

# ALGODÕES POLIPLÓIDES OBTIDOS PELA COLCHICINA. OBSERVAÇÕES CITOLÓGICAS EM GOSSYPIUM HIRSUTUM, OCTOPLÓIDE (\*)

A. J. T. Mendes

## INTRODUÇÃO

Quando se realizou a Primeira Reunião Sul Americana de Botânica, apresentamos uma nota preliminar (5) sobre a obtenção de poliploidia em algodão pela colchicina. Pelo tratamento de sementes de *Gossypium herbaceum* ( $2n=26$ ) e *G. hirsutum* ( $2n=52$ ), haviam sido obtidas plantas respectivamente com  $2n=52$  e  $2n=104$ . A imersão de sementes deslindadas em uma solução de colchicina a 0,15% durante cerca de 16 horas foi o tratamento do qual resultou um maior número de plantas "duplicadas". Vários outros tratamentos, entretanto, como com soluções a 0,075% e 0,3%, durante 25 e 48 horas, também produziram plantas poliplóides.

As sementes de *G. hirsutum* eram provenientes de um campo de multiplicação de uma variedade comercial, ao passo que as de *G. herbaceum* se originavam de plantas que foram autofecundadas por várias gerações. Diferentes tipos de anormalidades foram encontrados entre as plantas originadas dos tratamentos de sementes de *G. hirsutum*; algumas destas sementes não reagiram ao tratamento, dando plantas normais; as plantas obtidas dos tratamentos de sementes de *G. herbaceum*, entretanto, mostraram que estas reagiram mais uniformemente à droga, sendo todas igualmente anormais. As determinações dos números de cromossômios foram feitas em pontas de raízes, quando as plantas tinham a idade de cinco meses e meio; nessa ocasião ainda não haviam florescido.

No presente artigo, somente as experiências com *G. hirsutum* serão apresentadas; deixamos para uma futura publicação os resultados obtidos com *G. herbaceum*.

---

(\*) Tradução do original em inglês publicado em *The Botanical Gazette* 102:287-294. 1940.

## OBSERVAÇÕES MORFOLÓGICAS

As sementes tratadas com uma solução de colchicina de baixa concentração (0,06%), por um tempo relativamente longo (16 horas), não produziram senão plantas normais. As sementes tratadas com solução de alta concentração (0,6%), por pouco tempo (4 horas), produziram plantas bastante anormais, porém muitas delas não conseguiram sobreviver ao estado cotiledonar. Seus hipocotilos apresentavam-se inchados e suas raízes pouco desenvolvidas; nestas, foram encontradas células nas quais se podem contar  $2n = 104$ . Pelo uso de uma solução de concentração moderada (0,15%), durante 16 horas, obtiveram-se plantas normais e plantas anormais; entre estas, várias morreram logo. Este tratamento, entretanto, foi considerado como o mais eficaz na produção de plantas inteiramente octoplóides. Tanto este tratamento como os tratamentos mais fortes podem produzir plantas inteiramente octoplóides, aparentemente desprovidas de quimeras; todavia, as plantas octoplóides, obtidas pelo tratamento moderado, têm probabilidade maior de sobreviver do que as obtidas de sementes fortemente tratadas, sendo também o seu desenvolvimento muito mais regular.

Diversos tipos de anormalidades são constatados entre as plantas provindas de sementes que passaram pelos tratamentos mais fortes, anormalidades essas que não ocorrem entre as outras. Por exemplo, uma semente que sofreu um tratamento forte produziu uma planta octoplóide anã ( $2n = 104$  em pontas de raízes), cujas folhas eram inteiramente diferentes das de todas as outras, e que não floresceu ainda, se bem que já esteja com mais de 13 meses de idade (fig. 2). Uma outra planta octoplóide interessante (fig. 3) tem suas flores reduzidas a uma simples bráctea, com um cálice reduzido em sua base (fig. 4).

As plantas que pareciam ser tetraplóides foram eliminadas e cerca de 70% das que pareciam ser octoplóides foram conservadas até após florescimento. Foram raras as plantas que, examinadas depois, provaram ser inteiramente octoplóides. Verificou-se que muitas das raízes se compunham de uma mistura de tecidos com 52 e 104 cromossômios. Mais tarde, no estudo da microsporogênese, células tetraplóides e octoplóides foram algumas vezes observadas na mesma flor.

Vários caracteres servem para a identificação das plantas octoplóides adultas: seu desenvolvimento restrito (fig. 5), sua ramificação

anormal, suas folhas grossas, de um verde mais escuro que nas plantas normais, e flores que não se abrem facilmente, tem pétalas mais grossas e antenas indeiscentes (fig. 6). O tamanho das folhas era muito variável entre os octoplóides, sendo algumas muito delicadas e outras extremamente grandes.

### OBSERVAÇÕES CITOLÓGICAS

Fizemos uma análise da distribuição dos cromosômios nas células-mães de grãos de polen das plantas octoplóides. Os botões foram colhidos e fixados numa mistura de 3 partes de álcool e uma parte de ácido acético. Depois de 24 horas, foram transferidos para álcool a 70% e as anteras examinadas pelo método do carmin acético. Todos os desenhos, com exceção da figura 20, foram feitos com o auxílio de uma câmara clara, usando-se ocular 10X e objetiva 90X, o que dava um aumento de 1070 diâmetros.

É difícil observar a profase em detalhe. Os longos cromosômios ainda filamentosos podem ser vistos enquanto não se faz pressão sobre a lamínula, mas quando o material é esmagado, eles se tornam menos visíveis, confundindo-se com o plasma colorido. Um único grande nucléolo pode ser observado longamente na profase. Botões de diversos tamanhos mostram durante vários dias somente células profásicas, e as fases seguintes sucedem-se rapidamente, de forma que podem então ser encontradas na mesma antera células em todos os estados de divisão, desde a profase até a formação de quartetos.

A formação de quadrivalentes, a separação das metades dos bivalentes, e uma considerável porção de associação secundária tornam difícil a contagem dos cromosômios em metafase I. A figura 7 mostra células prometafásicas, tendo alguns bivalentes livres e outros associados em grupos de dois, quatro e mais. Na figura 8 observa-se uma associação ainda maior; esta pode tornar-se tão intensa a ponto de não se distinguirem os cromosômios uns dos outros (fig. 9). Junto a células como a que é ilustrada na figura 10, aparecem outras (fig. 11), nas quais se podem contar mais facilmente os cromosômios. A diferença de intensidade de tal aglomeração nestes estados pode ser causada por vários graus de associação secundária em estados mais jovens.

Como já foi dito, a contagem dos cromosômios em vistas polares de metafases I é difícil. A bipartição de vários cromosômios e a união de outros em pares ou grupos maiores causam confusão; além disso, a separação anafásica não se dá ao mesmo tempo para todos os cromosô-

mios: os univalentes são vistos frequentemente distanciados da placa equatorial. Uma vista lateral de uma anafase I é apresentada na figura 12, onde se pode verificar que alguns cromosômios se dirigem para os polos antes dos outros. Outras anafases foram encontradas, nas quais a separação dos cromosômios ocorria regularmente e ao mesmo tempo para todos os cromosômios. Na anafase I adiantada, quase todos os cromosômios já estão divididos (fig. 13).

Várias anafases I foram observadas em detalhe e quase sempre se verificava que, para cada polo, se dirigiam 52 cromosômios (fig. 14). Algumas células-mães de grãos de polen, entre muitas normais da mesma antera, mostraram diversos tipos de anormalidades, assim como distribuição desigual e perda de cromosômios entre os dois polos, citoquínese depois da primeira divisão, etc. Este último tipo de anormalidade foi observado somente uma vez e constituía um caso muito interessante, pois o citoplasma se dividia em três porções (fig. 15).

Pode-se observar no fim da primeira anafase uma aglomeração dos cromosômios, idêntica àquela observada anteriormente (fig. 16). Entretanto, parece que a regra mais geral é a imediata formação de duas segundas placas equatoriais (figs. 17 e 18). Núcleos interquinéticos, nos quais os cromosômios se tornam menos compactos, são formados quando não se dá nem aglomeração nem arranjo imediato das segundas metafases. Os cromosômios podem ser contados com facilidade na metafase II. Na segunda divisão, como na anafase I, 52 cromosômios são distribuídos para cada polo. Quase todas as anafases II são regulares. Alguns cromosômios ocasionalmente observados como perdidos entre os polos neste estado (fig. 19) são usualmente "lagers" da primeira divisão. Por predominar a regularidade nestas divisões, cerca de 73% dos "quartetos" formados têm realmente quatro células; somente cerca de 15% dos microsporocitos formam "quartetos" com 5 células e 12% com 6 células. Não é frequente a formação de "quartetos" com um maior número de células.

Um interessante tipo de anormalidade, isto é, o arranjo das células-mães do polen em sincícios (fig. 20), já observado por Levan (3) em *Petunias* octoplóides, foi também notado em algumas de nossas plantas. Em alguns casos, foi possível determinar a natureza mixoplóide destes algodoeiros, mas em outros pareceu-nos quase certo que se tratava de plantas inteiramente octoplóides. Foi difícil determinar se as

células que assim se ligavam eram tetraplóides ou octoplóides. Parece evidente que a anastomose das células ocorreu durante a profase da primeira divisão. As duas mitoses processavam-se regularmente na maior parte das células, formando quatro núcleos telofásicos normais, se bem que se tenha notado uma transferência de matéria cromática de algumas células para suas vizinhas ; é possível que esta transferência tenha ocorrido em consequência da pressão exercida sobre a lamínula.

### ESTUDOS SOBRE O POLEN, SEMENTE E PROGÊNIE

Como já dissemos, um dos característicos das plantas octoplóides era a indeiscência de suas anteras. Este fato é responsável pela sua alta esterilidade, desde que o pistilo se apresentava sempre normal, sendo a microsporogênese também quase inteiramente normal. Ocasionalmente, entretanto, algumas anteras de uma flor apresentavam-se deiscentes. Estudando o tamanho dos grãos de polen, verificou-se que algumas anteras eram diplóides e outras tetraplóides. Os grãos de polen das plantas não tratadas ( $2n = 52$ ) tinham um diâmetro de  $106,5 \pm 5,6\mu$ , enquanto os das plantas tratadas ( $2n = 104$ ) eram em geral maiores e mais variáveis, tendo um diâmetro de  $138,5 \pm 12,2\mu$ . Nas plantas tetraplóides o coeficiente de variabilidade era de 5,5%, ao passo que nas octoplóides era de 8,8%.

Procedeu-se à autopolinização e também à polinização cruzada das plantas octoplóides, neste último caso usando polen de plantas normais (tetraplóides) e tratadas (octoplóides ou não) ; porem não se obteve um único fruto maduro de mais de cem flores manipuladas. As flores polinizadas artificialmente produzem um fruto que não chega a se desenvolver muito, caindo 3 a 12 dias após a polinização. Da mesma forma, não foi obtida maturação dos frutos em enxertos dos octoplóides sobre plantas tetraplóides. Ocasionalmente, entretanto, amadureceram alguns frutos de flores não manipuladas, e, portanto, de polinização não controlada. Estes raros frutos diferiam dos anormais por serem quase esféricos, menores e conterem um reduzido número de sementes. Enquanto as sementes das plantas não tratadas eram uniformemente pequenas e longas, pesando cerca de 0,73 gr, as sementes obtidas das plantas tratadas variavam em forma, tamanho e peso. Na maior parte dos casos, elas eram semelhantes às normais em forma e tamanho, pesando de 0,71 a 0,87 gr ; em outros casos, entretanto, as sementes eram quase esféricas e muito maiores, pesando de 0,93 a 1,22 gr.

Uma parte das sementes foi semeada em caixas de Petri; depois de germinadas, foram transferidas para vasilhinhos com terra. À princípio, somente uma pequena percentagem das sementes maiores germinou, ao passo que todas as normais germinaram rapidamente. Um aumento na percentagem de germinação foi alcançado depois, cortando-se a testa em uma das pontas (1). Todas as plantas assim obtidas eram de aparência normal; floresceram e frutificaram. Em muitas delas determinamos o número de cromossômios ( $2n=52$ ).

## DISCUSSÃO

Especialistas (2, 4, 6, 7) do gênero *Gossypium* têm sugerido que a duplicação dos cromossômios de tipos ancestrais produziram os algodões americanos com  $2n=52$ . Desde que estes são considerados tetraplóides, as plantas com  $2n=104$  são octoplóides. A associação secundária dos cromossômios encontrada nos octoplóides é semelhante àquela que ocorre nos tetraplóides. As anormalidades encontradas durante a microsporogênese dos octoplóides são pouco mais pronunciadas que as citadas por outros autores nos tetraplóides. Considerando que na megasporogênese ocorram não maiores irregularidades que na microsporogênese, espera-se que elas não sejam responsáveis pela frutificação extremamente baixa dos octoplóides, pois a maior parte das células-ovo deveriam funcionar normalmente. A alta esterilidade dos octoplóides deve originar-se principalmente da indeiscência das anteras e outros distúrbios fisiológicos.

O fato de serem mais anormais as plantas provindas de tratamentos mais fortes com colchicina, sugere que esta, além de produzir a duplicação do número de cromossômios, promova ainda mudanças na estrutura dos cromossômios ou mutação de gens. A produção ocasional de sementes pelas plantas octoplóides e a natureza tetraplóide das plantas obtidas das mesmas, podem ser explicadas pelo desenvolvimento partenogênético de células-ovo com 52 cromossômios, ou pela fusão de dois gametas com 26 cromossômios, podendo ser estes derivados de ilhas de tecido tetraplóide. A segunda hipótese é muito mais provável, pois tais ilhas de tecido tetraplóide foram realmente constatadas não só em raízes como, também, em anteras.

A forma arredondada, o tamanho maior e, conseqüentemente, o peso mais elevado das sementes devem ser interpretados como resultantes da influência da planta-mãe octoplóide. O gigantismo dos órgãos vegetativos, encontrado em outros poliplóides conhecidos, não foi constatado no *Gossypium* octoplóide.

## SUMÁRIO

1. Plantas tetraplóides e octoplóides foram obtidas de sementes de *Gossypium herbaceum* e *G. hirsutum*, tratadas com colchicina.

2. As sementes de *G. herbaceum* eram bastante homozigotas e reagiram em regra mais uniformemente para o alcalóide do que as de *G. hirsutum*.

3. A microsporogênese em *G. hirsutum* octoplóide ( $2n=104$ ) é descrita com algum detalhe; algumas irregularidades cromosômicas foram observadas; os grãos de polen são maiores que os das plantas tetraplóides normais. Apesar de se encontrarem raros grãos de polen "vazios", as plantas são altamente estereis. As anteras são quase sempre indeiscentes.

4. Não se conseguiu frutificação quando as flores com anteras deiscentes foram autopolinizadas e quando outras flores foram polinizadas com polen de plantas tetraplóides e octoplóides.

5. Alguns frutos foram obtidos de flores não manipuladas, e, portanto, de polinização não controlada. Em alguns deles as sementes eram quase redondas, maiores e mais pesadas que as normais; a testa da semente era dura e a percentagem de germinação baixa. Plantas normais tetraplóides foram obtidas das que germinaram.

## AGRADECIMENTOS

O autor agradece ao dr. L. W. Sharp e ao sr. C. A. Krug por valiosas sugestões e crítica do original.

## SUMMARY

1. Octoploid and tetraploid plants were obtained from seeds of *Gossypium hirsutum* and *G. herbaceum* treated with colchicine.

2. The seeds of *G. herbaceum* were generally homozygous and reacted as a rule more uniformly to the drug than did the seeds of *G. hirsutum*.

3. Microsporogenesis in octoploid ( $2n=104$ ) *G. hirsutum* is described in some detail: a few chromosomal irregularities were observed and the pollen grains are larger than in the normal tetraploid plants. In spite of the fact that empty pollen grains were rarely found, the plants are highly sterile. The anthers are almost always indehiscent.

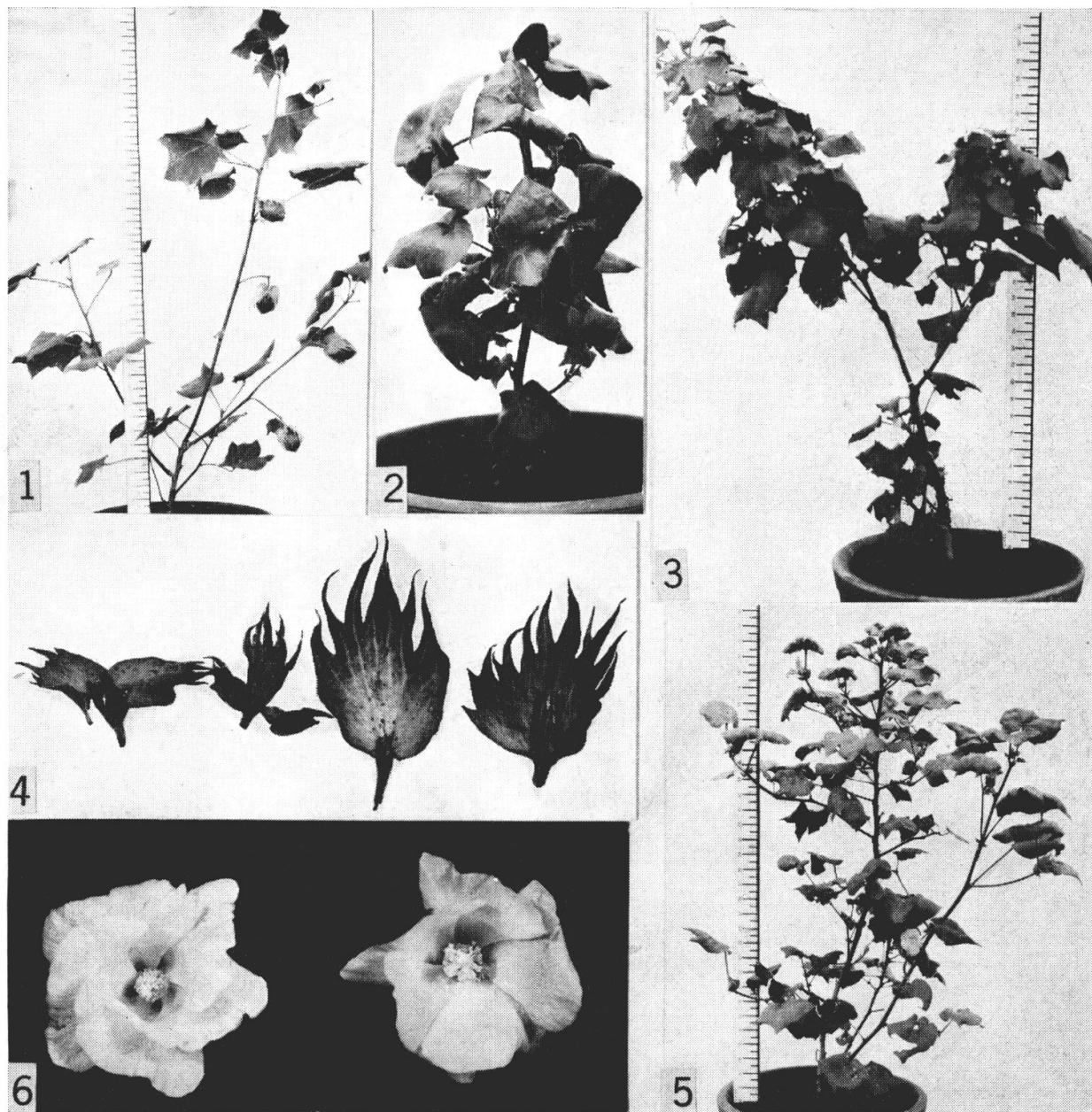
4. Flowers with dehiscent anthers were self-pollinated, and others were cross-pollinated with pollen from tetraploid and octoploid plants. No fruit set occurred.

5. A few fruits from open-pollinated flowers have been obtained. Their seeds were in some cases almost spherical and were larger and heavier than the normal. The seed coat was very hard and the percentage of germination low. These seeds yielded normal tetraploids ( $2n=52$ ).

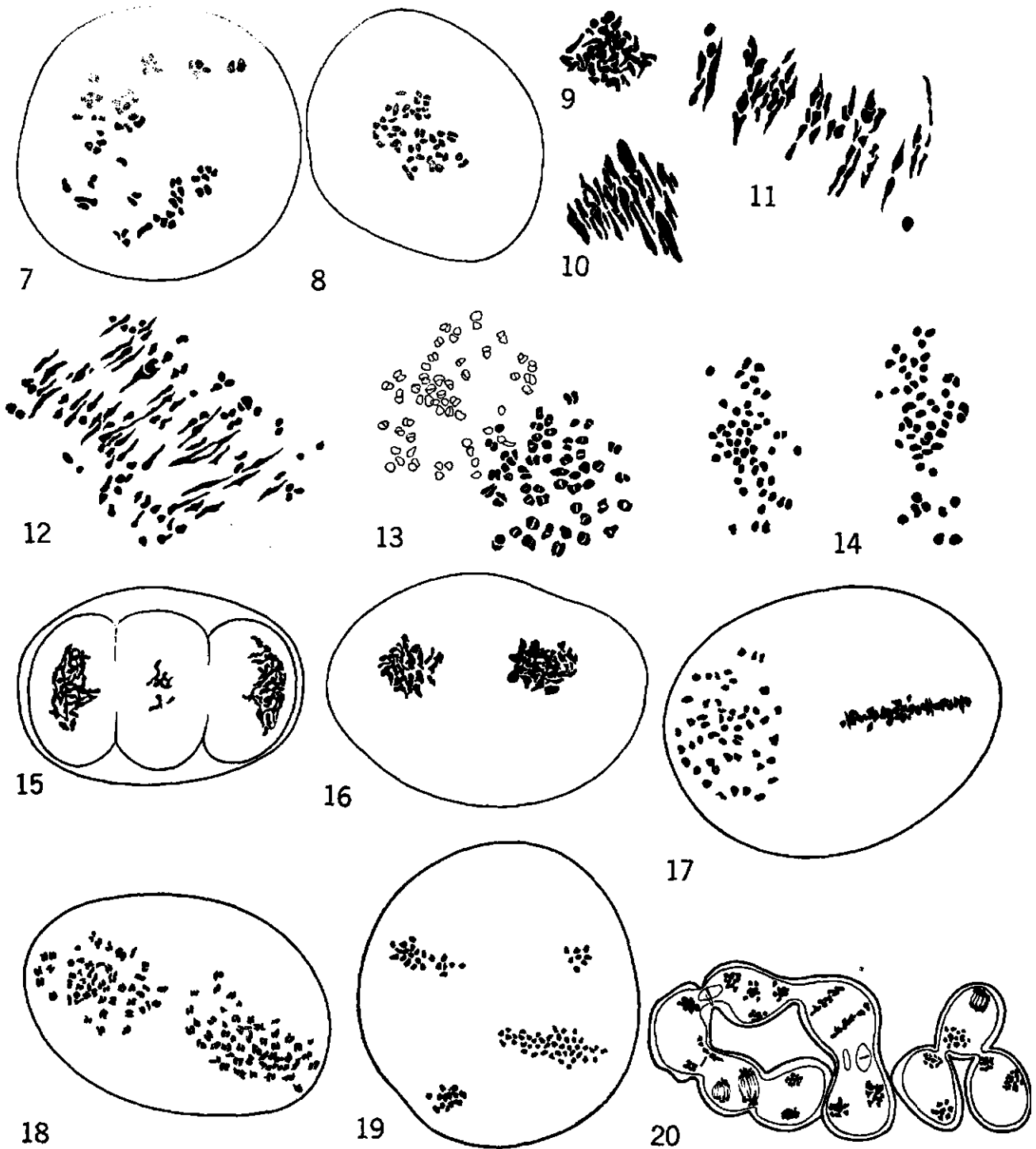
## LITERATURA CITADA

1. **Costa, A. S.** Experiências de germinação com *Gossypium thurberi* Tod. Revista de Agricultura (Piracicaba) 14:315-320. 1939.
2. **Denham, H. J.** The cytology of the Cotton Plant. I Microspore formation in Sea Island Cotton. Ann. Bot. 38:407-432. 1924.
3. **Levan, A.** Tetraploidy and Octoploidy induced by Colchicine in Diploid Petunia. Hereditas 25:109-131. 1939.
4. **Longley, A. E.** Chromosomes in *Gossypium* and related genera. Jour. Agr. Res. 46:217-227. 1933.
5. **Mendes, A. J. T.** Duplicação de Cromosômios em Café, Algodão e Fumo pela ação da Colchicina. Bol. Téc. Inst. Agron. do Estado, Campinas 57:1-21. fig. 1-17. 1938.
6. **Skovsted, A.** Cytological Studies in Cotton. II Two interspecific Hibrids between Asiatic and New World Cottons. Jour. Gen. 28:407-424. 1933.
7. **Webber, J. M.** Chromosome number and Meiotic Behavior in *Gossypium*. Jour Agr. Res. 49:223-237. 1934.





Figs. 1-6. *Gossypium hirsutum*. Fig. 1,  $2n=52$ , planta normal. Fig. 2,  $2n=104$ , de semente tratada fortemente; não produziu flores. Fig. 3, idem, de semente tratada fortemente; flores reduzidas a brácteas. Fig. 4, "flores" anormais de planta que se vê na fig. 3. Fig. 5,  $2n=104$ , de semente tratada. Fig. 6, de duas plantas com  $2n=104$  e  $2n=52$ ; note-se a indeiscência das anteras na flor com  $2n=104$ , à esquerda.



Figs. 7-20. *Gossypium hirsutum*,  $2n=104$ . Fig. 7, associação secundária em células-mães de polen. Fig. 8, associação mais pronunciada dos cromosômos. Fig. 9, aglomeração dos cromosômos em célula-mãe de polen. Fig. 10 ( $2n=104?$ ), vista lateral de metafase I. Figs. 11, 12, idem de metafase I. Fig. 13, vista polar de anáfase I; cromosômos já divididos. Fig. 14, anáfase I adiantada; 52 cromosômos em cada polo. Fig. 15, citoquinese depois da primeira divisão. Fig. 16, aglomeração dos cromosômos depois da primeira divisão. Fig. 17, metafase II; 52 cromosômos em cada placa. Fig. 18, metafase II; os cromosômos aparecem duplos. Fig. 19, arranjo multipolar dos cromosômos. Fig. 20 ( $2n=104$ , ou mixoplóide), sincício de células-mães de polen.