.

COMPARATIVE CHARACTERIZATION OF PARAMETERS MORPHOLOGICAL,
HISTOLOGICAL AND CYTOLOGICAL OF *Eucalyptus dunnii* TETRAPLOID
MAIDEN IN CONDITIONS OF GREENHOUSE

Botucatu, 2016. 41p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: CARLA TATIANE GUGLIERMONI DE SOUZA

Adviser: EDSON LUIZ FURTADO

Co-adviser: CELSO LUIZ MARINO

SUMMARY

Polyploidy has been an important mechanism in the plant evolution and other eukaryotes. The widespread occurrence of polyploid in nature suggest that there may be a function for survival and colonization of new environments. However, so far there are a very few studies that have explored these phenomena in *Eucalyptus* species. In this work were characterized and compared 25 tetraploid plants, 25 diploid after contact with colchicine and 12 diploid without contact with colchicine of *Eucalyptus dunnii* under greenhouse conditions. Morphological changes were measured for a period of six months. It was concluded that the number of branches, leaf area (length, width and petiole), frequency of stomata and fibre length showed significant differences between diploid and tetraploid plants. Although the number of branches has decreased in tetraploid plants and the plants tested showed no significant differences in height. These results demonstrated that there are morphological differences between diploid and tetraploid *Eucalyptus* and that these differences may be used to facilitate identification of newly produced tetraploid plants.

Keywords: Polyploidy, *Eucalyptus*, characterization.

1 INTRODUÇÃO

O setor florestal brasileiro vem apresentando um aumento de produtividade florestal devido aos fatores ambientais favoráveis para silvicultura, novas tecnologias voltadas ao melhoramento genético de sementes e de clonagem de espécies florestais. Segundo a FAO, 2015, as florestas plantadas quando bem geridas, podem fornecer vários serviços florestais e produtos, além de ajudar a reduzir a pressão sobre as florestas naturais.

O Brasil possui 7,74 milhões de hectares de florestas plantadas, correspondendo a 0,9% do território brasileiro, sendo 71,9 % deste total representada pela espécie do gênero *Eucalyptus* e 20,54% pelo gênero *Pinus* (IBÁ, 2015). Segundo o Sistema Nacional de Informações Florestais, SNIF (2016), o Brasil possui a segunda maior cobertura florestal do mundo, ficando atrás apenas da Rússia. Em 2014, foram gerados aproximadamente R\$10,23 bilhões em tributos federais, estaduais e municipais através do setor brasileiro de árvores, o que corresponde a 0,8% da arrecadação nacional (IBÁ, 2015). No âmbito social, a cadeia produtiva do setor, contribuiu na geração de 4,4 milhões de empregos e para o investimento de BRL 149 milhões em programas de inclusão social, educação e meio ambiente, beneficiando assim 1,3 milhões de pessoas (ABRAF, 2013).

A produção primária florestal em 2014 somou R\$ 20,8 bilhões, sendo 77,7% via silvicultura e 22,3% extração vegetal. Dados do IBGE em 2014, relatam que os maiores produtores de madeira em tora para papel e celulose foram São Paulo (16.716.275 m³), Bahia (12.296.942 m³), Paraná (10.645.010 m³), Pará (9.318.552 m³) e Mato Grosso do Sul (8.293.047m³), juntos correspondendo por 70,8% da produção nacional (80.873.295 m³) e destas 83,6% da madeira em tora utilizada para fabricação de papel e celulose foram provenientes de eucaliptos, porém, na Região Sul, 64,7% foram originárias de plantio de pinus. Destaca a Região Sudeste como a principal produtora de carvão vegetal (86,4%) e de madeira em tora para papel e celulose (36,2%) e a Região Sul responsável por 61,4% da produção de lenha e 64,1% da madeira em tora para outras finalidades (IBGE, 2014).

Através do melhoramento genético e novas tecnologias muitas das espécies florestais vêm demonstrando grande potencial para novos produtos. O *Eucalyptus dunnii* tem se destacado no Brasil pelo rápido crescimento, uniformidade dos talhões, forma das árvores e resistência à geada não muito severa (HIGA et al., 2000).

A poliploidia vem sendo utilizada como ferramenta de grande importância ao melhoramento genético através da obtenção de *Eucalyptus* poliplóide. Entende-se por poliploidia a existência, em um mesmo núcleo celular, de mais do que dois genomas. São classificados como autopoliplóides quando a duplicação do genoma ocorre dentro da mesma espécie ou alopoliplóides quando esta duplicação ocorre em espécies diferentes através de cruzamentos (WITTMANN e DALL'AGNOL, 2003).

Os poliplóides geralmente são mais robustos e maiores do que seus parentes diplóides, sendo por este motivo o interesse pela indução artificial das plantas normalmente não encontradas na natureza (WITTMANN e DALL'AGNOL, 2003). Produtos como colchicina, óxido nitroso, oryzalin são utilizados para indução da poliploidia. Após a indução são necessárias análises para identificação da ploidia. Algumas técnicas são utilizadas, como a contagem de cromossomos, porém devido ao alto custo e o extenso número de plantas inicialmente a ser analisadas, seu uso torna-se viável somente para confirmações finais de plantas que indicam ser poliplóides e que já passaram por outras análises. Uma técnica frequentemente utilizada para identificação de plantas poliplóides é a citometria de fluxo, que verifica o nível de ploidia através da quantidade de DNA nuclear (SCHIFINO e WITTMANN, 2001). Outras práticas também auxiliam na

identificação, como a densidade dos estômatos por área, comprimento de fibras, diâmetro de grãos de pólen, (SALON e EARLE, 1998; SAUCO et al., 2001; MORGAN et al., 2003). As características anatômicas da madeira permitem a identificação de muitas espécies de *Eucalyptus* variando entre as espécies quanto aos elementos de vaso, fibras, parênquima radial e longitudinal que compõem a estrutura anatômica da madeira dos eucaliptos (DADSWELL, 1972).

Para o gênero de *Eucalyptus* já foram produzidos alotetraplóides (KAPOOR e SHARMA, 1985) e autotetraplóides (JANAKI e KHOSLA, 1969). No entanto, a identificação e características de poliplóides ainda não foram bem definidas. Desta forma, este trabalho pretende caracterizar plantas tetraplóides de *Eucalyptus dunnii* visando fornecer informações sobre as possíveis alterações ocorridas neste material após poliploidização.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Caracterização comparativa de alguns parâmetros de morfologia, histologia e citologia de *Eucalyptus dunnii* tetraplóides, seus diplóides pós-indução (WT1) e diplóides que não passaram por indução (WT2).

2.2. Objetivos específicos

- Avaliação da estabilidade da poliploidia em diferentes fases de desenvolvimento por citometria de fluxo;
- Avaliação de crescimento (altura e diâmetro) entre diplóides e tetraplóides em casa-de-vegetação;
- Caracterização morfológica das plantas (número de ramificações e morfologia de folhas) tetraplóides e diplóides;
- Avaliação de densidade dos estômatos presentes em plantas diplóides e tetraplóides;
- Avaliação de comprimento de fibras entre plantas diplóides e tetraplóides;

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Eucalyptus*

O *Eucalyptus* é um gênero diversificado do grupo das angiospermas e pertence à família das Myrtaceae, sendo esta encontrada principalmente em países do hemisfério sul (OECD, 2014).

A palavra *Eucalyptus* vem das palavras gregas “eu” e “kalyptus” que significam “bem” e “coberto”, características observadas no seu opérculo, após a terceira expedição do capitão Cook à Austrália e Pacífico no final do século 18. O termo eucalipto é usado como referência a espécies a partir de um grupo monofilético conhecido como “grupo de eucalipto” que abrange sete gêneros: *Angophora*, *Corymbia*, *Eucalyptopsis*, *Allosyncarpia*, *Stockwellia*, *Arillastrum* e *Eucalyptus*, sendo este o maior gênero do grupo. Sua classificação e caracterização foram realizadas através das estruturas da flor, formato e tamanho de folhas e sementes. Para as empresas do setor florestal as espécies mais utilizadas pertencem principalmente ao subgênero *Symphyomyrtus*, sendo *Latoangulatae* (*E. grandis*, *E. urophylla*, *E. pellita*, e *E. saligna*), *Maidenaria* (*E. globulus*, *E. nitens* e *E. dunnii*) e *Exsertaria* (*E. camaldulensis* e *E. tereticornis*) as três das quinze seções mais usadas deste subgênero (LADIGES et al., 2003).

Eucaliptos são plantas diplóides contendo número de cromossomos haplóide igual a 11 (POTTS e WILTSHIRE, 1997). Para espécies de *Symphyomyrtus* considera-se um genoma haplóide variando de 530-710 milhões de pares de bases (Mbp) (GRATTAPAGLIA e BRADSHAW, 1994). Estudo realizado sobre o genoma de *Eucalyptus* revela que este foi marcado por um evento tetraplóide de linhagem específica e que a duplicação do genoma ocorreu à aproximadamente 109 milhões de anos (MYBURG e GRATTAPAGLIA, et al., 2014). Segundo Oudjehih e Bentouati (2006), após estudos realizados em 59 espécies de *Eucalyptus*, o número de cromossomos não deve ser um critério para distinção de espécies de *Eucalyptus* por não apresentar diferença entre elas, permanecendo todas $2n=22$.

Possui mais de 700 espécies sendo a maioria endêmica da Austrália e distribuído em climas quentes, frios e secos. Algumas espécies podem ser encontradas na Nova Guiné, Indonésia e Filipinas (OECD, 2014). Ocorre em uma ampla gama de condições ambientais variando assim de tamanho (WILLIAMS & WOINARSKI, 1997).

Há 200 anos tem sido plantado não só na Austrália, como em diversos países espalhados por toda a Ásia, América do Sul, Sul da Europa e África do Sul, Oriente Médio, República Popular da China e do subcontinente indiano, com pelo menos 12 milhões de hectares (TURNBULL, 1999; LADIGES et al., 2003).

No Brasil foi introduzido por Edmundo Navarro de Andrade em 1904 com propósito de plantios para produção de dormentes, postes e lenhas para locomotivas e hoje após 112 anos podemos constatar o quão versátil é esta espécie podendo ser usada para energia (lenha e carvão vegetal), postes, mourões, construção civil, chapas de fibras, celulose e te móveis finos, assim como para fins não madeireiros como extração de óleo essencial de folhas, plantio para quebra-ventos, produção de mel, entre outras utilidades (WILCKEN et al., 2008).

É considerado um gênero de grande importância mundial por sua adaptabilidade, rápido crescimento, propriedade da madeira, produção de celulose e papel, construção, biocombustíveis de suas matérias-primas, bem como o uso de alguns compostos orgânicos com potencial inseticida e medicinal (LADIGES et al., 2003; POTTS, 2004), levando-o a ser plantado em mais de 100 países (MYBURG e GRATTAPAGLIA, et al 2014).

E.grandis, *E.urophylla*, *E.globulus* e *E.camaldulensis* correspondem a 80% das áreas plantadas e seus híbridos são os materiais genéticos mais plantados. *E. grandis*, *E. urophylla* e seus híbridos são os mais favorecidos em regiões tropicais e subtropicais, com *E. globulus* em regiões temperadas (POTTS, 2004).

Seus plantios levam a renovação de recursos renováveis essenciais para produção de celulose, papel, biomateriais e bioenergia, favorecendo a redução de pressões humanas em florestas naturais (MYBURG e GRATTAPAGLIA, et al 2014).

Trabalhos em melhoramento genético têm buscado explorar a variabilidade genética natural das espécies e sua capacidade de hibridizar para identificar genótipos com características desejáveis (POKE et al., 2005).

3.2 *Eucalyptus dunnii*

Eucalyptus dunnii é uma espécie pertencente ao subgênero *Symphomyrtus*, seção *Maidenaria* (LADIGES et al., 2003). Possui um bom crescimento, sobretudo dentro desta seção (FONSECA et al., 2010).

Segundo Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais, IPEF 2016, *o Eucalyptus dunnii*, pode atingir 50 metros de altura, sendo umas das espécies de maior crescimento na Austrália, aonde se encontra distribuído à 250 km a Oeste de Coff's Harbour até o Oeste de Warwick (IPEF,2016).

Algumas espécies possuem resistência ou sensibilidade a estresses abióticos, como temperaturas abaixo de 0°C. O *E.dunnii* é indicado para plantios em regiões com temperaturas mínimas absolutas de até -5°C, sob condições de aclimação prévia. Pode suportar até 22 geadas anuais, porém se fora de época normal de ocorrência, sua mortalidade pode atingir 50% em plantios comerciais (PALUDZYSZYN FILHO e SANTOS, 2005). Devido à severas condições climáticas pela baixa temperatura, algumas espécies se destacam pela possibilidade de adaptação às alterações climáticas e pela produção de madeira de qualidade (BORÉM, 2007).

Segundo Fonseca (2010), *E. dunnii* apresenta maior densidade, menor teor de lignina e maior comprimento do sistema radicular do que *E.grandis*, além de ser mais resistente à seca. Entretanto apresenta problemas de propagação tanto por clonagem como por semente (florescimento tardio). Entre as espécies melhoradas de

Eucalyptus no Brasil o *E.dunnii* encontra-se juntamente com *E.grandis*, *E.saligna*, *E.urophylla* e *E.globulus* como espécies mais usadas para produção de papel de celulose de fibra curta.

A variação da densidade básica da madeira e característica das fibras em função da idade de indivíduos plantados em diferentes locais foram, em Linhares (ES) com 4 anos, Db (g/cm³) de 0,536 e comprimento de fibras de 1,09 mm e no Paraná com 5 anos, Db (g/cm³) de 0,486 e comprimento de fibras de 1,12 mm (FERREIRA, 1994).

É considerada uma madeira pesada devido à massa específica aparente elevada, e assim como a maioria das espécies do gênero apresenta elevadas tensões de crescimento manifestadas na madeira serrada através de rachaduras e empenamentos, sendo assim importantes alternativas para redução destes efeitos, como pesquisas no melhoramento genético, métodos de exploração, técnicas de desdobro adequadas, entre outras técnicas importantes para melhoramento da espécie (ROCHA e TRUGILHO, 2006).

3.3 Evolução e poliploidia em plantas

Dois processos irregulares podem promover a evolução de plantas poliplóides a partir de indivíduos diplóides, a duplicação somática através de irregularidades na mitose que perpetuam células meristemáticas em novas gerações, ou através da divisão reducional ou equacional em células reprodutoras na qual as áreas dos cromossomos não se separam completamente para os pólos na anáfase. Ambas são incorporadas no núcleo e promovem a duplicação do número cromossômico no gameta e podem ocorrer na natureza (GARDNER e SNUSTAD, 1986).

A evolução de poliplóide pela duplicação de cromossomos é generalizada entre plantas de floração e está ligado a efeitos fenotípicos significativos (OTTO e WHITTON 2000; LEVIN, 2002). Aspectos fenotípicos são afetados pela poliploidia devido à influência no genoma da planta, podendo ser mais considerável que qualquer outro único evento genético (HUSBAND et al., 2008).

Quando a duplicação ocorre no genoma de um material híbrido entre duas ou mais diferentes espécies recebem o nome de alopoliplóide. Porém se a poliploidia ocorrer por uma duplicação do genoma de uma mesma espécie chamamos os de autopoliplóide. Este ocorre com frequência em algumas células de plantas que ao final acabam não sobrevivendo. Em autopoliplóides, a segregação desigual dos cromossomos em quadrivalentes os tornam estéreis em vários graus gerando questionamentos sobre a atuação apenas da autoploidia na evolução das plantas devido ao histórico de ploidia em algumas espécies, como por exemplo o *Crysanthemum* ao qual são conhecidas plantas com número básico de 9, 18, 36, 54, 72 e 90 cromossomos. Porém a junção da autoploidia com a aloidia tem sido um processo importante na evolução das plantas. Um fenômeno que pode ocorrer é a formação de plantas triplóides com três genomas completos ($3n$) oriundas de plantas tetraplóides ($4n$) ou diplóides não reduzidas ($2n$) que ao produzir gametas $2n$ viáveis se une na fertilização com gametas normais produzindo os triplóides. Estes não se reproduzem normalmente e se estabelecem devido a irregularidade durante a meiose resultando em baixa sobrevivência e esterilidade dos sobreviventes. Outro produto da poliploidia é a planta tetraplóide frequentemente originada a partir da duplicação do genoma. Quando estas plantas são capazes de reprodução vegetativa, elas podem produzir tetraplóides completos (GARDNER e SNUSTAD, 1986).

Apesar da grande porcentagem de plantas cultivadas (40%) ser poliplóides, segundo Hilu (1993) não há como concluir que a poliploidia tenha facilitado ou dificultado a domesticação destas espécies. Para a evolução e adaptação, a poliploidia comum sugere a vantagem de ter um material genético adicional. Características como o aumento dos níveis de tolerância ao estresse, apomixia, resistência a pragas e a variação de floração em tempo e tamanho do órgão podem adaptar os poliplóides a novos nichos ou melhorarem a sua aptidão em seus ambientes como em climas frios e altas altitudes e latitudes (TATE et al., 2004).

Cultivares comerciais na agricultura são poliplóides devido às suas características favoráveis, tais como vigor, alta produtividade e resistência a doenças (SANFORD, 1983; PREDIERI, 2001). Segundo Zeldin e Mccown (2004), em triplóides o emparelhamento cromossômico durante a meiose é irregular e gametas com diferentes números de cromossomos são produzidos, resultando em diminuição da fertilidade. Desta maneira, o triplóide pode permitir um método de prevenção à propagação indesejável de

transgenes para plantas convencionais. Assim sendo, plantas poliplóides apresentam diferentes características, sendo os triplóides superiores aos diplóides e os tetraplóides mais vigorosos e de maior rendimento (ROY et al., 2001).

Os poliplóides também podem ser obtidos por indução química, que se dá pela má formação do fuso durante a mitose resultando na duplicação dos cromossomos. Quando células duplicadas dão origem a tecido somático produzem plantas inteiras para propagação. Alguns químicos são utilizados para indução de poliploidia. Um deles e também bastante utilizado é a colchicina, um alcalóide extraído do açafrão de outono, *Colchicum autumnale*, desenvolvida pelos pesquisadores A. F. Blakeslee, A. G. Avery e B. R. Nebel. A colchicina interfere na divisão celular e transforma células $2n$ em células $4n$, produzindo assim tetraplóide ou mixoplóides (quimeras que consistem em células diplóides e tetraplóides) (GARDNER e SNUSTAD, 1986).

Para o melhoramento genético a indução da poliploidia por colchicina tornou-se uma ferramenta auxiliar para o desenvolvimento de algumas espécies (SHIFINO-WITTMANN, 2004). Pôde ser utilizada através da poliploidização na espécie buscando plantas maiores e melhores através do efeito “gigas”, por poliploidização de um híbrido visando a restauração de fertilidade, novas espécies ou a ressintetização de alguma já existente ou pela transferência de genes de interesse entre níveis de ploidia diferentes, intra ou interespecíficos (SHIFINO-WITTMANN, 2004). Um exemplo bem-sucedido de alopoliplóide de trigo e centeio é o *Triticale*. Além da poliploidia somática por colchicina, oxido nitroso, oryzalin entre outros antimitóticos, utiliza-se seleção e cruzamentos de plantas com alta frequência de gametas com número somático de cromossomos buscando a heterozigose (SCHIFINO-WITTMANN & DALL'AGNOL, 2001).

Conseqüentemente, um método eficaz para a triagem da ploidia, torna-se necessário para identificar os poliplóides. A contagem de cromossomos é uma triagem clássica (HAMIL et al., 1992), porém podendo demandar um tempo maior (ROY et al., 2001). Outros métodos que também podem ser utilizados são os métodos indiretos, nos quais são realizadas caracterizações citoanatômicas e morfológicas, através de análises das características da planta como aspectos morfológicos, diâmetro do grão de pólen, número de cloroplastos por par de células-guarda, tamanho e densidade dos estômatos,

características foliares e comprimento de fibras. Através de correlações estatísticas, permitem associação entre o nível da ploidia e suas características morfológicas podendo auxiliar na separação de plantas poliplóides quando realizada em larga escala (VICHATO, 2006). Segundo VAN DUREN (1996), técnica para estimar a ploidia como característica das folhas e estômatos, podem ser utilizadas desde que não tenham sofrido efeitos ambientais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material Vegetal

Foram coletadas sementes de *Eucalyptus dunnii*, provenientes do pomar de polinização aberta de espécie pura pertencente a empresa Suzano Papel e Celulose localizada em Itapetininga-SP. Estas foram induzidas à poliploidização através do contato com colchicina no Laboratório de Cultura de Tecidos da FuturaGene Brasil, conforme descrito por Grouh et al. (2011). Após germinação em caixa tipo gerbox, as plântulas foram transferidas individualmente em tubetes para aclimação em casa-de-vegetação aonde permaneceram em desenvolvimento entre 90 e 120 dias.

Após surgimento de novas folhas, as mudas foram analisadas por citometria de fluxo para identificação da ploidia. Futuras avaliações por citometria de fluxo

foram realizadas em diferentes períodos para verificação da estabilidade da ploidia de cada indivíduo.

4.2 Experimento em casa-de-vegetação

O experimento iniciou-se com 25 plântulas tetraplóides, 25 plântulas diplóides pós indução (WT1) e 12 plântulas diplóides que não tiveram contato com colchicina (WT2). As plântulas foram transferidas para vasos de 18 litros contendo substrato até a cobertura do sistema radicular e receberam adubação manual duas vezes por semana da solução 1 g/L de Kristalon, Nitrato de cálcio e Rixolin, sendo 250 ml por vaso durante o primeiro mês seguindo posteriormente com 500 ml por vaso da solução. Estes foram identificados com placas individuais contendo o código das plantas e por cores sendo, verde para Tetraplóide, vermelho para WT1 e amarelo para WT2. O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação localizada no viveiro de mudas da empresa FuturaGene Brasil no município de Itapetininga-SP e foi instalado em blocos casualizados (Single Tree Plot) no dia 30 de abril de 2014 com temperatura média interna de 32,5°C (Figura 1). Ao final, devido a efeitos pleiotrópicos e análise de estabilidade de ploidia, as análises foram compostas por 21 plantas tetraplóides, 24 diplóide (WT1) e 12 diplóides (WT2). As análises foram feitas através do programa estatístico R e comparados pelo teste Tukey a 5%, como Delineamento em Blocos Casualizados Desbalanceado.

Os dados foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste Tukey ($p < 0,05$), utilizando-se o pacote estatístico R.

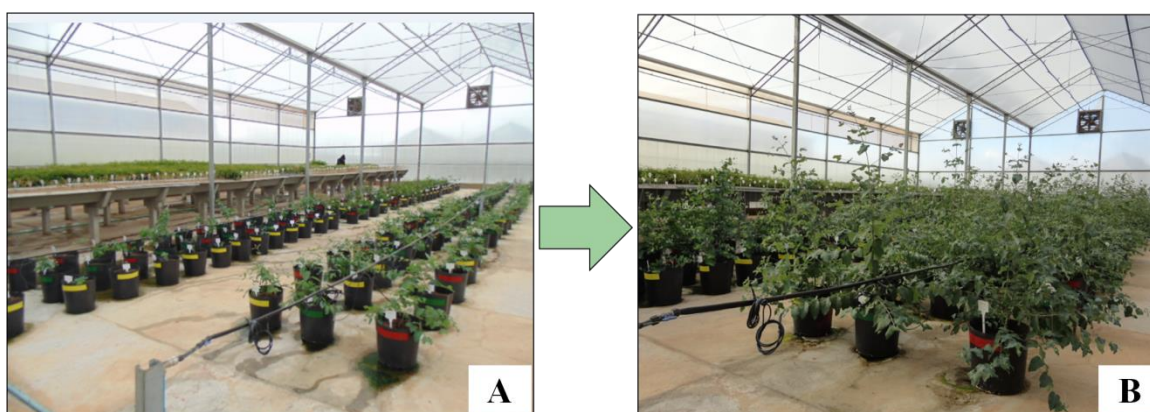


Figura 1: Experimento em casa-de-vegetação. A: 15 dias após instalação. B: 81 dias após instalação.

4.3 Estabilidade da ploidia

As plantas foram analisadas individualmente para confirmação da ploidia através de citometria de fluxo. Os tecidos coletados foram folhas do 3º e 4º par, identificadas, acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em caixas de isopor contendo gelo para envio ao laboratório de citogenética. As coletas para avaliações foram realizadas aos 30º, 120º e 240º dias em casa-de-vegetação para verificar a estabilidade da ploidia da planta após desenvolvimento.

A partir destas análises foram identificadas plantas como tetraplóides (Tetra), diplóides após contato com colchicina (WT1) e diplóides que não passaram por indução à poliploidização (WT2).

4.4 Crescimento

4.4.1 Altura

As medições de altura foram realizadas a partir do coleto até o ápice caulinar, através de trena milimetrada, a qual foi fixada a uma aste rígida para garantir a linearidade da mesma na medição (Figura 2). Os dados foram coletados semanalmente por um período de 3,5 meses a partir da instalação do experimento.



Figura 2. Medição de altura em experimento com 103 dias após instalação em casa-de-vegetação.

4.4.2 Diâmetro

Produtores e silvicultores utilizam o diâmetro como característica importante no desenvolvimento de mudas em viveiro florestal. Neste experimento as medições foram realizadas após 35 e 113 dias de instalação do experimento e realizadas através de paquímetro digital automático à altura de 10 cm do coleto. Esta foi padronizada com o auxílio de um suporte rígido colocado na base do coleto, para correta medição da altura mediante possíveis ondulações no substrato. Assim a altura foi demarcada com caneta para que as posteriores avaliações fossem realizadas na mesma posição do caule gerando dados precisos de crescimento nesta região.

4.5 Morfologia da planta

A caracterização morfológica foi realizada por meio de identificação das diferenças fenotípicas foliares e caulinares, após a avaliação, confirmação e identificação da ploidia dos indivíduos por citometria de fluxo. Os materiais vegetais foram caracterizados em condições de casa-de-vegetação.

4.5.1 Folha

Folhas completamente expandidas do terceiro, quarto e quinto nó a partir do ápice do ramo de cada planta foram cortadas através de bisturi e prensadas (Figura 3). Estas permaneceram em temperatura ambiente $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 7 dias. Após este período foram fixadas em folhas sulfite A4 e identificadas conforme tratamento. Para cada indivíduo foram separadas 5 folhas (Figura 4) as quais foram digitalizadas em scanner manual e avaliadas pelo programa ImageJ para os parâmetros comprimento (C) e largura (L) de folhas e comprimento do pecíolo (P) (Figura 5).



Figura 3. Corte de folhas para análise morfológica

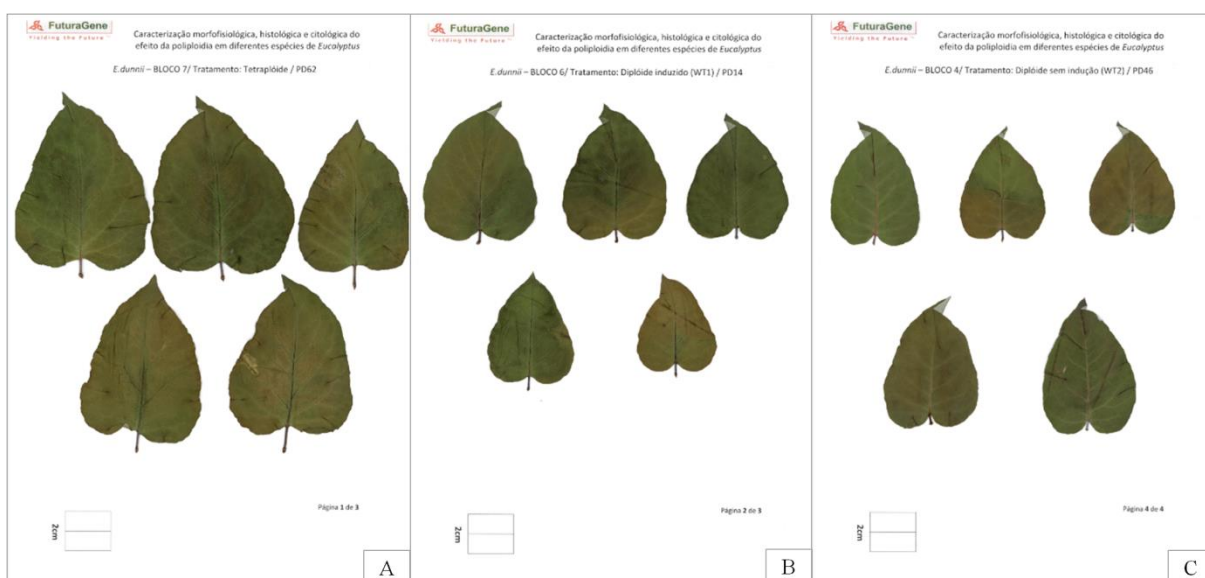


Figura 4. Folhas digitalizadas. A. Tetraplóide, B. WT1 e C. WT2.

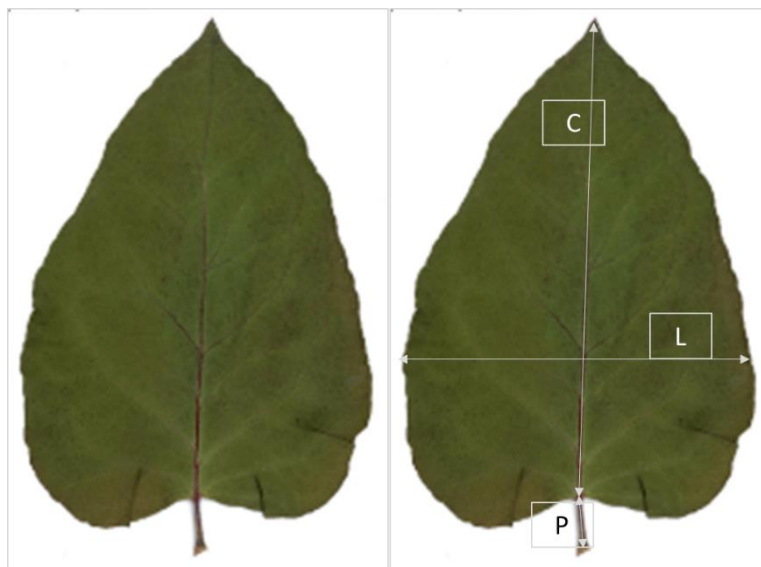


Figura 5. Posição de medição de comprimento (C), Largura (L) e pecíolo (P).

4.5.2 Ramificações

A quantificação do número de ramos presentes em cada planta foi realizada em três momentos, sendo eles na instalação do experimento e após 46 e 117 dias. Nestas datas, foram contados todos os ramos laterais presentes em cada indivíduo ao longo de seus caules.

4.6 Avaliações Citológicas

4.6.1 Densidade de estômatos

Do 10º par de ramos presente no caule da planta com 90 dias pós instalação do teste, foram coletados o 5º par de folhas posicionado no sentido do meristema apical para o caule totalizando, 4 folhas por planta. A superfície abaxial das folhas foi revestida com esmalte de unha incolor, formando uma camada espessa no centro da área foliar, permanecendo intactas até a secagem do mesmo. Posteriormente o comprimento das folhas foi medido com régua milimetrada para saber exatamente o centro desta e a partir deste ponto demarcar uma área de quadrado (tamanho de $\frac{1}{4}$ do comprimento) para retirada da película de esmalte contendo a impressão de estômatos (amostras). Este quadrado foi dividido ao meio pela nervura principal gerando 2 quadrados (sub-amostras, totalizando 2

por folha) os quais foram colocados em lâminas de tamanho 26x76 mm, posicionados um ao lado do outro e cobertos por lamínulas de 22x22 mm (Figura 6).

Os estômatos foram fotografados via microscópio no aumento de 400x através de microscópio óptico da marca Leica (Figura 7). Foram fotografadas 10 visadas (posição aleatória para fotografia) em cada sub-amostra, sendo 5 de cada lado, totalizando ao final 20 imagens por lâmina. Os estômatos foram contabilizados em número por mm² e os dados analisados através do programa R.

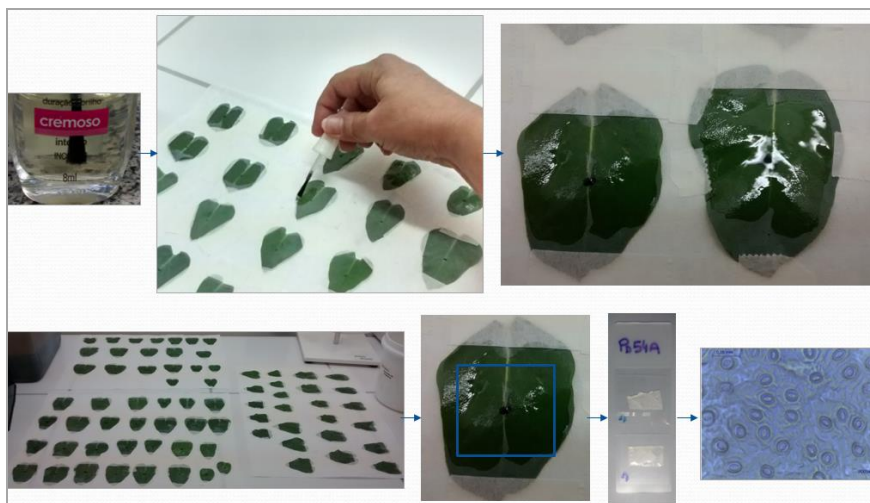


Figura 6. Preparo de folhas e lâminas para análise de densidade de estômatos.

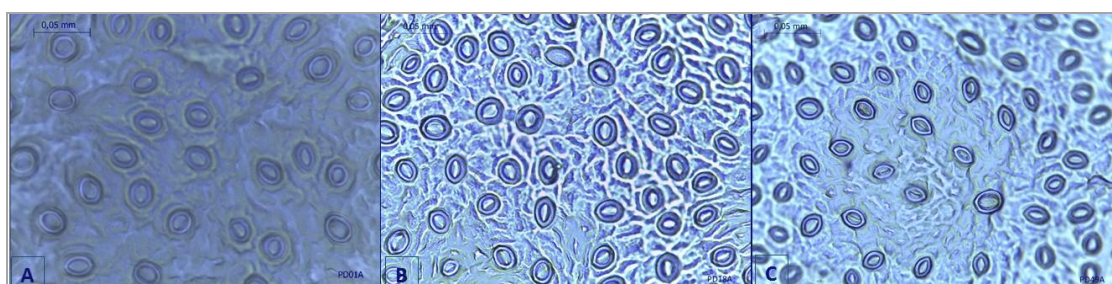


Figura 7. Lâminas de estômatos em aumento de 400x. A: Tetraplóide; B: WT1 e C:WT2.

4.6.2 Comprimento de fibras

Para análise de comprimento de fibras fez-se necessário o corte de amostras de 10 centímetros retiradas do caule a partir de 50 centímetros da base do colo (Figura 8). As plantas possuíam 210 dias de desenvolvimento em casa-de-vegetação. O processamento iniciou-se através da retirada da casca e cortes longitudinais (sub-amostras)

até o centro caule, para posterior análise de comprimento de fibras. As sub-amostras foram submetidas ao processo de maceração, sendo mantidas em ácido acético e peróxido de hidrogênio, fechados e transferidos para estufa à 60°C por 4 dias, conforme o método preconizado por DASDWELL (1972). Em seguida as amostras foram lavadas e diluídas com água destilada para desagregação das mesmas (Figura 9). As fibras foram mensuradas em fotomicrografias das lâminas montadas com os macerados e com presença de safranina, para posterior avaliação em programa de software ImageJ (Figura 10). Foram preparadas 3 lâminas e destas medidas 30 fibras, totalizando 90 medições por planta.



Figura 8. Plantas cortadas a 50 cm do coleto para retirada das amostras a serem processadas.

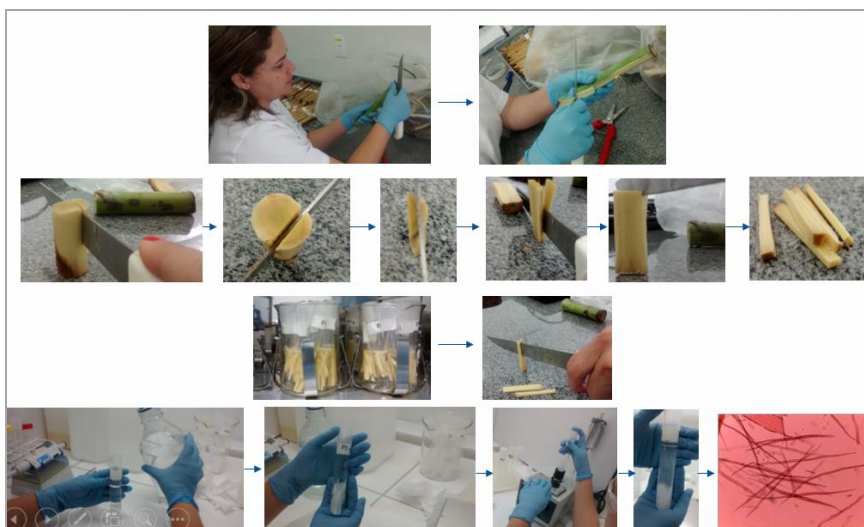


Figura 9. Sequência do processamento de amostras de caule para análise de fibras.



Figura 10. Lâminas de fibras em aumento de 40x. A: Tetraplóide; B: WT1 e C:WT2.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estabilidade de Ploidia

Segundo Otto e Whitton (2000), poliploidias antigas podem ter seus sinais de duplicação apagados pelo tempo através da segregação dissômica reestabelecida, por rearranjos na sintenia cromossômica e silenciamento ou diferenciação gênica que obscurecem a duplicação gênica. Diante de uma ocorrência natural em plantas poliplóides fizeram se necessárias avaliações em diferentes estágios para garantia do estudo e seus tratamentos.

Após 3 avaliações por citometria de fluxo, apenas um indivíduo teve alteração de ploidia desde a segunda análise via citômetro. Este passou de tetraplóide ($4n$) para mixoplóide ($2n$ e $4n$). Esta planta foi descartada do experimento passando o tratamento tetraplóide ao delineamento de 25 plantas para 24 confirmadas com esta ploidia (Tabela 1) (Figura 11). Segundo Marques, 2000, em seringueiras devido a possível natureza anfidiplóide é esperada uma instabilidade genética em qualquer poliplóide induzido.

Tabela 1. Avaliação de ploidia por citometria de fluxo

Clone	Ploidia	Primeira Avaliação (30 dias)	Segunda Avaliação (120 dias)	Terceira Avaliação (240 dias)
<i>E.dunnii</i>	Tetraplóide	25	24	24
	Diplóide (WT1)	25	25	25



Figura 11: Tamanho da planta na coleta para citometria

5.2 Efeitos Pleiotrópicos

Segundo Costa et al. 2011, o uso de colchicina pode ocasionar efeitos de fitotoxidez promovendo alterações na morfologia da planta. Efeitos como perda de dominância apical e bifurcação dos ramos foram observados e considerados como fatores importantes para descartes destes indivíduos do experimento.

Após 50 dias da instalação, algumas plantas começaram a apresentar perda de dominância apical, gerando bifurcação dos ramos em desenvolvimento, característica que não permitiu o desenvolvimento das plantas e o avanço destas para próximas etapas (Figura 12). Estes efeitos foram observados em apenas

2 plantas tetraplóides e 1 planta diplóide WT1, não sendo observado em plantas diplóide WT2, que por sua vez não tiveram contato com colchicina. A partir destes dados e subsequente análise de estabilidade de ploidia, o experimento passou a ser composto por 21 plantas tetraplóides, 24 plantas diplóides induzidos (WT1) e 12 diplóide (WT2).



Figura 12: Plantas bifurcadas após perda apical.

5.3 Crescimento

5.3.1 Altura

Os dados relacionados à altura de *E.dunnii* foram levantados durante 3,5 meses. Durante todo este período as plantas não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos tetraplóide e seus controles (WT1 E WT2). A partir de aproximadamente 70 dias a variação entre os indivíduos começou a diminuir (Figura 13). Pela análise de Tukey no dia 52º o coeficiente de variância (CV) foi de 19,41% (Tabela 2) (Figura 14) reduzindo em mais de 50% no 103º dia (Tabela 2) (Figura 15), no qual foi obtido CV=9,53%. No início do experimento as plantas possuíam menor competição entre elas favorecendo um crescimento individual das mesmas. Após este período de 103 dias, as plantas apresentaram dificuldade no desenvolvimento pela limitação dos vasos e espaço em casa-de-vegetação tornando esta avaliação inviável para o período posterior. Em citrus o crescimento de tetraplóides mostrou-se mais lento e compacto quando comparado com os diplóides, efeito este associado a menor transpiração e número de estômatos presentes nestas plantas (GUERRA, 2014).

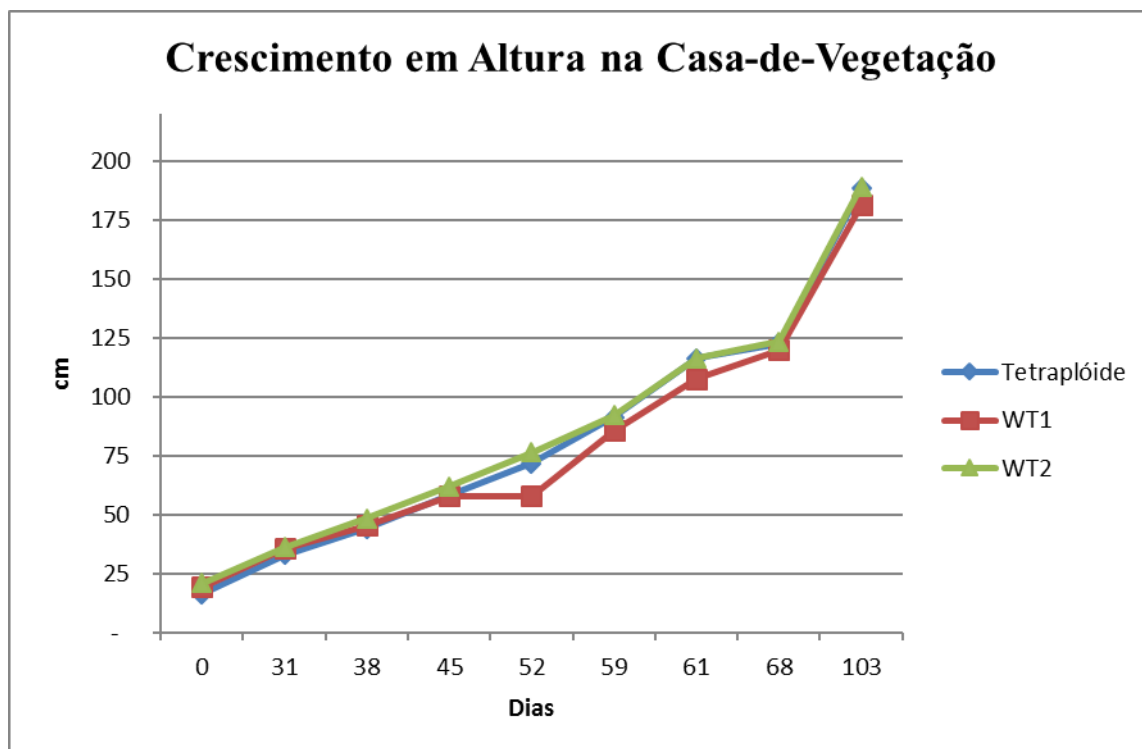


Figura 13. Análise média de crescimento em altura das plantas avaliadas por período de 3,5 meses em condições de casa-de-vegetação.

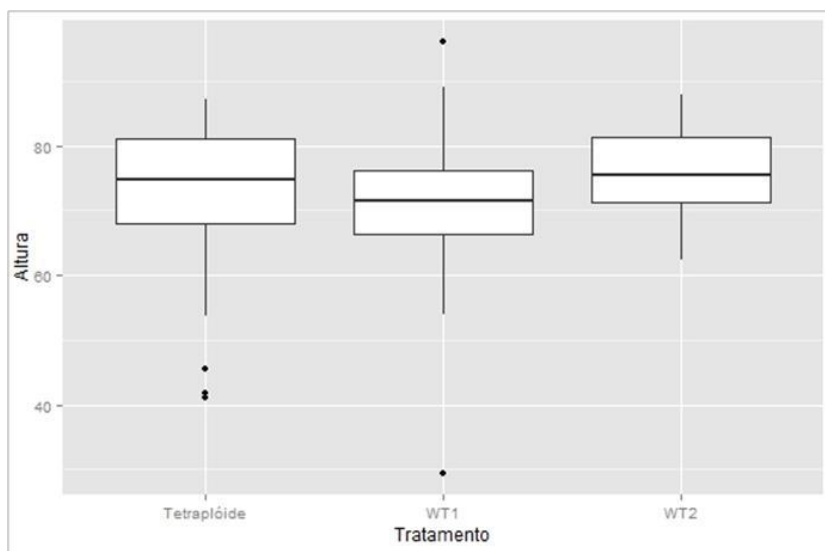


Figura 14. Boxplot com a distribuição dos dados das plantas avaliadas com 52 dias após instalação do teste.

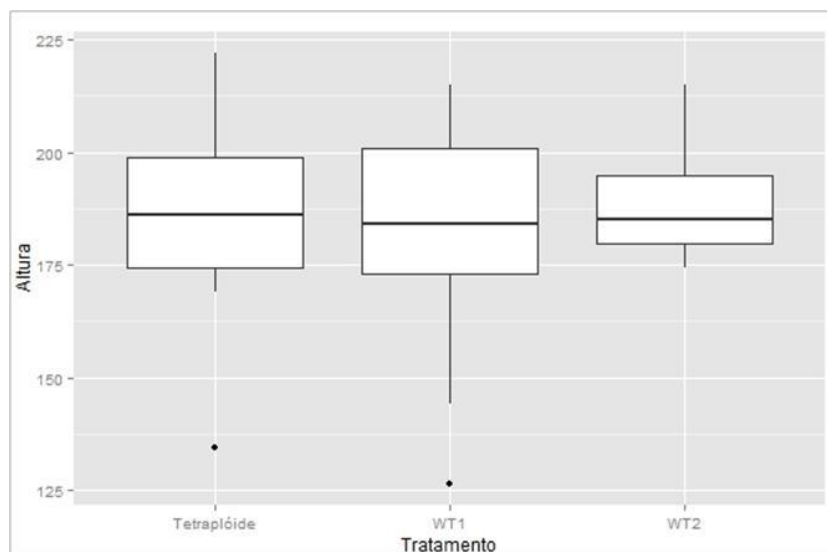


Figura 15. Boxplot com a distribuição dos dados das plantas avaliadas com 103 dias após instalação do teste.

Tabela 2. Análise de variância de altura do experimento com 52 e 103 dias pelo programa estatístico R. Comparação de médias por Teste de *Tukey* 5%.

<u>Tratamentos</u>	<u>Média Ajustada (cm)</u>	
	<u>52 dias</u>	<u>103 dias</u>
Tetraplóide	68,7653 a	183,9558 a
WT1	71,0139 a	182,6268 a
WT2	81,5258 a	199,2874 a
CV (%)	19,41	9,35

5.3.2 Diâmetro

As avaliações de diâmetro foram realizadas em intervalos maiores para que houvesse um desenvolvimento cambial e este fosse detectado nas medições. Conforme análise de variância por Tukey, ambas as plantas com 35 e 113 dias não apresentaram diferença significativa entre o tratamento tetraplóide e os controles WT1 e WT2 (Tabela 3) (Figuras 16 e 17), indicando assim que diâmetro não pode ser considerado uma característica diferencial entre plantas tetraplóides e diplóides sob condições de casa-de-vegetação. Segundo Pinheiro, 1980, características inerentes à planta como altura média e diâmetro médio, apresentaram-se mais uniforme e com pequena superioridade em plantas diplóides quando comparadas aos seus poliplóides.

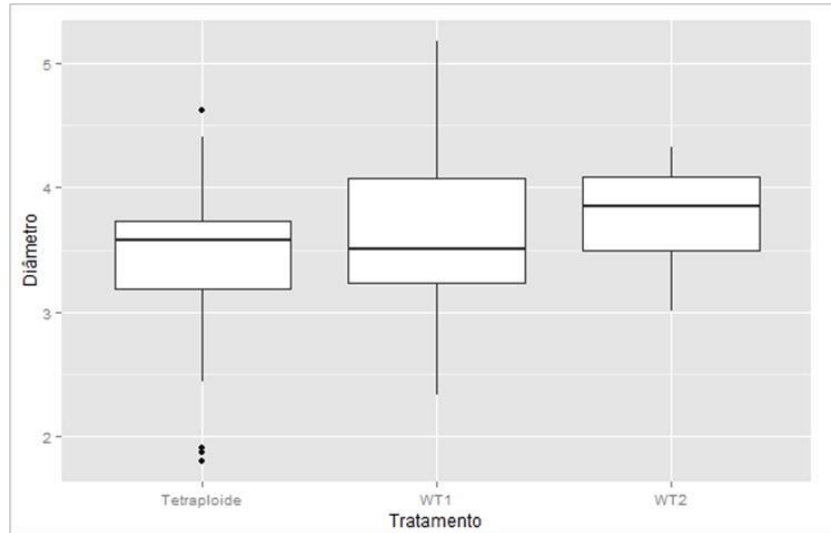


Figura 16. Boxplot com a distribuição dos dados do diâmetro das plantas avaliadas com 35 dias após instalação do teste.

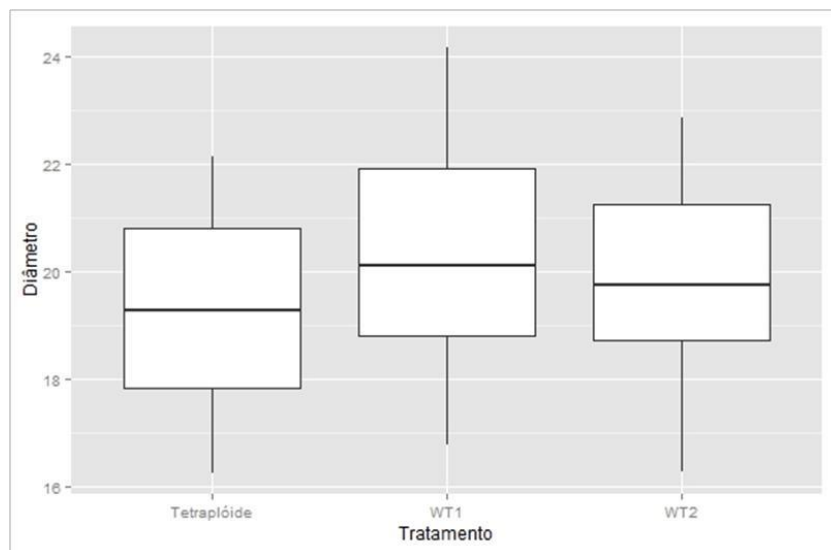


Figura 17. Boxplot com a distribuição dos dados das plantas avaliadas com 113 dias após instalação do teste.

Tabela 3. Análise de variância do diâmetro do experimento com 35 e 113 dias pelo programa estatístico R. Comparação de médias por Teste de *Tukey* 5%.

<u>Tratamentos</u>	<u>Média Ajustada (cm)</u>	
	<u>35 dias</u>	<u>113 dias</u>
Tetraplóide	3,3243 a	19,2596 a
WT1	3,5738 a	20,2838 a
WT2	3,761 a	20,3250 a
CV (%)	19,99	9,55

5.4 Morfologia da Planta

5.4.1 Ramificações

As plantas tetraplóides apresentaram menor quantidade de ramos presentes quando comparada as plantas controles. Dados levantados no 117º dia do experimento demonstraram pela análise de variância diferença significativa entre as plantas tetraplóides e diplóides, independente se em contato (WT1) ou não (WT2) com a colchicina (Figura 18) (Tabela 4).

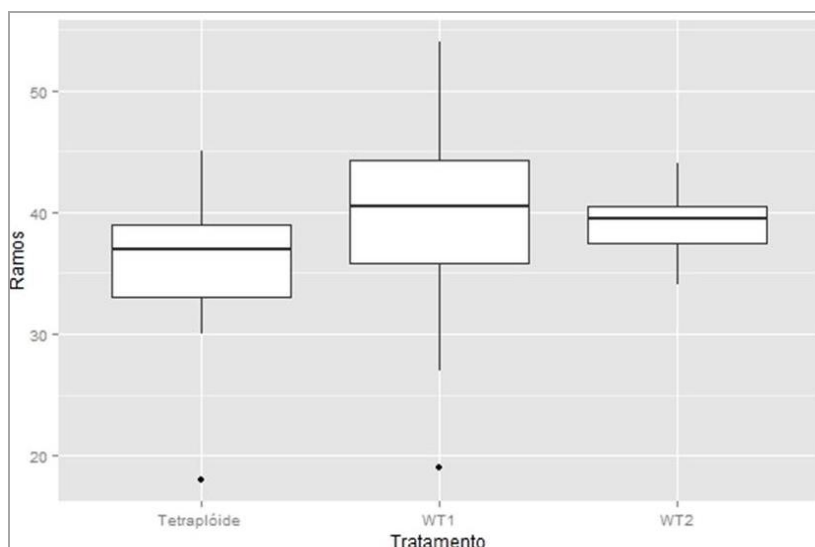


Figura 18. Boxplot com a distribuição dos dados das plantas avaliadas com 117 dias após instalação do teste.

Tabela 4. Análise de variância de ramificações do experimento com 117 dias pelo programa estatístico R. Comparação de médias por Teste de *Tukey* 5%.

<u>Tratamentos</u>	<u>Média Ajustada (Número de Ramos)</u>
Tetraplóide	35,0737 a
WT1	39,4553 b
WT2	43,2711 b
CV (%)	13,05

5.4.2 Morfologia de Folhas

O conhecido efeito “gigas” encontrado em plantas poliploidizadas promovem aumento dos órgãos das plantas, como aumento do limbo foliar, pecíolo, frutos, menor ramificação, entre outras características discutidas (MADAIL, 2008). Segundo Sugiyama (2005), a poliploidização promove um aumento no tamanho da folha e este efeito pode ocorrer pela expansão das células do mesofilo, característica esta observada em *Lolium*. Em citrus também foi evidenciada aumento da largura e comprimento das folhas, porém com redução no tamanho do pecíolo (GUERRA, 2014). Para *E.dunnii* houve aumento na estrutura foliar apresentando diferença significativa entre os tratamentos. Em seu comprimento plantas tetraplóides obtiveram média de 7,12 cm, nos controles WT1 de 6,50 cm e em WT2 de 5,92 cm (Tabela 5) (Figura 19). Esta diferença foi também observada na avaliação de largura, sendo de 7,76 cm em plantas tetraplóides, de 4,67 cm em plantas WT1 e de 4,20 cm em plantas WT2 sendo assim diferentes significativamente entre si (Tabela 5) (Figura 20). Para crescimento em pecíolo as diferenças continuaram mostrando-se de 0,72 cm em tetraplóides, de 0,45 cm em WT1 e de 0,31 cm em WT2 (Tabela 5) (Figura 21).

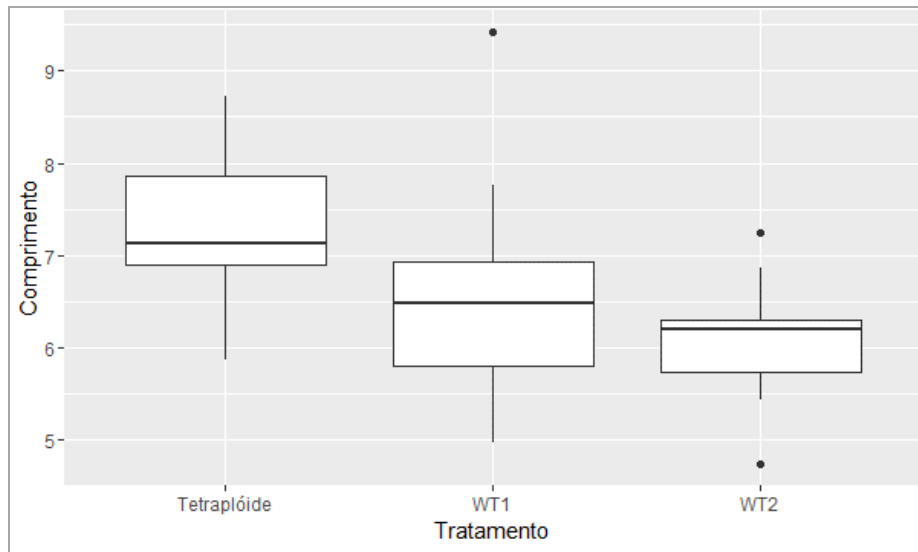


Figura 19. Boxplot com a distribuição dos dados de comprimento de folhas.

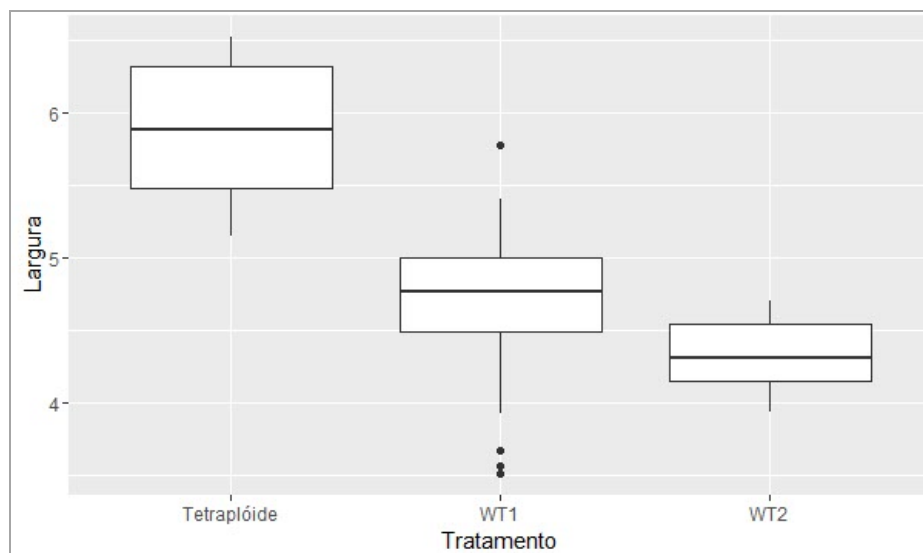


Figura 20. Boxplot com a distribuição dos dados da largura de folhas.

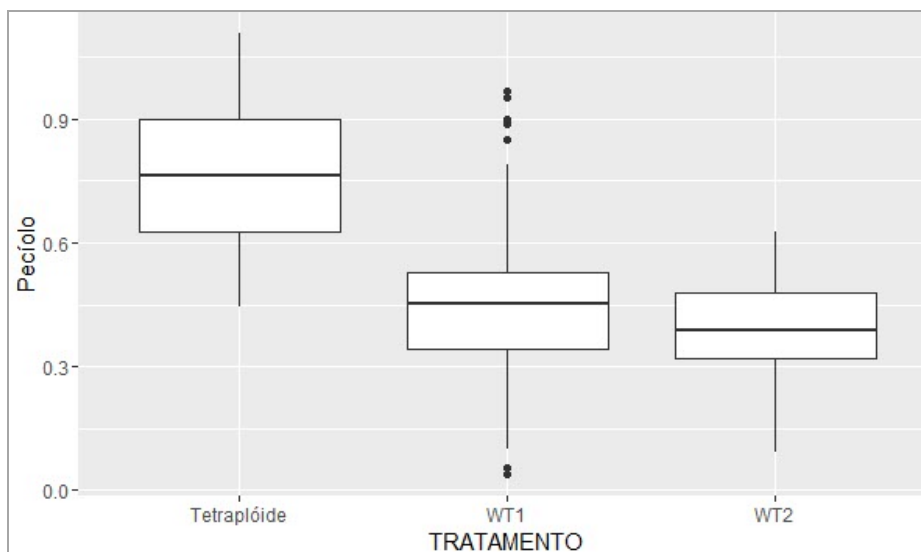


Figura 21. Boxplot com a distribuição dos dados de pecíolo de folhas.

Tabela 5. Análise de variância do comprimento e largura da folha e comprimento do pecíolo de folhas pelo programa estatístico R. Comparação de médias por Teste de *Tukey* 5%.

<u>Tratamentos</u>	<u>Média Ajustada (cm)</u>		
	<u>Comprimento de folhas</u>	<u>Largura de folhas</u>	<u>Comprimento de pecíolos</u>
Tetraplóide	7,1201 a	7,7685 a	0,7234 a
WT1	6,5012 b	4,6710 b	0,4526 b
WT2	5,9202 c	4,2053 c	0,3125 c
CV (%)	13,78	8,68	26,59

5.5 Avaliações Anatômicas

5.5.1 Densidade de estômatos

Segundo Vichiato (2006), em plantas de *Dendrobium nobile* a maior frequência estomática e número de estômatos em folhas de crisântemo foi diretamente proporcional ao aumento da ploidia. Em *Acacia mearnsii* a relação existente entre a frequência do estômato e o nível de ploidia foi inversa sendo quanto maior a ploidia menor a frequência de estômato (BECK, 2003). Esta relação de menor número de estômato por mm² foi também observada em plantas de *E.dunnii* conforme a ploidia. Em tetraplóides a frequência foi de 9.9 estômatos por mm², diferente significativamente quando comparada aos controles WT1 e WT2, com 12.4 e 13.3 estômatos por mm² respectivamente (Tabela 6) (Figura 22). Estudo realizado com *Aegilops neglecta* mostrou

que a frequência de estômatos pode ser utilizada para identificação e comparação entre plantas tetraplóides e hexaplóides (ARYAVAND, 2003). Em plantas de citrus a densidade estomática demonstrou haver alta correlação, porém negativa, entre a densidade estomática e a ploidia, chegando a reduções de 50% nas densidades estomáticas de folhas de plantas autotetraploides em relação às plantas controle diplóide (POVEDANO, 2012).

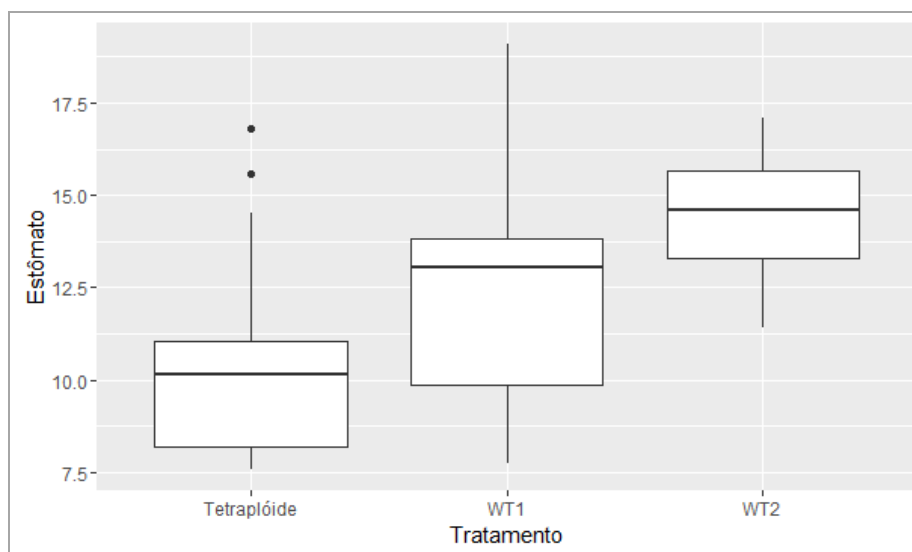


Figura 22. Boxplot com a distribuição dos dados da densidade de estômatos por mm^2 .

Tabela 6. Análise de variância de densidade de Estômatos pelo programa estatístico R. Comparação de médias por Teste de *Tukey* 5%.

<u>Tratamentos</u>	<u>Média Ajustada</u> <u>(Estômatos por mm^2)</u>
Tetraplóide	9,9502 a
WT1	12,4718 b
WT2	13,3223 b
CV (%)	20,02

5.5.2 Comprimento de fibras

Há mais de 100 anos atrás foram descritos efeitos da tetraploidia na anatomia da madeira observando fibras mais longas em plantas tetraplóides de *Oenothera stenomeres* (GRIFFIN, 2012).

Estudos realizados em *Acacia mangium* comparando plantas diplóides e tetraplóides demonstraram aumento no comprimento e largura das fibras, assim como aumento da eficiência no rendimento da polpa, menor uso de química na polpação e maior resistência no rasgamento (GRIFFIN, 2014). As fibras avaliadas neste trabalho apresentaram variações nos comprimentos entre as amostras. Conforme duplicação da ploidia, de diplóide para tetraplóide, houve aumento no comprimento das fibras sugerindo que a ploidia da planta pode influenciar em suas dimensões. Os resultados apresentados neste trabalho (Tabela 7) mostram que houve diferença significativa para comprimento de fibras entre plantas tetraplóides (0,86 mm), diplóide WT1 (0,73 mm) e diplóide WT2 (0,72mm), assim como no trabalho de Fantuzzi (2012) que concluiu que clones poliplóides podem apresentar fibras de maior comprimento e de melhor qualidade.

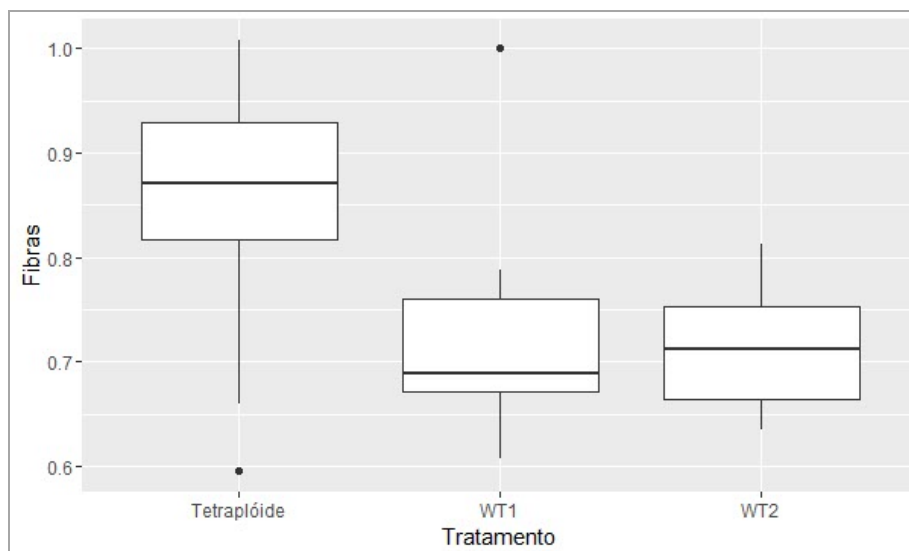


Figura 23. Boxplot com a distribuição dos dados de fibras.

Tabela 7. Análise de variância de comprimento de fibras pelo programa estatístico R. Comparação de médias por Teste de *Tukey* 5%.

<u>Tratamentos</u>	<u>Média Ajustada (mm)</u>
Tetraplóide	0,8552 a
WT1	0,7245 b
WT2	0,7200 b
CV (%)	10,08

6 CONCLUSÃO

Para a espécie de *Eucalyptus dunnii* as características de altura e de diâmetro não apresentaram diferença significativa entre plantas tetraplóides e diplóides sob condições de casa-de-vegetação.

Plantas tetraplóides de *Eucalyptus dunnii* apresentaram menor quantidade de ramos quando comparadas aos seus controles diplóides.

O comprimento, largura e pecíolo das folhas mostraram-se maiores significativamente em tetraplóides em relação aos seus controles diplóides de *Eucalyptus dunnii*.

Os resultados analisados de densidade de estômatos apresentaram menor densidade significativa para tetraplóides quando comparadas aos seus controles diplóides.

O comprimento de fibra apresentou maior diferença significativa em plantas tetraplóides de *Eucalyptus dunnii* em relação aos seus controles diplóides sob condições de casa-de-vegetação.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARYAVAND, A.; EHDAIE, B.; TRAN, B.; WAINES, J. G. Stomatal frequency and size differentiate ploidy levels in *Aegilops neglecta*. **Genetic Resources and Crop Evolution** v.50, p.175–182, 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS (ABRAF). **Anuário estatístico da ABRAF 2013 ano base 2012**. Brasília, DF, 2013, 146p.

BECK, S. L.; DUNLOP, R. W.; FOSSEY, A. Stomatal length and frequency as a measure of ploidy level in black wattle, *Acacia mearnsii* (de Wild). **Botanical Journal of the Linnean Society**, 141, p.177-181, 2003.

BORÉM, A. **Biotecnologia florestal**. Viçosa: Suprema, 2007.

COSTA, F. H. S.; PASQUAL, M.; SILVA, S. O.; SILVA NETO, H. P.; AMORIM, E. P.; SEREJO, J. A. S. Poliploidização em ápices caulinares de bananeira e seus efeitos morfofisiológicos in vitro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 8, p. 805-813, ago. 2011

DADSWELL, H. E. The anatomy of Eucalyptus Woods. **Melbourne: CSIRO: Forest Products Laboratory, Division of Applied Chemistry Technological**, Austrália, p. 35, 1972.

FERREIRA, M. Características da madeira de espécies/árvores superiores e clones de *Eucalyptus*. In: **REVISÃO APLICADA AO MELHORAMENTO PARA PRODUÇÃO DE PASTA CELULÓSICA**. 1994, Piracicaba, Anais da Reunião Regional sobre Clonagem Intensiva em *Eucalyptus*. Piracicaba: IPEF, 1994. 18 p.

FANTUZZI NETO, H. **Qualidade da madeira de eucalipto para produção de celulose kraft**. 2012. 105f. Tese (Doutorado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, 2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Disponível em: <<http://www.fao.org/news/story/pt/item/327830/icode/>>. Acesso em 06 de ago. 2016.

FONSECA, S. M.; RESENDE, M. D. V.; ALFENAS, A. C.; GUIMARÃES, L. M. S.; ASSIS, T. F.; GRATTAPAGLIA, D. **Manual Prático de Melhoramento Genético do Eucalipto**. Viçosa: UFV, 2010. 200 p.

GARDNER, E.J.; SNUSTAD, D.P. **Genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. cap.9, p. 497.

GRATTAPAGLIA, D.; BRADSHAW, H. D. Nuclear DNA content of commercially important *Eucalyptus* species and hybrids. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 24, p. 1074-1078, 1994.

GRIFFIN, A. R.; VUONG, T. D.; VAILLANCOURT, R. E.; HARBARD, J. L.; HARWOOD, C. E.; NGHIEM, C. Q.; THINH, H. H. The breeding systems of diploid and neoautotetraploid clones of *Acacia mangium* Willd. in a synthetic sympatric population in Vietnam. **Sexual Plant Reproduction**, v.25, p.257-265, 2012.

GRIFFIN, A. R.; TWAY, H.; BRAUNSTEIN, R.; DOWNES, G. M.; SON, D. H.; HARWOOD, C. E. A comparison of fibre and pulp properties of diploid and tetraploid *Acacia mangium* grown in Vietnam. **Appita**. v.67, n.1, p.43-49, 2014.

GROUH, M. S. H.; MEFTAHIZADE, H.; LOTFI, N.; RAHIMI, V.; BANIASADI, B. Doubling the chromosome number of *Salvia hains* using colchicines: Evaluation of morphological traits of recovered plants. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5(19), p. 4892-4898, sept., 2011.

GUERRA, D.; WITTMANN, M. T. S.; SCHWARZ, S. F.; SOUZA, P. D.; GONZATTO, M. P.; WEILER, R. L. Comparison between diploid and tetraploid citrus rootstocks: morphological characterization and growth evaluation. **Bragantia**, Campinas, v.73, n.1, p.1-7, 2014.

HAMILL, S.D.; SMITH, M.K.; DODD, W.A. In vitro induction of banana autotetraploidy by colchicine treatment of micropropagated diploids. **Aust J Bot**, v.40, p.887–896, 1992.

HIGA, C. V.; HIGA, A. R.; TREVISAN, R.; SOUZA, M, V, R. Resistência e resiliência a geadas em *Eucalyptus dunnii* Maiden plantados em Campo do Tenente, PR. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 40, p.67-76, 2000.

INSTITUO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção da extração vegetal e da silvicultura**, Rio de Janeiro, v. 29, p.1-56, 2014.

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES (IBÁ), 2005. Disponível em:
<http://iba.org/images/shared/iba_2015.pdf>. Acesso em: 5 de abr. 2016.

INSTITUTO DE PESQUISAS E ESTUDOS FLORESTAIS (IPEF). Disponível em:
<<http://www.ipef.br/identificacao/cief/especies/dunnii.asp>>. Acesso em: 5 de abr. 2016.

HUSBAND, P. S.; BOXALL, J. B.; AND SAUL, A. J. Laboratory studies investigating the processes leading to discolouration in water distribution networks, **Water Res.**, v.42, p.4309-4318, 2008.

JANAKI AMMAL, E.K.; KHOSLA, S.N. Breaking the barrier to polyploidy in the genus *Eucalyptus*. **Indian Academy of Sciences**, v.70(5), p.248-249, 1969.

KAPOOR, M.L.; SHARMA, V.K. Experimentally synthesized allotetraploids in *Eucalyptus*. **USDA**, v. 34(1), p. 19-22, 1985.

LADIGES, P.Y.; UDOVICIC, F.; GARETH, N. Australian Biogeographical Connections and the Phylogeny of Large Genera in the Plant Family Myrtaceae, **Journal of Biogeography**, v.30, p.989-998, 2003.

LEVIN, D. A. The origin, demise, and expansion of plant species. New York. The role of chromosomal change in plant evolution. **Oxford University Press**, New York, 2002.

MADAIL, H. R.; PIO, L. A. S.; PASQUAL, M.; SILVA, S. O. Caracterização morfológica de cultivares de bananeira micropropagadas em estágio juvenil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 2, p. 219-222, fev, 2011.

MARENCO, R.A.; GONÇALVES, J.F.C; VIEIRA, G. **Tree Physiology**, Victoria, v.21, p.1311-1318, 2001.

MARQUES, J. R. B.; MONTEIRO, R. M.; MORAES, V. H. F. Poliploidia em Seringueira: III – Estudo comparativo entre clones diplóides e novos poliplóides putativos em condições de jardim clonal. **Agrotrópica**, v.12(1), p.45-48, 2000.

MYBURG, A. A.; GRATTAPAGLIA, D.; TUSKAN, G. A.; et al. The genome of *Eucalyptus grandis*. **Nature**, v.510, p.356-362, jun. 2014.

MORGAN, E. R.; HOFMANN, B. L.; GRANT, J. E. Production of tetraploid *Gentiana triflora* var. *japonica* ‘Royal Blue’ plants. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, Auckland, v. 31, p. 65-68, 2003.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT

(OECD), 2014. Disponível em:

<[http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2014\)27&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2014)27&doclanguage=en)>. Acesso em: 6 de ago. 2016.

OU DJEHIH, B.; BENTOUATI, A. Chromosome numbers of the 59 species of *Eucalyptus* L’Herit. (Myrtaceae). **Caryologia**. V. 59, n. 3, p. 207-212, 2006.

- OTTO, S. P.; WHITTON, J. Polyploid incidence and evolution. **Annu. Rev. Genet.** v. 34, p. 401-437, 2000.
- PALUDZYSZYN FILHO, E.; SANTOS, P. E. T. Considerações sobre o plantio de *Eucalyptus dunnii* no estado do Paraná. **Comunicado Técnico 141**, Colombo: Embrapa Florestas, p.7, 2005.
- PETERSEN, K. K.; HAGBERG, P.; KRISTIANSEN, K. Colchicine and oryzalin mediated chromosome doubling in different genotypes of *Miscanthussinensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 73, p.137-146, 2003.
- PINHEIRO, F. S. V.; PINHEIRO, E.; CONCENÇÃO, H. E. O. In: III Seminário Nacional de Seringueira, 1980. Manaus. **Avaliação de clones poliplóides de seringueira (*Hevea* sp)**. 1980, p. 351-364.
- PIO, L. A. S. **Indução e identificação de poliploidia em bananeira (*Musa acuminata*, Colla)**. 2008. 72 f. Tese (Doutorado em Agronomia/ Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, 2008.
- POKE, F. S.; VAILLANCOURT, R. E.; POTTS, B. M.; REID, J. B. Genomic research in *Eucalyptus*. **Genetica**, v. 125, p. 79-101, 2005.
- POTTS, B. et al. Exploration of the *Eucalyptus globulus* gene pool. In: CONFERENCE *EUCALYPTUS IN A CHANGING WORLD*. Aveiro. Abstracts... Aveiro: **IUFRO**, 2004. p. 46-61, 2004.
- POTTS, B. M.; WILTSSHIRE, R. J. E. *Eucalyptus* genetics and genecology. In: WILLIAMS, J. E.; WOINARSKI, J. C. Z. (Eds.) *Eucalypt ecology: individuals to ecosystems*, **Cambridge University Press**, cap. 2, p.56-91, 1997.
- POVEDANO, L.; HENRIQUE, F.H.; TULMANN NETO, A.; LATADO, R.R. Obtenção de plantas tetraploides de citros visando a produção de frutos triploides sem sementes. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v.33, n.2, p.65-74, 2012.
- PREDIERI, S. Mutation induction and tissue culture in improving fruits. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v.64, p. 185–210, 2001.
- ROCHA, M. P.; TRUGILHO, P. F. Qualidade de madeira serrada de *Eucalyptus dunnii* em função do método de desdobro e condição de umidade. **Cerne**, Lavras, v. 12, n. 4, p. 314-321, out./dez. 2006
- ROY, A.T.; LEGGETT, G.; KOUTOULIS, A. In vitro tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploid in hop (*Humulus lupulus* L.). **Plant Cell Reports** v. 20, p. 489–495, 2001a.
- ROY, A.T.; LEGGETT, G.; KOUTOULIS, A. Development of a shoot multiplication system for hop (*Humulus lupulus* L.). **In Vitro Cell. Dev. Biol.**: Plant, v.37, p.79–83, 2001b.

SAKAI, W.S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue o. **Stain Technology**, Baltimore, v.48, p.247-249, 1973.

SANFORD, J.C.; MOORE, J. N.; JANICK, J. Ploidy manipulations. Methods in fruit breeding. **Purdue University Press**, West Lafayette, p. 100–123, 1983.

SAUCO, V. G.; MARTIN, M. J. G.; GALVÁN, D. F. et al. Ocurrência de espontâneos tetraploides nucelares de plantas de manga. **Hort science**, Alexandria, v.36, p. 755-757, 2001.

SALON, P. R.; EARLE, E. D. Chromosome doubling and mode of reproduction of induced tetraploides of eastern gama grass (*Tripsacum dactyloides* L.). **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 17, p. 881-885, 1998.

SCHIFINO-WITTMANN, M.T. Determinação da quantidade de DNA nuclear em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n.5, p. 897-902, 2001.

SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES FLORESTAIS (SIF). Disponível em: <<http://www.florestal.gov.br/snif/producao-florestal/cadeia-produtiva>>. Acesso em 06 de ago. 2016.

SUGIYAMA, S. Polyploidy and Cellular Mechanisms Changing Leaf Size: Comparison of Diploid and Autotetraploid Populations in Two Species of Lolium. Faculty of Agriculture and Life Science, Hirosaki University, **Annals of Botany**, v. 96 (5), p. 931-938, 2005.

TATE, J. A.; SOLTIS, P. S.; SOLTIS D. E. The evolution of the Genome, Polyploidy in Plants, **Academic**, New York, 43, 2004.

TURNBULL, J. W. *Eucalyptus* plantations. **New Forests**, New York, v.17, n.1, p.37-52, 1999.

VALE, F.X.R.; FERNANDES FILHO, E.I.; LIBERATO, J.R. QUANT. A software plant disease severity assessment. In: **International Congress of Plant Pathology**, v.8, p.105, 2003.

VAN DUREN, M.; MORPURGO, R.; DOLEZEL, J. et al. Induction and verification of autotetraploides in diploid banana (*Musa acuminata*) by in vitro techniques. **Euphytica**, Netherlands, v. 88, p. 25-34, 1996.

VICHIATO, M. R. M.; VICHIATO, M.; DUTRA, L. F.; PASQUAL, M.; MARCHIORI, W.; LIMA, C. D. F.; SALGADO, C. C. Análise estomática e morfométrica de folhas de plantas diplóides e tetraplóides de *Dendrobium nobile* LINDL. Revista Ceres, v.53(310): 541-548, p. 647- 644, 2006.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R.L.S. Silvicultura Clonal: Princípios e Técnicas. **Ed.UFV**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, p.13-23, 2013.

WILCKEN, C.F; LIMA, A.C.V; DIAS, T.K.R; MASSON, M.V; Filho, P.J.F; POGETTO, M.H.F.A.D. **Guia prático de manejo de plantações de eucaliptos**. FEPAF, Botucatu, 2008.

WILLIAMS, J.E.; WOINARSKI, J.C.Z.; Eucalyptus Ecology: Individual to ecosystems. Ed. Jann E. Willimas. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 1997.

WITTMANN, M. T. S.; DALL'AGNOL, M. Indução de poliploidia no melhoramento de plantas. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v.9, n. 1-2, p. 155-164, 2003.

ZELDIN, E.L.; MCCOWN, B.H. Polyploid breeding and the potential of its use for transgene containment with American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*). **Acta Hort** v.663, p. 838–840, 2004.