

BRAGANTIA

Boletim Científico do Instituto Agrônômico do Estado de S. Paulo

Vol. 30

Campinas, janeiro de 1971

N.º 2

MICROSPOROGÊNESE EM CLONES NORMAIS E TETRAPLÓIDES DE *HEVEA BRASILIENSIS* MUELL.-ARG. (1)

CÂNDIDA H. T. M. CONAGIN, *engenheira-agrônoma, Seção de Citologia, Instituto Agrônômico*

SINOPSE

Pesquisas sobre o efeito da colquicina em *Hevea brasiliensis* Muell.-Arg. realizadas anteriormente levaram à obtenção de clones com número duplicado de cromossomos; tais clones, atualmente em fase de amplas e detalhadas observações (6), floresceram em 1969, pela primeira vez.

Foi então realizado um estudo citológico comparativo da microsporangênese de duas plantas, uma pertencente ao clone normal n.º 3064, com $2n=36$ cromossomos, e outra pertencente ao clone duplicado n.º 3065, com $2n=72$ cromossomos. Ambos são considerados clones gêmeos, porque foram obtidos de uma mesma semente, por técnica especial (7).

Na planta com $2n=36$ cromossomos, o processo meiótico é normal, dando tétrades perfeitas e grãos de pólen aparentemente funcionais.

A planta 3065, com $2n=72$ cromossomos, apresenta, além de células-mães de pólen que se dividem normalmente, outras que no final da meiose produzem tétrades anormais, com micrócitos excedentes e grãos de pólen vazios. Caracteriza-se também por grãos de pólen que não passam pelas divisões mitóticas, isto é, apresentam sempre um núcleo só, que não se divide.

Em virtude destas primeiras observações pode-se formular uma hipótese de esterilidade masculina para o clone em estudo.

1 — INTRODUÇÃO

A duplicação artificial dos cromossomos de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell.-Arg.) através de tratamentos pela colquicina foi obtida pela primeira vez por Mendes em 1942 (4) em trabalho realizado no Instituto Agrônômico do Norte, trabalho esse que não teve prosseguimento (6). Posteriormente, em trabalho realizado no Instituto Agrônômico de Campinas, outras

(1) Recebido para publicação em 13 de maio de 1970.

plantas duplicadas foram obtidas através de tratamentos de sementes. Entretanto, nenhum estudo citológico destes clones tinha sido feito até agora, a não ser a determinação do número de cromossomos (7).

Pesquisas realizadas na Malaia sobre diversas espécies, clones e híbridos de seringueira, tanto férteis como estéreis, demonstraram que todo o material examinado, inclusive um clone tratado por colquicina, tinha $2n=36$ cromossomos (2, 3, 8). Quanto à meiose, as irregularidades descritas por Ramaer (8) são consideradas como insuficientes para causar a esterilidade encontrada, sendo esta devida à degenerescência posterior das tétrades (2, 3).

2 — MATERIAL E MÉTODO

As plantas estudadas neste trabalho pertencem a dois clones gêmeos obtidos por técnica especial (7) e que vêm sendo estudados quanto às alterações ocasionadas pela poliploidização (6). Originados de uma mesma semente seccionada ao meio durante os primeiros estados de germinação o clone 3064 veio do desenvolvimento da gema não tratada, tem $2n=36$ cromossomos e é fértil; o clone 3065 veio da gema que foi imersa na solução de colquicina, tem $2n=72$ cromossomos, e as plantas que dele se originaram apresentam diversos caracteres morfológicos que confirmam sua natureza poliplóide (5, 7); algumas floresceram em 1969 pela primeira vez.

Para o estudo da microsporogênese e da gametogênese, botões florais de diversas idades foram colhidos em uma solução de 3 partes de álcool absoluto e uma parte de ácido acético glacial e coloridos em esfregaços de carmin acético.

3 — OBSERVAÇÕES

Clone normal, n.º 3064, $2n=36$ — As células-mães em início de meiose apresentam os cromossomos muito enovelados e com pouca afinidade pelo carmin acético, razão pela qual o seu estudo é muito limitado; entretanto, o enovelamento inicial evolui normalmente, dando os 18 pares de cromossomos encontrados em diacinese. Mesmo esta fase, que é tão clara em muitas outras plantas, aqui é muito fracamente colorida, razão pela qual apenas a determinação do número de bivalentes foi possível.

A contração e ao arranjo na placa equatorial em metáfase I (figura 1-A) segue-se uma separação anafásica sem "laggards" (figura 1-B).

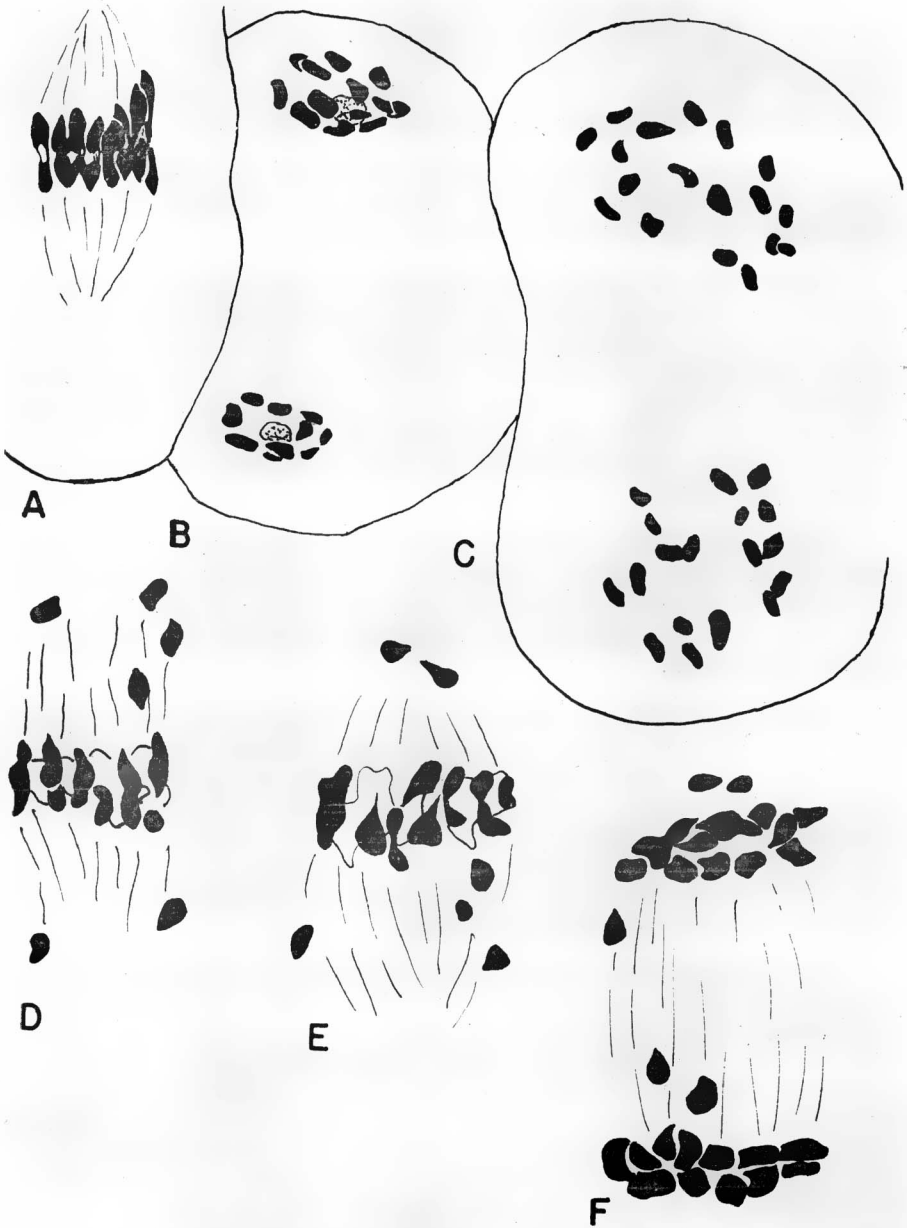


Figura 1. — Meiose em *Hevea brasiliensis*, Muell.-Arg. A-C — Clone normal: separação normal dos cromossomos; D-F — Clone anormal: separação irregular dos cromossomos.

As fases que se seguem, de metáfase e anáfase II, não se desviam do processo normal e terminam em tétrades de micrósporos iguais; nas contagens realizadas houve 100% de tétrades normais. Em uma célula em metáfase II foram contados os 18 cromossomos resultantes da anáfase I (figura 1-C).

O processo, tal como se passa no clone em estudo, é, em linhas gerais, igual ao que foi descrito por Ramaer (8) e por Majumdar (2) para clones normais, férteis.

Depois que se soltam das tétrades, os micrósporos transformam-se em grãos de pólen, de forma aproximadamente esférica, com três poros germinais, exina espessa e atravessada por inúmeros canaliculos de abertura circular que dão à sua superfície aparência ponteadas. A frequência de grãos vazios é baixa, não ultrapassando 10,0%; seu citoplasma se colore muito bem pelo carmin acético, mas plasmolisa-se com facilidade à medida que o pólen envelhece.

Tanto nos grãos perfeitos como nos plasmolisados foi possível ver as duas células, vegetativa e reprodutiva, provenientes da primeira divisão mitótica de grão de pólen; a segunda divisão, pela qual os gametas se originam, também foi frequentemente observada.

Clone duplicado, n.º 3065, 2n=72 — Também no clone duplicado as primeiras fases da meiose são difíceis de estudar, e aqui com maior razão, pois os cromossomos, em grande número, apresentam-se muito emaranhados. Possíveis irregularidades no mecanismo cromossômico podem ter passado despercebidas, como também não foi possível analisar o número e a distribuição dos quiasmas em diacinese. Verificamos que outros autores (2, 8) também tiveram o mesmo problema.

Em metáfase I os cromossomos às vezes se arrumam perfeitamente na placa equatorial, mas outras vezes alguns deles se apresentam bem deslocados no fuso, já a caminho dos pólos (figura 1-D, E). Isso traz como consequência uma separação anafásica irregular e a formação de núcleos telofásicos com cromossomos retardatários (figura 1-F). Há, entretanto, muitas células em que a separação em anáfase I é perfeitamente normal, sem "laggards". As fases encontradas neste material muito se assemelham às descritas por Ramaer (8), ao estudar clones com alto grau de esterilidade. O citoplasma das células em telófase I apresenta, muito frequentemente, granulações como as que foram encontradas em *Manihot* (1).

QUADRO 1. — *Hevea brasiliensis*. Frequência de tétrades anormais e de grãos de pólen vazios

Botões n.º	Tétrades			Grãos de pólen		
	Total	Anormais		Total	Vazios	
	n.º	n.º	%	n.º	n.º	%
5	84	25	29,8			
17	96	8	8,3			
19	43	9	21,0			
Total	223	42	18,8			
28				101	34	34,0
30				139	34	24,5
31				102	37	36,7
32				108	45	42,6
Total				450	150	33,3

Segue-se a metáfase II, na qual em algumas células e com dificuldade foi possível contar cerca de 34-37 cromossomos em apenas um dos pólos.

Em virtude da dificuldade apresentada pelo material, não foi possível estudar as últimas fases da meiose; o resultado final, entretanto, indica que também nelas deve ter havido irregularidades na separação dos cromossomos, pois foram constatados 18,8% de tétrades com micrócitos excedentes e 33,3% de grãos de pólen vazios (quadro 1).

Os grãos de pólen recém-formados tomam a forma aproximadamente esférica, com exina espessa, pontuada dos mesmos canalículos encontrados no pólen do clone normal, apresentando, entretanto, quatro poros germinais, às vezes cinco. Nêles, entretanto, há aparentemente paralisação de desenvolvimento, sendo raros os grãos que apresentam formadas as células germinativa e vegetativa.

4 — CONCLUSÕES

O estudo da microsporogênese nos dois clones gêmeos mostrou que:

a) O clone 3064, normal, fértil, com $2n=36$ cromossomos, tem meiose normal, com formação de tétrades de micrósporos perfeitos, os quais passam em seguida por gametogênese também normal.

b) O clone 3065, duplicado artificialmente, com $2n=72$ cromossomos, apresenta no final da microsporogênese certa porcentagem de tétrades anormais (com micrócitos excedentes), de grãos de pólen vazios, e de grãos que, aparentemente normais, não passam pelas mitoses que originam as células vegetativa e germinativa, e depois, os gametas.

A planta em questão pode ser considerada macho estéril até que futuras observações, em floradas posteriores, venham indicar o contrário.

MICROSPOROGENESIS IN NORMAL AND TETRAPLOID *HEVEA BRASILIENSIS* (Muell.-Arg.)

SUMMARY

Previous works on *Hevea brasiliensis* Muell.-Arg. produced several pairs of twin clones, one member having the normal chromosome number and the other the duplicated set after colchicine treatment.

Plants of normal clone 3064 are fertile and have 32 chromosomes. Microsporogenesis is normal, producing only normal tetrads of four microsporocytes. The resulting pollen grains have three germinal pores. Grains in different stages of development could be noticed, from one-nucleated cytoplasm to the two-nucleated reproductive cell, which undoubtedly means normal gametogenesis.

On the other hand plants of the duplicated twin clone 3065, blossomed during the year of 1969 for the first time. Microsporogenesis studied in one plant showed a certain percentage of normal first meiotic division, without laggards in anaphase I, but it presented also abnormal sporads containing four microspores and one to four microcytes. It was also observed that pollen grains have four germinal pores and their development stopped at the one-nucleus stage.

These observations suggest male sterility for this duplicated clone.

LITERATURA CITADA

1. CRUZ, N. D. Citologia do gênero *Manihot* Adans. Microsporogênese em plantas selvagens e cultivadas. Apresentado na XX Reunião Anual da Soc. Bras. para o Prog. da Ciência, S. Paulo, 1968. (Não publicado)

2. MAJUMDAR, S. K. Chromosome studies of some species of *Hevea*. J. Rubb. Res. Inst. Malaya 18:269-275, 1964.
3. ———. Male sterile clones in *Hevea brasiliensis*. Can. J. Bot. 45:145-146, 1967.
4. MENDES, L. O. T. Investigações preliminares sobre a duplicação do número de cromossomos na seringueira pela ação da colquirina. Belém, Instituto Agr. do Norte, 1946. 62p. (Bol. Tec. 7)
5. ———. Projeto de duplicação do número de cromossomos da seringueira. Relatório dos trabalhos realizados. Campinas, Instituto Agrônômico, 1969. 210 fls. (Datilografado)
6. ———. Relatório anual referente ao projeto de duplicação do número de cromossomos da seringueira, correspondente ao ano de 1964. Campinas, Instituto Agrônômico, 1965. 15 fls. (Datilografado)
7. ——— & MENDES, A. J. T. Poliploidia artificial em seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell.-Arg.). Bragantia 22:384-392, 1963.
8. RAMAER, H. Cytology of *Hevea*. Genetica 17:193-236, 1935.