

BRAGANTIA

Boletim Científico do Instituto Agrônomo do Estado de São Paulo

Vol. 22

Campinas, julho de 1963

N.º 30

POLIPLOIDIA ARTIFICIAL EM SERINGUEIRA (*Hevea brasiliensis* Muell.—Arg.) (1)

LUIZ O. T. MENDES, engenheiro-agrônomo, Seção de Entomologia e A. J. TEIXEIRA
MENDES, engenheiro-agrônomo, Seção de Citologia, Instituto Agrônomo

RESUMO

Tendo em vista verificar se, com a duplicação do número de cromossômios, obter-se-iam seringueiras com vasos laticíferos de maior diâmetro que o observado em plantas normais e, conseqüentemente, de maior produção de látex, os autores, por meio de soluções de colchicina, trataram plantas recém-germinadas, assim obtendo poliplóides artificiais. No decurso dos trabalhos foi desenvolvida uma técnica especial, pela qual, de uma mesma semente de seringueira, eram obtidas duas plantas, uma normal e outra com o número duplo de cromossômios; dessa maneira, a planta normal se constitui em perfeita testemunha da planta poliplóide, podendo-se, assim, atribuir à poliploidia tóda e qualquer alteração que se venha a verificar na planta com o número duplo de cromossômios. Acreditam os autores que êsse mesmo processo poderá ser utilizado com êxito em outras plantas dicotiledôneas.

Os resultados mostram que, nas plantas poliplóides, os estomas são maiores e em menor número, por unidade de superfície foliar, que nas plantas normais; observam-se também diferenças morfológicas nessas plantas, que se desenvolvem satisfatoriamente. Ainda não foram feitos estudos para a determinação do diâmetro dos vasos laticíferos.

O material foi multiplicado por enxertia e está sendo incluído em experimentos a cargo da Seção de Plantas Tropicais.

1 - INTRODUÇÃO

A seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell.-Arg.) tem $2n=36$ cromossômios (3). Levando em consideração que a duplicação dêsse número poderá resultar em aumento do tamanho dos vasos laticíferos e, portanto, em maior produção de látex, será interessante obter, artificialmente, seringueiras com $2n=72$ cromossômios.

Experiências que visavam a êsse resultado, foram realizadas por um dos autores (3): inicialmente foram usadas soluções de colchicina desde 0,0625 até 1% que eram aplicadas em gôtas sôbre gemas vegetativas de

(1) Recebido para publicação em 15 de janeiro de 1963.

“seedlings”; em elevado número de plantas obteve duplicação (de $2n=36$ para $2n=72$) e mesmo reduplicação ($2n=144$), verificadas através de contagens em fôlhas muito novas. Em seguida êsse autor passou ao tratamento de sementes, concluindo que nesse caso o melhor método consiste em fazê-las germinar e só então tratá-las pela colchicina, o que, aliás, já havia sido também constatado pelo segundo dos autores com relação a sementes de café (2). Seringueiras com duplo número de cromossômios foram obtidas ao tratar sementes por soluções de colchicina de 0,2 a 0,4% desde 3 até 9 horas. As plantas tetraplóides ($2n=72$) assim obtidas apresentavam fôlhas mais espessas e também estomas maiores e menos numerosos que nas fôlhas das plantas normais ($2n=36$). Tendo o autor deixado o Instituto Agronômico do Norte, em Belém, o trabalho foi interrompido e o material ficou naquele Instituto, à disposição de seus técnicos.

No Instituto Agronômico de Campinas, os autores realizaram uma série de tratamentos, visando também à duplicação dos cromossômios. Os resultados das experiências são expostos a seguir, depois de um relato sobre o material usado e os métodos de trabalho.

2 – MATERIAL E MÉTODO

As primeiras 54 sementes utilizadas foram fornecidas pela Seção de Plantas Tropicais, da planta n.º 2, considerada, em 1956, como a melhor da coleção do I.A. Semeadas a 11 de agosto de 1956, em germinador à temperatura de 32°C, germinaram mal e serviram apenas para observações gerais sobre o desenvolvimento inicial das plantas (figura 1-A).

Em outubro de 1956 o I.A. recebeu cerca de 80.000 sementes da Libéria, de um cruzamento “ilegítimo” dos clones Tj 1 x Tj 16. A germinação foi muito boa, tendo a Seção de Plantas Tropicais fornecido, de suas sementeiras, 59 sementes em início de germinação. As mais adiantadas (1 a 2 cm de hipocótilo) foram imediatamente tratadas com colchicina a 0,4% durante 6 horas, à temperatura ambiente (+19°C); o tratamento consistiu apenas em inverter os “seedlings” na solução em recipiente de vidro tampado para evitar que as raízes secassem; após o tratamento, o material foi lavado e colocado numa caixa com areia, transportando-se para uma estufa a 30°C.

As mais atrasadas foram ressemeadas em areia, na estufa a 30°C. Dois dias depois os seus hipocótilos mediam 3 a 10 cm de comprimento. Foram tratadas, então, durante 6 horas, com colchicina a 0,4%. O tratamento foi feito dentro da estufa a 30°C e somente a ponta dos hipocótilos (1 cm) foi

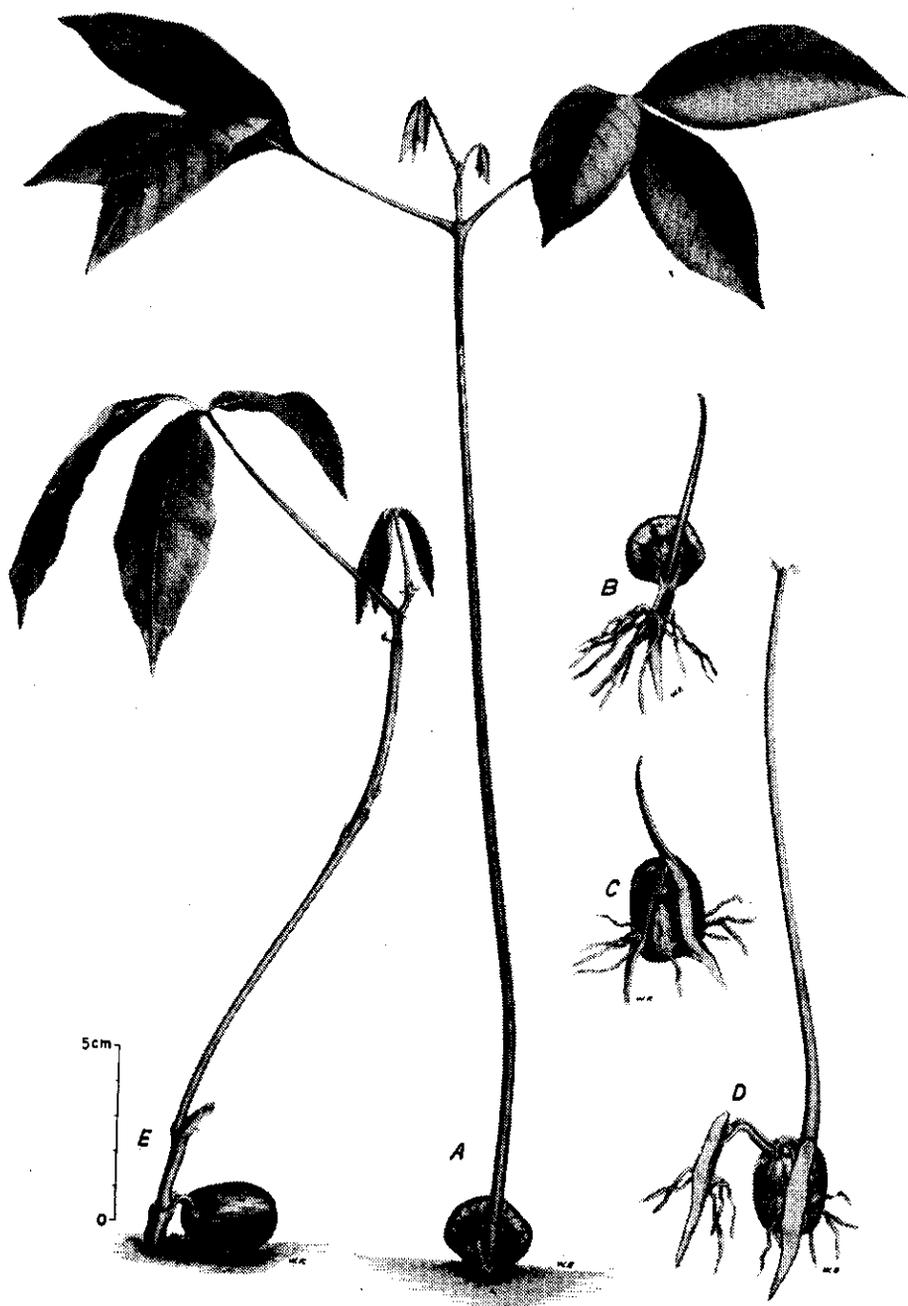


FIGURA 1. — Seringueira. A — Planta normal; B — semente germinada em condições de ser operada; C — plantinha operada; D — plantinha operada, com gema latente em desenvolvimento, no ponto de ser tratada; E — planta obtida após tratamento com solução de colchicina.

mergulhada na solução. Depois de lavadas e ressemeadas em areia, as platinhas continuaram na estufa.

Em abril de 1957 foram recebidas da Seção de Plantas Tropicais 200 sementes da "parcela III", colhidas a 28 de abril de 1957. Colocadas em germinador com 100% de umidade e 30°C de temperatura, 50 sementes germinaram entre 11 e 30 dias depois. À medida que germinavam, as sementes eram tratadas individualmente.

O tratamento consistia em mergulhar as sementes (mal germinadas, algumas ainda não exteriorizando o caulículo) inteiramente em solução de colchicina a 0,4% durante 6 horas. Em seguida eram lavadas e voltavam à areia em estufa a 30°C; passados alguns dias os "seedlings" eram transplantados para uma casa de vegetação, em canteiro com terra. Diariamente, escolhendo, foram tratadas as 31 sementes que primeiro germinaram, numeradas de Cit. 3001 a Cit. 3031.

As sementes germinadas (figura 1-B) a partir de 31 de maio foram tratadas diferentemente; apenas germinadas, com uma lâmina de barbear (tipo Gillete) procedia-se à divisão longitudinal do hipocótilo, de forma a separar, de um lado, a gema apical em brotação, ligada ao respectivo cotilédone e, de outro, a gema lateral latente, existente logo acima da inserção do pecíolo cotiledonar, com seu respectivo cotilédone; o corte era feito até a extremidade apical da raiz pivotante, de forma a repartir pela metade esta e as demais raízes existentes (figura 1-C). As platinhas assim seccionadas eram recolocadas em areia, em estufa aquecida a 30°C e com 80% de umidade relativa; dentro de 4 a 8 dias a platinha original atingia altura de cerca de 20 cm e a gema da outra, desperta, começava a brotar (figura 1-D); mergulhava-se esta, então, em solução de colchicina (a 0,2% durante 6 horas), deixando fora do frasco a planta que não ia ser tratada. Decorrido o espaço de tempo determinado, lavava-se tudo e a semente com os dois brotos, um tratado e o outro não, era recolocada em areia, na mesma estufa (4). Quinze plantas foram assim tratadas com colchicina a 0,2%. Onze a quinze dias depois, a maior parte delas enraizava bem e continuava a brotação; algumas não continuaram a crescer; uma ou outra só recomeçou a brotar mais de 40 dias após o tratamento. Decorridos 6 meses foram separadas as plantas mais interessantes, principalmente aquelas em que subsistia a gêmea não tratada; assim, 6 plantas tratadas a 0,2% (figura 1-E), além das gêmeas de 3 delas, foram transplantadas para canteiro fora da casa de vegetação, com os números Cit. 3032 a Cit. 3040.

Enquanto se faziam êstes tratamentos, mais 200 sementes colhidas no I.A. em 28 de maio de 1957 eram semeadas em duas caixas com areia,

na casa de vegetação da Seção de Introdução de Plantas. Setenta plantinhas recém-germinadas foram seccionadas como as anteriores, entre 24 de junho de 1957 e 2 de julho de 1957; a parte que deveria servir como testemunha, nesta experiência, foi completamente separada da outra no momento da operação: dispondo de boa quantidade de raízes e da parte aérea em franco desenvolvimento, essa secção podia já prescindir da fôlha cotiledonar. Assim, cada par de secções recebia um número, indo a secção bem desenvolvida diretamente para canteiro na casa de vegetação enquanto a secção com a gema latente era conservada na estufa a 30°C e umidade 80%. Dentro de 3 a 6 dias o tratamento era feito por imersão em solução de colchicina a 0,3% durante 6 horas, à medida que a gema se mostrava ativa, apenas brotando ou apresentando brôto de 4 a 5 mm de comprimento. Após o tratamento, o material continuava na estufa até apresentar novamente boa atividade vegetativa; assim, 14 a 23 dias depois, eram as plantinhas conduzidas para canteiros com terra, na casa de vegetação, em local previamente reservado ao lado das gêmeas respectivas; destas, aliás, diversas não tinham resistido à separação prematura da semente e tinham morrido. Das secções tratadas, muitas não voltaram a vegetar; outras voltaram, mas morreram antes do transplante, sendo de notar o caso de muitas que apresentaram uma sensível dilatação da gema, sem contudo brotar. Meses depois, ao transplantar para local fora da casa de vegetação, sòmente foram conservadas aquelas que aparentemente eram diferentes das respectivas gêmeas; incluíram-se 22 tratadas e suas gêmeas respectivas e 11 tratadas desacompanhadas das respectivas gêmeas. Receberam a numeração Cit. 3.041 a Cit. 3.073.

Finalmente, entre 2 e 13 de julho de 1957, tratamos as 25 últimas plantas nascidas da sementeira de 29 de maio de 1957. O tratamento pela colchicina a 0,3% durante 4 a 6 horas diferiu do anterior no fato de não se ter procedido à separação das gêmeas na ocasião do tratamento, mas sòmente dias depois, como nos primeiros tratamentos semelhantes. Observou-se, de modo geral, um grande entumescimento da gema adventícia, porém, apenas 8 delas produziram uma nova planta; apenas 4 gêmeas não tratadas sobreviveram; ao serem transplantadas mais tarde para local fora da casa de vegetação, foram assim numeradas: Cit. 3.074 a Cit. 3.085.

3 — RESULTADOS OBTIDOS

De modo geral, as plantas tratadas com colchicina tiveram um desenvolvimento inicial mais lento que as respectivas gêmeas. No entanto, mesmo entre as plantas não tratadas, observava-se grande desuniformidade, prin-

principalmente quanto à forma das folhas, ora largas, ora estreitas, e às nervuras, ora proeminentes, ora não. Esta desuniformidade se devia à origem das sementes, de plantas possivelmente bastante heterozigotas. Tal observação comprovava o alto valor da técnica de produção de gêmeas: entre duas gêmeas, as diferenças morfológicas que se encontrassem deveriam ter como causa o tratamento pela colchicina.

Foi possível, então, separar alguns pares de plantas que aparentemente tinham sido afetadas pelo tratamento. Das plantas resultantes dos primeiros tratamentos, quando ainda a técnica de geminação não era adotada, foram também separadas algumas que, pela textura das folhas, pareciam ter sofrido duplicação dos cromossômios.

O exame dos estomas e, posteriormente, a contagem dos cromossômios, conforme ver-se-á adiante, revelou que, de todo o material tratado, tínhamos 4 plantas com número duplo de cromossômios, duas das quais provenientes dos primeiros tratamentos, sem gêmeas, e duas outras morfológicamente muito diferentes das gêmeas respectivas.

Quando se tornou possível, as seis plantas foram multiplicadas por enxertia pela Seção de Plantas Tropicais, que lhes deu, então, números definitivos dentro da numeração geral dos clones em estudo por aquela dependência.

No quadro 1 tem-se o número de enxertos produzidos de cada clone.

QUADRO 1. — Clones de seringueira obtidos pelo tratamento com solução de colchicina. Número de cromossômios e de enxertos feitos e pegados

Numeração		Cromossômios	Enxertos	
Primitiva	Definitiva		Feitos	Pegados
		2n	n.º	n.º
Cit. 3.026	IAC-4	72	20	18
Cit. 3.030	IAC-5	72	56	44
Cit. 3.046	IAC-6 ⁽¹⁾	36	—	—
Cit. 3.047	IAC-7	72	25	23
Cit. 3.064	IAC-8 ⁽²⁾	36	9	9
Cit. 3.065	IAC-9	72	12	8

(1) IAC-6, com $2n=36$, gêmeo de IAC-7, com $2n=72$; a enxertia do IAC-6 foi feita posteriormente.

(2) IAC-8, com $2n=36$, gêmeo de IAC-9, com $2n=72$.

A duplicação dos cromossômios nessas plantas foi obtida pelo tratamento com colchicina a 0,4% e 0,3% durante 6 horas, de "seedlings" provenientes de sementes que germinaram rapidamente. As observações parecem

mostrar que os tratamentos de "seedlings" provenientes de sementes que demoravam a germinar foram menos eficientes.

3.1 - NÚMERO DE CROMOSSÔMIOS E DE ESTOMAS

A verificação do número de cromossômios foi feita através de contagens em fôlhas muito novas. O método adotado foi o mesmo já descrito detalhadamente em trabalho anterior de um dos autores (3); em resumo, consiste na colheita dos folíolos em fixador de Carnoy, amolecimento em rápida passagem (1 minuto) por uma mistura de álcool a 95% e HCl concentrado na proporção de 3:4 partes, lavagem no mesmo fixador e coloração pelo aceto-carmim férrico. Enquanto nas plantas normais encontramos $2n=36$ cromossômios, (figura 2-A), determinamos $2n=72$ cromossômios (figura 2-B) em diversas plantas tratadas pela colchicina, conforme relatamos em capítulo anterior.

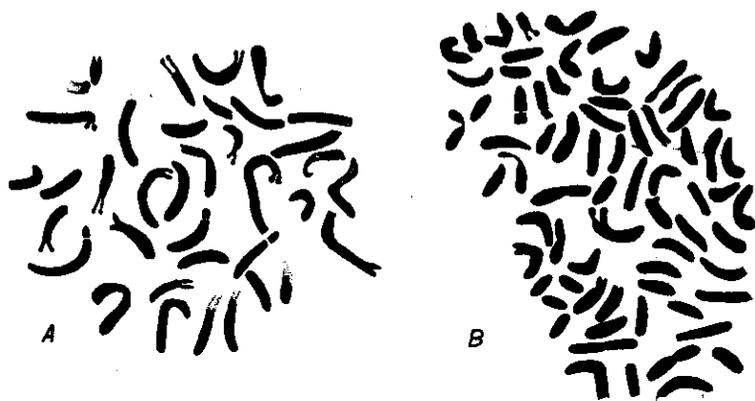


FIGURA 2. - Cromossômios somáticos de seringueira. A - Planta normal; $2n=36$, aumento de $3.380 \times$. B - Planta duplicada, $2n=72$; aumento de $3.380 \times$.

A contagem de estomas foi feita indiretamente pelo método de obtenção de películas de acetato de celulose, conforme método desenvolvido neste Instituto e descrito por Medina (1). Em resumo, o método consiste em se aplicar, sobre pequena extensão da página inferior da fôlha, algumas gotas de acetato de celulose dissolvido em ácido acético, esparramando-as com um pincel; depois de evaporado o ácido acético, resta uma fina película de acetato que é facilmente retirada e que traz muito bem impressos os estomas da fôlha. Colocada a película sobre uma lâmina e recoberta com outra lâmina ou com uma lamínula, pode ser levada ao

microscópio com a introdução, no momento do exame, de uma gôta d'água entre as lâminas.

De cada planta foram examinadas 10 películas retiradas da parte mediana de outros tantos folíolos adultos. Usando uma ocular quadriculada 3x e uma objetiva 20x tínhamos um campo igual a 0,1246 mm². De cada película eram contados os estomas existentes em 10 campos de igual área. Tínhamos assim 100 contagens por planta, das quais se calculava a média que, para comparação final com as demais médias, era transformada em número de estomas por milímetro quadrado.

Pôde-se verificar, no exame dos resultados a seguir expostos, uma variação grande do número de estomas por mm² entre as plantas tetraplóides. A média mais alta, no entanto, ainda é inferior às médias encontradas para as plantas diplóides (quadro 2).

QUADRO 2. — Clones de seringueira obtidos pelo tratamento com solução de colchicina. Número de cromossômios e de estomas

Clones	Cromossômios	Estomas
	n.º	n.º/mm ²
IAC-5	72	177
IAC-7 ⁽¹⁾	72	231
IAC-4	72	237
IAC-9 ⁽²⁾	72	309
IAC-6	36	349
IAC-8	36	455

(1) IAC-7 é gêmeo de IAC-6.

(2) IAC-9 é gêmeo de IAC-8.

Comparadas as gêmeas especialmente, vamos verificar a patente diferença entre os dois elementos de cada par; 231 e 349 num caso e 309 e 455 no outro. Em ambos os casos, o elemento tetraplóide tinha apenas 2/3 do número de estomas encontrado no elemento diplóide.

A variação encontrada entre as plantas tetraplóides deve ser resultante da heterogeneidade das sementes tratadas. Para comprovação do fato, fizemos uma contagem dos estomas de 10 plantas diplóides da mesma idade, escolhidas ao acaso: as médias das 10 plantas variaram de 395 a 677 estomas por mm², variação alta como se esperava.

4 — DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A variabilidade do material de que dispusemos para as experiências, serviu para pôr em evidência o valor do método de tratamento de plantas

gêmeas. No momento em que escrevemos o presente trabalho, desenvolvem-se, satisfatoriamente, as plantas resultantes dos enxertos das matrizes diplóides e tetraplóides; um dos clones, o IAC-5, com $2n=72$, apresenta folhas largas e grossas, e persistentes ao longo do tronco, se bem que com desenvolvimento médio (em altura e diâmetro do tronco) inferior aos demais; por outro lado, o IAC-4, também com $2n=72$, apresenta desenvolvimento médio, nem superior nem inferior ao dos demais, enquanto o IAC-7, com $2n=72$, é o de maior desenvolvimento, quer em altura, quer em diâmetro do tronco (2).

O método de tratamento adotado é satisfatório. Se a duplicação do número de cromossômios trazer um aumento na produção de látex, como se espera, o método pode ser aplicado a clones mais produtivos, ainda com melhores resultados.

As plantas obtidas servirão não só para uma comparação da produção de látex, mas também para estudos de uma possível resistência dos tetraplóides à "Moléstia das folhas", causada pela *Dothidella ulei*. Servirão ainda para um plano de melhoramento por hibridação: a esterilidade dos triploides não será óbice, quando se sabe que a multiplicação da seringueira pode ser feita por via assexual.

COLCHICINE INDUCED POLYPLOIDY OF HEVEA RUBBER PLANTS SUMMARY

Based on the assumption that latex production is positively correlated to the diameter of the latex vessels and hoping to obtain rubber plants with larger latex vessels than those observed in normal plants, the authors duplicated the chromosome number of small seedlings, using aqueous solutions of colchicine. Some polyploid plants with 72 chromosomes were obtained.

A special technique was developed, ensuring the obtention of twin plants from a single seed, by splitting very young seedlings; one of them remained untreated, while the other was submitted to a colchicine aqueous solution. Any difference noted later between the plants could only be attributed to the treatment and in several cases chromosome doubling has been achieved. In this way the pair was constituted by a diploid ($2n=36$) and a tetraploid plant ($2n=72$).

The results show that in the polyploid as compared to the normal plants the stomata are larger and in smaller number per area unit. Some morphological differences were also noticed. Up to now no measurements were taken of the latex vessels neither of the polyplids nor of the normal plants.

The material was propagated by budding, and a large number of each developed clone is being included in field experiments to test their productivity and resistance to diseases.

(2) Resultados de observações feitas em fins de agosto de 1962, sobre enxertos existentes na Estação Experimental "Theodureto de Camargo", em Campinas.

LITERATURA CITADA

1. MEDINA, DIXIER MAROZZI. Uso de acetato de celulose diluído em ácido acético para tomar impressões dos estomas foliares. *Bragantia* 20:xxxix-xli. 1961.
2. MENDES, A. J. T. Duplicação do número de cromossômios em café, algodão e fumo, pela ação da colchicina. Campinas, Instituto Agronômico do Estado de São Paulo, 1939. 21 p. (Boletim técnico n. 57)
3. MENDES, LUIZ O. T. Investigações preliminares sobre a duplicação do número de cromossômios da seringueira — *Hevea brasiliensis* Muell.-Arg. — pela ação da colchicina. Belém, Instituto Agronômico do Norte, 1946. 62 p. (Boletim técnico n. 7)
4. ————— & MENDES, A. J. TEIXEIRA. Obtenção de uma planta normal e outra com o número duplo de cromossômios de uma mesma semente de seringueira. *Ann. Acad. bras. Sci.* 34:xxiii-xxiv. 1962.