

UM ESTUDO CITOLÓGICO COMPARATIVO DE *THALICTRUM* E *ILEX*

Henry Wilhelm Jensen (*)

A escolha dos gêneros *Thalictrum* e *Ilex* como base para o presente estudo se deve à existência de uma condição citológica peculiar entre as suas espécies. Sob alguns aspectos, membros destes gêneros, na região leste dos Estados Unidos, representam extremos de duas linhas divergentes de evolução cromosômica comum à maior parte das formas unissexuais das plantas superiores. Uma comparação destas duas tendências pode sugerir o que produziu sua diversidade e até certo ponto estabelecer o significado de diversos fenômenos citológicos que parecem ser produtos desta evolução.

Além da diversidade de comportamento citológico nos dois gêneros, igualmente importante é a semelhança de hábito sexual. Em ambos os gêneros se encontram formas perfeitas; muitas são polígamas e algumas são funcional ou morfológicamente bem dióicas. Assim, dentro de cada gênero existe uma série que constitui uma transição completa dos hermafroditas aos unissexuais. Por outras palavras, o hábito sexual destes dois grupos parece ser de origem comparativamente recente e nos pode explicar o que aconteceu em outros grupos que agora são estritamente unissexuais e dos quais as formas perfeitas e intermediárias há muito tempo foram eliminadas. Naturalmente, o tempo envolvido é realmente enorme e o uso do termo **recente** deve bem excluir muito de que o homem histórico se lembre ou que o horticultor rotule como uma introdução recente. Dos dois gêneros em investigação, *Ilex* parece ter atingido o estado unissexual antes de *Thalictrum*; no primeiro, não se descreveram espécies que sejam hermafroditas inteiramente (somente indivíduos isolados aqui e ali dentre as espécies polígamas), enquanto algumas espécies de *Thalictrum* na Europa, na Ásia e na América são geralmente hermafroditas. Entretanto, as espécies de *Ilex* estão longe de estabilizadas sexualmente; e isto é evidente por exemplo no conhecido *folklore* do sul da "*Appalachian region*", segundo o qual plantas masculinas

(*) Dean, Warren Wilson College, Swannanoa, North Carolina, U. S. A.

de *Ilex opaca* produzem frutos quando muito velhas e também pela observação do autor de um macho da mesma espécie que produziu frutos cada vez em menor quantidade por vários anos após o seu transplante ; êle é agora completamente masculino e a árvore feminina adjacente não produz pólen se bem que anteras abortivas estejam presentes na maioria das flôres.

O problema é, pois, de comparação. Seu valor não é ilimitado porque as observações se restringiram à microsporogênese e o autor não está preparado para admitir completa semelhança de comportamento em plantas masculinas e femininas dos tipos unissexuais. Como se verificará no capítulo reservado à discussão dêste artigo, as formas aziáticas e européias do gênero *Thalictrum* foram tratadas por Kuhn (5) e Langlet (6) de modo que abundante material existe enquanto, no conhecimento do autor, nenhuma profunda investigação foi publicada sôbre *Ilex*. Algumas formas de *Ilex* da Flórida não estiveram ao alcance do autor ; estas, de acôrdo com as suas relações sistemáticas, devem constituir interessante material para investigação por alguém que esteja mais favoravelmente situado.

MATERIAL E MÉTODOS

Pela coleta de material de *Ilex decidua* e *I. vomitoria* dos espécimes do jardim botânico da Universidade de North Carolina em Chapel Hill, o autor agradece ao Dr. Lindsay S. Olive. Agradece também à Academia de Ciências de North Carolina pela contribuição de uma parte da bolsa de estudos de 1942 da A.A.A.S. para esta investigação. A Srta. Isabel Miller forneceu gentilmente material de *Thalictrum dioicum* de Hot Springs, em North Carolina.

Com as exceções acima especificadas, o material foi coletado no município de Buncombe em North Carolina, a maior parte na área de Swannanoa Valley. A preservação foi feita em fluido de Carnoy ou numa modificação melhorada dêste, cuja fórmula o autor não pode revelar no momento por pertencer a outro laboratório. O material foi então incluído em nitrocelulose quente de acôrdo com a técnica desenvolvida por E. C. Jeffrey (2), e colorido pela hematoxilina férrica de Haidenhain. Os desenhos foram feitos sem o auxílio de câmara clara.

TERMINOLOGIA

Faremos freqüentemente o uso da palavra *heterocromôsomio*, à qual, um ou dois dos seguintes significados se adaptam :

a) um cromossômio que difere em estrutura e comportamento do cromossômio que lhe corresponde fornecido pelo complemento de outro pai (talvez o companheiro sináptico).

b) um cromossômio que não segue o comportamento meiótico dos outros cromossômios no complemento.

INVESTIGAÇÕES

THALICTRUM CLAVATUM DC. (Britt.) ($n=7$) *Hermafrodita*

A microsporogênese em *Thalictrum clavatum* é inteiramente normal. Os sete cromossômios meióticos reúnem-se na placa metafásica para a divisão heterotípica (fig. 1) e subseqüentemente os cromatídeos dirigem-se simultaneamente para os polos do fuso (fig. 3). Os sete cromossômios podem ser contados outra vez durante a divisão homotípica (fig. 5), na qual há uma semelhante regularidade de comportamento. A tetrade usual se forma à conclusão da meiose; os microsporos mostram um desenvolvimento normal e parecem ser estruturalmente perfeitos. Dos cromossômios, quatro parecem ser grandes, dois médios, e um algo menor que os restantes — não é extrema a variação de tamanho.

THALICTRUM CORIACEUM (Britt.) Small ($n=70$) *Dioica*

Também em *Thalictrum coriaceum* a meiose é estritamente normal. O autor encontrou nesta espécie o mais alto número de cromossômios do gênero; no entanto ela vegeta a poucos metros de *Th. clavatum*, que tem o menor número, básico, de sete. Os cromossômios de *Th. coriaceum* são tão numerosos que tendem a formar blocos quando vistos de um ângulo polar durante a metafase heterotípica. É impossível contá-los então (fig. 8). Durante a anafase (cedo ou tarde) o mesmo acontece (figs. 7 e 10). Assim, o fim da profase oferece a única oportunidade satisfatória para contagem. Cêrca de 70 cromossômios são observados, se bem que sejam comuns as associações de dois ou mais cromossômios. Não se observam cromossômios atrasados nem precoces e em momento nenhum há expulsão de cromatina ao citoplasma. A tetrade é usual; os microsporos são perfeitos.

THALICTRUM DIOICUM L. ($n=14$) *Dioica*

Thalictrum dioicum é uma espécie tetraplóide em que o número reduzido é catorze (fig. 11). Um cromossômio parece ser substancialmente menor que os restantes. A não ser isso, parecem estar presentes dois grupos duplicados de cromossômios. A variação em tipo de cro-

mosômio e conexão do fuso é bem demonstrada na fig. 12. São inteiramente normais as divisões homo- e heterotípicas, e também o desenvolvimento do pólen.

THALICTRUM POLYGAMUM Muhl ($n=42$) *Polígamo*

Uma investigação nesta espécie foi feita pela primeira vez pelo autor (8) quando parecia haver alguma razão para se acreditar que a condição *polígama* das flôres devia indicar alguma irregularidade entre os cromosômios. Nenhuma foi encontrada então e nem depois. Esta espécie tem o número reduzido de 42 (fig. 16) e é inteiramente regular em tôdas as fases da meiose. Nenhum cromosômio se perde no citoplasma no fim da primeira divisão (fig. 15) e quase todos os cromosômios parecem ter aproximadamente o mesmo tamanho.

Estas quatro espécies de *Thalictrum* que incluem os limites de variação em número de cromosômios 7, 14, 42 e 70 até agora encontrados, são uniformemente regulares em comportamento meiótico. Além disso, não há diferença essencial no comportamento perfeito dos tipos polígamos ou dióicos.

ESPÉCIES DE ILEX · PARTE GERAL

Não é fácil a investigação das "*holliés*" americanas. Os cromosômios são muito pequenos, a coloração deve ser feita com cuidado, e a diferenciação deve ser observada de perto. Os cromosômios têm uma tendência para se juntar na placa metafásica e como o fuso é comprido e muito estreito, os cromosômios raramente se dispersam suficientemente para que se possa fazer uma contagem segura. *Ilex decidua* é uma agradável exceção, pois que seus cromosômios se espalham durante a maior parte dos estados ativos. As profases são de difícil estudo, não só pelo reduzido tamanho dos núcleos como porque os cromosômios ficam ligados no que parece ser um espirema fundamentalmente contínuo, até o momento em que desaparece a membrana nuclear. A importância desta observação será discutida mais tarde. Omitimos os desenhos dos estados da meiose normal por julgarmos desnecessários.

ILEX DECIDUA Walt. ($n=20$)

Uma vista polar da primeira divisão meiótica durante a microsporangênese em *Ilex decidua* mostra vinte cromosômios, quatro dos quais são relativamente grandes e dois bem pequenos (fig. 18). Estes se arranjam mais ou menos irregularmente pela placa durante a metafase. Em alguns cromosômios os cromatídeos separam-se mais rapidamente

que em outros e há uma tendência da parte de algumas unidades para ligar a parte associada dos cromatídeos através do centro da célula (fig. 17). Apesar da pesquisa pela evidência em contrário, todos os cromatídeos parecem se tornar parte dos núcleos filhos — nenhum traço de cromatina foi encontrado no citoplasma durante a telófase. Durante a segunda divisão (fig. 19), alguns "laggards" foram observados e alguns deles expulsos do fuso e abandonados no citoplasma depois da segunda telófase (fig. 20). Entretanto, a julgar pelo tamanho da cromatina expulsa, somente um cromossômio parece ser suficientemente incompatível, o qual parece ser um cromossômio anafásico, da segunda divisão. Este não é naturalmente o primeiro exemplo em que uma anormalidade meiótica não se apresenta na primeira divisão, mas é evidente na segunda.

A presença da cromatina expulsa limita-se a menos da metade das CMPs. se bem que alguns sacos polínicos mostrem irregularidades em quase todas as células enquanto em outros nenhuma célula dentro da secção contém cromossômio expulso. Uma tal variação extrema é também verificada em sacos polínicos adjacentes no mesmo filete.

ILEX MONTICOLA Gray ($n=20$)

Os cromossômios na primeira metafase em *I. monticola* são na maior parte aglomerados em uma massa compacta (fig. 21). Ocasionalmente, o número haplóide de 20 (fig. 26) nesta espécie pode ser distintamente contado em anafase. Nenhuma anormalidade ocorre até o fim de anafase, quando surgem alguns cromossômios atrasados (fig. 22). Em cerca de metade das CMPs. um dos cromatídeos-filhos do menor cromossômio é abandonado no citoplasma no fim da primeira divisão (fig. 23). Este cromossômio parece ainda se dividir, mas apenas chega a atingir forma de alteres, parecida com a de um cromossômio normal durante o início de anafase. Durante a segunda divisão meiótica o pequeno cromatídeo é ainda visível (fig. 24). Incluímos a fig. 25 porque ela mostra o heterocromossômio no processo de divisão e possivelmente exhibe também um estado excepcional da ocorrência de uma parte de um cromossômio no fuso de uma outra figura de divisão; nota-se que é um fragmento muito pequeno que fica no centro de um fuso anafásico e que se assemelha ao pedaço do heterocromossômio em forma de alteres, que tem apenas três secções. Podemos resumir a condição citológica nesta espécie dizendo que a irregularidade se restringe a um heterocromossômio que se perde e degenera no citoplasma. No citoplasma dos microsporos não se encontra nenhum vestígio daquele singular pedaço de cromatina;

aparentemente êle é absorvido no início da formação de tetrade. O pólen parece ser bastante normal, existindo, porém, uma diferença na velocidade de desenvolvimento. Cêrca de metade dos microsporos se colore muito mais profundamente que os restantes. Nos estados iniciais de crescimento, nota-se também uma diferença em densidade do citoplasma e a percentagem é aproximadamente a mesma. Entretanto, não há micronúcleos no material estudado e também parece não haver grãos de pólen abortivos; nesse material o pólen estava praticamente maduro.

ILEX OPACA Ait. ($n=18$)

Dos dezoito cromosômios meióticos de *Ilex opaca* (fig. 29) seis são bem grandes, onze são de tamanho médio variável e um é distintamente pequeno. Um heterocromosômio é presente; êle parece ser precoce em relação à divisão, pois que, freqüentemente, se divide duas vêzes durante a primeira divisão meiótica. Entretanto, êste cromosômio de tamanho médio se atraza em relação ao movimento no fuso e pode ser visto na placa equatorial quando os cromosômios restantes já atingiram os polos. Todo êle ou uma sua parte é abandonada no citoplasma no fim da primeira divisão em cêrca de 50% das CMPs. Durante a segunda divisão meiótica nada parece acontecer à cromatina expulsa até a formação de tetrade, quando ela desaparece no citoplasma. Freqüentemente o pedaço de cromatina (a maior parte das vêzes é apenas um pedaço) permanece ao longo da parede celular e mesmo induz a parede à formação de uma protuberância nesse lugar (fig. 31). O tamanho do heterocromosômio expulso e a observação do seu comportamento inicial sugerem que, na maioria dos casos, um dos dois cromatídeos-filhos da primeira divisão meiótica ou é incluído nos grupos telofásicos de cromosômios da primeira divisão ou se torna parte de um grupo mitótico durante a segunda divisão. Os cromatídeos restantes iniciam e às vêzes completam uma segunda divisão durante a parte final da primeira e regular divisão meiótica. Os cromatídeos-filhos desta divisão não se separam inteiramente, mas reúnem-se em uma massa globular que jáz à periferia da célula onde degenera antes da citoquinese.

É de algum interêsse a observação de que durante a anafase heterotípica quatro dos maiores cromosômios são intimamente associados (fig. 28). Por ser de 20 o número reduzido de algumas outras espécies de *Ilex* talvez êste fenômeno em *Ilex opaca* seja mais uma evidência de que o número básico para o gênero tenha sido de cinco em outros tempos, se bem que num passado remoto, porque o resto dos cromosômios

não parece cair em qualquer de tais agrupamentos, e há somente um cromosômio muito pequeno.

Em *Ilex opaca* a anormalidade meiótica em cerca de 50% das CMPs. é o aparecimento de um heterocromosômio, metade do qual é geralmente expulsa para o citoplasma, onde degenera. O pólen é altamente regular, se bem que se encontrem alguns grãos abortivos.

ILEX VERTICILLATA (L.) Gray ($n=18$)

Os cromosômios meióticos de *I. verticillata* são interessantes por causa do seu número e da presença de mais de um heterocromosômio. É particularmente difícil o estudo dos cromosômios nesta espécie por causa de sua aglomeração e porque as velhas conexões de espirema freqüentemente aparecem ainda no início da anafase de modo que mesmo sob uma vista polar, diversos cromosômios se acham inter-ligados. Parecem ser 18 cromosômios. A fig. 32 representa uma das metafases mais normais encontradas, e foi ampliada na fig. 36 para mostrar a natureza do único cromosômio, o qual é muito menor do que qualquer outro do complemento. Além disso, este tão pequeno cromosômio parece ser tripartido e quando é expulso do fuso, um maior e um menor pedaços de cromatina são encontrados freqüentemente próximos um do outro (fig. 34). Entretanto, metade de um cromosômio de tamanho médio também parece ser indesejável nos complementos-filhos, e ele também jáz no citoplasma em aproximadamente metade das CMPs. no fim da primeira divisão meiótica. A fig. 33 mostra uma anafase normal sem qualquer cromatina "atrazada" ou expulsa. A fig. 37 é uma vista polar da metafase heterotípica e mostra 16 cromosômios livres--note-se que um deles é muito pequeno -- e dois que são ligados por uma parte do velho espirema.

A cromatina expulsa parece degenerar logo nesta espécie, não se encontrando dela qualquer traço nas figuras de segunda divisão. Naturalmente o material deve se incluir de novo nas figuras homotípicas. Os cromosômios são muito pequenos, enovelados durante esta divisão, para serem contados com suficiente exatidão de modo a determinar se a cromatina expulsa é ainda ausente ou restabelecida. Os microsporos parecem passar por um desenvolvimento normal, porém em cerca de metade dos grãos de pólen há uma concentração mais rápida do protoplasma do que nos outros. Pode haver ou não qualquer significado para esta observação.

Devermos nos lembrar que um cromosômio notavelmente pequeno também foi encontrado em *Ilex decidua* e *I. opaca*, mas nestas espécies

êle se comportara normalmente. Em *I. verticillata*, entretanto, o pequeno cromosômio é também heterocromático no comportamento e comumente tripartido em construção.

ILEX VOMITORIA Ait ($n=20$)

O número reduzido de cromosômios em *Ilex vomitoria* parece ser vinte (fig. 40) e inclui um cromosômio muito pequeno, cujo comportamento é normal nesta espécie. No material que tivemos às mãos, nenhuma cromatina expulsa foi encontrada durante a microsporogênese. A segunda divisão é inteiramente normal; não se encontram microsporos abortivos. A peculiaridade desta espécie é quanto a um complexo tripartido que freqüentemente forma uma ponte através a anafase heterotípica inicial (fig. 38), a qual persiste ocasionalmente mesmo até o fim da anafase (fig. 39). Nem todos os cromosômios se encontram no equador durante a metafase (fig. 41); entre os esparsos pelo fuso podem ser freqüentemente encontrados dois tipos: um é da forma usual e o outro é o complexo tripartido (fig. 43). Se bem que a segunda divisão seja bastante regular nesta espécie, os cromosômios são muito pequenos, agregados, para se contar com certo grau de exatidão. Se isso não acontecesse, seria possível traçar a disposição do cromosômio tripartido —, para verificar se êle determinou o estabelecimento de dois complementos diversos, como aquêles que se diz existir em diversas espécies de *Rumex*. Naturalmente, contagens para confirmar ou não esta segregação foram feitas. Algumas delas realmente confirmaram-na, outras confundiram-na. Não há seguramente base para uma opinião categórica; o estudo poderia ser tentado por alguém que tivesse menos cuidado pela sua vista e mais imaginação do que o autor...

DISCUSSÃO

Poliploidia e Aneuploidia

Considerando apenas as espécies do leste americano, os gêneros *Ilex* e *Thalictrum* apresentam extremos de desenvolvimento citológico. O primeiro é estritamente aneuplóide e dado à formação de heterocromosômios; o segundo é vastamente poliplóide, extremamente regular em comportamento meiótico. Ambas condições são agora geralmente encaradas como tendo sua origem em hibridação prévia no grupo. Particularmente, quanto à poliploidia é êsse o caso. Kuhn (5) chegou a essa conclusão após o estudo do número de cromosômios de 37 espécies e formas de *Thalictrum*. Com poucas exceções, nas 60 espécies e varie-

dades investigadas por êle e Langlet (6) sòmente se estudaram figuras meióticas. Outro trabalho foi executado por Day (1) em *Th. Fendleri* e por Overton (7) em *Th. purpurascens*, mas principalmente quanto à partenogênese, a qual, segundo Kuhn, não pôde ser bem estabelecida. Das 70 espécies reconhecidas por Engler-Diels, o número de cromosômios foi agora determinado para 63 formas, o que deve retratar o gênero com bastante exatidão. Onde a divisão de redução foi estudada, fala-se sempre da mesma regularidade de comportamento meiótico, e aquelas espécies incluem números reduzidos na seguinte série: 7, 14, 21, 28, 35, 42 e 70. Para *Th. purpurascens* Langlet determinou $n=21$, mas Overton e Kuhn, separadamente, encontram aí uma exceção em que $n=12$. A não ser êste caso, a espécie faz uma nítida série de 7 a 70 incluindo tanto espécies dióicas como perfeitas. As espécies com o número básico de 7 cromosômios não se restringem a uma dada região; assim, temos, por exemplo:

<i>Th. aqualegijolium</i>	--- Europa e Ásia
<i>Th. petaloideum</i>	--- Ásia
<i>Th. Przewalskii</i>	--- China
<i>Th. montanum</i>	--- Europa
<i>Th. clavatum</i>	--- América do Norte

Os números mais altos distribuem-se também pelo hemisfério norte, mas se restringem largamente aos tipos dióicos. As formas perfeitas têm números haplóides de 7 a 21, enquanto as unissexuais vão de 7 a 70. Diferentes números são freqüentemente dados para a mesma espécie, mas em cada caso o número cai dentro da progressão. Aparentemente houve também poliploidia intra-específica. Não podemos concluir como no caso de *Rumex* --- Jensen (3) --- que a poliploidia tenha expandido as espécies perfeitas e que a secção dióica do gênero se tenha restringido a variações aneuplóides do número diplóide ou tetraplóide. Muito ao contrário, porque no caso de *Thalictrum*, os números mais altos encontram-se entre os tipos unissexuais. Outros gêneros que exibem semelhantes extremos de poliploidia são hermafroditas, e quase unânimemente os investigadores atribuem a multiplicação de complementos cromosômicos à hibridação prévia. Podemos, portanto, concluir, no exemplo de *Thalictrum*, que a hibridação foi responsável pela poliploidia e que, como alguns dos números mais altos são encontrados entre formas dióicas, a hibridação com conseqüente poliploidia ocorreu **antes** do advento da condição dióica.

O extremo oposto é encontrado nas espécies estudadas de *Ilex*: três espécies com 20 cromosômios meióticos e duas com 18. Em cada

caso aparecem heterocromosômios entre as CMPs; além disso outros característicos diagnósticos como cromosômios atrasados e precoces, cromatina expulsa, diferentes proporções de crescimento dos microporos, lembram-nos do comportamento meiótico típico de híbridos. Esta condição é também bastante típica de um número de gêneros unissexuais que são aneuplóides e nos quais se descreveram heterocromosômios, como *Smilax*, *Dioscorea* e a secção dióica de *Rumex*. Devemos lembrar neste ponto que uma referência anterior foi feita à ausência em *Ilex* de espécies distintamente de flôres perfeitas, em contraste com a sua presença em *Thalictrum*, com a conjetura que *Ilex* tomou a direção da unissexualidade antes de *Thalictrum*. No caso de *Ilex* é possível que a hibridação da espécie tenha ocorrido **simultaneamente** ou **depois** do advento da condição dióica. Vamos admitir esta hipótese e ver que limitações seriam impostas pela simultânea interação de duas forças muito elementares: hibridação interespecífica e o estado unissexual.

Entre as plantas superiores hermafroditas o arranjo geral exige a maturação do pólen e do saco embrionário aproximadamente ao mesmo tempo na mesma planta, de modo que a autopolinização é mais variável que a polinização cruzada. Por assim dizer, não nos esqueçamos das numerosas exceções em que a maturação de um tipo de esporos é atrasada, ou a flor de tal modo construída, ou a espécie auto-estéril de modo que o que se dá é a polinização cruzada. Entretanto, a situação geral é perturbada quando uma raça de plantas começa a eliminar um tipo de tecido esporogênico das flôres num dado indivíduo. As probabilidades da ocorrência de autopolinização decrescem progressivamente até que se estabeleça o estado funcional dióico. Cada ato de fertilização então envolve a introdução de protoplasma que é até certo ponto estranho à célula-ovo —, protoplasma de um outro indivíduo, talvez da mesma raça, mas assim mesmo diferente, pois que não há dois indivíduos exatamente iguais. Fôssem as espécies geneticamente bem estabilizadas, o advento da condição dióica não determinaria distúrbios no processo meiótico; lembremos a este respeito, da centena de plantas unissexuais que não mostram senão um sistema normal de meiose, particularmente os gêneros monotípicos, nos quais a única espécie não tem parente próximo com o qual se cruzar. Por outro lado, se as espécies afins e próximas admitirem polinização cruzada, deve ocorrer uma hibridação inter-específica. Com ela vêm as irregularidades meióticas usuais: cromosômios precoces ou atrasados, distribuição desigual de cromosômios, núcleos e esporos múltiplos, esterilidade, etc. Subseqüentemente cada ato de fertilização serve para reintroduzir alguma coisa que descontrola o sistema meiótico. Assim, geração após geração, as plantas unissexuais se vão tornando

geneticamente misturadas. Aparentemente estas formas unissexuais desenvolvem certo grau de tolerância, pois, do contrário, a desvantagem que levariam pela fertilidade decrescente devida à má distribuição, letal, dos cromosômios durante a meiose, determinaria sua gradual eliminação na competição com suas vizinhas hermafroditas. Com toda probabilidade este deve ser o caso, algumas vezes. Entretanto, a persistência de numerosos tipos unissexuais por longos períodos de tempo sugere que é possível a existência de um certo grau de tolerância citológica. E, entretanto, esta mesma tolerância também não permite que aconteça o que parece ser comum entre as plantas perfeitas: nestas, o distúrbio meiótico produzido pela hibridação é tão intenso que, em alguns casos, a divisão heterotípica se interrompe. Forma-se um núcleo de restituição, o número de cromosômios dobra, e assim se restauram a fertilidade e a meiose normal. Todavia, quando se descontrola o processo meiótico nas formas unissexuais, mas não tanto que dê para a formação de anfidiplóidia, haverá uma tendência para impedir a poliploidia e reter o número básico de cromosômios com uma tendência ainda para a diminuição do número (aneuploidia negativa) pela exclusão de cromosômios de alguns dos microsporos, exclusão essa que não impede a formação do tubo polínico e eventual fertilização.

Este parece ser o caso que ocorre com *Ilex*. O número básico do gênero parece ser 20, e isto particularmente pelo fato da observação em *Ilex opaca* de 4 grandes cromosômios freqüentemente formando um quarteto o que talvez indique que, originalmente, o número básico era de 5, o qual num período de hibridação se elevou a 20 e mais recentemente diminuiu em algumas espécies por um outro período de hibridação após o advento da condição dióica. Este processo pode ter determinado o número $n=18$ em *Ilex opaca* e *I. verticillata*.

O esquema de incidentes acima delineado pareceria ser responsável pela diferença em topografia cromosômica nos dois gêneros, *Thalictrum* e *Ilex*, os quais tomaram o hábito unissexual e sofreram hibridação. Em vista das condições impostas por estes dois fatores modificadores e dos nossos conhecimentos da citologia dos híbridos, a diferença em épocas clama ao autor como uma hipótese firmemente alicerçada. No caso de *Thalictrum*, a hibridação deu-se antes, permitindo que se completasse um largo sistema poliplóide antes da mudança para a unissexualidade. No caso de *Ilex*, a hibridação ocorreu simultaneamente ou mesmo depois da ocorrência da unissexualidade.

Entre as plantas unissexuais encontra-se freqüentemente um terceiro grupo --- constituído pelos gêneros em que as espécies são diplóides ou

tetraplóides, como *Populus*, *Salix*, e a espécie dióica de *Lychnis*. Talvez através de um estudo mais apurado dêste grupo em relação aos tipos extremos discutidos neste artigo se chegue a um ciclo completo de fatos que abrangerá as várias formas produzidas pela interação da hibridação e da diferenciação sexual.

HETEROCROMOSÔMIOS

O aparecimento de heterocromosômios em algumas CMPs. de tôdas as cinco espécies de *Ilex* em estudo, provavelmente só tem importância por fortalecer a opinião do autor de que serão encontrados heterocromosômios entre as espécies de qualquer grupo variável que simultaneamente caminhou para a hibridação e o hábito unissexual. Não é de surpreender que se encontrem vários tipos de heterocromosômios. Os seguintes foram encontrados em *Ilex*:

- I. decidua* --- Um cromosômio de tamanho médio da segunda divisão meiótica --- um cromatídeo expulso em cêrca de metade das CMPs. Degenera.
- I. monticola* --- O menor cromosômio do complemento --- um cromatídeo expulso durante a primeira divisão meiótica. Degenera.
- I. opaca* --- Um cromosômio atrazado, de tamanho médio --- um ou ambos cromatídeos-filhos expulsos durante a primeira divisão meiótica. Degenera.
- I. verticillata* --- Um cromosômio muito pequeno, tripartido e atrazado --- um cromosômio de tamanho médio tem um cromatídeo-filho expulso em cêrca de metade das CMPs. A cromatina expulsa degenera.
- I. vomitoria* --- Dois tipos de heterocromosômio: um atrazado de tamanho médio, e um tripartido do tipo de ponte anafásica. Não há expulsão de cromatina.

É interessante o complexo tripartido visto em algumas CMPs. de *I. vomitoria* porque pode representar um estado intermediário no desenvolvimento do tipo mais notório de complexo tripartido encontrado nas CMPs. de algumas espécies de *Rumex*. Neste último caso, sua presença e seu comportamento têm sido interpretados como significativos de intervenção na determinação do sexo, e por essa razão êles têm sido

encarados há bastante tempo como cromosômios sexuais. O autor re-investigou as formações de heterocromosômios em alguns dos casos clássicos em *Rumex* (3), sem chegar a uma conclusão tão taxativa. Há muitas razões para se acreditar que estes assim chamados cromosômios sexuais são tipos exatos de heterocromosômios, cuja origem está firmemente ligada à prévia hibridação, e cuja ocorrência é regulada pela determinação do sexo e não o sexo determinado pela presença deste tipo especial de cromosômio. Uma atenção crescente à citologia das formas intermediárias entre os tipos estritamente dióicos e os perfeitos, e a admissão ao nosso pensamento de um mais amplo conhecimento do comportamento das plantas, devem corroborar com a opinião do autor sobre este assunto. A evidência da formação de heterocromosômios nas espécies de *Ilex* acima citadas é uma contribuição para este fim. A variedade de comportamento heterocromosômico nestas cinco espécies é importante, pois ela indica porque existe tal diversidade entre os assim chamados cromosômios sexuais das espécies de *Rumex* e porque algumas das espécies não têm heterocromosômios. Seria difícil conceber como cromosômios sexuais que reaparecem com regularidade e têm um bem definido padrão de comportamento, podem surgir tão de repente. É mais razoável admitir que sejam necessárias várias gerações para o seu desenvolvimento, e se isso for verdade, a única fonte de "cromosômios do sexo" potenciais deve ser encontrada justamente entre tais tipos como as espécies de *Ilex* aqui descritas. Certamente o heterocromosômio tripartido em *I. vomitoria* não tem uniformidade de comportamento e não se mostrou visível em metade das células estudadas; além disso não há confirmação de sua presença durante a mitose somática, mas o mesmo se dá em vários casos dos chamados "cromosômios sexuais". Por exemplo, a opinião se acha bem dividida quanto à existência de heterocromosômios em *Rumex acetosella*. Uma escola diz que há, outra insiste em que não há, e, no entanto, o autor viu células em que havia dois grupos. ¶ Quem está com a razão? Provavelmente todos, dentro dos limites de suas observações. A variabilidade é certamente uma característica reconhecida nas plantas de origem híbrida e os cromosômios sexuais acham-se invariavelmente associados com outros caracteres diagnósticos de hibridação. À medida que se obtiverem informações sobre uma maior variedade de formas tornar-nos-emos capazes de traçar a evolução dos heterocromosômios com maior exatidão. Precisamos estudar mais tipos como *Benzoin acitivale*, Jensen (4), nos quais os heterocromosômios estão em processo de formação. Neste exemplo foi encontrado no macho um tipo X-Y de heterocromosômio. Fazemos

agora apenas a sugestão de que os tipos de comportamento heterocromossômico em cinco espécies de *Ilex* nos fornecem algumas irregularidades meióticas que parecem ser intermediárias entre os autosômios que se comportam normalmente e os tipos especializados de heterocromossômios chamados cromossômios sexuais.

A HEREDITARIEDADE DAS IRREGULARIDADES MEIÓTICAS

A tendência geral para eliminar cromatina dos núcleos em cerca de 50% das CMPs. de quatro espécies de *Ilex* em investigação apresenta uma base para especulação. Se bem que os números aneuplóides de que se fez menção indiquem que alguma mudança afetou o número básico de cromossômios do gênero, há também forte indicação de que a mudança se operou muito vagarosamente e que num determinado período o número de cromossômios se tornou constante. Mas as anormalidades meióticas persistem — um tipo de anormalidade que acarretaria a diminuição do número de cromossômios — portanto, os microsporos que contêm os núcleos deficientes, em sua maior parte, não chegarão a efetuar uma fertilização. E assim, as CMPs. funcionais devem ser aquelas em que ocorre meiose normal. Isto é paradoxal, pois a anormalidade meiótica que aparentemente persiste durante muitas gerações se transmite através do tecido esporogênico que não manifesta o caráter. Como dissemos anteriormente, não há um comportamento uniforme — em alguns sacos polínicos, tôdas as CMPs. contêm cromatina expulsa, em outros apenas a metade e finalmente noutros nenhuma apresenta cromatina expulsa. Não há uniformidade entre sacos adjacentes no mesmo estame. É possível que tôdas as CMPs. nestas espécies de *Ilex* sejam potencialmente anormais em comportamento meiótico, mas em alguns casos o distúrbio que faz aparecer o heterocromossômio é suprimido. Os estudiosos da citologia dos híbridos têm notado mais freqüentemente irregularidades menos pronunciadas na megasporogênese do que nas CMPs. em espécies hermafroditas em que a disposição genética deveria ser a mesma para ambos os tipos de tecidos esporogênicos. Aparentemente, o tecido envolvente pode afetar o comportamento interno de uma célula separada em alguns casos. O autor não se aventura a opinar mais que isto. A explicação para êste paradoxo talvez possa ser encontrada pela extensão dos argumentos acima, mas, por enquanto, parece não ser aproveitável levar mais avante a questão. Deve servir somente para mostrar que todos aquêles que acreditam que os livros atuais de citologia já apresentaram ao mundo uma nítida explicação dos mistérios que nos confundem na vida celular, são facilmente enganáveis e pouco curiosos.

SUMMARY

1. New chromosome numbers have been determined for the following species from material collected in various counties of North Carolina, U.S.A.

<i>Thalictrum clavatum</i>	n = 7
<i>Th. dioicum</i>	n = 14
<i>Th. polygamum</i>	n = 42
<i>Th. coriaceum</i>	n = 70
<i>Ilex decidua</i>	n = 20
<i>I. monticola</i>	n = 20
<i>I. vomitoria</i>	n = 20
<i>I. opaca</i>	n = 18
<i>I. verticillata</i>	n = 18

2. The genus *Thalictrum* has been rather well investigated cytologically but the genus *Ilex* has not yet received the attention it merits, and offers cytologists in North, Central, and South America an opportunity to study an extensive genus which has been, and probably is, undergoing interespecific hybridization while a shift from the hermaphroditic to the unisexual habit is also well established. These two great evolutionary factors, hybridization and the advent of the dioecious condition, appear to stimulate divergent lines of meiotic behavior depending upon whether or not they appear in the phylogeny of a race simultaneously or successively, and in the case of the latter, which came first. The genus *Thalictrum* was used as a basis for comparison with the situation as found in the eastern North American forms of *Ilex* with the following conclusions.

- a. The genus *Thalictrum* is vastly polyploid and meiotically regular. This condition is thought to be the result of previous hybridization of the species **before** the advent of the dioecious habit.
- b. The genus *Ilex* is, as far as research has gone, negatively aneuploid and frequently irregular meiotically. This condition is thought to be the result of previous hybridization of the species **after**, or no more than simultaneously with, the advent of the dioecious habit.

3. Heterochromosomes were found in microsporogenesis of all five species of *Ilex*, along with other meiotic peculiarities of suggested hybrid origin, but no two were alike. Behavior of the heterochromosomes was not found to be consistent and in approximately 50% of the PMCs. meiosis was normal. Findings are summarized in following table.

Heterochromosome Complex		Division in which first seen.	Chromatin ejected.	Other diagnostic hybrid characteristics.
Species	Type of Chromosome			
<i>I. decidua</i>	Medium	Homeotypic	One chromatid during second anaphase.	Laggards anaphase bridges
<i>I. monticola</i>	Smallest member of complement	Heterotypic	One chromatid during first anaphase. Left in cytoplasm	Lagging Precocious chrom.
<i>I. opaca</i>	Medium	Heterotypic	Whole chrom. One chromatid sometimes accepted by complement in second div.	Lagging chrom.
<i>I. verticillata</i>	Two types. One tripartite X--X ₁ Y ₂ small Other medium	Heterotypic Heterotypic	Yes. Degenerates during first telophase. Yes. Degenerates during first telophase.	
<i>I. vomitoria</i>	Medium sized tripartite complex	Heterotypic	None found	A number of laggards during first division

4. In view of the generally stable chromosome number for the five species of *Ilex* investigated, only such pollen as arises from PMCs, which possess the normal meiosis may produce the gametes which effect fertilization. This presents the problem of explaining how the ability to produce meiotic abnormalities is inherited through cells which do not exhibit it or through the female side and its significance on the whole question of the evolution of sex chromosomes from various types of heterochromosomes.

5. A comparison of the cytology of species of *Thalictrum* and *Ilex* adds support to the author's earlier contention that so-called sex chromosomes in higher plants have their origin in special types of heterochromosomes which in turn owe their appearance to meiotic disturbances induced by previous hybridization of the species and preserved through the more or less simultaneous advent of the dioecious habit. In the author's opinion, the genus *Ilex* offers an opportunity to increase our knowledge of what occurs during the stage intermediate between autosome and the specialized types of sex-linked heterochromosomes.

LITERATURA CITADA

1. Day, D.F. Parthenogenesis in *Thalictrum Fendleri* Bot. Gaz. 22:41. 1896.
2. Jeffrey, E.C. Technical Contributions Bot. Gaz. 86:456-467. 1928.
3. Jensen, H.W. Meiosis in *Rumex*. II The origin and behavior of the so-called sex-chromosomes in *Rumex*. Cytologia 7:23-34. 1936.

4. **Jensen, H.W.** Heterochromosome formation in *Benzoin aestivale* (L) Nees. *Cytologia* **11**:591-599 1941.
5. **Kuhn, E.** Zur Zytologie von *Thalictrum*. *Jahr. wiss. Bot.* **68**:382-430 1928.
6. **Langlet, O.** Beitrage zur Zytologie der Ranunculazeen *Sv. Bot. Tids.* **21**:1-17 1927.
7. **Overton, J.B.** Über Parthenogenesis bei *Thalictrum purpurascens*. *Vorl. Mitt. Ber. d. Deutsch. Bot. Ges.* **22**:274-288 1904.
8. **Jensen, H.W.** The Origin of Sex Chromosomes in Higher Plants *La Cellule.* **48**:49-60 1939.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

ESTAMPA I

Figuras 1-6. *Thalictrum clavatum*. Microsporogênese.

- Fig. 1 --- Vista lateral de metafase heterotípica
 " 2 --- Vista polar de metafase heterotípica. $n=7$
 " 3 --- Anáfase heterotípica
 " 4 --- Vista polar de anáfase heterotípica
 " 5 --- Vista polar de um complemento metafásico em divisão homotípica
 " 6 --- Metafase da segunda divisão meiótica.

Figuras 7-10. *Th. coriaccum*. Microsporogênese.

- Fig. 7 --- Metafase heterotípica. Note-se a uniformidade dos cromosômios
 " 8 --- Vista polar da mesma para mostrar o agrupamento dos cromosômios
 " 9 --- Núcleo pre-meiótico para mostrar 70 cromosômios em diaquênese
 " 10 --- Anáfase heterotípica

ESTAMPA II

Figuras 11-14. *T. dioicum*. Microsporogênese

- Fig. 11 --- Metafase heterotípica. Vista polar. $n=14$
 " 12 --- A mesma, vista polar, mostrando vários tipos de cromosômios
 " 13 --- Anáfase heterotípica
 " 14 --- Fim da segunda divisão meiótica.

Figuras 15-16. *T. polygamum*. Microsporogênese

- Fig. 15 --- Anáfase heterotípica
 " 16 --- Contagem de cromosômios na divisão heterotípica. $n=42$

ESTAMPA III

Figuras 17-20. *Ilex decidua*. Microsporogênese

- Fig. 17 --- Metafase heterotípica. Vista lateral
 " 18 --- Metafase heterotípica. Vista polar. $n=20$
 " 19 --- Segunda metafase meiótica mostrando expulsão de cromatina
 " 20 --- Quarteto nuclear e degenerescência de cromatina no citoplasma.

Figuras 21-22. *I. monticola*. Microsporogênese

- Fig. 21 --- Metafase heterotípica
 " 22 --- Anáfase da divisão heterotípica mostrando "laggards".

ESTAMPA IV

Figuras 23-26. *I. monticola*. Microsporogênese

- Fig. 23 --- Telofase da 1.^a divisão, com cromossômio expulso do citoplasma
- „ 24 --- Metafase homotípica
- „ 25 --- Anafase homotípica mostrando "laggard" e cromatina expulsa.
- „ 26 --- Metafase heterotípica. Vista polar. $n=20$.

Figuras 27-29. *I. opaca*. Microsporogênese

- Fig. 27 --- Metafase heterotípica mostrando heterocromossômio
- „ 28 --- Vista polar de dois tipos de configurações anafásicas, uma das quais mostra quatro grandes cromossômios associados
- „ 29 --- Vista polar da divisão heterotípica. $n=18$

ESTAMPA V

Figuras 30-31. *I. opaca*. Microsporogênese

- Fig. 30 --- Anafase heterotípica mostrando cromatina expulsa
- „ 31 --- Cromatina ainda visível no citoplasma à telofase da 2.^a divisão.

Figuras 32-35. *I. verticillata*. Microsporogênese

- Fig. 32 --- Metafase heterotípica
- „ 33 --- Anafase heterotípica, forma regular
- „ 34 --- Telofase da 1.^a divisão mostrando cromatina expulsa
- „ 35 --- 2.^a divisão meiótica regular

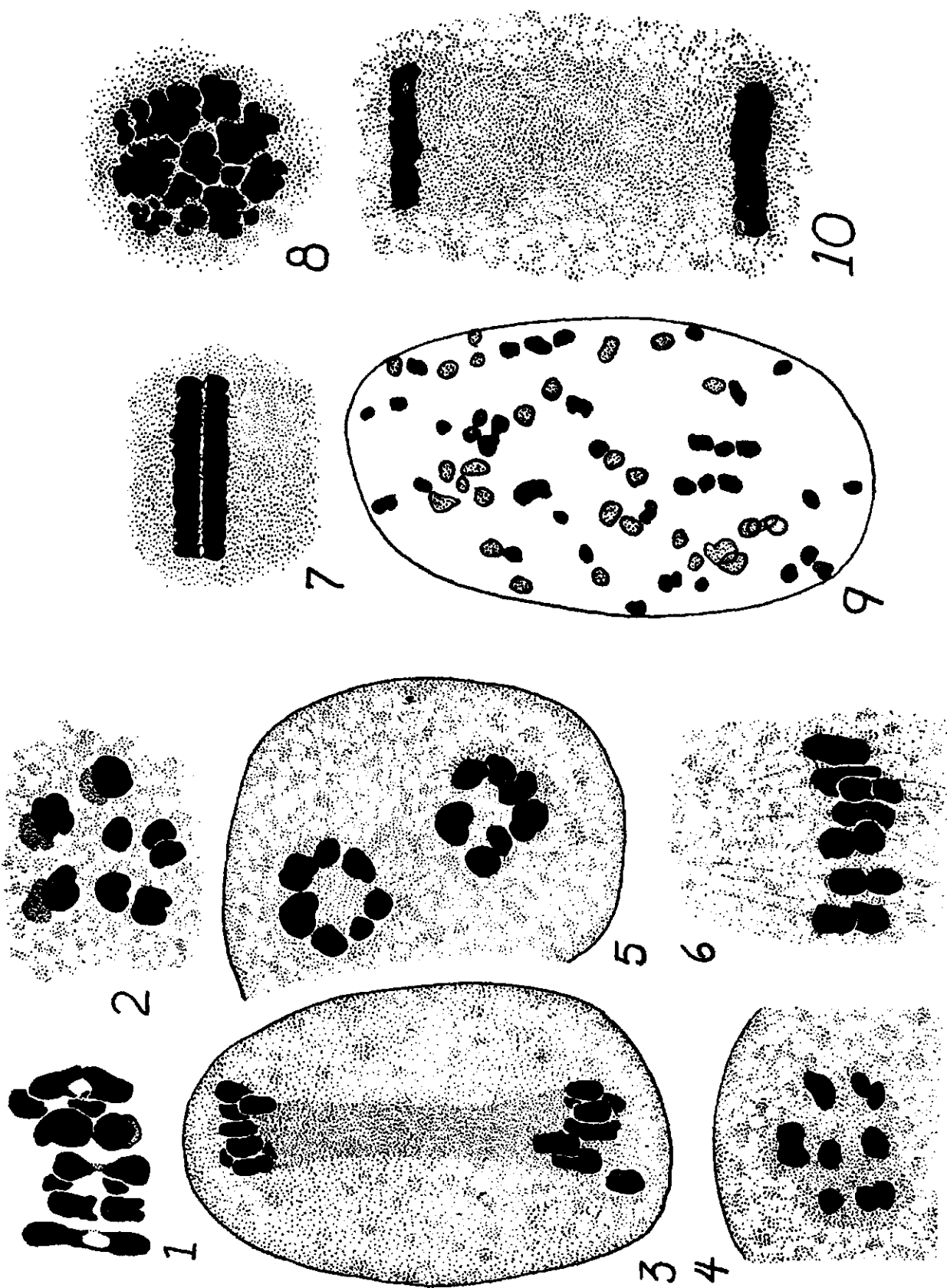
ESTAMPA VI

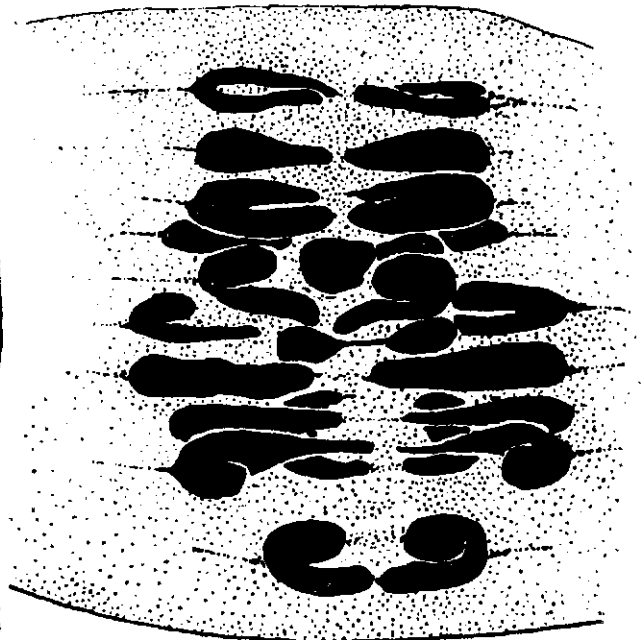
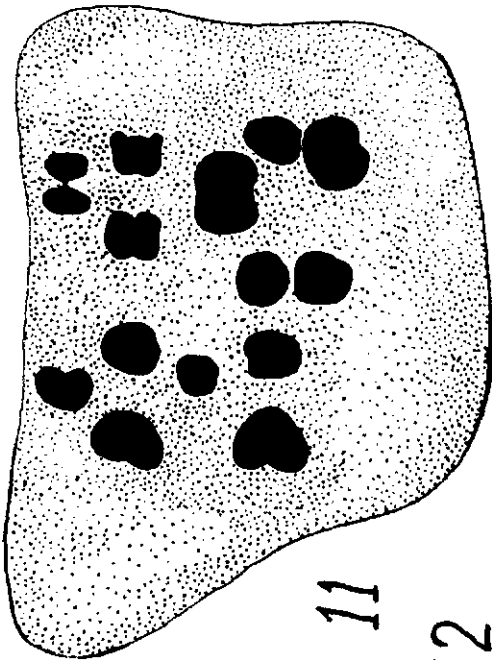
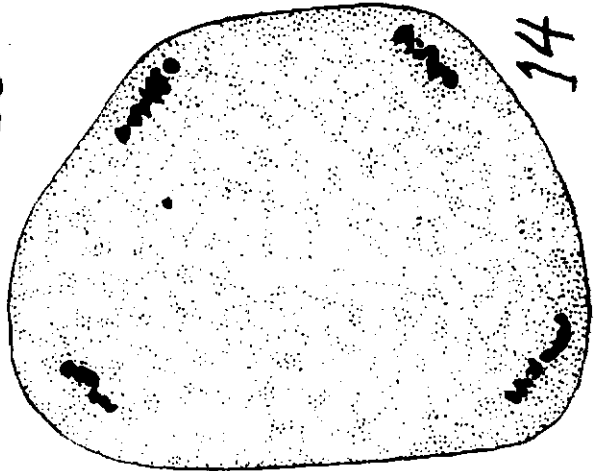
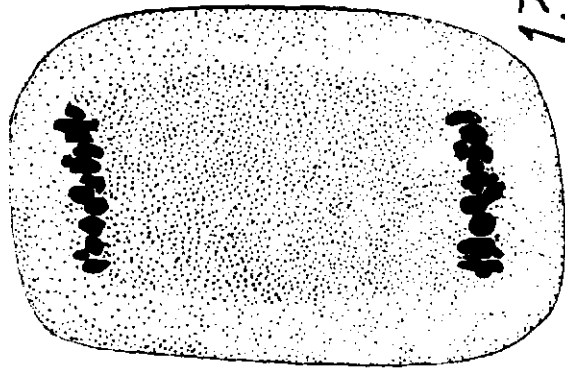
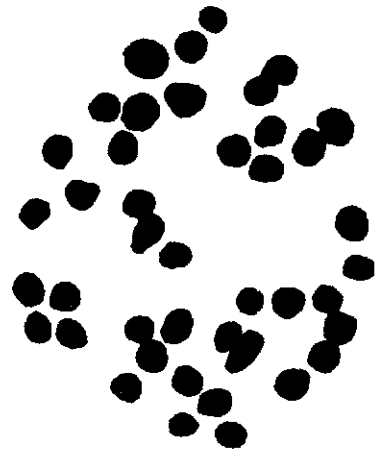
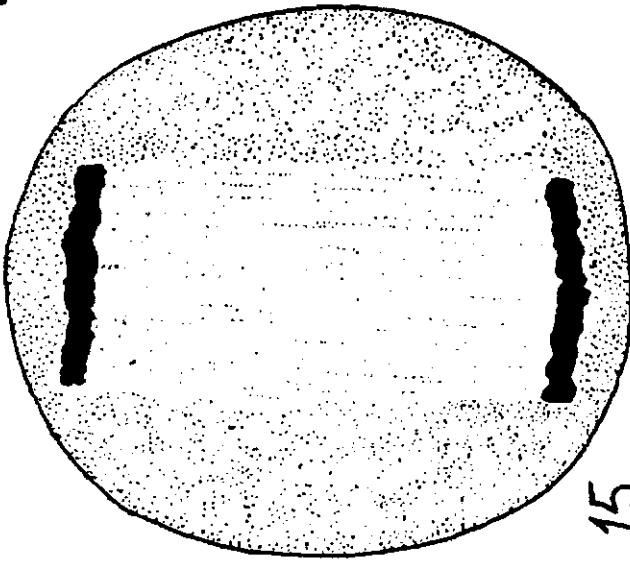
Figuras 36-37. *I. verticillata*. Microsporogênese

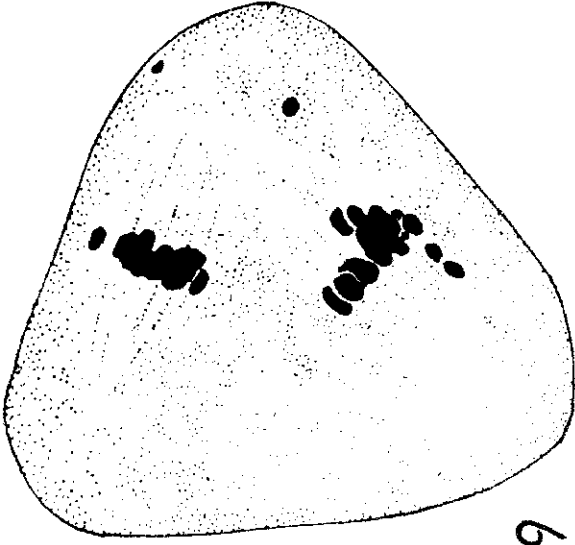
- Fig. 36 --- Metafase heterotípica. Vista lateral mostrando pequeno cromossômio precoce
- „ 37 --- Metafase heterotípica. Vista polar. $n=18$

Figuras 38-43. *I. vomitoria*. Microsporogênese

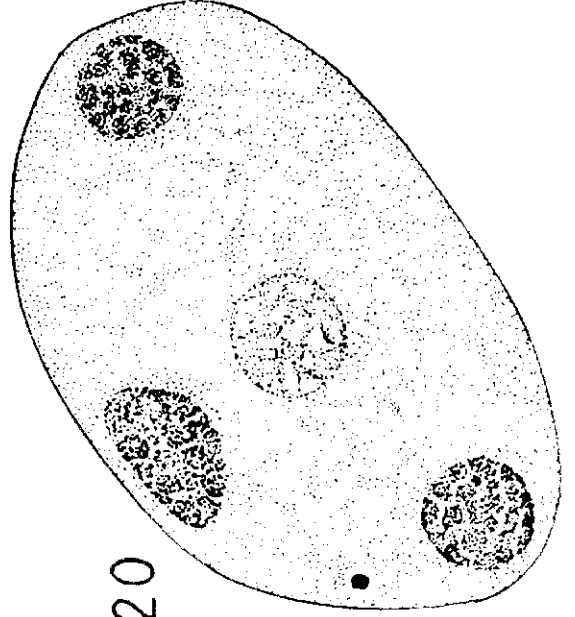
- Fig. 38 --- Início de Anafase heterotípica mostrando ponte tripartida
- „ 39 --- Estádio mais avançado da mesma
- „ 40 --- Metafase heterotípica. Vista polar. $n=20$
- „ 41 --- Metafase heterotípica, mostrando heterocromossômio singular
- „ 42 --- Tipo normal de "laggard"
- „ 43 --- Complexo tripartido visto no fuso acima



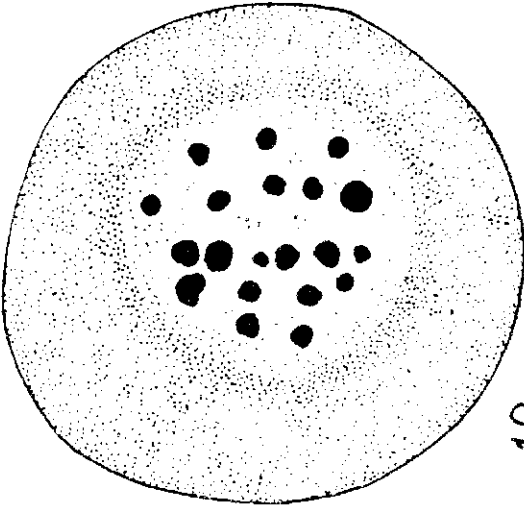




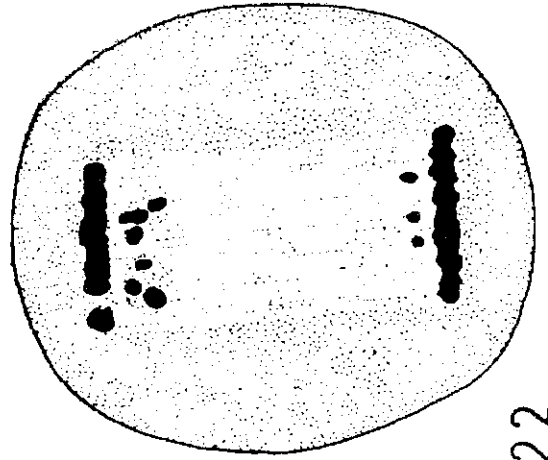
19



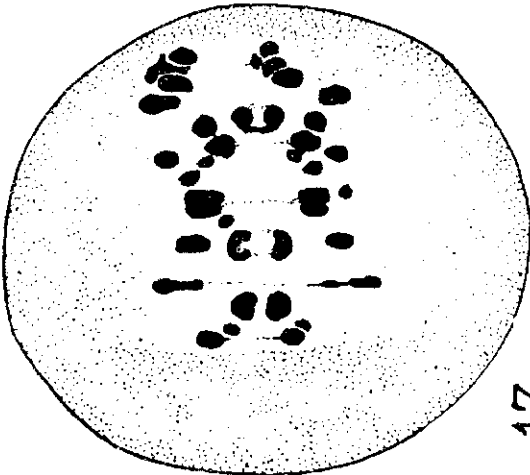
20



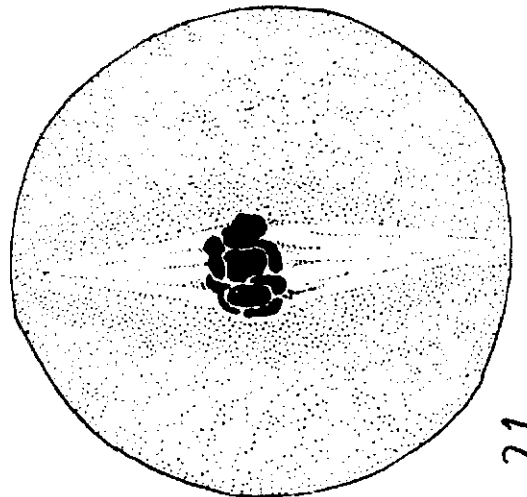
18



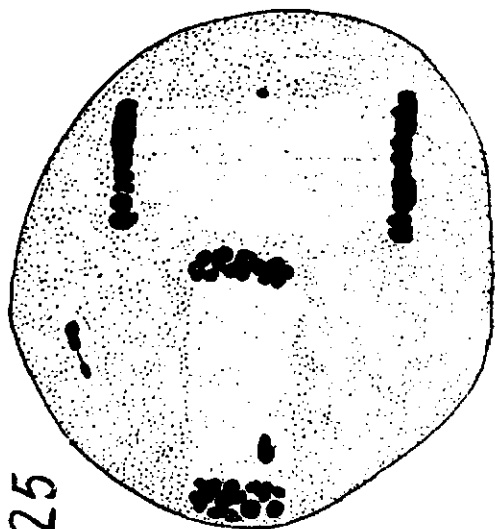
22



17



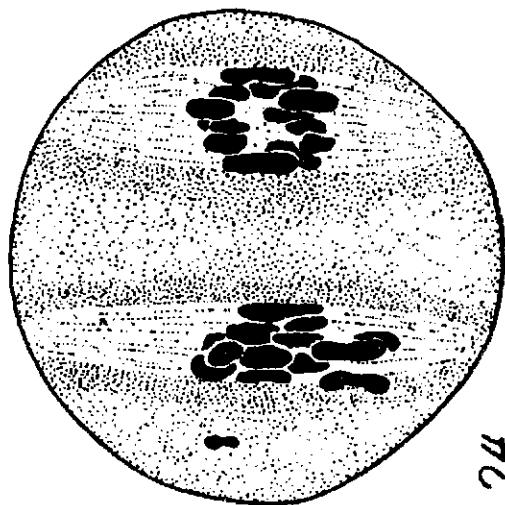
21



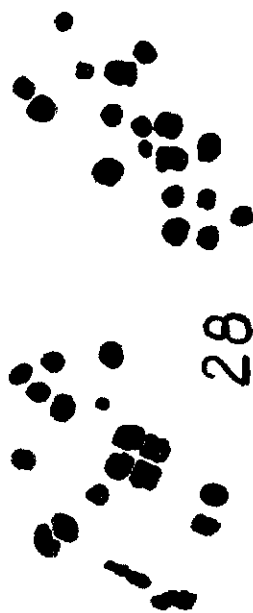
25



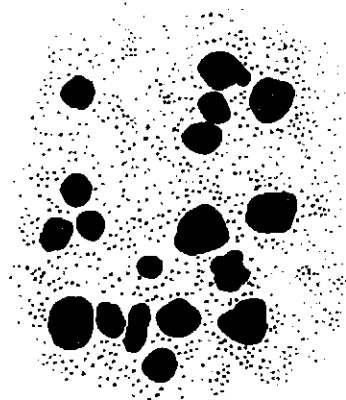
26



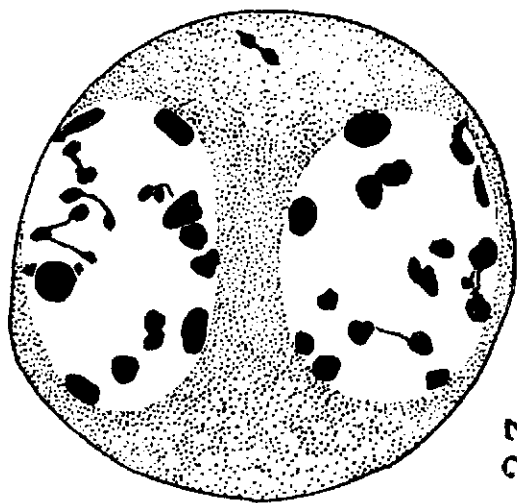
24



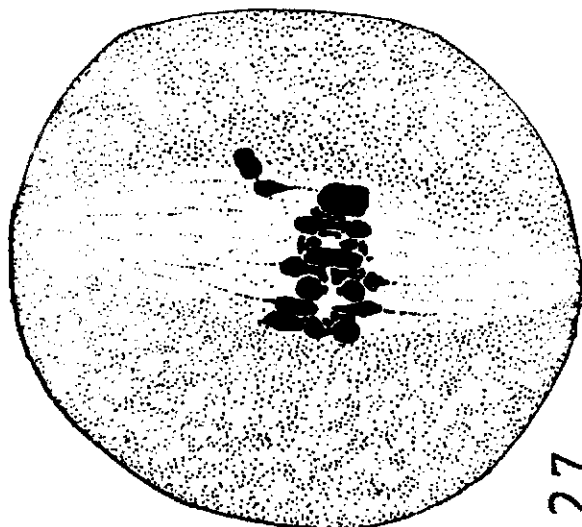
28



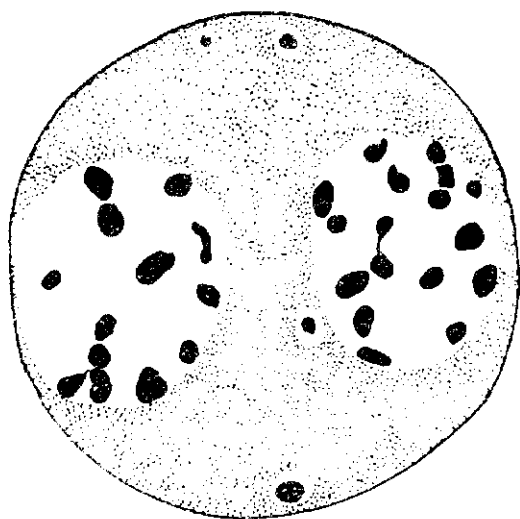
29



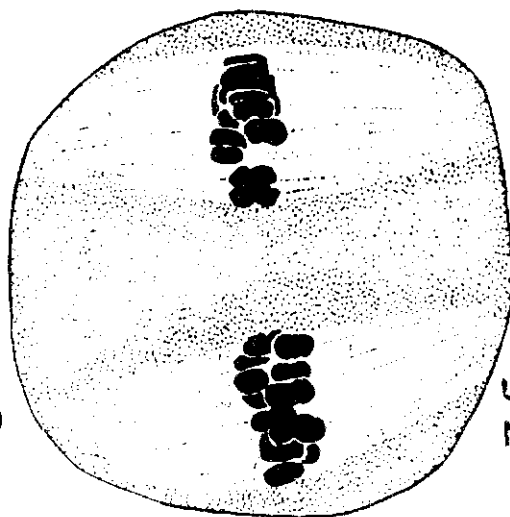
23



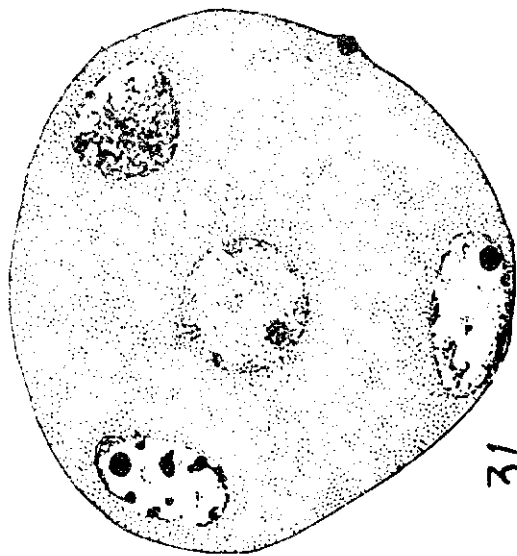
27



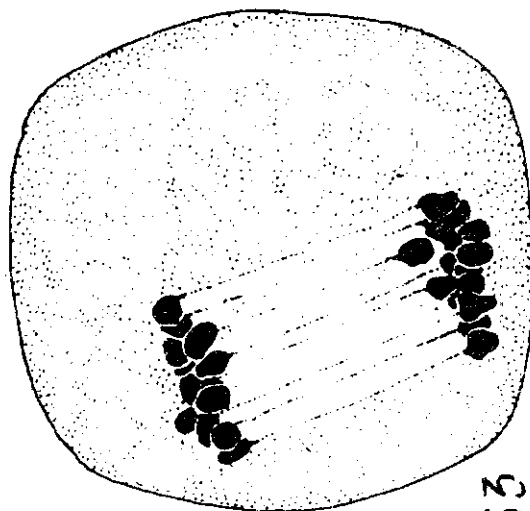
34



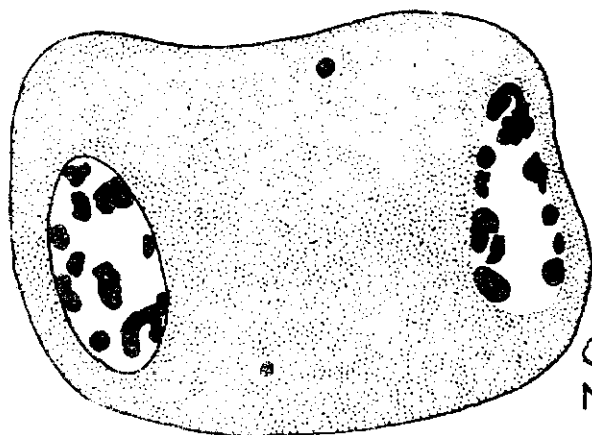
35



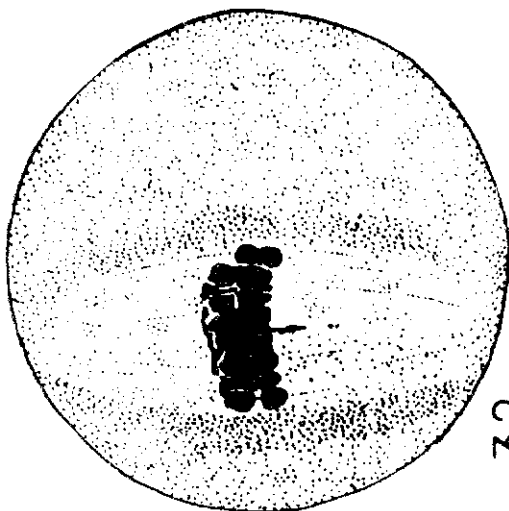
31



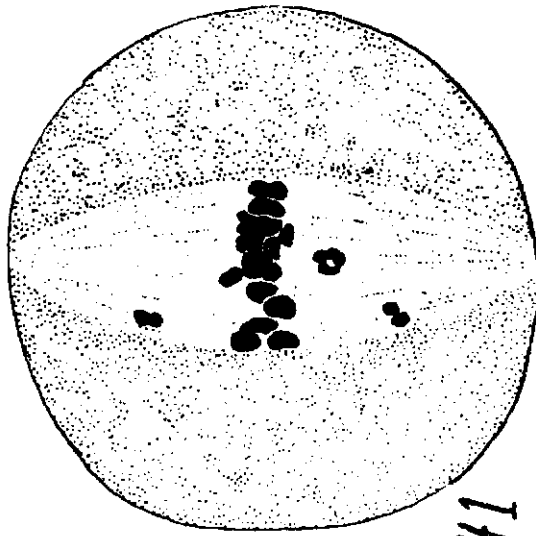
33



30



32



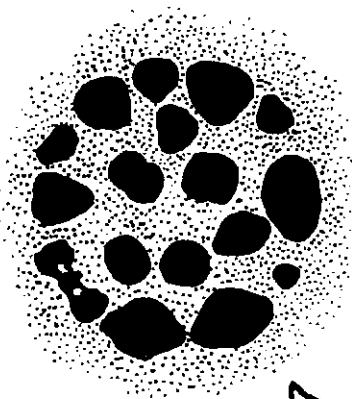
41



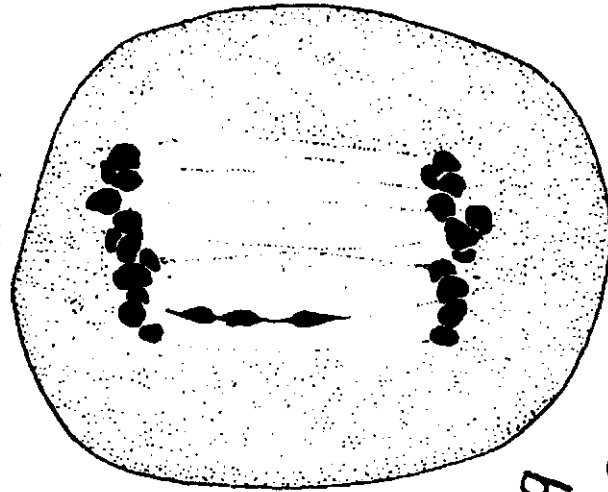
43



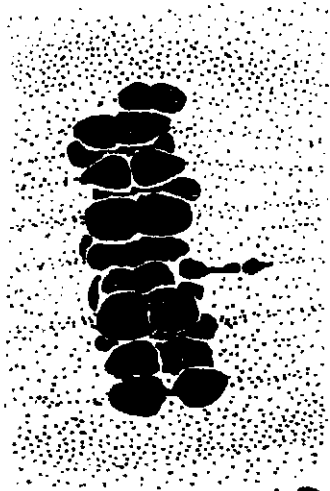
42



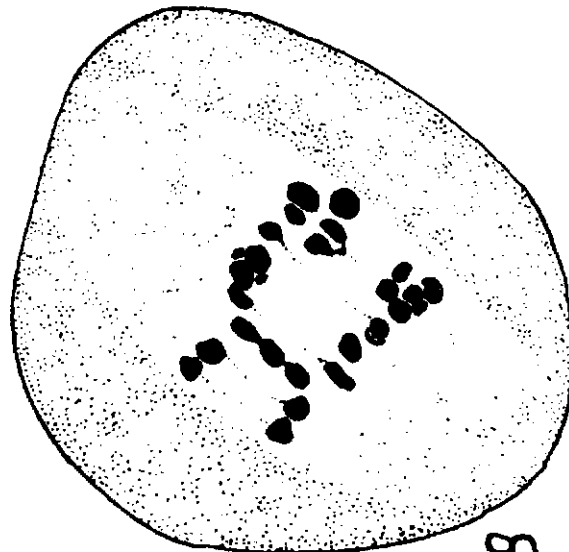
37



39



36



38



40