

OBSERVAÇÕES CITOLÓGICAS EM TRÊS ESPÉCIES DE *ERYTHRINA* L. (1). NEUSA DINIZ DA CRUZ, MARIA REGINA GONÇALVES UNGARO e DIXIER MAROZZI MEDINA (2). O gênero *Erythrina* (Papilionaceae) compreende aproximadamente cento e cinco espécies na forma de árvores, arbustos e ervas perenes distribuídas por todos os continentes, com exceção da Europa. Na América está o maior número de espécies. Este grupo de plantas, além de interesse ornamental, alimentício e de produção de corantes, tem sido utilizado na fabricação de artigos que exigem madeiras leves (3); das sementes de algumas espécies é extraído um alcalóide de efeito semelhante ao curare, além de outros alcalóides de importância na medicina (4). Estas plantas têm sido pouco estudadas citologicamente e os dados fazem referência principalmente ao número de cromossomos.

Atchison apresentou uma tabela com número de cromossomos de 33 espécies, das quais 31 são diplóides com $2n = 42$ e, apenas duas, *E. amazônica* e *E. acanthocarpa*, são tetraplóides com $2n = 84$ (5). Considerando a ampla distribuição geográfica, concluiu a referida autora que a diversificação específica se deu mais por mutação gênica que por poliploidia.

Apresentam-se nesta nota observações preliminares sobre a meiose em plantas de *E. corallodendron* L., *E. sandwicensis* Degener e *E. speciosa* Andr., a primeira originária da América tropical e encontrada até no Estado do Pará, a segunda do Hawaii, e a última, uma espécie comum no Estado de São Paulo. Florescem em abundância e, provavelmente, ainda não foram domesticadas, isto é, não sofreram interferência de um melhoramento genético. O interesse da pesquisa surgiu da observação da falta de frutos nas duas primeiras espécies mencionadas, procurando-se comparar o seu comportamento meiótico com o de *E. speciosa*, a qual produz sementes normalmente.

Material e métodos: Das três espécies estudadas existem exemplares no Instituto Agrônomo de Campinas. *E. corallodendron* L. foi introduzida através da "Division of Plant Exploration and Introduction USDA, Washington D. C., Maryland"; *E. sandwicensis* Degener, através do "L. A. State and Country Arboretum Arcadia, U. S. A."; e *E. speciosa* Andr., introduzida através do Instituto de Botânica, SP.

(1) Recebida para publicação em 15 de julho de 1976.

(2) Com bolsa de suplementação do C.N.Pq.

(3) BURKART, A. Las leguminosas argentinas silvestres y cultivadas. Buenos Aires, ACME Agency, 1952.

(4) KRUKHOFF, B. A. Supplementary notes on the American species of *Erythrina*. Amer. J. Bot. 28:683-691, 1941.

(5) ATCHISON, EARLENE. Studies in the Leguminosae. I. Chromosome numbers in *Erythrina* L. Amer. J. Bot. 34:407-414, 1947.

Florescem em julho e agosto, sendo *E. speciosa* um pouco mais precoce.

Para as observações meióticas, botões florais foram fixados em Carnoy 3:1 e as células-mães de pólen coloridas pelo carmim acético ou propiônico. Quando este último foi usado, os botões foram transferidos para outro fixador, onde o ácido acético era substituído pelo ácido propiônico, nas mesmas proporções, e saturado de acetato férrico. Antes do preparo da lâmina o material era lavado em álcool 70, segundo método de Yeh e Peloquin (6).

O pólen foi também colorido com carmim acético, em material não fixado, utilizando-se, para cada lâmina, todas as anteras. Cinco flores foram analisadas para cada espécie.

Para a germinação artificial do pólen empregou-se o meio de cultura mais comum, isto é, mistura de solução de ágar a 5% com sacarose a 10%. Cerca de cinco horas após a semeadura era feita a coloração, pingando sobre a lâmina a solução de carmim acético, que atua ao mesmo tempo como solução fixadora e corante, facilitando a visibilidade dos tubos polínicos.

Resultados: A meiose nessas espécies de *Erythrina* caracteriza-se por apresentar, ao lado do comportamento normal, uma série de anormalidades que ocorrem nos diversos estádios, diversificadas em aspecto e grau, descritas a seguir:

1. Grande variação no tamanho das células-mães, sendo algumas bem menores e apenas identificáveis pela forma e pelo aspecto do citoplasma ou dos cromossomos.
2. Grande variação do tamanho e aspecto das células do tapete; em certos casos mostravam-se tão hipertrofiadas que dificilmente se distinguiam das células-mães de pólen.
3. Células-mães com dois, três ou até quatro núcleos, algumas vezes no mesmo estádio, outras vezes completamente defasados um do outro.
4. Diacineses estranhas, cujos bivalentes se apresentavam extremamente condensados e se reduziam a pequenas massas mais ou menos esféricas e heterocromáticas, rodeadas de porções irregulares de eucromatina. A cada bivalente correspondia um pequeno nucléolo. Às vezes, o aspecto dos cromossomos era aparentemente normal e além dos numerosos pequenos nucléolos havia um nucléolo de tamanho normal. Isso foi observado também em algumas prófases II.

(6) YEH, B. P. & PELOQUIN, S. J. Pachytene chromosomes of the potato (*Solanum tuberosum*, Group Andigena). Amer. J. Bot. 52:1014-1120, 1965.

5. Ocorrência de monovalentes. Considerando apenas as células euplóides, as combinações mais comumente observadas foram: $20_{II} + 2_I$ e $19_{II} + 4_I$.

6. Não-disjunção de bivalentes, os quais eram vistos mais distantes do conjunto e, aparentemente, estavam desorientados.

7. Associações secundárias. Algumas M_I foram observadas com formação de tetravalentes. Outros tipos de associação de cromossomos foram vistos em M_{II} (associação "sticky").

8. Assincronismo acentuado entre os agrupamentos cromossômicos. Em alguns casos, por exemplo, em um dos polos os cromossomos estavam em M_{II} e, no outro, em A_{II} já bem avançada.

9. Agrupamentos cromossômicos com número desigual de elementos após as separações anafásicas.

10. Assincronismo acentuado em separações anafásicas, favorecendo, dessa forma, a distribuição irregular.

11. Ocorrência de "laggards", que freqüentemente não eram incluídos nos agrupamentos.

12. Cromossomos "sticky", produzindo aglutinação de elementos em diferentes fases, como em prófase I inicial, diacinese, M_I e M_{II} .

13. Citomixia, ou passagem de material de uma célula para outra. Foi observada em diferentes fases de meiose, havendo casos evidentes da transferência do próprio nucléolo. A citomixia é aparente também entre células do tapete e entre estas e células-mães.

14. Formação de díades, tríades, mônades e de micrócitos.

As anormalidades não são mutuamente exclusivas podendo se apresentar combinadas. Algumas mostraram-se especialmente freqüentes em uma ou duas das espécies. Assim, por exemplo, a citomixia foi observada em freqüência mais alta em *E. corallodendron*; díades eram preponderantes em *E. sandwicensis*, e cromossomos "sticky" parecem ser um fenômeno comum às três espécies. De modo geral, foram menos freqüentes em *E. speciosa*.

Aparentemente, parte das células de tamanho médio exibiu comportamento meiótico normal, com 21 bivalentes em diacinese e metáfase, seguindo-se separações anafásicas normais.

O exame das tétrades revelou que, enquanto em *E. speciosa* e *E. corallodendron* havia formação de cerca de 90% de tétrades aparentemente normais com quatro micrósporos, em *E. sandwicensis* elas só se formaram em cerca de 5% das células-mães, havendo 90% de díades (num total de 1.000 células analisadas para cada espécie).

As frequências de grãos de pólen viáveis (com citoplasma) foram, em média, 97% para *E. speciosa*, 88% em *E. sandwicensis* e 73% em *E. corallodendron*. Nestas duas últimas houve grande variação entre flores, sendo que em *E. sandwicensis* havia flores completamente estéreis. Nesta espécie, ainda, o pólen variou em tamanho e em intensidade de coloração.

Em *E. speciosa* houve baixa germinação (33%), enquanto em *E. corallodendron* e *E. sandwicensis* atingiu, respectivamente, 69% e 87%. Entretanto, nestes últimos dados estão incluídos os grãos maiores, que germinavam mais lentamente e que emitiam, muitas vezes, mais de um tubo polínico.

Discussão: Esterilidade masculina tem sido encontrada em vários casos associada a aberrações ou irregularidades em algum estágio do processo da formação do pólen. A degenerescência pode se dar nas células-mães desde antes de a meiose ter realmente começado até nos núcleos do grão de pólen. A literatura neste aspecto é bem vasta, como comentada por Chowdhury & Das (7). Segundo estes autores, a diferença entre plantas normais e macho-estéreis de *Brassica campestris* L. só se tornou evidente após a formação das tétrades. Nas plantas estéreis, o tapete não mostrou degenerescência, como era comum acontecer nas plantas normais. A degenerescência do grão de pólen foi atribuída ao não funcionamento das células do tapete como camada nutritiva. Aliás, a hipertrofia de células do tapete tem sido constantemente relacionada com esterilidade do pólen em muitas plantas, como por exemplo medicaço (8), cenoura (9) e milho (10); em geral, supõe-se que devido ao crescimento excessivo do tapete haja um seqüestro dos materiais nesse tecido, levando à privação dos meiócitos e esporos jovens, que necessitariam dos mesmos para a meiose normal e crescimento normal do pólen.

Pesquisas estão em andamento a fim de verificar, no caso das eritrinas, o comportamento das células do tapete e associar o desenvolvimento desse tecido com os diversos estádios da meiose. Algumas observações preliminares indicam um provável desvio em relação ao processo normal.

Associações secundárias de cromossomos na metáfase foram observadas por Sunder Rao (11) em *E. indica* e, mais recentemente,

(7) CHOWDHURY, J. B. & DAS, R. Cytomorphological studies on male sterility in *Brassica campestris* L. Cytologia 33:195-9, 1968.

(8) CHILDERS, W. R. Male sterility in *Medicago sativa*. Sci. Agric. 32:351-64, 1952.

(9) ZENKTELER, M. Microsporogenesis and tapetal development in normal and male sterile carrot (*Daucus carota*). Am. J. Bot. 49:341-8, 1962.

(10) MOSS, G. I. & HESLOP-HARRISON, J. Photoperiod and pollen sterility in maize. Ann. Bot. 32:833-846, 1968.

(11) SUNDER RAO, Y. Chromosomes of *Erythrina indica* Lamk. J. Indian bot. Soc. 24:42, 1945.

por Mehra & Hans (¹²) em *E. fusca*. Embora os autores se refiram a uma tendência bem marcada para associação de bivalentes, o número de células analisadas é pequeno. Da mesma forma, no nosso material as associações secundárias foram vistas e, apesar de não se ter feito ainda observações sistemáticas, pode-se dizer que são em baixa proporção. Estas observações poderiam dar suporte a uma origem por autopoliploidia para as espécies de *Erythrina*, mas segundo Atchison (³) isso é bastante discutível, dada a origem muito antiga das espécies com quarenta e dois cromossomos. Através da anfidiplóidia, a explicação seria mais simples, tendo havido, talvez, hibridação entre espécies $x = 10$ e $x = 11$ seguida de duplicação do híbrido para produzir a forma fértil. As eritrinas modernas ter-se-iam diferenciado por mutação gênica.

“Stickness” dos cromossomos é um aspecto relativamente frequente nos processos meióticos abortivos; embora o efeito “sticky” resulte muitas vezes de mutações gênicas, pode também ser induzido por aplicação de agentes químicos e físicos durante a mitose ou meiose. Em várias espécies de *Brachiaria* (Paniceae), por exemplo, a extrema aglutinação dos cromossomos no final da primeira divisão meiótica impedia a completa separação dos dois núcleos (¹³). A maior ou menor fertilidade do pólen estava correlacionada com esse fenômeno em várias espécies desse gênero (¹¹). Nas eritrinas aqui estudadas, cromossomos “sticky” foram observados em várias fases da meiose, desde prófase I até metáfase II e em graus variados. Se bem que tenham sido observadas células em diacinese, metáfase I, prófase II e metáfase II com aparência de degenerescência, não se pode afirmar que as mesmas se relacionem com esse fenômeno.

A citomixia, atribuída algumas vezes à deficiência na formação da parede celular (¹⁴), pode ocorrer tanto em mitose quanto em meiose, podendo em alguns casos estar ligada com fenômeno de degenerescência. Bhandari, Tandon e Jain (¹⁵) observaram passagem do nucléolo de uma célula meiótica para outra, sem que isto afetasse a fertilidade do pólen. No nosso material houve passagem do nucléolo, mas sempre acompanhado de parte dos cromossomos: às vezes, todo o conteúdo nuclear era transferido. Além da citomixia, células gigantes foram observadas contendo vários núcleos, na forma de verdadeiros sincícios, muito semelhantes aos descritos por

(¹²) MEHRA, P. N. & HANS, A. S. Cytological observations in arborescens leguminosae of Eastern Himalayas. *The Nucleus* 14:144-152, 1971.

(¹³) NATH, J.; SWAMINATHAN, M. S. & MEHRA, K. L. Cytological studies in the tribe Paniceae, Gramineae. *Cytologia* 35:111-131, 1970.

(¹⁴) LEVAN, A. Syncyte formation in the pollen mothercells of a haploid *Phleum pratense*. *Hereditas* 27:243-252, 1941.

(¹⁵) BHANDARI, N. N.; TANDON, S. L. & JAIN, SARMISHTHA. Some observations on the cytology and cytomixis in *Canavalia* DC. *Cytologia* 34:22-8, 1967.

Sadasivaiah & Magoon (16) e interpretado por supressão da formação da parede em estádios pré-meióticos. Neste aspecto, como Levan (14) focalizou, os dois fenômenos, citomixia e formação de sincício, seriam relacionados em seu modo de origem. No nosso material, os cromossomos dos vários núcleos permanecem separados com atividade meiótica independente, não se tendo observado sua fusão num conjunto único, como visto em haplóides de *Phleum* (14) e em sorgo (16).

A formação de díades pode ser o resultado de anomalias na formação do fuso ou de citocineses aberrantes na primeira ou segunda divisão meiótica (17). Núcleos de restituição após a primeira divisão meiótica poderiam ocasionar díades com número de cromossomos não reduzidos.

Não existe correspondência entre as irregularidades na meiose e a esterilidade do pólen, nas espécies de *Erythrina* aqui estudadas. Pólen vazio foi observado em porcentagens relativamente baixas. Isso poderia ser explicado supondo que o pólen maduro analisado tivesse, na realidade, se originado só de células-mães de pólen normais; os outros, resultantes de processo irregular, talvez tenham sido eliminados durante seu desenvolvimento, ou então após anormalidades muito grandes, nem chegaram a se formar. Nessa ordem de idéias chega-se à conclusão que a ausência de frutos pode estar associada a irregularidades na meiose, mas não deve ser atribuída a elas exclusivamente. Por outro lado pode-se pensar que, embora germinado em meio artificial, o pólen não tenha viabilidade suficiente para efetuar a fertilização. Muitos pólenes germinavam até certo ponto e, em seguida, os tubos polínicos se desfaziam. Os dados a esse respeito estão ainda incompletos.

Pesquisas deverão ser conduzidas proximamente sobre a biologia floral, visando esclarecer o tipo de fecundação nessas plantas, em nossas condições. SEÇÃO DE CITOLOGIA E SEÇÃO DE OLEAGINOSAS, INSTITUTO AGRÔNOMICO DO ESTADO DE SÃO PAULO.

(16) SADASIVAIAH, R. S. & MAGOON, M. L. Abortive meiosis and organization of atypical spindles in plasmodial pollen mother cells of *Sorghum*. *The Nucleus* 9:53-60, 1966.

(17) RAMANNA, M. S. The origin of unreduced microspores due to aberrant cytokinesis in the meiocytes of potato and its genetic significance. *Euphytica* 23:20-30, 1974.

CYTOLOGICAL OBSERVATIONS IN THREE SPECIES OF **ERYTHRINA** L.
(PAPILIONACEAE)

SUMMARY

Beside the normal meiotic process occurring in part of the pollen mother cells, meiotic irregularities were found in some plants of **Erythrina** L. (**E. speciosa** Andr, **E. corallodendron** L., and **E. sandwicensis** Deg.) at the Instituto Agronômico do Estado de São Paulo, Brazil. The abnormalities occur at different stages of meiosis and are variable in their aspect and proportion. In general meiosis is less irregular in **E. speciosa** which yields seeds normally. The lack of fruits in **E. sandwicensis** and **E. corallodendron**, however, could not be ascribed only to meiotic irregularities, for pollen fertility and artificial germination were not so low.