

OBSERVAÇÕES CITOLÓGICAS EM CITRUS

VI. RESULTADOS PRELIMINARES DO EFEITO DA COLCHICINA SÔBRE SEMENTES EM GERMINAÇÃO.

Oswaldo Bacchi

INTRODUÇÃO

À obtenção de frutos sem sementes constitue uma das importantes finalidades de um programa de melhoramento das plantas cítricas.

Por essa razão, dada a geral esterilidade dos poliplóides, especial atenção tem sido dedicada ao estudo de tetraplóides e, principalmente, triplóides, obtidos ocasionalmente pela hibridação entre tetraplóides e diplóides ou, mesmo, entre diplóides normais (6, 7, 11).

A maior parte dos tetraplóides e triplóides até agora estudados, se bem que produzam frutos com reduzido número de sementes, apresentam, por outro lado, a desvantagem de um crescimento mais lento, um porte menor e menos erecto, além de uma frutificação menos abundante que os correspondentes diplóides. Os seus frutos são de casca mais grossa, com as glândulas de óleo mais proeminentes e de estrutura interna mais fibrosa, alcançando, por isso, pouco valor comercial.

Entretanto, apesar dos resultados pouco satisfatórios acima mencionados, a possibilidade econômica dos poliplóides, em *Citrus*, foi recentemente demonstrada (1, 9) pela constatação da triploidia natural nas variedades comerciais desprovidas de sementes, "Tahiti lime" e "Bearss seedless lime", da espécie *C. aurantifolia* Swingle. Somos de opinião, portanto, que esta constatação deve constituir, a despeito da condição triplóide nestas duas variedades não ser considerada como a causa da sua esterilidade (9), um motivo de estímulo para a intensificação das pesquisas neste sentido.

Iniciando as nossas investigações a êste respeito, tentamos, desde logo, a obtenção de plantas poliplóides naturais, provenientes de sementes

híbridas ou autofecundadas, das nossas principais variedades. Num exame de, aproximadamente, 250 plantinhas (de embriões nucelares e sexuais), apenas conseguimos identificar um único tetraplóide ($2n=36$) e um pentaplóide ($2n=45$). O tetraplóide foi encontrado numa progênie autofecundada do pomelo Mac Carty diplóide (*C. paradisi* Macf.), e, o pentaplóide, num cruzamento entre as variedades diplóides Baianinha e Sabará (*C. sinensis* Osbeck).

À vista dos resultados favoráveis já obtidos com a colchicina em outras plantas, resolvemos também tentar a obtenção de plantas poliplóides pelo tratamento com êste alcalóide. Se bem que o uso da colchicina se tenha generalizado muito, não encontramos, na literatura, indicação alguma da sua aplicação em *Citrus*. Relatamos neste trabalho os métodos de tratamento, assim como as primeiras observações citológicas realizadas nas plantas obtidas.

MATERIAL E MÉTODOS

A experiência foi realizada com as variedades Pêra do Rio, Barão e Mexirica do Rio, as duas primeiras pertencentes à espécie *C. sinensis* Osbeck, e, a última, classificada como *C. reticulata* Blanco. As sementes, provenientes de polinização livre, foram lavadas e imediatamente postas a germinar em caixas de Petri (com exceção das sementes da Mexirica do Rio, que foram sêcas e guardadas por 5 dias). Três dias depois, os seus tegumentos foram retirados; esta operação, conforme foi previamente verificado, aumenta consideravelmente a percentagem de germinação das sementes em caixa de Petri e traz a vantagem de colocar os embriões em contacto direto com a colchicina.

Duas séries de tratamentos foram levadas a efeito: a primeira, 5 dias depois de colocadas as sementes a germinar, e, a segunda, 4 dias depois da realização do primeiro tratamento. Em ambas, 10 sementes de cada variedade foram imersas em água destilada (testemunha) ou em soluções de colchicina a 0,015, 0,05, 0,15 e 0,5% durante 1, 3 e 9 horas. O número de sementes foi, pois, de 450 para cada uma das duas séries de tratamento, ou seja um total de 300 por variedade.

Tôdas as contagens do número de cromosômios foram efetuadas em pontas de raízes, que foram fixadas em Craí (12) durante 24 horas e incluídas em parafina pelo método do álcool butílico. Os cortes foram coloridos pela hematoxilina férrica de Heidenhain.

Para a medição dos estomas, usamos o mesmo método empregado por Krug e Bacchi (10). Como era reduzido o número de fôlhas, em virtude do pequeno porte das plantas, que contavam nessa ocasião somente 10 meses de idade, fomos forçados a fazer esta determinação em 4 fôlhas apenas de cada planta. Utilizamo-nos, sempre que possível, das 4.^a, 5.^a, 6.^a e 7.^a fôlhas a partir da base da planta. O material foi fixado em "F-A-A" (formalina : 5cc ; ác. acético glacial : 5cc e álcool etílico a 70% : 90cc) e depois de 24 horas, transferido para álcool etílico a 70%. Em cada fôlha foram feitos 5 cortes tangenciais na epiderme inferior e em cada corte medimos 5 estomas nos sentidos longitudinal e transversal. O número total de estomas medidos foi, portanto, de 100 para cada planta. As secções foram montadas diretamente em água destilada e as medições efetuadas com um microscópio Zeiss, usando-se uma ocular micrométrica 7 x e uma objetiva de imersão 100x.

Para o cálculo da área dos estomas, multiplicamos o produto comprimento x largura, expresso em divisões da ocular, por 2,1792, que é o produto dos fatores 0,785 (admitindo-se a forma elíptica dos estomas) e 2,776, que corresponde, em micra², ao quadrado do valor de cada uma das divisões da ocular (1,666²). Fizemos a determinação da área média para cada uma das 4 fôlhas e calculamos depois, por meio destas médias parciais, a média geral para cada planta.

OBSERVAÇÕES REALIZADAS E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Das 900 sementes tratadas, obtivemos um total de 743 plantinhas. Este número foi relativamente baixo, em virtude da não germinação de muitas sementes, especialmente da variedade Mexirica do Rio, cujas sementes foram bastante prejudicadas com a secagem e demora de sementeira a que acima aludimos. Aparentemente, não houve influência alguma dos tratamentos sobre a germinação das sementes.

Um grande número de plantas apresentava, quando ainda em germinação, o engrossamento característico da radícula e da gêmula, mostrando os primeiros sinais da ação da colchicina.

A fim de se evitar um demorado e inútil exame citológico de tôdas as plantas obtidas, fizemos, baseando-nos nos caracteres morfológicos, duas seleções das plantas, eliminando tôdas as que se apresentavam com o aspecto inteiramente normal. A primeira dessas eliminações foi reali-

zada quando as plantinhas contavam três meses de idade e, a segunda, quatro meses mais tarde. Esta operação, dada a falta de segurança na identificação dos poliplóides em *Citrus* (7), foi efetuada com o máximo cuidado, conservando-se tôdas as plantas que apresentassem o menor indício de modificação morfológica.

Foram conservadas, dêste modo, apenas 44 plantinhas, numeradas de C.1 a C.44, cujas raízes foram utilizadas para a determinação do número de cromosômios.

Número de cromosômios. — A contagem do número de cromosômios nos revelou que apenas quatro destas plantas apresentaram modificações cromosômicas em suas raízes; encontramos em tôdas as demais somente raízes diplóides normais ($2n = 18$).

Nas plantas C.3, C.9 e C.15 (figs. 1b, 3b e 4a) foram encontradas raízes inteiramente diplóides ($2n = 18$) e raízes cujas células eram tôdas tetraplóides ($2n = 36$). A C.12 (figs. 2b e 3a) nos forneceu o resultado menos esperado, pois constatamos 19 (e 20?) cromosômios somáticos, além de uma célula, em uma das raízes examinadas, com $2n = 38$ aproximadamente.

Em vista dêstes resultados, que demonstraram ser aparentemente normal a constituição citológica da grande maioria das plantas, mantivemos, para as posteriores observações sôbre a área dos estomas, apenas 19 plantas das 44 examinadas. Entre estas 19 plantas foram incluídas as quatro que sofreram alterações (C.3, C.9, C.12 e C.15), as irmãs gêmeas de três delas (C.2, C.11 e C.16) (figs. 1a, 2a. e 4b) e mais 12, com o número normal de cromosômios. Apresentamos no quadro I, juntamente com a indicação da variedade e outras observações, os resultados do exame citológico realizado nestas plantas. Com relação às soluções de colchicina e aos tempos de exposição que empregamos, não é possível chegar a qualquer conclusão, em vista do número muito reduzido de alterações produzidas. Cumpre notar, entretanto, que as quatro plantinhas alteradas se originaram de quatro tratamentos diferentes, tanto com relação à concentração das soluções, como ao tempo de imersão, conforme se verifica pelo referido quadro.

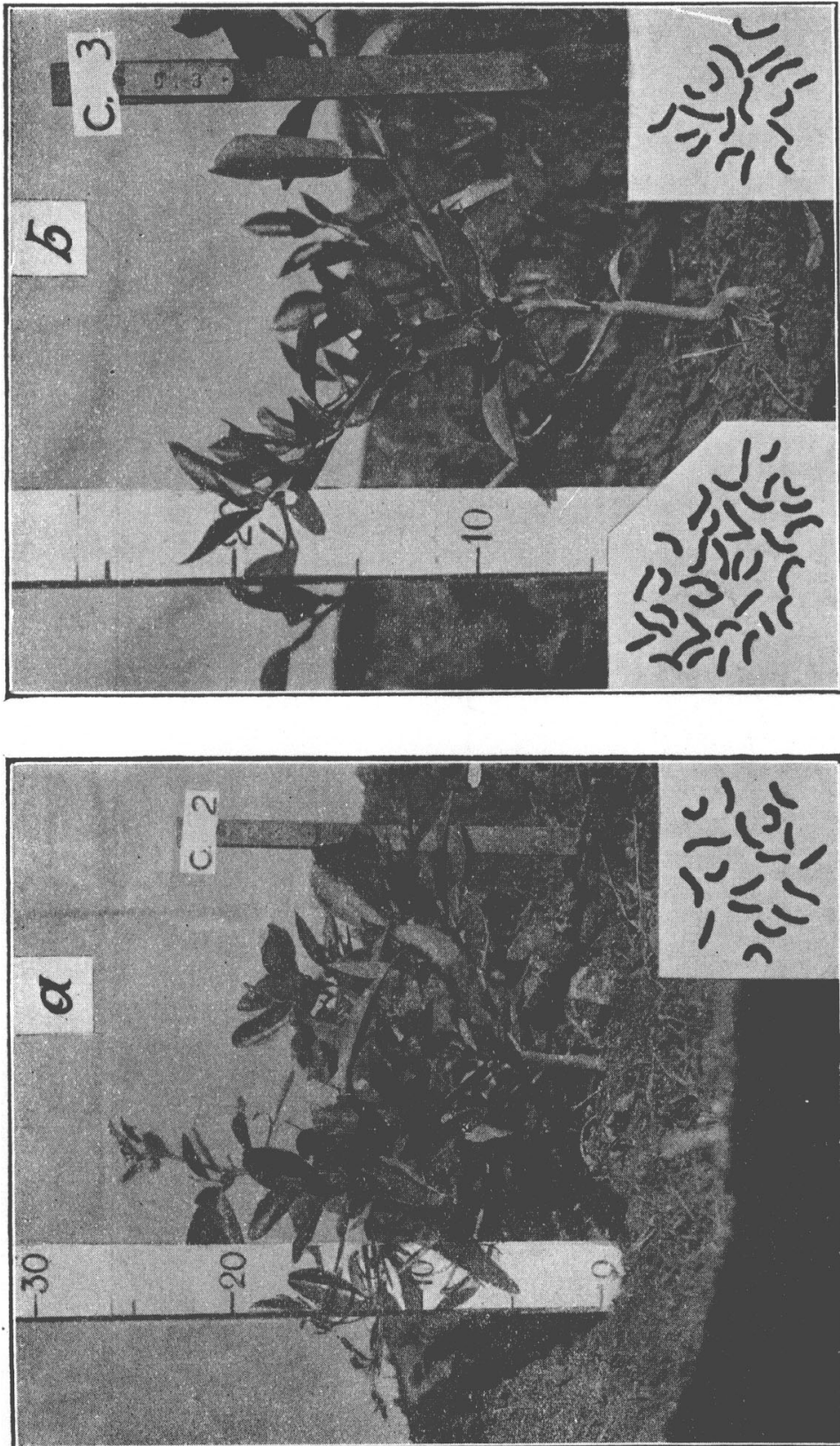


Fig. 1 — Plantas gêmeas da variedade Barão :

- a — C. 2 com raízes diplóides e estoma médio = 220,01 micra². (cromosômios x 2.800).
 b — C. 3 com raízes di... e tetraplóides e estoma médio = 299,49 micra². (cromosômios x 2.800).

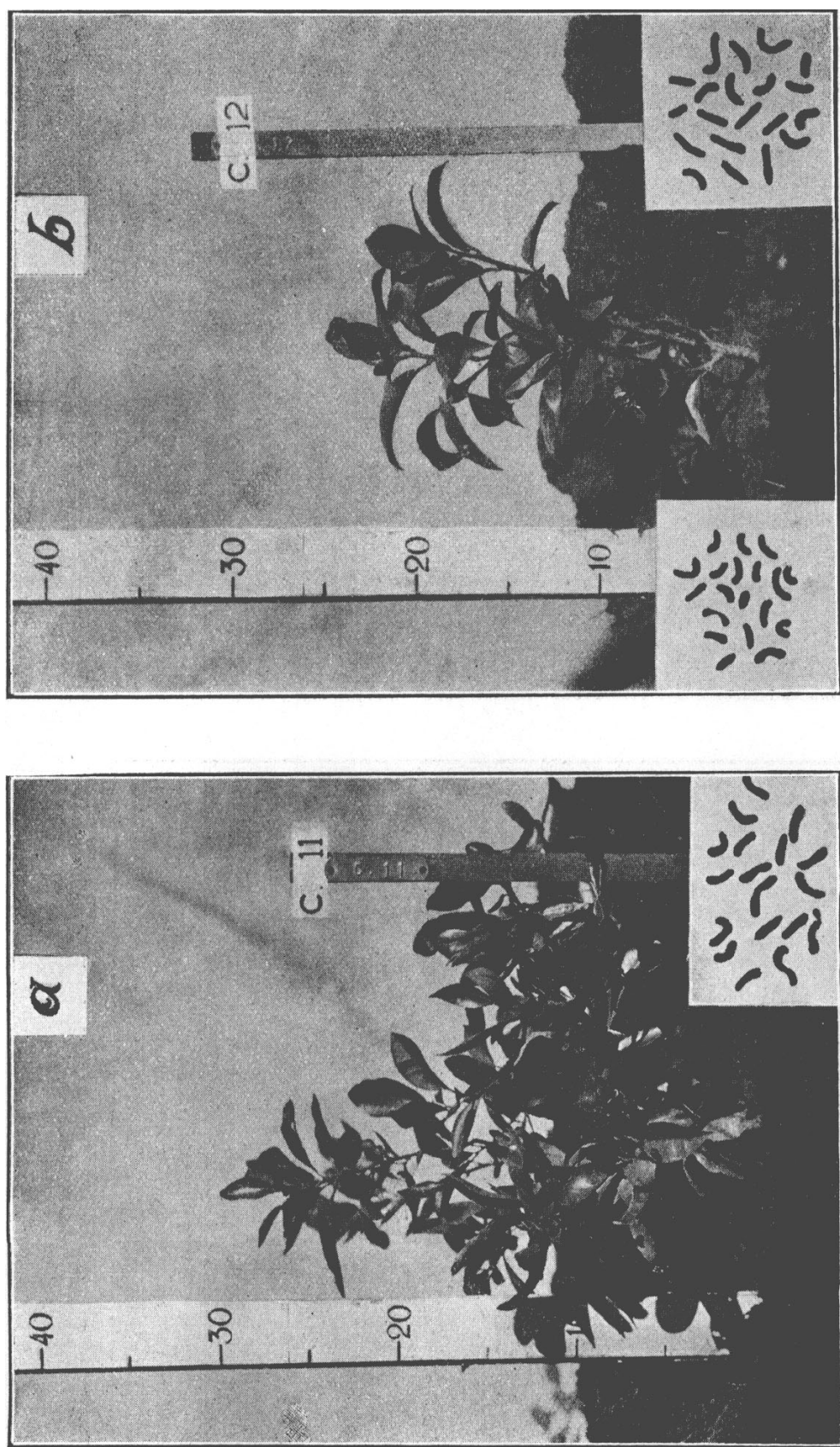


Fig. 2 — Plantas gêmeas da variedade Péra do Rio :

a — C. 11 com raízes diplóides e estoma médio = 209,75 micra². (cromosômios x 2.800).

b — C. 12 com raízes hiperdiploides (2n = 19 e 20 ?) e estoma médio = 208,11 micra². (cromosômios x 2.800).

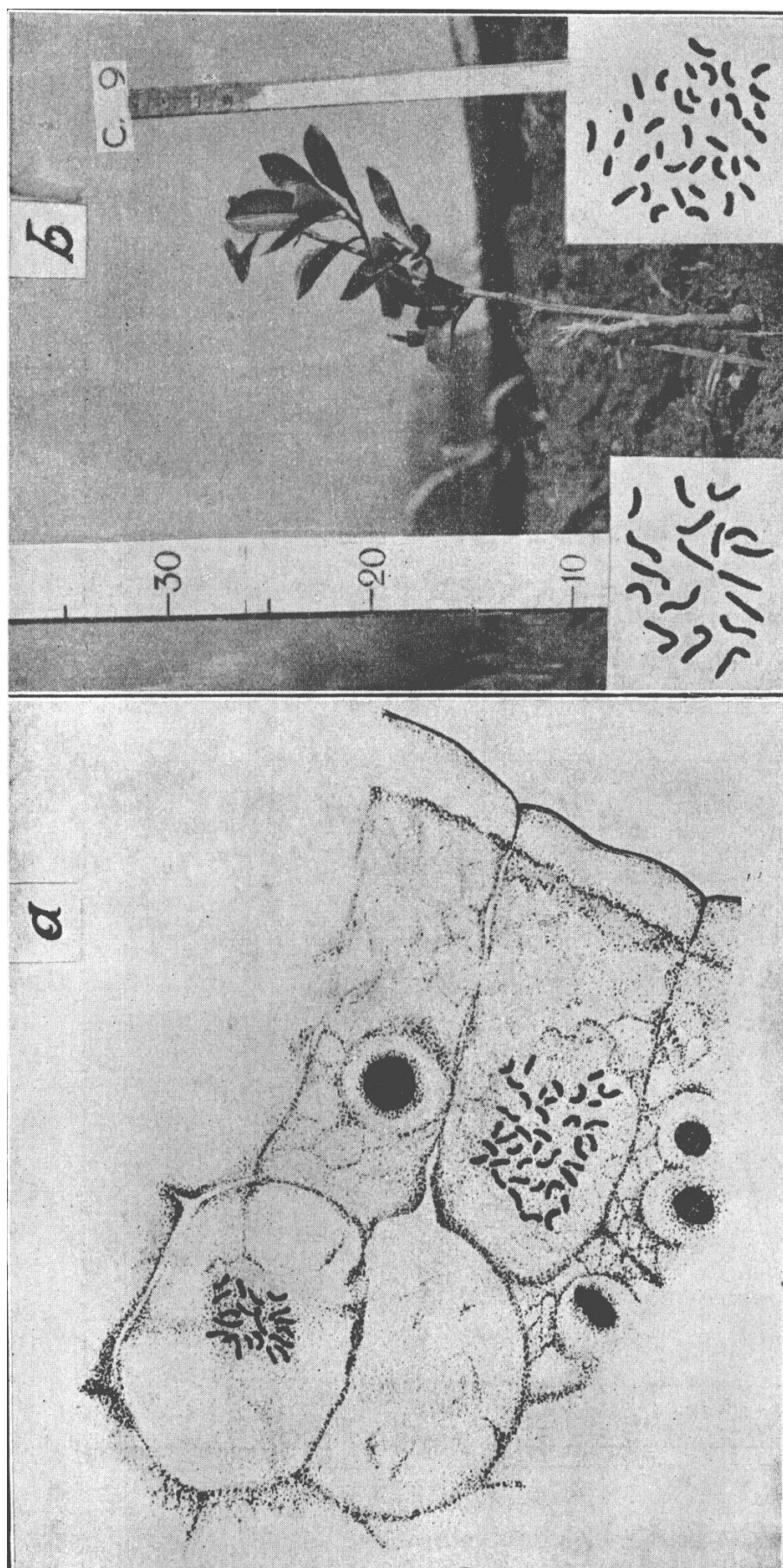


Fig. 3 — a — Quimera observada em uma das raízes da planta **C. 12** ($2n = 20$ e $2n = 38$ aproximadamente). (x 2.100).
 b — Planta **C. 9** da variedade Pêra do Rio com raízes di- e tetraplóides e estoma médio = 324,68 micra². (cromossomos x 2.800).

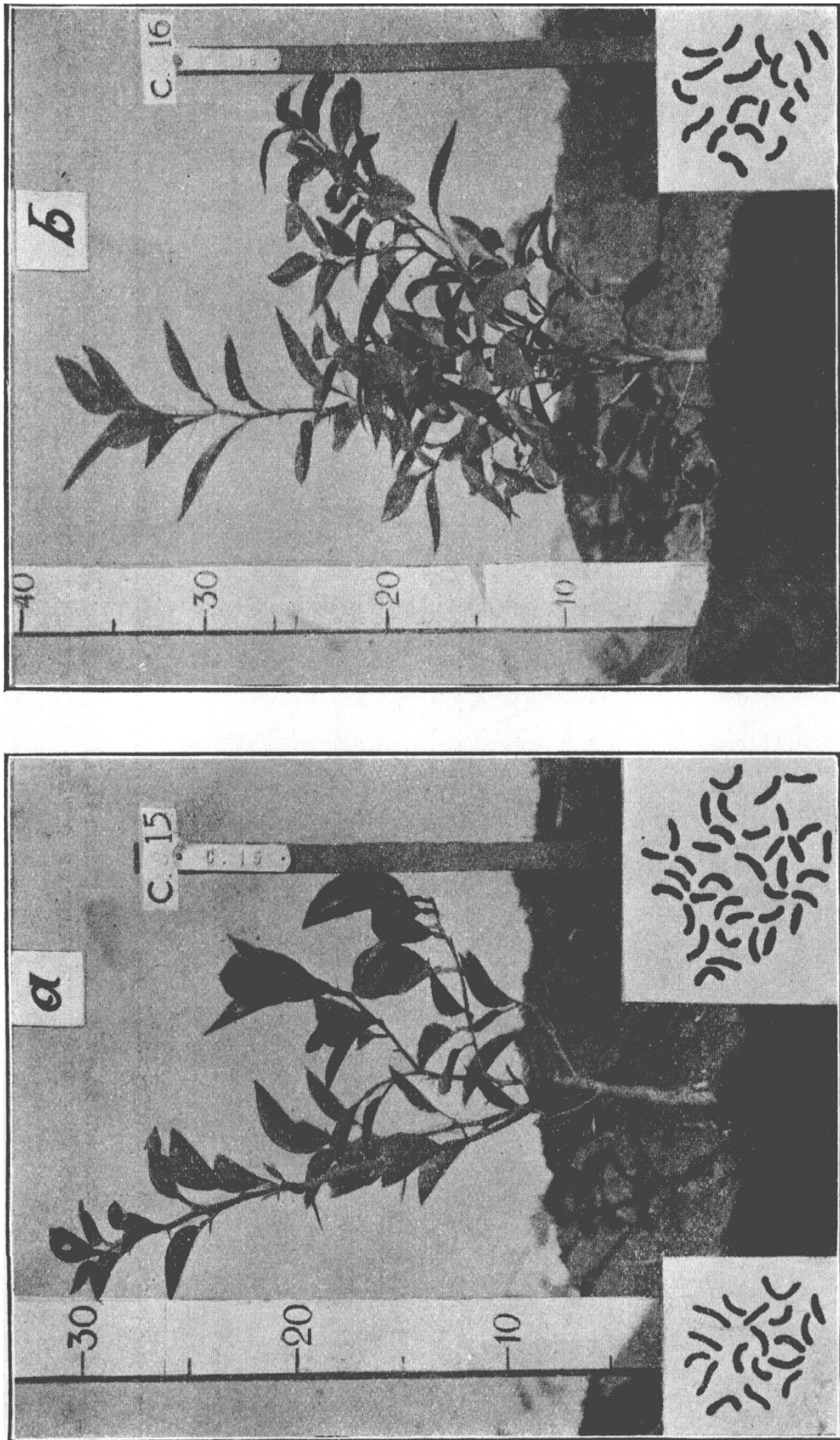


Fig. 4 — Plantas gêmeas da variedade Pera do Rio:

- a --- C. 15 com raízes di- e tetraplóides e estoma médio = 318,92 micra². (cromossômios x 2.800).
 b --- C. 16 com raízes diplóides e estoma médio = 204,08 micra². (cromossômios x 2.800).

QUADRO I
RESULTADOS OBTIDOS COM O EXAME CITOLÓGICO

N.º da planta	VARIETADE	Concentração da solução usada	Tempo de imersão (horas)	Série de tratamentos	N.º de cromossômios (2n)	OBSERVAÇÕES
C. 1	Barão	0,5	1	2ª	18	
C. 2	"	0,015	9	2ª	18	Gêmea da C. 3
C. 3	"	0,015	9	2ª	18 e 36	Gêmea da C. 2
C. 4	"	0,15	9	2ª	18	Gêmea da C. 5
C. 5	"	0,15	9	2ª	18	Gêmea da C. 4
C. 6	Mexirica do Rio	0,05	9	1ª	18	
C. 7	"	0,015	9	2ª	18	Gêmea da C. 8
C. 8	"	0,015	9	2ª	18	Gêmea da C. 7
C. 9	Pêra do Rio	0,5	1	1ª	18 e 36	
C. 10	"	0,5	1	1ª	18	
C. 11	"	0,15	3	1ª	18	Gêmea da C. 12
C. 12	"	0,15	3	1ª	19 (e 20?)	Gêmea da C. 11
C. 13	"	0,15	9	2ª	18	
C. 15	"	0,05	9	2ª	18 e 36	Gêmea da C. 16
C. 16	"	0,05	9	2ª	18	Gêmea da C. 15
C. 17	"	0,05	3	1ª	18	
C. 18	"	0,05	9	1ª	18	
C. 19	"	0,05	3	1ª	18	
C. 20	"	0,05	1	2ª	18	

Área dos estomas. — Realizamos uma determinação da área dos estomas nas plantas mais interessantes, pois que êste estudo, se bem que não represente um método seguro na determinação da poliploidia, nos dá uma idéia da constituição citológica, pelo menos da epiderme. Os resultados por nós apresentados (quadro II) estão sujeitos, como se sabe, às possíveis ocorrências de quimeras, tais como as já verificadas em *Citrus* (8), *Datura* (2, 3, 13, 14), *Prunus* (4), *Rubus* (5) e muitas outras.

Para uma melhor interpretação dos resultados, realizamos a análise da variance para cada indivíduo, verificando, pela determinação do valor "s", se as médias eram ou não representativas. Em 8 plantas, das 15 examinadas, o êrro "dentro" foi maior do que "entre" as fôlhas examinadas; em 6 casos o valor de "s" foi encontrado como sendo um pouco superior ao da tabela, sendo 3 dos casos para P=50% e 3 para P=10%. Esta variabilidade, assim como as que constatamos nas demais análises estatísticas realizadas, parece-nos razoável, em vista da influência de certos fatores, tais como a pequena idade das plantas e a posição, tamanho e número reduzido de fôlhas usadas nas medições.

QUADRO II

ÁREA MÉDIA DOS ESTOMAS

N.º da planta	VARIEDADE	N.º de cromosômios (2n)	Tamanho médio dos estomas em micra ²	OBSERVAÇÕES
C.9	Pêra do Rio	18 e 36	324,68 ± 2,97	
C.15	"	18 e 36	318,92 ± 2,95	Gêmea da C. 16
C.3	Barão	18 e 36	299,49 ± 2,95	Gêmea da C. 2
C.17	Pêra do Rio	18	244,78 ± 2,42	
C.13	"	18	237,83 ± 2,81	
C.4	Barão	18	231,99 ± 2,39	Gêmea da C. 3
C.2	"	18	220,01 ± 2,70	Gêmea da C. 3
C.18	Pêra do Rio	18	218,20 ± 2,70	
C.7	Mexirica do Rio	18	213,48 ± 2,22	
C.1	Barão	18	212,36 ± 2,95	
C.5	"	18	212,06 ± 2,28	Gêmea da C. 4
C.11	Pêra do Rio	18	209,75 ± 2,03	Gêmea da C. 12
C.12	"	19 (e 20?)	208,11 ± 2,08	Gêmea da C. 11
C.16	"	18	204,08 ± 2,08	Gêmea da C. 15
C.10	"	18	201,13 ± 2,17	

Média geral do 1.º grupo (plantas C.3, C.9 e C.15): 314,36 ± 4,29

Média geral do 2.º grupo (as restantes plantas) : 217,81 ± 1,97

As contagens de cromosômios anteriormente feitas estão de acôrdo com êstes resultados, e assim pudemos separar as plantas em dois grupos distintos quanto ao tamanho dos estomas. No primeiro grupo, com uma média geral igual a 314,36 micra², estão incluídas as 3 plantas com raízes diplóides e tetraplóides (C.3, C.9 e C.15) e, no segundo, acham-se reunidas as restantes plantas diplóides, além da hiperdiplóide (C.12) com uma média geral igual a 217,81 micra².

Examinando-se a variabilidade **dentro** de cada um dêstes dois grupos, verificamos que, práticamente, não foi significativa para o primeiro grupo e significativa para o segundo.

1.º grupo $\sigma = 2,52$

Valores máximos da tabela : P = 50% — 2,1
= 10% — 2,8

2.º grupo $\sigma = 7,39$

Valores máximos da tabela : P = 50% — 1,4
= 10% — 1,7

Entretanto, a despeito desta variabilidade, que em grande parte atribuímos às causas acima mencionadas, as diferenças entre os dois grupos de plantas são estatisticamente significantes:

- 1) Comparação entre as médias gerais dos dois grupos de plantas:

Diferença (micra ²)	t
96,55.....	20,45(*)

- 2) Comparação entre as plantas **C.3** e **C.17** (respectivamente, com a **menor** média do primeiro grupo e a **maior** do segundo):

Diferença (micra ²)	t
54,71.....	14,32(*)

Utilizando-nos das diversas plantas gêmeas que possuímos (quadro II), realizamos também os seguintes "t-tests", cujos resultados nos proporcionam interessantes comparações.

- 1) Plantas gêmeas **C.2** (2n = 18) e **C.3** (2n = 18 e 36):

Diferença (micra ²)	t
79,48.....	19,87(*)

- 2) Plantas gêmeas **C.15** (2n = 18 e 36) e **C.16** (2n = 18):

Diferença (micra ²)	t
114,84.....	31,81(*)

- 3) Plantas gêmeas **C.11** (2n = 18) e **C.12** (2n = 19 e 20?):

Diferença (micra ²)	t
1,64.....	0,56(*)

- 4) Plantas gêmeas **C.4** e **C.5** (ambas com 2n = 18):

Diferença (micra ²)	t
19,93.....	6,04(*)

Sendo significantes, as diferenças entre as plantas gêmeas C.2 — C.3 e C.15 — C.16 mostram-nos, claramente, como vemos, a natureza poliplóide da epiderme nas plantas C.3 e C.15. A planta C.9, que constitui a outra componente do primeiro grupo, não foi incluída nas comparações acima, por não ter gêmea; parece-nos, entretanto, evidente a sua condição poliplóide, se levarmos em conta a sua média (324,68

(*) Valores máximos de "t" na tabela: P = 5% — 2,58
 = 2% — 2,33
 = 1% — 1,96

micra²), que é superior às constatadas nas outras duas plantas deste grupo (318,92 e 299,49 micra²).

Com relação à planta hiperdiplóide C.12, apenas podemos concluir que a alteração cromosômica constatada nas raízes não deu origem a qualquer modificação no tamanho dos seus estomas. É possível, no entanto, que encontremos nos tecidos de sua parte aérea idênticas alterações cromosômicas.

A diferença entre as plantas C.4 e C.5, ao contrário do que era de se esperar, é estatisticamente significativa. Todavia, em vista do desenvolvimento desigual destas duas plantas e da influência dos fatores já considerados na apreciação das médias individuais, parece-nos mais razoável, apesar da significância estatística desta diferença, que consideremos as epidermes destas duas plantas, como diplóides normais. A confirmação ou não desta nossa conclusão será feita logo que obtivermos novo material em melhores condições.

SUMÁRIO

Salientamos, em linhas gerais, as possibilidades econômicas da triplicidia em *Citrus*. Citamos a constatação de um tetraplóide ($2n=36$) e de um pentaplóide ($2n=45$), que constituem os únicos poliplóides naturais por nós observados.

Apresentamos, a seguir, as observações preliminares sobre uma experiência de tratamento de sementes com a colchicina, para a obtenção de plantas poliplóides. Nos tratamentos efetuados não notamos qualquer influência da mesma sobre a percentagem de germinação.

As contagens do número de cromossomos em pontas de raízes e as medições das áreas dos estomas nas folhas nos revelaram os seguintes resultados :

1) Das plantas examinadas, três (C.3, C.9 e C.15) têm raízes ditetraplóides, e apresentam, a julgar pela área dos seus estomas, epiderme tetraplóide.

2) Uma outra planta, a C.12, além de hiperdiplóide, com $2n=19$ (e $20?$), apresentou uma raiz de natureza quimérica, pois em uma de suas células contamos, aproximadamente, 38 cromossomos somáticos ; a despeito dessa alteração cromosômica, não verificamos, nesta planta, qualquer modificação no tamanho dos seus estomas.

SUMMARY

Attention is drawn to the economic importance of triploidy in *Citrus*. During his investigations, the author only found one tetraploid ($2n=36$) and one pentaploid ($2n=45$) as natural polyploids in *Citrus*.

Preliminary results are then presented of an experiment to produce polyploids through the treatment of seeds with colchicine. Germination was not influenced by these treatments.

Chromosome counts in root tips and the measurement of stomata area gave the following results :

1) Three of the examined plants (C.3, C.9 and C.15) had diploid and tetraploid roots and a tetraploid epidermis, to judge from its stomata area.

2) Another plant, C.12, besides being an hyperdiploid ($2n=19$ and $20?$), had one root which was a chimera, as in one of its cells approximated 38 chromosomes were counted; in spite of this chromosomal alteration, the epidermis of its leaves were of normal size, as in diploids.

LITERATURA CITADA

1. **Bacchi, Osvaldo.** Observações citológicas em *Citrus*. I. Número de cromosômios de algumas espécies e variedades. *Jor. Agronomia* **3** : 249-258. 1940.
2. **Blakeslee, A. F.** Effects of induced polyploidy in plants. *Amer. Nat.* **75** : 117-135. 1941.
3. **Blakeslee, A. F., A. D. Bergner, S. Satina e E. W. Sinnott.** Induction of periclinal chimeras in *Datura stramonium* by colchicine treatment. *Science* **89** : 402. 1939.
4. **Dermen, Haig.** Periclinal and total polyploidy in peaches induced by colchicine. *Genetics* **26** : 147. (An abstract). 1941.
5. **Dermen, Haig e Henry F. Bain.** Periclinal and total polyploidy in cranberries induced by colchicine. *Genetics* **26** : 147-148. (An abstract). 1941.
6. **Frost, H. B.** Tetraploidy in *Citrus*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **11** : 535-537. 1925.
7. **Frost, H. B.** The genetics and cytology of *Citrus*. *Current Sci.* Special number on *Genetics*. pp. 24-27. 1938.
8. **Frost, H. B. e C. A. Krug.** Diploid-tetraploid periclinal chimeras as bud variants in *Citrus*. *Genetics* **27** : 619-634. 1942.
9. **Krug, C. A. e O. Bacchi.** Triploid *Citrus* varieties. (Cytological observations in *Citrus*. II.) *Jour. Heredity* **34** : 277-283. 1943.
10. **Krug, C. A. e O. Bacchi.** Observações citológicas em *Citrus*. V. Poliploidia em relação à densidade e ao tamanho dos estomas em *Citrus* e outros gêneros das *Aurantioideae*. *Bragantia* **4** : 429-448. 1944.
11. **Lapin, W. K.** Investigations on polyploidy in *Citrus*. *Wks. All-Unions Sci. Res. Inst. Humid. Sub-Tropics* **1** : 3-68. 1937.
12. **Randolph, L. F.** A new fixing fluid and a revised schedule for the paraffin method in plant cytology. *Stain Tech.* **10** : 95-96. 1935.
13. **Satina, S. e A. F. Blakeslee.** Periclinal chimeras in *Datura stramonium* in relation to development of leaf and flower. *Amer. Jour. Bot.* **28** : 862-871. 1941.
14. **Satina, S., A. F. Blakeslee e A. G. Avery.** Demonstration of the three germ layers in the shoot apex of *Datura* by means of induced polyploidy in periclinal chimera. *Amer. Jour. Bot.* **27** : 895-905. 1940