

BRAGANTIA

Boletim Científico do Instituto Agrônomo do Estado de S. Paulo

Vol. 31

Campinas, setembro de 1972

N.º 23

POLIPLOIDIZAÇÃO EM BERINJELA (*SOLANUM MELONGENA* L.) – I. TRATAMENTO DE SEMENTES PELA COLQUICINA ⁽¹⁾

DIXIER M. MEDINA, *engenheira-agrônoma* ⁽²⁾, CATALINA R. LOPES LONGO, NEUSA DINIZ DA CRUZ, *biologistas* ⁽²⁾, Seção de Citologia, LUIZ E. AZZINI e J. A. USBERTI FILHO, *engenheiros-agrônomo*s, Seção de Genética, Instituto Agrônomo

SINOPSE

Com o objetivo de conseguir plantas poliplóides de berinjela, foram realizados em 1970 alguns tratamentos com colquicina em sementes do cultivar Santa Genebra. Três séries de tratamentos foram efetuadas, empregando-se soluções de diferentes concentrações, variando a duração do tratamento e também seu momento de aplicação, isto é, antes, durante e até a germinação.

O número de cromossomos nas raízes e o número de estomas do material tratado, quando comparados com o original diplóide, indicam que a completa poliploidização não foi conseguida. O máximo que se constatou até o estágio de desenvolvimento em que foram levadas as observações, foram plantas quiméricas, tanto na parte aérea como nas raízes, provenientes dos tratamentos de sementes em germinação e dos tratamentos mais fortes (0,4% e 0,6%) aplicados antes da germinação das sementes.

1 – INTRODUÇÃO

O presente trabalho foi realizado como uma das atribuições recebidas durante o curso de pós-graduação em Citogenética, na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ou seja, a obtenção de poliplóides pela colquicina.

Uma revisão completa da literatura é encontrada em Eigsti e Dustin (5), no qual os mais variados campos da utilização da col-

⁽¹⁾ Os autores agradecem ao Prof. Dr. Almiro Blumenschein, Diretor do Instituto de Genética, da E.S.A.L.Q., Piracicaba, a orientação e o estímulo dados, e ao eng.º agr.º Eduardo Abramides, Chefe da Seção de Técnica Experimental e Cálculo, do Instituto Agrônomo, as análises estatísticas feitas. Recebido para publicação em 14 de novembro de 1971.

⁽²⁾ Com bolsa de suplementação do CNPq.

quicina são focalizados. Verifica-se que num grande número de espécies, abrangendo diversos gêneros e famílias, a colquicina foi experimentada, desde quando sua ação sobre a mitose foi observada. A maneira de fazer o tratamento, a parte da planta a ser tratada e a concentração da solução variam de acordo com a planta e com o fim que se tem em vista, devendo ser estudadas em cada material.

Os resultados aqui apresentados referem-se somente às observações feitas em plantas jovens, desde sua germinação até que apresentassem de sete a dez folhas. Observações posteriores encontram-se num segundo artigo desta série.

2 — MATERIAL E MÉTODO

Tentou-se a obtenção de poliplóides em berinjela pela imersão das sementes em soluções de colquicina, levando em conta os resultados obtidos por Bandel em trabalho análogo (2), cuja análise dos estomas nas folhas cotiledonares indicou uma razoável eficiência dos tratamentos empregados.

Inicialmente foram experimentadas três concentrações de colquicina (0,05%, 0,1% e 0,8%), variando a duração do tratamento.

Tendo-se verificado que as concentrações mais fracas foram ineficazes, e letal a mais forte, novas tentativas foram feitas com outras concentrações, além do tratamento de sementes cuja germinação já se havia iniciado.

Foram utilizadas sementes do cultivar Santa Genebra, selecionado e mantido na Seção de Hortaliças de Frutos, Instituto Agrônomo, colhidas em 1968 e que apresentavam poder germinativo ao redor de 90%.

Antes de aplicar os tratamentos procurou-se determinar a curva de absorção de água, utilizando para isso várias amostras de 0,500 g de sementes do mesmo lote, as quais foram submersas em água. Pesagens foram feitas a diversos intervalos de tempo, com três repetições para cada amostra. A curva da figura 1 foi construída a partir das porcentagens de aumento de peso em relação ao peso inicial. Da observação dessa figura constata-se que a quantidade de água absorvida, grande nas primeiras horas, foi diminuindo aos poucos até que o peso das sementes ficasse mais ou menos estável, próximo às 20 horas. Esse tempo ficou estabelecido,

pois, como um mínimo a que deveriam ser expostas as sementes para garantir a completa absorção.

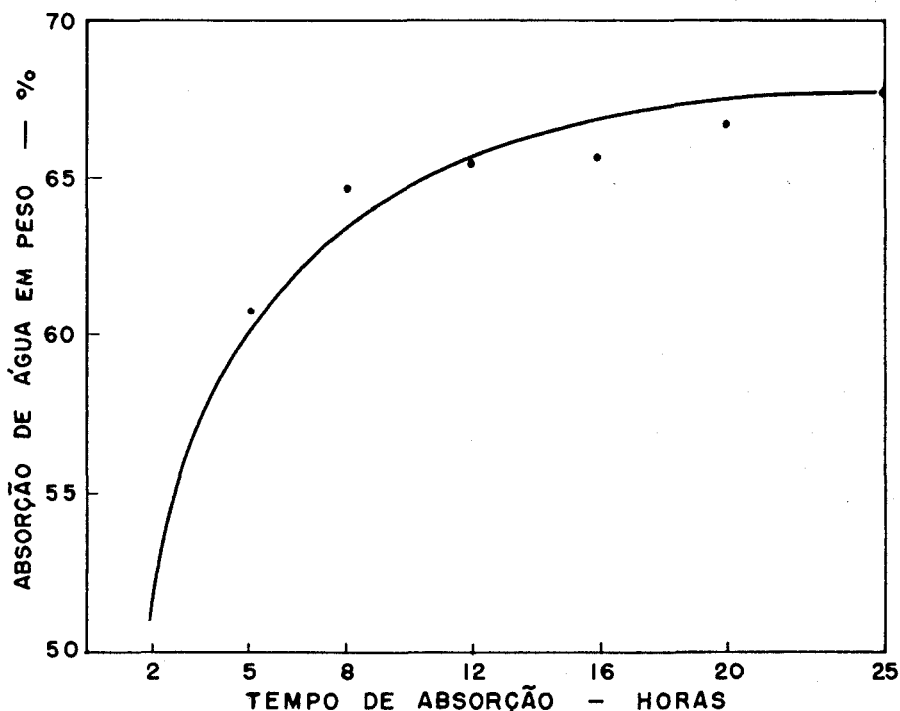


FIGURA 1. — Absorção de água por sementes de berinjela (*Solanum melongena* L.), cv. Santa Genebra.

Os tratamentos foram feitos em três séries: na primeira, soluções de colquicina a 0,05%, 0,1% e 0,8% foram empregadas durante 24, 36, 48 e 72 horas, tendo-se feito os respectivos controles de imersão em água (quadro 1). Em cada tratamento, as sementes permaneceram apenas 24 horas completamente imersas; em seguida foram semeadas em caixas de petri forradas com papel de filtro e molhadas com água ou com solução de colquicina até o final do tratamento, quando eram lavadas em água e semeadas em vasilhos de plástico com terra. Os vasilhos foram mantidos em casa de vegetação durante três meses aproximadamente.

A segunda série de tratamentos foi efetuada com soluções de colquicina a 0,2%, 0,4% e 0,6%, que correspondiam à faixa intermediária entre 0,1% e 0,8%. Nesta série, apenas três tempos foram empregados, 24, 48 e 72 horas, e somente um controle foi

feito, ou seja, o tratamento com água durante 72 horas (quadro 2). A imersão, a rega e o transplante das sementes foram executados como descrito anteriormente.

Foram também experimentados tratamentos de sementes em germinação. Devido à impossibilidade de levar adiante um número muito grande de experiências, apenas alguns itens foram executados (quadro 3). Utilizaram-se soluções de colquicina a 0,2%, 0,4% e 0,6% durante 24 horas (tratamentos 22, 26 e 30, respectivamente), como também a 0,1% durante 36 horas (tratamento 18); tentou-se, também, procurando um êxito maior na obtenção da poliploidia, tratar as sementes em duas etapas, isto é, após permanecerem 24 horas numa solução a 0,1% de colquicina, ficaram na água até à germinação, sendo em seguida tratadas novamente com colquicina a 0,1% durante 36 horas (tratamento 17).

Finalmente, em dois dos tratamentos (32 e 33), as sementes foram tratadas com solução de colquicina a 0,2% e 0,4%, respectivamente, e aí deixadas até à germinação.

Efetuaram-se contagens de estomas em plantinhas oriundas das três séries de tratamentos. Escolheu-se para comparação dos diferentes tratamentos a segunda folha, que, no estado de desenvolvimento das plantas, representava uma folha adulta, além de ser mais fácil de trabalhar devido à menor saliência de suas nervuras.

Para as contagens de estomas, porções de epiderme foram retiradas da página inferior das folhas e montadas numa gota de acetato de celulose dissolvido em ácido acético glacial (7). Isso leva a uma preparação semipermanente da epiderme, perfeitamente uniforme para focalização dos campos ao microscópio, com grande facilidade de manuseio. Os campos foram tomados ao acaso, fugindo-se das nervuras, e dez campos foram contados em cada película.

Inicialmente procurou-se verificar a variação do número de estomas da mesma folha. Escolheu-se para isso um dos tratamentos controle (tratamento 4), e as contagens foram feitas nas segundas folhas de cinco plantas e em três regiões da mesma folha: (a) base, (b) meio e (c) ápice. A análise da variância mostrou não haver diferença significativa entre as regiões da mesma folha, o que facilitou sobremaneira a coleta posterior de porções da epiderme, que nem sempre são conseguidas exatamente da mesma região.

Procurando uniformizar ainda mais o material, estabeleceu-se uma só região (b) para a coleta da película, isto é, aproximadamente o meio do limbo de um dos lados da nervura principal.

O número de cromossomos foi determinado apenas nos tratamentos 3, 8 e 12 da primeira série e em todos das demais séries. Em cada tratamento examinaram-se cinco plantas e um número variável de raízes.

Como método de coloração empregou-se o da orceína acética, o qual vem sendo utilizado com bastante sucesso para diferentes plantas, na Seção de Citologia (8). O tratamento com o paradi-clorobenzeno foi indispensável para aumentar o número de placas metafásicas e individualizar melhor os cromossomos para as contagens. Os melhores resultados foram conseguidos com 6,30 h até 7,30 h de pré-tratamento à temperatura de 16°C a 20°C. A fixação foi em álcool absoluto e ácido acético glacial (1:1); seguiram-se uma hidrólise em mistura de orceína a 2% em ácido acético a 70% e HCl N, na proporção de 9:1, por 1/2 hora a 30-40°C, e um esmagamento em orceína a 1% em ácido acético 45%. Sempre que possível, três a quatro pontas de raízes de uma mesma planta eram colocadas na mesma lâmina, bem separadas uma da outra, para o posterior esmagamento.

3 — RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 — PRIMEIRA SÉRIE DE TRATAMENTOS

Logo de início notou-se que a concentração mais forte (0,8%) foi letal, mesmo no menor tempo experimentado (quadro 1), impedindo completamente a germinação, enquanto nas outras duas concentrações ocorreram porcentagens de germinação bem altas. Assim que as platinhas cresceram e emitiram as primeiras folhas, ficou evidente a ausência de qualquer efeito no sentido de poliploidia.

Os tratamentos com soluções a 0,05% e 0,1% não produziram qualquer efeito visível, relacionado com a poliploidia. A germinação das sementes foi normal e o desenvolvimento das platinhas bastante uniforme. Não se observou diferença no tamanho dos internódios, nem no tamanho, na cor ou na textura das folhas.

3.2 — SEGUNDA SÉRIE DE TRATAMENTOS

Nos tratamentos feitos a seguir, com concentrações de 0,2%, 0,4% e 0,6% (quadro 2), notou-se certo engrossamento do hipocó-

QUADRO 1. — Resultados da primeira série de tratamentos de sementes de berinjela (antes da germinação) cv. Santa Genebra, com soluções de colquicina a diferentes concentrações

Tratamento		Sementes			Plantas sobrevi- ventes	Natureza das raízes		
Solução	Tempo	Tra- tadas	Germinadas	Diplóide 2n=24		Quimé- rica 2n=24 e 48	Tetra- plóide 2n=48	
	h	n.º	n.º	%	n.º			
ÁGUA DESTILADA								
1	24..	50..	43	86,0	41			
2	36..	49..	45	91,8	45			
3	48..	50..	45	90,0	44	+		
4	72..	50..	43	86,0	43	+		
COLQUICINA 0,05%								
5	24..	50..	43	86,0	40			
6	36..	48..	43	89,5	43			
7	48..	50..	47	94,0	47			
8	72..	50..	46	92,0	46			
COLQUICINA 0,1%								
9	24..	50..	47	94,0	45			
10	36..	45..	40	88,8	40			
11	48..	49..	44	89,7	43			
12	72..	50..	43	86,0	43	+		
COLQUICINA 0,8%								
13	24..	50..	0	0	0			
14	36..	50..	0	0	0			
15	48..	49..	0	0	0			
16	72..	50..	0	0	0			

QUADRO 2. — Resultados da segunda série de tratamentos de sementes de berinjela (antes da germinação) cv. Santa Genebra, com soluções de colquicina a diferentes concentrações

Tratamento		Sementes			Plantas sobrevi- ventes	Natureza das raízes		
Solução	Tem- po	Tra- ta- das	Germinadas			Diplóide 2n=24	Quimé- rica 2n=24 e 48	Tetra- plóide 2n=48
	h	n.º	n.º	%	n.º			
COLQUICINA 0,2%								
19	24..	50..	47	94	44	+		
20	48..	50..	46	92	41	+		
21	72..	50..	46	92	40	+		
COLQUICINA 0,4%								
23	24..	50..	45	90	41	+		
24	48..	50..	42	84	40	+	+	+
25	72..	50..	41	82	35	+	+	
COLQUICINA 0,6%								
27	24..	50..	48	96	47	+		+
28	48..	50..	46	92	38	+		+
29	72..	50..	46	92	46	+	+	
ÁGUA DESTILADA								
31	72..	50..	49	98	47			
COLQUICINA 0,2%								
32	(1)	50..	36	72	26	+		
COLQUICINA 0,4%								
33	(1)	50..	35	70	27	+		

(¹) Sementes sob ação da colquicina até o início da germinação.

tilo e algum atraso no desenvolvimento das plantas. Foi sensível o espessamento das folhas contiledonares, que ao mesmo tempo se mostravam mais estreitas. Deformações também foram notadas nas primeiras folhas, que se apresentavam assimétricas em relação à nervura principal, além de exibirem regiões irregulares, mais escuras, espalhadas por todo o limbo. Essas manchas coincidiam, em geral, com maior enrugamento das folhas nessas áreas.

QUADRO 3. — Resultados da terceira série de tratamentos de sementes de berinjela (em germinação) cv. Santa Genebra, com soluções de colquicina a diferentes concentrações

Tratamento		Sementes tratadas	Plantas sobreviventes	Natureza das raízes		
Solução	Tempo			Diplóide 2n=24	Quimérica 2n=24 e 48	Tetra-plóide 2n=48
	<i>h</i>	<i>n.º</i>	<i>n.º</i>			
COLQUICINA 0,1%						
17	36.....	48 (1)	45	+		+
18	36.....	49.....	42	+	+	+
COLQUICINA 0,2%						
22	24.....	40.....	49	+	+	+
COLQUICINA 0,4%						
26	24.....	100.....	60	+	+	+
COLQUICINA 0,6%						
30	24.....	100.....	27	+		

(1) Sementes que antes da germinação haviam sido tratadas com solução de colquicina a 0,1%, durante 24 horas.

3.3 — TERCEIRA SÉRIE DE TRATAMENTOS

Os mesmos aspectos descritos na segunda série foram observados nos tratamentos das sementes em germinação, com a diferença de serem mais pronunciados os efeitos referidos e num maior número de plantas (quadro 3).

3.4 — NÚMERO DE CROMOSSOMOS

O número de cromossomos observados nas raízes dá uma idéia aproximada do efeito dos diferentes tratamentos; a duplicação dos cromossomos foi constatada a partir dos tratamentos com solução a 0,4% durante 48 horas, pelo aparecimento de raízes quiméricas com células diplóides e tetraplóides e raízes inteiramente tetraplóides. Nos tratamentos de sementes em germinação, a poliploidização das raízes foi observada já nas doses mais fracas de colquicina, 0,1% e 0,2% (tratamentos 17, 18 e 22) (quadros 1, 2, 3).

Na estampa 1 são mostradas fotomicrografias de placas metafásicas diplóides e tetraplóides em raízes de alguns dos tratamentos.

3.5 — NÚMERO DE ESTOMAS

Quanto aos estomas, as contagens relativas ao controle e aos tratamentos da primeira série não dão diferenças significativas de um para o outro, indicando estarem as plantas no mesmo nível de ploidia, com exceção da planta 3 do tratamento 12, cuja média bem mais baixa pode significar uma quimera. Também não foi encontrada diferença entre os tratamentos da segunda série e o respectivo controle; neste caso, há uma variabilidade um pouco maior entre as folhas do mesmo tratamento, o que representa, por sua vez, variação entre as plantas. Isso aconteceu dentro dos tratamentos 21, 23 e 27 (quadro 4).

Muito maior variação foi encontrada nos tratamentos da terceira série, isto é, de sementes em germinação: a variação existe tanto de uma folha para outra como dentro da mesma folha, sugerindo uma constituição quimérica das plantas. Em algumas

QUADRO 4. — Resultados das contagens de estomas de cinco plantas tomadas ao acaso em cada uma das séries de tratamentos de sementes de berinjela cv. Santa Genebra com soluções de colquicina a diferentes concentrações

Tratamento	Número médio de estomas por campo ⁽¹⁾ em cinco plantas					Média
	I	II	III	IV	V	
1.ª SÉRIE						
4	10,5	8,9	10,7	10,2	9,6	9,98
5	10,7	10,3	9,9	9,5	11,1	10,30
6	9,8	9,4	10,1	8,8	9,7	9,56
7	9,1	9,6	7,5	10,7	9,2	9,22
8	11,8	8,9	8,5	9,2	9,5	9,58
9	10,0	7,9	9,3	8,2	8,4	8,76
10	9,3	9,1	9,3	9,0	8,9	9,12
11	7,8	9,8	7,7	9,0	8,7	8,60
12	8,3	8,3	6,8	9,4	9,7	8,50
2.ª SÉRIE						
19	7,8	8,6	7,9	7,7	7,5	7,90
20	7,7	8,2	8,6	9,0	8,7	8,44
21	6,8	8,5	6,9	8,7	8,0	7,78
23	8,0	9,7	6,8	8,1	6,6	7,84
24	7,5	7,3	7,9	8,4	6,9	7,60
25	6,3	7,5	7,5	6,7	7,3	7,06
27	6,5	7,1	7,5	8,6	8,5	7,64
28	8,3	8,2	7,3	7,4	8,4	7,92
29	7,0	7,9	7,9	7,6	7,9	7,66
31	8,5	8,1	8,9	8,2	7,9	8,32
3.ª SÉRIE						
17	6,7	6,6	6,2	5,7	2,4	5,52
18	8,2	5,7	8,3	3,7	4,1	6,00
22	8,0	7,9	7,7	9,8	5,4	7,76
26	4,3	4,3	3,3	3,9	4,0	3,96
30	5,2	8,9	9,7	4,5	5,3	6,72

⁽¹⁾ Cada planta foi representada pela região b da segunda folha, e 10 campos foram contados em cada película.

folhas houve redução à metade, ou até maior, no número de estomas por campo, em comparação com o controle, verificando-se também o aumento do seu tamanho; a correlação negativa entre tamanho e número dos estomas é evidenciada nas fotomicrografias da estampa 1, que representam áreas equivalentes das folhas.

O aspecto morfológico irregular mostrado por algumas das plantas provavelmente é consequência da diferença do número de cromossomos — 24 e 48 — em diferentes regiões das folhas. Os dados sobre a contagem de estomas refletem essa variação morfológica, e a observação dos cromossomos nas raízes comprova a existência de regiões duplicadas com $2n=48$ cromossomos, as quais não foram encontradas em qualquer dos tratamentos com água.

Dado às diversas concentrações e tempos empregados nos tratamentos, parece haver, no material utilizado, certa resistência à ação da colquicina. Houve mesmo uma fase no desenvolvimento inicial das plantas em que os sintomas de poliploidização se atenuaram consideravelmente, a ponto de se pensar numa reversão à condição original diplóide. Esse fenômeno se deu, provavelmente, pela competição entre tecidos diplóides formados a partir de células não alteradas e tecidos tetraplóides, de crescimento mais retardado. Ocorrências semelhantes são mesmo citadas em *Vicia* e *Allium*, quando meristemas de raízes foram tratados com colquicina (3, 6).

Essa resistência à ação da colquicina talvez esteja relacionada com o fato de o cultivar utilizado ser há muito tempo intensivamente cultivado e selecionado pelo homem. Essa hipótese se baseia no fato de que resultados bem diferentes, com elevada porcentagem de poliplóides, foram alcançados por Blumenschein (3), usando doses semelhantes de colquicina, mas aplicando-as à variedade "White Giant", considerada semi-selvagem. Uma outra hipótese seria que respostas diferentes à colquicina foram dadas pelas duas variedades de berinjela, como as relatadas para duas variedades de sorgo igualmente cultivadas (1); nessas experiências os autores não encontraram explicação para o fato de apenas uma delas ter-se poliploidizado.

Aliás, os efeitos da colquicina não se restringem apenas à

(3) BLUMENSCHHEIN, A. Comunicação pessoal.

duplicação do número de cromossomos. Em muitos outros casos, mutações gênicas são produzidas com alterações nas mais variadas características das plantas, combinadas ou não com alteração no número de cromossomos (1, 4).

4 – CONCLUSÕES

O efeito da colquicina depende, entre outros fatores, do estado de desenvolvimento da planta no momento de sua aplicação; assim, nos tratamentos de imersão de sementes antes da germinação, a concentração de 0,8% foi letal (quadro 1), enquanto nos tratamentos das sementes em germinação o efeito letal começou a se manifestar já na concentração de 0,6%, pela sobrevivência de um número bem menor de plantinhas (quadro 3 – tratamento 30). Quando a colquicina foi aplicada às sementes até à germinação, doses ainda mais fracas afetaram sensivelmente sua sobrevivência (quadro 2 – tratamentos 32 e 33).

Até ao estágio de desenvolvimento em que foram levadas as observações, embora não se tenha constatado completa poliploidização, plantas quiméricas foram obtidas com regiões diplóides e tetraplóides distribuídas ao acaso. O tratamento de sementes em germinação parece ser o que mais se aproximou do objetivo. Do que foi visto sobre os estomas, eles parecem ser um caráter bastante seguro na identificação da poliploidia na berinjela como o é para muitas plantas (5).

POLYPLODIZATION IN *SOLANUM MELONGENA* L.

I. SEED TREATMENTS WITH COLCHICINE

SUMMARY

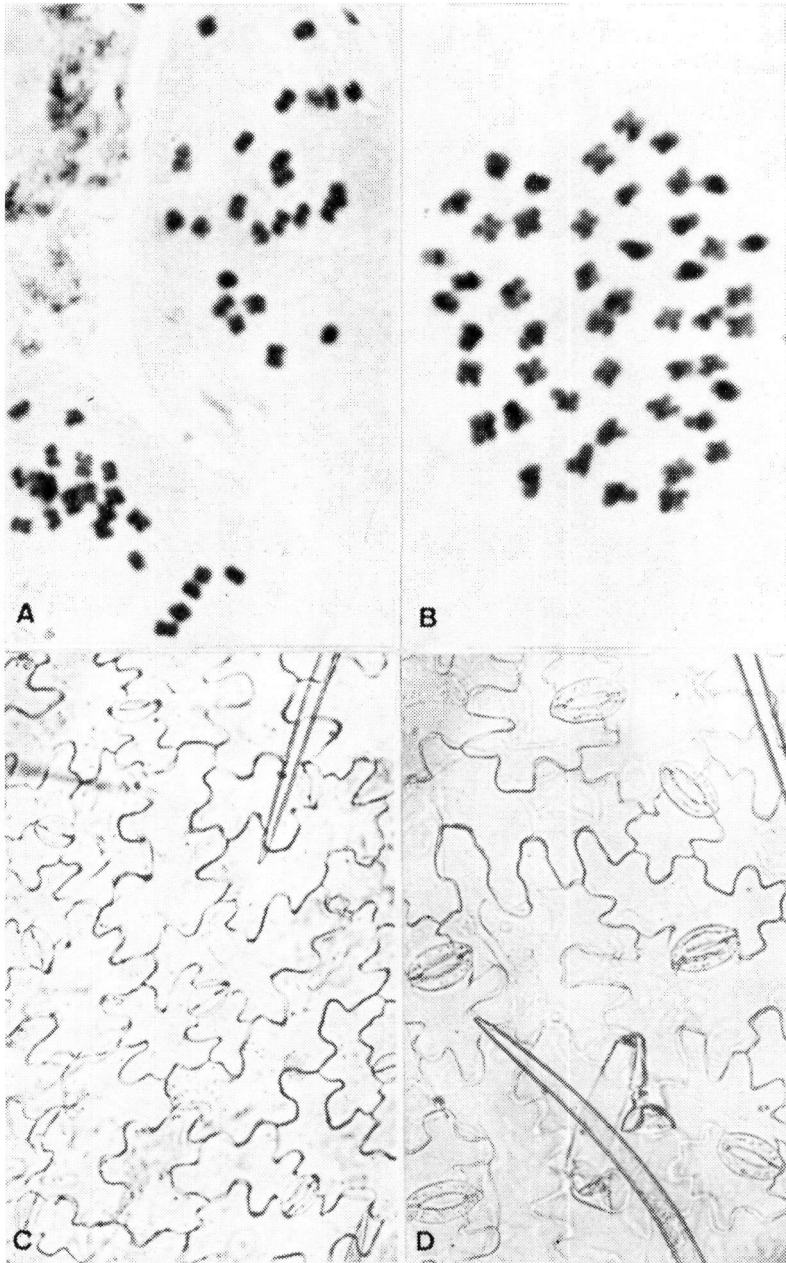
Polyploidization in egg-plant has been tried through colchicine treatments in seeds of the cultivar Santa Genebra from Instituto Agrônômico.

Several trials were made varying the strength of the solution, the duration of the treatment and the time of its application, that is, before, during, and after seed germination.

Chromosome numbers determined in roots as well as the number of stomata of treated material compared to those of original diploid one, indicate that complete polyploidization was not achieved. Instead, chimeric plants either in aerial part or in the roots were detected, that resulted from treatment of seeds in germination and from those stronger treatments (0.4 and 0.6%) applied before germination.

LITERATURA CITADA

1. ATKINSON, G. F.; ROSS, J. G. & FRANZKE, C. J. Differential reaction of two varieties of sorghum to colchicine treatment. *J. Hered.* 48:259-264, 1957.
2. BANDEL, G. Indução da poliploidia pela colchicina em tomateiro (*Lycopersicum solanum*) e berinjela (*Solanum melongena*). Relatório apresentado no Curso de Pós-graduação em Citogenética I, da E.S.A.L.Q., 1968. (Não publicado)
3. DAVIDSON, D. Mechanisms of reorganization and cell repopulation in meristems in roots of *Vicia faba* following irradiation and colchicine. *Chromosoma* 12:484-504, 1961.
4. DIRKS, V. A.; ROSS, J. G. & HARPSTEAD, D. D. Colchicine induced true-breeding chimeral sectors in flax. *J. Hered.* 47:229-233, 1956.
5. EIGSTI, C. J. & DUSTIN, P. Colchicine in agriculture, medicine, biology and chemistry. Ames, Iowa State College Press, 1962. 470p.
6. LEVAN, A. The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*. *Hereditas* 24:471-486, 1938.
7. MEDINA, D. M. Uso do acetato de celulose diluído em ácido acético para tomar impressões dos estomas foliares. *Bragantia* 20:XXXIX-XLI, 1961. (Nota 9)
8. ——— & CONAGIN, C. H. T. M. Técnica citológica. Campinas, Instituto Agrônômico, 1964. 107p. (Publicação 2610)



A-B — Metáfases diplóide ($2n = 24$) e tetraplóide ($2n = 48$), respectivamente, em raízes provenientes de sementes de berinjela em germinação, tratadas com solução de colquicina a 0,1% (A, X 1560; B, X 2400). C-D — Aspectos dos estomas, respectivamente em folhas normais e afetadas pelo tratamento com colquicina (X 236).