

Indução e identificação de tetraplóides em *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae)¹

Tetraploidy induction and identification in *Dendrobium nobile* Lindl (Orchidaceae)

Mívia Rosa de Medeiros Vichiato², Marcelo Vichiato³, Moacir Pasqual⁴, Daniel Melo de Castro⁵

e Leonardo Ferreira Dutra⁶

Resumo - A indução da duplicação cromossômica em orquídeas é uma importante ferramenta em programas de melhoramento genético, pois, geralmente, promove aumento no tamanho da flor, a intensificação da cor e perfume, bem como a restauração da fertilidade de híbridos raros. Este trabalho objetivou a indução e identificação de poliplóides em *Dendrobium nobile* Lindl. Para a poliploidização, plantas com altura média de 5,0 cm foram completamente imersas, no escuro, em solução de colchicina a 0,05% e 0,1% por 24; 48; 72 e 96 horas. Sete meses após o início do tratamento, foram avaliados a taxa de sobrevivência, a altura e o diâmetro do pseudobulbo, o comprimento e a largura das folhas e os níveis de ploidia. A determinação do nível de ploidia foi feita por meio da contagem do número de cromossomos em células metafásicas mitóticas. Verificou-se que o tratamento com colchicina, até um período máximo de imersão de 96 horas, não afetou a sobrevivência das plantas tratadas em relação à testemunha. Tetraplóides induzidos ($2n = 4x = 76$ cromossomos) foram obtidos após imersão das plantas por 72 e 96 horas, nas duas concentrações de colchicina testadas. A imersão das plantas de *D. nobile* em solução de colchicina a 0,1% por 96 horas induziu maior número de plantas tetraplóides (29,17%). Plantas mixoplóides não foram observadas.

Palavras-chave: Poliploidia. Colchicina. Cromossomos. Orquídea.

Abstract - The induction of the chromosomal duplication is an important tool in plant breeding programs, so it usually promotes the increase of the flower size, color and essence, as well as the restoration of the rare hybrids fertility. This research aimed to induce and identify the polyploids in *Dendrobium nobile* Lindl. For the poliploidy induction, plants with medium height of 5.0 cm were completely submerged, in dark conditions, in 0.05% and 0.1% colchicine solutions for 24; 48; 72 and 96 hours. Seven months later, the plants were evaluated for survival rate, height and diameter of the pseudo bulb and for ploidy levels. The ploidy level determination was made through the counting of chromosomes in the mitotic metaphase cells. It was verified that the colchicine treatment in the two concentrations and until a maximum period of immersion of 96 hours, did not affect the survival of the treated plants. The induced tetraploids plants ($2n = 4x = 76$ chromosomes) were obtained after 72 and 96 hours of immersion periods in the two concentrations of tested colchicine. The immersion of plants in 0.1% colchicine over 96 hours induced more tetraploids plants. Mixoploids plants were not observed.

Key words: Polyploidy. Colchicine. Chromosome. Orchid.

¹ Recebido para publicação em 20/10/2005; aprovado em 31/07/2007

Parte da tese de doutorado da primeira autora apresentada ao Dep. de Fitotecnia / Universidade Federal de Lavras-MG (UFLA). Caixa Postal 37, CEP 37200-000.

² Bióloga, D.Sc. em Agronomia. Dep. de Fitotecnia, UFLA. mivia@ig.com.br.

³ Eng. Agrônomo, D.Sc., Dep. de Fitotecnia, UFLA. vichiato@hotmail.com.br.

⁴ Eng. Agrônomo, D.Sc., Prof. do Depto de Fitotecnia, UFLA, mpasqual@ufla.br.

⁵ Eng. Agrônomo, D.Sc., Prof. do Depto de Biologia, UFLA, danielmec@hotmail.com.br.

⁶ Eng. Agrônomo, D.Sc., Pesquisador da Embrapa Florestas, Colombo – PR. leo@cnpf.embrapa.br.

Introdução

Dendrobium nobile Lindl. (olho de boneca) é uma das orquídeas mais populares do Brasil, ocupando posição de destaque no mercado de plantas de corte e de vaso. São citados mais de quinze cultivares, nas quais varia o tamanho e a cor das flores (CAMPOS, 2000).

O considerável interesse pelo gênero *Dendrobium* é devido a sua larga distribuição geográfica, crescimento em diferentes habitats, cultivo relativamente simples e, principalmente, ao grande valor florístico de seus híbridos e volume expressivo de comercialização (JONES et al., 1998).

A poliploidia nas plantas ocasiona, geralmente, um aumento em tamanho das estruturas vegetativas, o que é chamado por alguns autores de “gigantismo”. Por isso, a poliploidia beneficia a orquicultura, uma vez que o aumento da variabilidade genética, resulta em flores de maior valor comercial, normalmente de maior tamanho, com conformação mais redonda e maior conteúdo de substâncias que intensificam a cor e fragrância, quando comparadas com as orquídeas diplóides. Também é uma ferramenta útil na restauração da fertilidade de híbridos com problemas de pareamento dos cromossomos durante a meiose (GRIESBACH, 1985; BRIEGER, 1992; DRESSLER, 1993; GAO et al., 1996; TOSCANO; MORAES, 2002; KIM; KIM, 2003; FAM et al., 2003). Por essas características vantajosas, os melhoristas selecionam e realizam cruzamentos entre plantas poliplóides. Assim sendo, a análise citogenética de orquídeas é uma importante e imprescindível ferramenta em programas de melhoramento genético.

Entretanto, o efeito “gigas”, aumento das estruturas vegetativas, nem sempre é observado entre plantas com diferentes níveis de ploidia. Silva et al. (2000), observaram que todas as plantas de *Cattleya intermedia* tratadas com colchicina, indiferente do número de cromossomos, apresentaram crescimento vigoroso e maior intensidade de coloração das folhas quando comparadas com as plantas testemunhas.

Esse fenômeno pode ser explicado pelo trabalho de Webster e Davidson (1969), que observaram que a duração do ciclo mitótico em raízes de *Vicia faba* pode ser influenciada pela ação da colchicina, que parece ter efeito similar as citocininas. Segundo Ruiz e Vasquez (1982), a colchicina adicionada ao meio de cultura modifica a relação auxina/citocinina, aumentando a população de células.

Farinaci (2001), que avaliou indivíduos diplóides e tetraplóides naturais de *Bulbophyllum ipanemense*, não observou qualquer modificação morfológica visualmente

associada a poliploidia, nem mesmo o aumento no tamanho dos indivíduos.

Em trabalhos de poliploidização em orquídeas, via cultivo *in vitro*, a colchicina é a substância mais empregada e os meristemas são os materiais biológicos comumente utilizados. Porém, essa metodologia é inadequada para a duplicação cromossômica de várias plantas por proporcionar elevada mortalidade, conseqüente da toxicidade da colchicina e do pequeno tamanho do explante que não permite um pegamento eficiente (SANGUTHAI et al., 1973; GRIEBACH, 1985; WALTROUS; WIMBER, 1988; SILVA et al., 2000; KIM; KIM, 2003; BARBOSA, 2004). Por isso, a variação do material botânico a ser utilizado, bem como a variação da concentração e do tempo de exposição e as formas de aplicação da droga, tornam-se requisitos indispensáveis em programa de melhoramento genético, visando a duplicação cromossômica. Roth (1984), por exemplo, obteve poliplóides de *Eucalyptus urophylla* mediante imersão de suas plantas intactas em soluções de colchicina.

Pouco ainda se sabe a respeito da cariomorfologia das espécies dessa família, que é a maior do reino vegetal (TANAKA; KAMEMOTO, 1980; VOSA, 1983). Embora os primeiros registros sobre o número cromossômico das espécies de *Dendrobium* datem de 1929, atualmente há pouca informação citogenética publicada para esse gênero, que normalmente apresenta números de cromossomos uniformes de $2n=2x=38$ (SHINDO; KAMEMOTO, 1963; WILFRET; KAMEMOTO, 1969, 1971; WILFRET et al., 1979; MEHRA; KASHYAP, 1989; INDEX, 1994; JONES et al., 1998). Cromossomos B foram descritos para poucas espécies desse gênero (LÖVE et al., 1970; MEHRA; KASHYAP, 1989).

Considerando que a poliploidia nas plantas pode resultar em flores de maior valor comercial e que o gênero *Dendrobium* é muito popular no Brasil, este trabalho objetivou a indução e identificação de poliplóides em *Dendrobium nobile* Lindl., mediante imersão de suas plantas em soluções de colchicina.

Material e Métodos

A pesquisa foi conduzida em casa-de-vegetação pertencente ao Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura e no Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, localizada no município de Lavras, Minas Gerais.

As plantas de *D. nobile* diplóides ($2n = 38$ cromossomos), com altura média de 5,0 cm e 3 folhas foram

obtidas de um orquidário particular em Lavras-MG. A confirmação do nível de ploidia, via análise citogenética, foi feita de acordo com Vichiato et al. (2004).

Para a imersão na solução de colchicina, plantas de *D. nobile* diplóides tiveram as raízes aparadas para permanecerem com 1,0-1,5 cm de comprimento. Em dois recipientes com capacidade para 5 litros, as plantas foram totalmente imersas em solução aquosa de colchicina a 0,05% e 0,1% por períodos de 24; 48; 72 e 96 horas. O tratamento testemunha constou de 24 plantas não imersas em solução de colchicina. Durante o período de imersão, as plantas permaneceram no escuro, a temperatura ambiente. Objetivando prevenir danos às plantas por depleção de oxigênio, utilizou-se borbulhamento de ar constante, por meio de bombas aeradoras de aquário doméstico. Para aumentar a eficiência da colchicina foi adicionado Tween-80 a 0,01% (ROTH, 1984).

Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado com nove tratamentos e 24 repetições, com uma planta por parcela, perfazendo um total de 216 parcelas, sendo 192 tratadas com colchicina. Depois de transcorrido cada tempo de tratamento com colchicina, as plantas foram lavadas cuidadosamente em água corrente por 20 minutos e em água destilada por 5 minutos, para remover o excesso de colchicina. Em seguida, foram devidamente identificadas e plantadas em vasos de polietileno preto com volume de 500 cm³, contendo fibra de xaxim como substrato.

As plantas foram transferidas para a casa de vegetação, sobre bancadas metálicas, onde permaneceram por sete meses. A irrigação foi feita de acordo com as condições de umidade do substrato sendo, em média, quatro vezes por semana. Dois meses após os tratamentos de poliploidização, efetuou-se adubação básica semanal com o fertilizante Biofert Plus® na concentração de 5,0 mL L⁻¹ por meio de pulverização foliar. Foi feita a aplicação de 2 mL da solução por planta.

A determinação do nível de ploidia foi realizada através da contagem de cromossomos, sete meses após o início do experimento, de acordo com Vichiato et al. (2004). A análise do efeito dos diferentes tratamentos na poliploidização de *D. nobile* foi feita em pelo menos três lâminas por tratamento, levando em conta o acúmulo de metáfases, o espalhamento e a morfologia dos cromossomos. Foram avaliadas, em média, 50 metáfases por lâmina.

Sete meses após o início do experimento, avaliaram-se as seguintes características: taxa de sobrevivência, altura do pseudobulbo (medida com régua e expressa em cm), o diâmetro do pseudobulbo (medido com paquímetro digital

e expresso em mm), a largura e o comprimento da folha (medido com paquímetro digital e expresso em cm) e o nível de ploidia (obtido pela contagem do número de cromossomos em células metafásicas). Os dados das plantas tetraplóides utilizadas foram os tratamentos em que ocorreu a poliploidização.

Para a avaliação das características das plantas duplicadas, os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância, considerando-se um fator de variação (nível de ploidia) e as médias comparadas através do teste de Scott Knott a 1% de probabilidade. Para a variável número de tetraplóides induzidos, a análise de variância foi realizada considerando-se o esquema fatorial 4 x 2 + 1 composto pelos fatores concentração de colchicina e tempo de imersão, mais o tratamento adicional, constituído por plantas não tratadas com colchicina (testemunha).

Resultados e Discussão

Sobrevivência das plantas de *D. nobile*

A metodologia testada neste trabalho promoveu 100% de sobrevivência nas plantas de *D. nobile* em todos os tratamentos. Resultado semelhante foi registrado por Roth (1984) e considerado satisfatório em comparação a outros métodos de poliploidização *in vitro* conhecidos, envolvendo a aplicação de colchicina e descritos na literatura (SANGUTHAI et al., 1973; GRIEBACH, 1985; WALTROUS; WIMBER, 1988; SILVA et al., 2000; KIM; KIM, 2003; FAM et al., 2003). Isso é importante porque a baixa sobrevivência das plantas, em consequência da toxidez da colchicina, é um dos obstáculos para os fitomelhoristas (Roth, 1984; WAN et al., 1989; ABREU, 2002; KIM; KIM, 2003).

A ausência de morte em plantas de *D. nobile* tratadas com colchicina, sugere que essa orquídea possui maior resistência aos efeitos nocivos do alcalóide. Silva et al. (2000), observaram que, para o mesmo tratamento, clones de variedades diferentes da orquídea *Cattleya intermedia* apresentavam diferentes respostas para a taxa de mortalidade, indicando um possível efeito do genótipo na resistência à colchicina. Comportamentos semelhantes foram observados em clones CO₁, DO₁ e BO₁ de *Eucalyptus urophylla* (ROTH, 1984).

Características das plantas duplicadas

As plantas diplóides deste trabalho (testemunhas e as dos tratamentos em que não ocorreu poliploidização) apresentaram, até o sétimo mês após o início do tratamento

com colchicina, maior altura (125,81%), maior diâmetro do pseudobulbo (96,44%), com folhas 73,18% maiores e 50% mais largas quando comparadas com as folhas tetraplóides (Figura 1, Tabela 1).

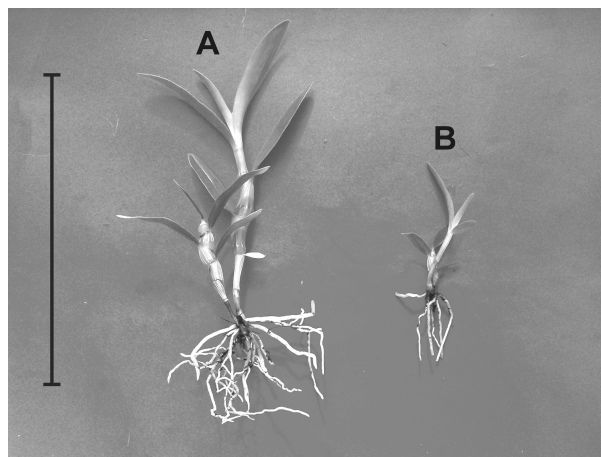


Figura 1- Plantas de *Dendrobium nobile* Lindl. sete meses após tratadas com colchicina: A: diplóide (38 cromossomos); B: tetraplóide induzido (76 cromossomos). Barra = 10 cm. UFLA, Lavras-MG, 2005

Tabela 1- Altura da planta (AP), diâmetro do pseudobulbo (DP), comprimento (CF) e largura da folha (LF) em plantas diplóides e tetraplóides induzidos de *Dendrobium nobile* Lindl. UFLA, Lavras-MG, 2005

Nível de ploidia	AP (cm)	DP (mm)	CF (cm)	LF (cm)
Diplóide	11,2 a	6,07 a	9,30 a	2,4 a
Tetraplóide	4,96 b	3,09 b	5,37 b	1,6 b
CV(%)	22,72	22,31	8,2	6,4

* Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo Teste Skott Knott a 1% de probabilidade

As plantas poliplóides de *D. nobile* também expressaram desenvolvimento lento e pouco vigoroso com raízes reduzidas, mas com folhas de coloração e textura normais (Figura 1). Esse comportamento também foi observado por Mergen e Lester (1971), Vandenhout et al. (1995) e Gao et al. (1996). O efeito “gigas”, aumento das estruturas vegetativas, encontra-se comumente em órgãos de padrão de crescimento altamente determinado como flores e sementes (ROTH, 1984; DRESSLER, 1993) e, por isso, nem sempre é observado entre plantas com diferentes níveis de ploidia. Assim sendo, em trabalhos com duplicação cromossômica, o crescimento mais vigoroso das plantas não pode ser classificado como indicador morfológico de poliploidia.

As características das plantas poliplóides de *D. nobile* são, provavelmente, conseqüentes da dosagem gênica dobrada. O efeito morfofisiológico imediato da poliploidização é o aumento do tamanho das células devido ao maior volume nuclear. Conseqüentemente, consome-se mais tempo e energia na duplicação do próprio DNA (DRESSLER, 1993), e isso conduz a uma redução do número de divisões celulares durante o desenvolvimento, causando retardamento no ciclo mitótico e nos ciclos vitais, que se expressam em menor produção de biomassa por unidade de tempo (ROTH, 1984; GRIESBACH, 1985; BRIEGER, 1992; DRESSLER, 1993; TAKAMURA; MIYAJIMA, 1996; TOSCANO; MORAES, 2002).

Análise do número de tetraplóides induzidos

Apesar da pouca informação citogenética publicada para essa espécie, o resultado obtido é condizente com a literatura que mostra que *D. nobile* apresenta números de cromossomos uniformes de $2n=2x=38$ (JONES, 1982; KARASSAWA; HASHIMOTO, 1980). Além disso, observou-se interação significativa do tempo de tratamento com a concentração de colchicina (Tabela 2).

Tabela 2 - Resumo da análise de variância do número de tetraplóides induzidos de *Dendrobium nobile* Lindl. em duas concentrações colchicina e 5 períodos de imersão. UFLA, Lavras-MG, 2005

Fonte de Variação	GL	QM
Tratamento	8	0,2289 **
Tempo (T)	3	0,4574 **
% Colchicina (C)	1	0,1507 **
T X C	3	0,0563 **
Fatorial X Adicional	1	1,5291 **
Resíduo	27	0,0139
TOTAL	35	
C.V. (%)		10,03%

**Significativo pelo teste F a 1% de probabilidade

A duplicação cromossômica em plantas de *D. nobile* somente foi possível nos tratamentos por 72 e 96h, nas duas concentrações de colchicina testadas (Tabela 3). Tempos maiores de exposição em solução de colchicina também favoreceram a obtenção de poliplóides em híbridos de *Dendrobium* cultivados *in vitro* (SANGUTHAI et al., 1973), *Phalaenopsis* (GRIESBACH, 1985) e *Cattleya intermedia* (SILVA et al., 2000).

Tabela 3- Percentagem de plantas tetraplóides induzidas obtidas com tratamento de *Dendrobium nobile* Lindl. com duas concentrações colchicina e 4 tempos de imersão. UFLA, Lavras –MG, 2005

Colchicina (%)	Tempo (horas)			
	24	48	72	96
0,1	0,0 a	0,0 a	12,5% a	29,17% a
0,05	0,0 a	0,0 a	8,33% b	16,67% b

*Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade

Desdobrando-se a interação tempo em cada nível de colchicina, foram observados efeitos dos tempos de tratamento a partir de 72 h, nas duas concentrações testadas (Figura 2), obtendo-se maior média de plantas tetraplóides com solução de colchicina a 0,1%.

Assim, fica evidente que a concentração de colchicina e o tempo de imersão foram diretamente proporcionais à frequência de tetraplóides induzidos nas condições deste experimento. Isso sugere que, em experimentos semelhantes, doses mais altas de colchicina e/ou intervalos de tempos maiores possibilitam maior percentagem de poliplóides. Griesbach (1985) obteve 50% de *Phalaenopsis* tetraplóides utilizando colchicina a 0,05% por 10 a 14 dias. Em *Cattleya intermedia*, a maior média de plantas poliplóides foi obtida com solução de colchicina a 0,1% por 8 dias (SILVA et al., 2000).

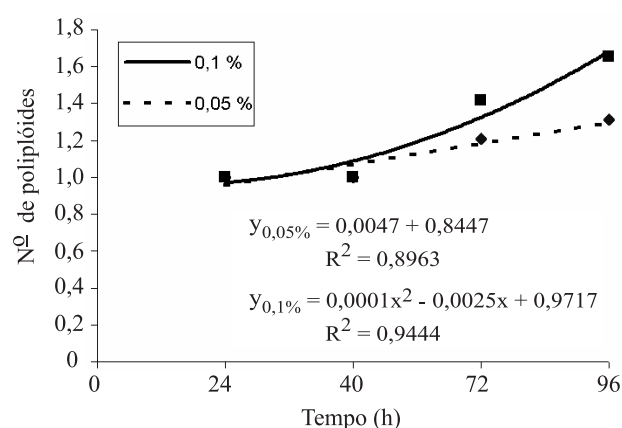


Figura 2 - Número médio de plantas poliplóides obtidas com tratamento de *Dendrobium nobile* Lindl. com duas concentrações colchicina por 5 períodos de tempo. UFLA, Lavras – MG, 2005. (Dados transformados para $\sqrt{x + 1}$)

Das 192 plantas de *D. nobile* tratadas com colchicina, 16 (8,33%) eram tetraplóides. Sanguthai et al. (1973), observaram que 40% das plantas de *Dendrobium* que sobreviveram aos efeitos da colchicina eram poliplóides. Silva et al. (2000), que cultivaram protocormos de dois clones de *Cattleya intermedia*, conseguiram, das plantas sobreviventes, 13% e 36% de tetraplóides. Esses resultados sugerem que a solução de colchicina adicionada ao meio de cultura de meristema é mais eficiente na indução de poliploidia em orquídeas do que a imersão das plantas intactas. Barbosa (2004), realizou a indução de poliploidia em híbridos de capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) e milho (*Pennisetum glaucum*) em cultivos *in vitro* e *in vivo* e observou que o cultivo *in vitro* facilitou tanto a indução de duplicação cromossômica quanto a obtenção e proliferação de raízes.

Mixoplóides, muito comuns em trabalhos de poliploidização, não foram encontrados. Esse fato pode ser explicado pelo maior intervalo de tempo entre o dia do tratamento à avaliação citogenética, que foi de 210 dias. Silva et al. (2000), que avaliaram dois clones de *Cattleya intermedia* aos 120 dias após os tratamentos, detectaram 9% e 13% de plantas mixoplóides. Apesar de não existirem dados exatos quanto ao tempo necessário para a avaliação do nível de ploidia, sabe-se que a planta tratada com colchicina está apta para ser avaliada quando sofreu inúmeras divisões celulares, apresentando raízes, folhas e pseudobulbo novos e desenvolvidos. Obviamente, esse período de tempo varia entre as espécies e, como o desenvolvimento das orquídeas é muito lento, exige maior intervalo de tempo.

Conclusões

1. A indução de poliploidia em *Dendrobium nobile* L., mediante imersão das plantas em solução de colchicina é viável;
2. Maior número de tetraplóides induzidos de *D. nobile* (29,17%) é obtido pela imersão de suas plantas em solução de colchicina a 0,1% por 96 horas;
3. A imersão em solução de colchicina a 0,05% e 0,1%, até um período máximo de 96 horas, não afeta a sobrevivência das plantas até os sete meses após o tratamento; e
4. O desenvolvimento das plantas tetraplóides induzidas é lento e pouco vigoroso em relação às plantas diplóides.

Referências

- ABREU, J. C. **Mixoploidia em híbridos de capim-elefante x milho tratados com agentes antimitóticos**. 2002. 71 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- BARBOSA, S. **Micropropagação e duplicação cromossômica de híbridos triplóides de capim-elefante e milho**. 2004. 119 f. Tese (Doutorado Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- BRIEGER, A. H. N. **Caracterização morfológica e estudo da anatomia foliar de populações de *Epidendrum nocturnum* Jacq. (Orchidaceae)**. 1992. 79 f. Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético Vegetal). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- CAMPOS, K. O. **Floração em *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) e os níveis endógenos de citocininas, auxina e ácido abscísico**. 2000. 74 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- DRESSLER, R. L. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Portland: Dioscorides Press, 1993. v. 1, 314p.
- FAM, L. Y.; THAMEA, A.; WING, Y. T. Influence of the increase of ploidy levels (from 2n to 4n) on the physical attributes of *Ionocidium* popcorn. **Singapore Botanic Garden**: Singapore, 2003. Disponível em: <http://staf.science.nus.edu.sg/~scilooe/srp-2003/sci-paper/botanic/research>. Acesso em: 12 set. 2004.
- FARINACI, J. S. **Variabilidade genética em algumas espécies de *Bulbophyllum* Thouars (Orchidaceae) de campos rupestres**. 2001. 58f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- GAO, S. L.; ZHU, D. N.; CAI, Z. H.; XU, D. R. Autotetraploid plants from colchicine-treated bud culture of *Salvia miltiorrhiza* Bge. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 47, n. 1, p. 73-77, 1996.
- GRIESBACH, R. J. Polyploidy in *Phalaenopsis* orchid improvement. **The Journal of Heredity**, v. 6, n. 1, p. 4-75, 1985.
- INDEX to plant chromosome numbers 1990-1991. Saint Louis, M.O.: Missouri Botanical Garden, 1994. 267p.
- JONES, W. E.; KUEHNLE, A. R.; ARUMUGANATHAN, K. Nuclear DNA content of 26 orchid (Orchidaceae) genera with emphasis on *Dendrobium*. **Annals of Botany**, v. 82, n. 2, p. 189-194, 1998.
- KIM, M. S.; KIM, J. Y. Chromosome doubling of a *Cymbidium* hybrid with colchicine treatment in meristem culture. **Proceedings of NIOC**, p. 37-40, 2003. Disponível em: <http://www.biolo.aichi-edu.ac.jp/NIOC2003/poster/37-40>.
- MEHRA, P. N.; KASHYAP, S. K. **Cytology of orchids of North-West Himalayas**. Pramodh P. Kapur at Raj: New Delhi, 1989. 56p.
- MERGEN, F.; LESTER, D. T. Colchicine induced polyploidy in *Abies*. **Forest Science**, v. 7, n. 4, p. 314-319, 1971.
- ROTH, P. S. **Indução de poliploidia em clones de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake**. 1984. 78 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.
- RUIZ, M. L.; VÁSQUEZ, A. M. Colchicine effect on the chromosome number of barley embryos cultured *in vitro*. **Protoplasma**, v. 113, n. 3, p. 237-240, 1982.
- SANGUTHAI, O.; SANGUTHAI, S.; KAMEMOTO, H. Chromosome doubling of *Dendrobium* hybrid with colchicine in meristeme culture. **Na Pua Okika O Hawaii Nei**, Hawaii, v. 2, n. 1, p. 12-16, 1973.
- SHINDO, K.; KAMEMOTO, H. chromosome numbers and genome relationships in some species in the Nigrohirsutae section of *Dendrobium*. **Cytologia**, v. 28, n. 1, p. 68-75, 1963.
- SILVA, P. A. K. X. M.; CALLEGARI-JACKES, S.; ZANETTINI, M. H. B. Induction and identification of polyploids in *Cattleya intermedia* Lind. (Orchidaceae) by *in vitro* techniques. **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 105-111, 2000.
- TAKAMURA, T.; MIYAJIMA, I. Colchicine induced tetraploids in yellow-flowered cyclamens and their characteristics. **Scientia Horticulturæ**, v. 65, n. 4, p. 305-312, aug. 1996.
- TANAKA, R.; KAMEMOTO, H. Chromosomes is orchids: counting and numbers. In: ARDITTI, J. **Orchid Biology: reviews and perspectives III**. New York: Cornell University Press, 1980. p. 329-397.
- TOSCANO, L. A. B.; MORAES, M. M. **Saiba mais sobre orquídeas**. [on line] Disponível na Internet via <http://www.jbrj.gov.br/saibamais/orquideas>. Arquivo capturado em 01/09/2002
- VANDENHOUT, H. et al. Effect of ploidy on stomatal and other quantitative traits in plantain and banana hybrids. **Euphytica**, v. 83, n. 2, p. 117-122, 1995.
- VICHIATO, M. R. M. et al. Indução e identificação de poliplóides em *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). In: CONGRESSO DOS PÓS-GRADUADOS DA UFLA, 13., 2004, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2004. p. 248-254.
- VOSA, C. G. The ecology of B-chromosomes in *Listera ovata* (L.) R. BR. (Orchidaceae). **Caryologia**, v. 36, n. 1, p. 113-120, 1983.
- WALTROUS, S. B.; WIMBER, D. E. Artificial induction of polyploidy in *Paphiopedilum*. **Lyndleyana**, v. 3, n. 2, p. 177-183, 1988.
- WAN, Y.; PETOLINO, J. F.; WIDHOLM, J. M. Efficient production of doubled haploid plants through colchicines treatment of anther-derived maize callus. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 77, n. 1, p. 889-892, 1989.
- WEBSTER, P. L.; DAVIDSON, D. Changes in the duration of the mitotic cycle induced by colchicine and indol-3yl-acetic in *Vicia faba* roots. **The Journal of Experimental Botany**, v. 20, n. 2, p. 671-685, 1969.
- WILFRET, G. J.; T.; KAMEMOTO, H. Genome and karyotype relationships in the genus *Dendrobium* (Orchidaceae). II. Karyotype relationships. **Cytologia**, v. 36, n. 1, p. 604-613, 1971.
- WILFRET, G. J.; T.; KAMEMOTO, H. Genome and karyotype relationships in the genus *Dendrobium*. I. Cross compatibility. **American Journal of Botany**, v. 56, n. 1, p. 521-526, 1969.