CITOGÉNÉTICA DA SERINGUEIRA [*Hevea brasiliensis*
(*Willd. ex. Adr. de Juss.*) Muell. Arg.]

SILVIA MARINA CUCO
(Engenheira Agrônoma)

Orientador: Prof.Dr. Gerhard Bandel

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Julho - 1992

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

C963c Cuco, Silvia Marina
 Citogenética da seringueira Hevea
 brasiliensis (Willd. ex. Adr. de Juss.)
 (Muell. Arg.). Piracicaba, 1992.
 86p. ilustr.

 Diss.(Mestre) - ESALQ
 Bibliografia.

 1. Seringueira - Citologia 2. Serin
 gueira - Genética I. Escola Superior
 de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracica
 ba.

CDD 633.895

CITOGENÉTICA DA SERINGUEIRA [*Hevea brasiliensis*
(Willd. ex. Adr. de Juss.) Muell. Arg.]

SILVIA MARINA CUCO

Aprovada em 06/07/1992

Comissão Julgadora:

Prof.Dr. Gerhard Bandel

ESALQ/USP

Prof.Dr. Natal Antonio Vello

ESALQ/USP

Dr. Paulo de Souza Gonçalves

IAC

Prof.Dr. Gerhard Bandel
Orientador

À minha pequena Ana Clara

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho e, em especial:

- Ao Professor Dr. Gerhard Bandel, pela orientação e amizade constantes.
- Aos Professores, Dr. João Lúcio de Azevedo e Dr. Geraldo Antonio Tosello, na qualidade de chefes do Departamento de Genética, pelas facilidades concedidas.
- Ao Instituto Agronômico de Campinas, nas pessoas de Dr. Mário Cardoso e Dr. Paulo de Souza Gonçalves, pela concessão do material biológico empregado no estudo.
- Aos professores do Departamento de Genética, pelos conhecimentos transmitidos.
- À Prof^a Dr^a Margarida L. R. Aguiar-Perecin, pela concessão de alguns equipamentos e grande ajuda.
- Ao CNPq (Centro Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento) pela concessão da bolsa de estudos.
- À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo auxílio financeiro.
- Aos funcionários do Departamento de Genética e, em especial

a Antonio de Pádua Gorga (Oberdã) e Silvia C. M. Molina.

- Aos amigos do Departamento de Genética e, em especial, a: Mônica Rosa Bertão, pelo auxílio na obtenção das fotomicrografias.

Antonio Fluminham Jr., por suas sugestões valiosas.

Tamara Canto Fonseca, pela amizade e inestimável auxílio.

- À minha família, pela grande ajuda prestada.
- Ao meu esposo, pela compreensão e companheirismo.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	v
RESUMO	xi
SUMMARY	xiv
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	05
2.1. Classificação taxonômica	05
2.2. Cromossomos meióticos	09
2.2.1. Irregularidades meióticas	13
2.3. Cromossomos somáticos	19
2.4. Biologia floral	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1. Biologia floral, macrosporogênese e microsporogênese	29
3.2. Cromossomos somáticos	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1. Biologia floral	35
4.1.1. Flores masculinas	37
4.1.2. Flores femininas	40
4.2. Gametogênese	46
4.2.1. Microsporogênese	46
4.2.2. Macrosporogênese	61
4.3. Cromossomos somáticos	69
5. CONCLUSÕES	80
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
7. APÊNDICE	90

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Esquemas de flor feminina e masculina de seringueira	24
Figura 2 - Corte transversal de flor masculina do clone AVROS 1328 mostrando os cinco esta- mes com anteras bilobadas e tetralocula- das, com CMGP em prófase I	39
Figura 3 - Corte longitudinal de flor masculina do clone PR 107 mostrando os sacos políni- cos (sp) com grãos de pólen maduros	39
Figura 4 - Corte transversal de flor masculina do clone PR 107 com seis anteras tetralocu- ladas preenchidas por grãos de pólen ma- duros	39
Figura 5 - Corte transversal de flor masculina do clone GT 711 onde uma das anteras possui seis lóculos (SETA)	39
Figura 6 - Corte transversal de flor feminina do clone GT 711 onde são vistas as sépalas (s) circundando externamente o ovário(o) com três carpelos (c), com um óvulo mos- trando uma CMSE ao centro	42

Figura 7 - Corte longitudinal de flor feminina de Fx 25 mostrando um só óvulo com sua CMSE indicada por uma seta	42
Figura 8 - Corte transversal de flor hermafrodita onde aparece o ovário triloculado circun ^u dado pelos estames (es) com grãos de pólen maduros. Clone Tjir 16	42
Figura 9 - Flor hermafrodita de GT 711 em corte transversal mostrando ovário tetralocula ^a do e estames (es) com grãos de pólen maduros	42
Figura 10 - Corte transversal de flor feminina mostrando dois óvulos em um único <u>l</u> óculo, no clone RRIM 526	44
Figura 11 - Secção de uma antera do clone IAC 1 com células-mães dos grãos de pólen (CMGP) recém formadas	49
Figura 12 - Corte de uma antera do clone AVROS 1328 mostrando CMGP em prófase I (paquíteno)	49
Figura 13 - Corte em antera de PR 107 com CMGP em início de prófase	49

Figura 14 - Paquíteno bem caracterizado no clone AVROS 1328	49
Figura 15 - Cromossomos visíveis como uma massa eno- velada e mais compactada no clone PB 86	51
Figura 16 - Metáfase I, em vista polar, no clone IAC 1. Note-se os bivalentes bem compac- tados	54
Figura 17 - Metáfase I, em vista lateral, no clone AVROS 1328	54
Figura 18 - Anáfase I observada no clone AVROS 1328	54
Figura 19 - Fotomicrografia do clone GT 711 mostran- do uma célula em anáfase I com dois cro- mossomos retardatários ("laggards") ...	54
Figura 20 - Fotomicrografia mostrando duas CMGP em telófase I, no clone AVROS 1328	57
Figura 21 - No destaque (seta) uma CMGP em prófase II, em AVROS 1328. Nota-se os dois nú- cleos com nucléolos evidentes. Não há citocinese	57
Figura 22 - CMGP em metáfase II, em vista polar, no clone AVROS 1328	57

Figura 23 - Anáfase II no clone AVROS 1328 mostrando a segregação cromatídica	57
Figura 24 - Telófase II bem caracterizada no clone AVROS 1328	59
Figura 25 - Tétrade resultante do processo meiótico no clone IAC 1	59
Figura 26 - Micrósporos ainda envolvidos pela parede celular da CMGP, em AVROS 1328. A <u>se</u> ta mostra uma tétrade	59
Figura 27 - Grão de pólen maduro do clone PR 107 mostrando os dois núcleos, vegetativo e generativo (seta)	59
Figura 28 - Célula-mãe do grão de pólen (CMGP) de AVROS 1328 mostrando dois nucléolos em início de prófase I	62
Figura 29 - Célula-mãe do saco embrionário do clone PR 107 em início de prófase I	64
Figura 30 - Paquíteno em CMSE do clone RRIM 526 ...	64
Figura 31 - CMSE do clone RRIM 526 mostrando os cromossomos mais condensados, em final de prófase I	64

Figura 32 - CMSE do clone GT 711 em anáfase I	64
Figura 33 - Saco embrionário no estágio binucleado (pós-meiótico) em tjir 16	67
Figura 34 - Saco embrionário tetranucleado no clone AVROS 1328. A seta indica o 4º núcleo cujo nucléolo não é visível em função do corte	67
Figura 35 - As fotomicrografias mostram os oito nú- cleos do saco embrionário completo, no clone Tjir 16. Devido ao seu tamanho não é possível sua visualização em um único corte. a) quatro núcleos b) um nú- cleo c) um núcleo d) dois núcleos ...	67
Figura 36 - Cromossomos metafásicos do clone PR 107. Observam-se os $2n=36$ cromossomos	72
Figura 37 - Complemento cromossômico do clone C 297 com os $2n=36$ cromossomos. As setas indi- cam a localização de dois satélites ...	72
Figura 38 - Metáfase mitótica no clone RRIM 513 com 36 cromossomos	72
Figura 39 - Cromossomos somáticos de RRIM 526 ($2n=$ 36)	72

Figura 40 - Metáfase com $2n=36$ cromossomos em célula de ponta de raiz do clone AVROS 1328	75
Figura 41 - Cromossomos metafásicos do clone GT 711 com $2n=36$. Note-se o alto grau de condensação	75
Figura 42 - Célula somática de AVROS 1328 mostrando 36 cromossomos	75
Figura 43 - Complemento cromossômico com os 36 cromossomos do clone Tjir 16	75
Figura 44 - Fotomicrografia mostrando os 36 cromossomos de IAC 2	77
Figura 45 - Célula de ponta de raiz do clone PR 107 com número duplicado de cromossomos. <u>No</u> te-se o tamanho reduzido dos mesmos ...	77
Figura 46 - Cromossomos "pulverizados": número duplicado e tamanho reduzido. Clone RRIM 526	77
Figura 47 - Telófase no clone RRIM 526 mostrando distribuição irregular dos cromossomos, alto grau de condensação e presença de cinco "laggards"	77

CITOGENÉTICA DA SERINGUEIRA [*Hevea brasiliensis*
(Willd. ex. Adr. de Juss.) Muell. Arg.]

Autora: SILVIA MARINA CUCO

Orientador: PROF. DR. GERHARD BANDEL

RESUMO

A seringueira, apesar da grande importância de seu produto comercial, o látex, é muito pouco estudada e conhecida, especialmente em aspectos básicos, como a genética da espécie.

O presente estudo foi idealizado com a finalidade de se obter informações sobre a biologia floral e o comportamento cromossômico, tanto na meiose como na mitose, na intenção de um melhor conhecimento da espécie.

Através da análise de cortes histológicos de botões florais foi realizado um estudo sobre a biologia floral, ou seja, a organização interna das flores, em 13 clones de H. brasiliensis, a saber: GT 711, PR 107, AVROS 1328, Fx 25, RRIM 526, Tjir 16, IAC 1, RRIM 600, IAN 2652, IAC 2, PB 86, IAN 2813 e Tjir 1. Observou-se que as flores masculinas possuem dez estames divididos em dois verticilos, circundando o andróforo, com anteras bilobadas e tetraloculadas. Como exceções observaram-se flores com seis estames em um plano e anteras hexaloculadas. A estrutura típica da flor feminina consta de um ovário triloculado, contendo em cada carpelo um único óvulo onde se forma o saco embrionário. Como alterações

observaram-se ovários tetraloculados e lóculos com dois óvulos.

Observou-se que 25,81% das flores dos clones GT 711, AVROS 1328, PR 107 e Tjir 16 eram, na realidade, hermafroditas, em cuja estrutura os estames circundam o ovário. Nos clones Fx 25 e RRIM 526 as flores são sempre unisexuadas. As flores masculinas são sempre exclusivamente masculinas, em todos os clones.

Os resultados mostram evidências de ocorrência de protandria em seringueira, uma vez que nas flores hermafroditas analisadas os grãos de pólen já estavam maduros enquanto as células-mães dos sacos embrionários ainda estavam em prófase I. Além disso, como os botões florais foram estudados antes da antese, há a possibilidade de tais clones serem cleistogâmicos.

O estudo da microsporogênese mostrou que a meiose se dá de forma normal, com 18 bivalentes na metáfase I e formação de tétrades normais. Na microsporogênese também não foi detectada nenhuma irregularidade meiótica, em algumas das fases observadas.

No presente estudo foram também realizadas contagens cromossômicas em pontas de raízes dos clones RRIM 513, RRIM 509, C 297, PR 107, Tjir 16, RRIM 526, GT 711, AVROS 1328 e IAC 2. Os resultados obtidos mostram um número de $2n=36$ cromossomos somáticos em todos os materiais, sem alterações significativas no ciclo meiótico. Como exceções, as irregularidades foram células com número duplicado de cromossomos e em grande contração ("pulverizados"), células com os cromossomos excessivamente compactados e ocorrência de "laggards".

Dos resultados obtidos conclui-se também que todos os materiais estudados apresentam mitose e meiose normais e, conseqüentemente, não há problemas de fertilidade. Portanto, as altas taxas de abscisão de flores e frutos não têm causa citogenética mas possivelmente fisiológica.

CYTOGENETICS OF RUBBER TREE [*Hevea brasiliensis*
(Willd. ex. Adr. de Juss.) Muell. Arg.]

Author: SILVIA MARINA CUOCO

Adviser: PROF. DR. GERHARD BANDEL

SUMMARY

The rubber tree, in spite of the importance of its commercial product (latex), is poorly studied and known, specially in basic features like the cytogenetics.

This study was designed in order to obtain in formation about the flower biology and chromosome behaviour in meiosis as well as in mitosis, aiming a larger knowledge about the species.

Through the analysis of histological cuts of flower a study was carried out on flower biology, that is, internal organization of flower, in 13 clones of H. brasiliensis: GT 711, PR 107, AVROS 1328, Fx 25, RRIM 526, Tjir 16, IAC 1, RRIM 600, IAN 2652, IAC 2, PB 86, IAN 2813 e Tjir 1. It was observed that male flowers have basically ten stamens divided in two levels around the androphore, with bilobated and tetraloculated anthers. Exceptions were flowers owing six stamens in one level and hexaloculated anthers. The typical structure of the female flower is made of one triloculated ovary containing in each carpel an only one ovule where the embryonic sac is originated. Alterations were tetraloculated ovary and locules with two ovules.

A number of 25.81% of GT 711, AVROS 1328, PR 107 and Tjir 16 were hermaphrodite, with stamens situated around the ovary. Clones Fx 25 and RRIM 526 have flowers which are always female or male. Male flowers are almost exclusively male in all clones.

Results show evidences of protandry in rubber tree, since the analysed hermaphrodite flowers were already mature while embryonic sac mother cell were in prophase I yet. As flowers were studied before the anthesis, there is a possibility of such clones be cleistogamies.

The study of microsporogenesis showed that meiosis occurs in a normal way, with 18 bivalents at metaphase I and creation of normal tetrads. During the megasporogenesis it was not detected any meiotic abnormality in some observed phases of the meiotic cycle.

In the present study were also counted the chromosomes of RRIM 513, RRIM 509, C 297, PR 107, Tjir 16, GT 711, RRIM 526, AVROS 1328 and IAC 2. Results shown $2n=36$ somatic chromosomes in all materials, without significant alterations in mitotic cycle. Exceptions were cells containing doubled chromosome number which were very contracted, cells in which chromosomes are quite compacted and occurrence of laggards.

Based on the results it was also concluded that all materials presented normal mitosis and meiosis and consequently no fertility problems. High rates of flower and fruit abscission do not have cytogenetic cause but possibly physiological one.

1. INTRODUÇÃO

Há várias espécies de plantas produtoras de látex dentro das famílias Euphorbiaceae, Moraceae, Apocynaceae, Asclepiadaceae, Asteraceae e Sapotaceae (ALBUQUERQUE, 1981). Dentre todas as plantas laticíferas sobressai-se o gênero Hevea, da família Euphorbiaceae, que possui 11 diferentes espécies.

SCHULTES (1977b) afirma que dentre todas as espécies do gênero somente três produzem látex de qualidade aceitável: Hevea benthamiana, Hevea brasiliensis e Hevea guianensis. Por sua superioridade Hevea brasiliensis foi eleita para domesticação no século passado.

A partir de sua descoberta (que parece ter ocorrido à época do descobrimento da América, de acordo com SCHULTES, 1977b) a seringueira alcançou logo grande importância, a ponto de caracterizar determinado período da história, o "Ciclo da Borracha". Hoje é indispensável em uma grande variedade de produtos industrializados, utilizados com as mais diversas finalidades.

A borracha natural é um hidrocarboneto de alto peso molecular, dito isopreno polimerizado, cujos grupos

isoprenos (C_5H_8) são arranjados em longas cadeias filiformes. Este hidrocarboneto é produzido em numerosas células especializadas e incisões na planta fazem escorrer o fluido de aspecto leitoso chamado látex.

Dentre os produtos naturais a borracha é a única que apresenta características especiais combinadas como elasticidade, plasticidade, resistência à abrasão, propriedades de isolamento elétrico e impermeabilidade a líquidos e gases (SCHULTES, 1977b).

Apesar do aparecimento dos elastômeros sintéticos e do contínuo desenvolvimento de estudos neste setor, o consumo de borracha natural tem aumentado gradativamente no mundo. Pelos conhecimentos atuais, a borracha natural não pode ser substituída pelo produto sintético em uma gama de manufaturados que exigem características que somente aquela lhes pode conferir. Alto grau de plasticidade e dissipação ao calor são próprios de artigos produzidos com borracha natural (CARDOSO, 1989).

Embora a borracha sintética seja superior para algumas utilizações ainda é inferior para pneumáticos, produto que requer cerca de 75% da produção mundial de borracha natural.

De acordo com SCHULTES (1977b) a borracha natural ocorre em cerca de 7000 espécies, em plantas de ambos os hemisférios. Entretanto, nenhuma das grandes civilizações do Velho Mundo parece tê-la utilizado em grande quantidade. Mesmo no Ocidente, os nativos usavam-na para propósitos secundários. Os índios amazônicos utilizavam as sementes ricas em carboidratos como fonte de alimento. Os exploradores vindos da Espanha encontraram índios jogando bolas de borracha

produzidas a partir da Castilla elastica, planta nativa da América. Foram os portugueses que primeiro entraram em contato com a exploração de Hevea, cujo centro primário de diversidade genética é a bacia do Rio Negro (WYCHERLEY, 1977).

O ano de 1823 foi um marco na história da borracha natural pela descoberta do escocês Charles Macintosh de que a borracha se dissolve em nafta, o que possibilitou a industrialização de manufaturados. Mas, o marco mais importante na história para a indústria ocorreu a partir de 1839 quando Charles Goodyear descobriu a vulcanização, que permitiu muitas novas aplicações do produto.

No entanto, a era moderna da seringueira inicia-se em 1876 quando as sementes contrabandeadas do Brasil por Henry Wickham chegam ao Jardim Botânico de Kew, na Inglaterra (DEAN, 1989).

O Brasil alcançou o índice de 98% da produção mundial de borracha natural, no início deste século, quando era o segundo produto brasileiro mais exportado. Perdeu esta posição por volta de 1910 quando as colônias britânicas e holandesas do sudeste asiático colocaram no mercado a borracha produzida em seus seringais (DEAN, 1989). Hoje, produz menos de 1% do total mundial e importa cerca de 75% do consumo interno (BERNARDES et alii, 1990).

Considerando-se a grande importância do látex, cuja produção é controlada principalmente pelo potencial genético da planta, pode-se dizer que a seringueira é pouco estudada.

De acordo com GONÇALVES (1986), num programa de melhoramento o tempo necessário desde o início das polinizações controladas até a recomendação de clones para plantio

em larga escala é de 30 anos. Isto, aliado à sazonalidade, falta de sincronismo no florescimento e baixo sucesso de polinização, entre outros, torna imperioso um conhecimento o mais detalhado possível do material a ser tomado como base em um programa de melhoramento. Assim, é fundamental a realização de estudos básicos que permitam o conhecimento do gênero para uma racionalização de esquemas de melhoramento.

Desta forma, o presente trabalho foi idealizado com o objetivo de contribuir para um melhor conhecimento de Hevea. Pretendeu-se analisar tanto a macrosporogênese como a microsporogênese, eventos muitas vezes relacionados a problemas de fertilidade e baixo pegamento de frutos. A seringueira apresenta baixo percentual de frutificação o que pode estar relacionado à formação irregular de grãos de pólen ou de megásporos, os produtos finais da meiose.

Além da análise detalhada dos cromossomos meióticos e gametogênese, outro objetivo foi o estudo dos cromossomos mitóticos, na intenção de se obter informações sobre a estrutura dos cromossomos somáticos e funcionamento do ciclo celular, em vários clones de Hevea brasiliensis.

Complementando, desejava-se observar a morfologia e estrutura floral da espécie.

Desta forma, o estudo engloba vários aspectos simultaneamente: funcionamento cromossômico, celular e da flor como um todo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Classificação taxonômica

Embora Hevea seja uma entidade taxonômica bem definida e, portanto, de fácil reconhecimento, desde o início estudos no gênero sempre foram confusos, contraditórios, e houve muita discordância entre os botânicos.

A seringueira é muito pouco estudada, e isto fica mais patente especialmente se comparada com importantes culturas alimentícias como milho, soja, trigo, entre outras. Além de escassos, os estudos são isolados, ou seja, não há um interrelacionamento entre eles. Desta forma, ainda hoje não se tem um conhecimento global do gênero, que carece de informações sob vários aspectos.

A história botânica do gênero Hevea inicia-se em 1775 com a descrição de H. guianensis pelo botânico francês Fusée Aublet. Quatro anos mais tarde, L. C. Richard propôs um novo nome para Hevea, Siphonia, indicando claramente tratar-se da Hevea de Aublet. Dois anos depois, Gmelin publicou um terceiro nome genérico para a mesma, Caoutchoua, dando o nome de C. elastica para a H. guianensis de Aublet. Em

1844 R. Brown descreveu um espécime de H. brasiliensis com o nome de Micrandra ternata (SCHULTES, 1970).

De todos estes epítetos genéricos somente Hevea e Siphonia foram utilizados na literatura botânica, até que o Código Internacional deixou claro ser Hevea o nome correto.

Durante muitos anos somente se tinha notícia de H. guianensis. Somente em 1801 o botânico alemão Karl Ludwig Willdenow descreveu H. brasiliensis. Em 1824 Jussieu publicou o binômio Siphonia brasiliensis. A seguir, passaram-se mais 30 anos sem qualquer acréscimo ao assunto até que em 1854 Bentham descreveu cinco novas espécies e no ano seguinte Spruce propôs mais uma. Foi então que Bentham propôs um tipo de classificação infragenérica colocando S. elastica, S. brasiliensis, S. discolor, S. spruceana e S. pauciflora em uma seção caracterizada por estigma séssil e trilobado e S. lutea e S. rigidifolia em outra seção, com estilo menos pronunciado.

Uma segunda classificação infragenérica foi feita em 1858 por Baillon. Ele dividiu Siphonia em duas seções, Hevea e Bisiphonia. A seção Hevea abrangia a agora chamada Hevea guianensis e H. guianensis var. lutea. A seção Bisiphonia incluía as espécies hoje tidas como H. brasiliensis, H. pauciflora, H. spruceana, H. benthamiana e H. rigidifolia.

Em 1865 Müller-Argovienensis sugere uma classificação abrangente no gênero. Hevea foi colocada na tribo Hippomaneae, com várias subtribos. Em 1874 o mesmo autor fez algumas modificações na classificação anteriormente proposta.

Até 1906 houve novo espaço de tempo sem atenção ao assunto quando então Huber iniciou detalhados estudos

no gênero e introduziu o nome de novas espécies, H. lutea, H. apiculata, H. cuneata, H. duckei, H. randiana, H. discolor, H. confusa e H. viridis entre as já conhecidas H. benthamiana, H. paludosa, H. rigidifolia, H. brasiliensis, H. pauciflora e H. nitida. Em 1910 o autor reconhecia cerca de 25 espécies de Hevea.

Em 1910 Pax reconhecia 17 espécies no gênero, dividindo Hevea em duas seções, Euhevea, que abrangia três espécies, e Bisiphonia, com as demais 14 espécies.

De 1929 a 1935 Ducke publicou vários textos dizendo que a classificação de Hevea era difícil devido à irregularidade de características morfológicas e por causa da grande afinidade ou proximidade entre as espécies.

Por outro lado, até esta época já haviam sido publicadas cerca de 37 espécies de seringueira, com algumas dezenas de formas, quando finalmente DUCKE (1946) conseguiu estabelecer certa ordem e, criteriosamente, reduziu o gênero a nove espécies. SCHULTES (1970) fornece uma relação de 39 espécies, divididas em muitas variedades, num total de 96 diferentes formas de Hevea.

BALDWIN JR (1947) realizou uma análise citogeográfica de Hevea na região amazônica e concluiu que o gênero possuía nove espécies, a saber: H. spruceana, H. benthamiana, H. viridis, H. confusa, H. rigidifolia, H. pauciflora, H. guianensis, H. minor e H. brasiliensis. Ainda assim reconhece ser Hevea um gênero de difícil caracterização taxonômica.

No Peru, SEIBERT (1947) reconheceu oito espécies e uma variedade, H. guianensis, H. spruceana, H. pauciflora, H. nitida, H. guianensis var lutea, H. benthamiana, H.

brasiliensis, H. microphylla e H. rigidifolia.

Os estudos de SCHULTES (1977a) levaram-no a reconhecer nove espécies e quatro variedades, H. microphylla, H. brasiliensis, H. nitida, H. nitida var. toxicodendroides, H. pauciflora, H. pauciflora var. coriacea, H. rigidifolia, H. camporum, H. spruceana, H. benthamiana, H. guianensis, H. guianensis var. lutea e H. guianensis var. marginata. Concor dantemente, WYCHERLEY (1977) também reconhece as mesmas nove espécies em um trabalho onde descreve a distribuição política, geomórfica, climática e o habitat das referidas.

Finalmente, Pires, citado por GONÇALVES et alii (1983), reconheceu 11 espécies, com a inclusão de H. camargoana, por ele encontrada na Ilha de Marajó.

A classificação atual das espécies do gênero Hevea é baseada nos estudos realizados por Baillon e Müller Argoviensis, citados em SCHULTES (1977). Pires e Gomes, citados por GONÇALVES et alii (1983), ordenaram as espécies e hoje são reconhecidas no Brasil 11, a saber:

- H. brasiliensis (Willd. ex A. Juss.) Muell. Arg.
- H. guianensis Aub.
- H. benthamiana Muell. Arg.
- H. nitida Mart. ex Muell. Arg.
- H. pauciflora (Spr. ex Bth) Muell. Arg.
- H. rigidifolia (Spr. ex Bth.) Muell. Arg.
- H. camporum Ducke
- H. spruceana (Bth.) Muell. Arg.
- H. microphylla Ulle
- H. camargoana Pires
- H. paludosa Ule Jahrb

2.2. Cromossomos meióticos

HEUSSER (1919) foi o pioneiro na realização de estudos em órgãos reprodutivos de H. brasiliensis, no que diz respeito à meiose. Analisando células generativas da espécie chegou ao número de oito cromossomos. No entanto, seu trabalho é superficial, sem entrar em detalhes do processo meiótico.

Durante um período de mais de uma década nenhum dado novo foi adicionado ao tema até que BANGHAM (1931) realizou contagens cromossômicas em células-mães dos grãos de pólen (CMGP) de H. brasiliensis onde observou 17 cromossomos sofrendo divisão normal em todas as células analisadas.

Um trabalho elucidativo foi conduzido por RAMAER (1935) onde se determinou o número correto de cromossomos de Hevea como sendo $2n=36$ e $n=18$. O referido autor estudou a meiose em CMGP de quatro espécies, H. brasiliensis, H. spruceana, H. guianensis, H. collina, e dois híbridos H. collina X H. brasiliensis e H. spruceana X H. brasiliensis.

Trata-se do primeiro trabalho em Hevea a descrever o processo meiótico em sua totalidade, de prófase I a anáfase II. Constatou que as CMGP nas várias anteras de uma flor muitas vezes estão em diferentes fases do ciclo. Os estádios de maior duração foram encontrados em número maior de estames, ao mesmo tempo. Às vezes, nos quatro lóculos de uma antera as CMGP da parte superior em estágio mais avançado que as da parte inferior.

Observou que as fases de leptóteno e zigóteno são indistinguíveis, os cromossomos apresentam-se como filamentos muito delgados e enovelados. O paquíteno foi o primei

ro estágio identificável da prófase. Da mesma forma que o leptóteno, o diplóteno consistia de uma complicada massa de filamentos finos e alças. No diplóteno o conteúdo nuclear se espalha por toda a célula, o nucléolo desaparece e aumenta a compactação dos cromossomos. Metáfase I e anáfase I se processam normalmente e têm curta duração. Na telófase I duas novas membranas nucleares são formadas. A seguir dá-se a intercinese, onde cada cromossomo é visto individualizado e um ou vários nucléolos aparecem. Após o desaparecimento das duas membranas nucleares ocorrem metáfase, anáfase e telófase da segunda divisão meiótica. À telófase II segue-se uma fase que muito se assemelha com a intérfase, até que a CMGP se organiza em tétrades de grãos de pólen jovens, uninucleados.

O trabalho apresenta uma descrição detalhada das observações feitas em cada etapa do ciclo meiótico, ilustrada por representações esquemáticas das mesmas. Nas espécies estudadas observou que a meiose dá-se de forma absolutamente normal.

Novamente, mais de uma década se passa sem acréscimos. WARMKE (1950) estuda a meiose em anteras de H. brasiliensis e afirma ser o processo completamente normal e regular, com os cromossomos se associando sempre em 18 bivalentes na metáfase I. Afirma ainda que o fato dos cromossomos se associarem aos pares e sofrerem meiose regular pode indicar que a alta taxa de abscisão de flores e frutos em H. brasiliensis não é causada por distúrbios citológicos.

Repetindo o intervalo de tempo, dez anos depois BOUHARMONT (1960) estuda a microsporogênese em cinco espécies de Hevea, H. collina, H. guianensis, H. benthamiana,

H. brasiliensis e H. spruceana. Neste trabalho, o enfoque está no comportamento cromossômico através das várias fases do ciclo meiótico, ou seja, o autor faz uma descrição detalhada da morfologia cromossômica em cada etapa, níveis de compactação, diferenças de coloração ao longo dos mesmos, conformação de bivalentes e quadrivalentes na diacinese, número e posicionamento de quiasmas.

O referido trabalho fornece esquemas das várias fases da microsporogênese e conclui ser a mesma regular e idêntica nas cinco espécies estudadas. Como única exceção observou em H. guianensis três esporócitos com um ou dois cromossomos telofásicos retardatários formando micronúcleos, e uma única célula com ponte anafásica. No entanto, afirma que tais anomalias não podem ter influência na fertilidade do indivíduo, pois são muito raras. O estudo da meiose permitiu ao autor a conclusão da origem anfidiplóide de Hevea.

MAJUMDER (1964) realizou estudos meióticos em seis clones de H. brasiliensis e em todos os casos as diversas fases da meiose mostraram-se absolutamente normais. Constataram-se sempre 18 bivalentes na diacinese, 18 cromossomos na anáfase I e clara segregação dos mesmos na anáfase II e formação de tétrades aparentemente normais. Observou somente poucos casos onde eram vistos um ou dois cromossomos perdidos ou pontes cromossômicas na anáfase I.

No mesmo trabalho, cinco clones macho-estéreis foram examinados (não especificados) e também nestes a meiose foi normal, exceto em poucos casos onde as irregularidades constatadas foram semelhantes às observadas nos clones normais. Tétrades normais foram visualizadas, mas cerca de 80% a 95% dos grãos de pólen estavam vazios ou deformados.

Concluiu que as irregularidades detectadas não têm efeito sobre a fertilidade dos clones e que a macho-esterilidade não se deve a elas, e que talvez as tétrades formadas sofram processo degenerativo no desenvolvimento posterior.

ONG (1975) estudou a morfologia de cromossomos paquitênicos de cinco clones, GT 1 (macho-estéril), Tjir 1, PB 86, RRIM 501 e RRIM 600. Neste caso, o enfoque não está na análise do ciclo meiótico mas sim na morfologia e comportamento dos cromossomos na prófase meiótica, mais precisamente na fase de paquíteno.

Os idiogramas dos 18 bivalentes do complemento cromossômico foram construídos com base no comprimento cromossômico total, relação de braços, segmentos heterocromáticos, padrão de cromômeros, localização de satélites e região organizadora do nucléolo. Os resultados mostraram que existe homologia no comprimento cromossômico entre vários pares de cromossomos, confirmada pela formação de multivalentes, especialmente quadrivalentes, que às vezes ocorreu. Multivalência foi relativamente mais frequente no clone macho-estéril GT 1 que nos outros quatro estudados. Isto, aliado à presença de quatro satélites no complemento suportam a idéia de que H. brasiliensis é um anfidiplóide ($2n=36$) e poderia ser descendente de cruzamento entre duas espécies com $2n=18$ cromossomos. Conclui ainda que o número básico de cromossomos é provavelmente $x=9$.

LECONTE (1984) estudou a reprodução sexuada em vários clones de H. brasiliensis (não identificados). Afirou que na maior parte deles onde se estudou a microsporogênese, o processo de formação de grãos de pólen não apresentou nenhuma anomalia. A meiose deu-se normalmente, formando

os micrósporos haplóides associados em tétrades que depois se separam e sofrem diferenciação dando grãos de pólen binucleados.

Confirmando a idéia proposta por MAJUMDER (1964) de que a macho-esterilidade não se deve a irregularidades meióticas, o referido autor afirma que a microsporogênese no clone GT 1 não apresentou nenhuma alteração significativa. As tétrades se formaram normalmente, mas não foram liberadas e sofreram degeneração citoplasmática ao invés de entrarem em processo de diferenciação.

Quanto à macrosporogênese, LECONTE (1984) somente mostra que a meiose produz três megásporos haplóides (ao invés de quatro). Dois se degeneram e um sofre diferenciação e forma o saco embrionário octanucleado. Com relação ao processo meiótico da gametogênese feminina não há nenhuma referência. Disse apenas que nenhuma anomalia foi detectada na macrosporogênese e que a abscisão floral precoce de flores fecundadas deve-se a uma estratégia de plantas tropicais. Este é o único trabalho a citar alguma informação sobre a megasporogênese.

2.2.1. Irregularidades meióticas

Como se pode observar na escassa literatura existente sobre o assunto, os materiais (clones ou espécies) estudados do ponto de vista da microsporogênese mostram que o comportamento cromossômico é absolutamente normal no decorrer do ciclo meiótico, não confirmando o argumento de que a

baixa fertilidade de Hevea está relacionada a irregularidades na meiose. Irregularidades deste tipo somente foram detectadas em análises de flores oriundas de plantas macho-estéreis (naturais ou induzidas) ou que sofreram poliploidização artificial.

RAMAER (1935), no mesmo trabalho citado anteriormente, apresenta a análise meiótica em clones macho-estéreis onde foram detectadas várias anomalias que o autor julgou serem as causas da macho-esterilidade. Observou que as divisões da CMGP parecem iniciar - se em estágio bem precoce do desenvolvimento do lóculo. Metáfases irregulares também foram observadas. Em alguns casos os cromossomos não se arranjavam na placa equatorial, mas ficavam separados em vários locais do fuso. Em outros casos há cromossomos perdidos próximos à placa metafásica ou nos polos e concluiu tratar-se de univalentes. Além de univalentes e bivalentes, trivalentes e multivalentes também foram encontrados. Com isto tudo, a distribuição na anáfase também foi irregular. Em um dos clones notou assínapse completa, onde apareceram somente univalentes na diacinese. Na telófase foram observados micronúcleos em várias células que resultaram em hexas, octas, etc. Em plantas completamente estéreis não encontrou tétrades normais.

Os trabalhos citados anteriormente de MAJUMDER (1964) e LECONTE (1984) também demonstram irregularidades meióticas, apesar de terem concluído, diferentemente de RAMAER (1935), que tais anormalidades não são a causa da macho esterilidade.

Além destes, há outros estudos relacionando a macho-esterilidade a problemas meióticos.

No Rubber Research Institute of India (RRII), ANNAMMA et alii (1980) realizaram uma seleção de clones resistentes a Phytophthora spp e entre os selecionados encontraram dois macho-estéreis, RRII 15 e RRII 17. O RRII 17 produziu frutos mas o primeiro não produziu nenhum. Análise meiótica destes clones mostrou uma série de anomalias. No clone RRII 15 observaram-se univalentes, bivalentes e multivalentes causando anáfase I anormal, com segregação cromossômica desigual e presença de retardatários, fatos que levaram à formação de dois a seis esporos por CMGP. No clone RRII 17 ocorreu inibição de formação de bivalentes em diacinese e metáfase I. Consequentemente, todas as fases posteriores foram irregulares. O número de esporos por CMGP variou de dois a nove, com diferentes tamanhos. Os autores concluem que a esterilidade do pólen nestes dois clones deve-se às irregularidades meióticas.

SARASWATHY AMMA et alii (1990a) realizaram estudos meióticos em dois clones de H. brasiliensis, RRII 17, macho-estéril, e RRII 105, normal. O clone fértil não apresentou anormalidades meióticas e mostrou 18 bivalentes na metáfase I. Ao contrário, estudos meióticos em flores masculinas do clone estéril mostraram um grande espectro de irregularidades meióticas. O comportamento normal de formação de 18 bivalentes nunca foi observado, com predominância de univalentes, variando de oito a 32. Não houve orientação destes univalentes na placa metafásica (distribuíram-se ao acaso) e houve ocorrência de cromossomos perdidos na placa equatorial. A anáfase I também foi altamente irregular, com distribuição desigual dos cromossomos, ausência de movimento na direção dos polos e número variável de retardatários, o que resultou

em graus variáveis de desbalanço cromossômico. A distribuição dos micrósporos no estágio de tétrade variou de três a nove e após sua formação ocorreu completa degeneração de citoplasma e núcleos, resultando na formação de grãos de pólen estéreis, com diferentes formas e tamanhos. Este é o primeiro relato de dessinapse em H. brasiliensis, ou seja, a ocorrência de irregularidades no pareamento dos cromossomos na meiose, resultando em esterilidade.

A megasporogênese não foi discutida e os autores limitaram-se em afirmar que foram encontrados sacos embrionários em degeneração e concluíram que a baixa produção de frutos, tanto sob condições naturais como em hibridações artificiais, pode indicar a possibilidade de dessinapse nos megásporos.

SARASWATHY AMMA et alii (1990b) submeteram sementes de H. brasiliensis em germinação à ação de raios gama. Como resultado obtiveram plantas mutantes macho-estéreis com várias anomalias meióticas. Das flores masculinas, 15% mostraram citomixia, ou seja, transferência de conteúdo citoplasmático de uma célula a outra. Conexões citoplasmáticas foram observadas em todos os estádios da meiose nas CMGP. Também observaram transferência de cromatina de uma célula a outra desde a prófase I até a telófase II, o que resulta em células com número diferente de cromossomos ao invés dos $n=18$. Foram vistas formações de pontes anafásicas em 3% das células, com ou sem retardatários. Após a telófase II notaram citocinese aberrante resultando em total esterilidade. Devido às aberrações citocinéticas a distribuição dos núcleos variou grandemente.

Este foi o primeiro relato de radiação indu-

zindo macho-esterilidade em H. brasiliensis. A esterilidade deveu-se, neste caso, a um desbalanço genético causado pelos raios gama. Citomixia e aberrações citocinéticas, isto é, aberrações na separação dos territórios citoplasmáticos no final do processo de divisão celular, também causam esterilidade. Entretanto, a planta produziu frutos, indicando que é femea-fértil.

A opinião de ONG et alii (1984) é de que trabalhos de indução de poliploidia em H. brasiliensis parecem mais promissores que de indução à mutação. Na indução por irradiação há alta taxa de mortalidade e alterações morfológicas, em plantas irradiadas com raios X ou gama.

A maioria dos trabalhos sobre poliploidização artificial não envolve análises citológicas mas somente uma descrição das alterações morfológicas nas plantas resultantes dos tratamentos.

CONAGIN (1971) estudou a microsporogênese em dois clones gêmeos de H. brasiliensis obtidos pelo seccionamento de uma semente nos primeiros estádios de germinação. Uma das gemas foi imersa em solução de colchicina e originou planta com $2n=72$ cromossomos. A outra, não tratada, resultou em uma planta normal fértil, com $2n=36$ cromossomos. O estudo da microsporogênese mostrou que o clone normal apresentou a meiose regular, com 18 bivalentes na diacinese, segregação anafásica sem retardatários e 100% de tétrades normais, sendo a frequência de grãos de pólen vazios não superior a 10%. O clone duplicado apresentou algumas anormalidades meióticas. Em metáfase I os cromossomos às vezes não se ordenaram perfeitamente na placa equatorial, o que causou segregação ana-

fásica irregular e formação de núcleos telofásicos com cromossomos retardatários. No entanto, também foram observadas células com meiose normal. O clone em questão pode ser considerado macho-estéril, pois foram detectados 18,8% de tétrades com micrócitos excedentes, 33,3% de grãos de pólen vazios e também grãos de pólen aparentemente normais mas que não passam pelas mitoses pós-meióticas do processo de diferenciação.

ONG (1980) estudou os cromossomos meióticos de sete espécies de Hevea: H. benthamiana, H. brasiliensis, H. guianensis, H. nitida, H. pauciflora, H. rigidifolia e H. spruceana. Nas CMGP analisadas a configuração usual observada foi de 18 bivalentes na metáfase I, em todas as espécies estudadas. Ocasionalmente, um ou dois quadrivalentes foram encontrados, mas em frequência muito baixa. O número de quiasmas por célula foi de 28 em todas as espécies.

SARASWATHY AMMA et alii (1984) realizaram estudos citomorfológicos em um poliplóide induzido de H. brasiliensis. Na planta testemunha, normal, com 36 cromossomos somáticos, não ocorreram alterações meióticas, com 18 bivalentes na metáfase I, apesar da aderência cromossômica ser uma característica comum. Na planta cujos cromossomos foram duplicados a meiose foi anômala. Apesar da formação predominante de bivalentes, também foram observados univalentes, trivalentes e quadrivalentes. Ocorreu segregação desigual na anáfase I, cromossomos retardatários, micronúcleos.

Além dos casos já citados de anormalidades meióticas encontradas em plantas macho-estéreis e poliploidizadas, há também alguns raros casos de triploidia. Entretanto, há somente um estudo citológico em triplóide.

NAZEER & SARASWATHY AMMA (1987) analisaram citológicamente, pela primeira vez, um triplóide espontâneo. A seguir, obtiveram um triplóide induzido, pelo cruzamento de um clone tetraplóide poliploidizado com colchicina e um clone diplóide. Procederam então o estudo da meiose em ambos os triplóides. Nos dois casos observou-se em metáfase I a ocorrência de trivalentes, bivalentes e univalentes. Um teste "t" para o número médio de trivalentes mostrou que há diferença significativa entre os dois tipos de triploidia, sendo que o triplóide natural apresenta maior frequência de trivalentes. A segregação na anáfase I e divisões subsequentes foram irregulares em ambos os casos. O triplóide espontâneo foi totalmente pólen-estéril e no induzido 5,5% do pólen apresentou resposta à coloração. Nenhum dos clones produziu sementes.

2.3. Cromossomos somáticos

Muitos dos autores citados no tópico anterior serão novamente mencionados aqui, pois são realmente poucos os pesquisadores envolvidos em estudos citológicos em seringueira, de forma que a literatura é escassa.

HEUSSER (1919) foi o primeiro na tentativa de determinar o número de cromossomos de H. brasiliensis. Erroneamente, chegou a 16 cromossomos em células vegetativas.

BANGHAM (1931) fez a segunda tentativa de determinação do número cromossômico em seringueira. Analisou materiais somáticos de quatro espécies: H. brasiliensis, H. collina, H. guianensis e H. spruceana. As contagens revela-

ram o número (incorreto) de $2n=34$ cromossomos. Foi ainda o primeiro autor a sugerir a possibilidade de ocorrência de híbridos interespecíficos férteis no gênero.

RAMAER (1935) foi quem determinou o correto número de cromossomos de Hevea. Como já foi dito anteriormente, em seu estudo encontra-se uma análise detalhada dos cromossomos meióticos de quatro espécies de Hevea. No caso de H. brasiliensis realizou contagens em células meristemáticas, onde observou $2n=36$ cromossomos somáticos.

Em 1943, PERRY realizou um estudo citológico e de relações filogenéticas na família Euphorbiaceae. Trata-se de um estudo abrangente envolvendo 109 espécies e variedades da referida família, divididas em 22 gêneros. Concordantemente com RAMAER (1935) encontrou neste estudo o número de $2n=36$ cromossomos para H. spruceana e H. brasiliensis.

No mesmo ano, PADDOCK (1943) chega aos mesmos $2n=36$ cromossomos, em análise de células meristemáticas de pontas de raízes de H. brasiliensis. Afirmou ainda que os menores e os maiores cromossomos têm aproximadamente $1\mu m$ e $2\mu m$ de comprimento, respectivamente.

Dezesseis anos mais tarde, ROSS (1959) torna a confirmar a ocorrência de $2n=36$ cromossomos em células de pontas de raízes de PR 107, um clone de H. brasiliensis.

BOUHARMONT (1960) analisou citologicamente cinco espécies de Hevea: H. guianensis, H. collina, H. benthamiana, H. brasiliensis e H. spruceana. Fornece uma descrição das alterações observadas nos núcleos das células meristemáticas e do comportamento cromossômico no decorrer do ciclo mitótico. Na maioria dos casos, somente um nucléolo estava

presente na célula. Afirmou que todas as espécies estudadas possuíam 36 cromossomos somáticos e forneceu o comprimento cromossômico total das espécies, obtido com a média de dez placas metafásicas de cada uma.

Contagens de cromossomos somáticos de seringueira foram novamente realizados por MAJUMDER (1964) nas espécies H. brasiliensis, H. benthamiana, H. pauciflora e H. spruceana. Confirmou o número de $2n=36$ cromossomos para todas as quatro espécies. Observou também que a morfologia e o tamanho dos cromossomos é similar nos diferentes clones. Os maiores cromossomos têm 3 a $3,5\mu\text{m}$ de comprimento. A maioria tem um tamanho mediano variando de 2 a $2,5\mu\text{m}$ e é muito difícil diferenciá-los. Finalmente, os menores têm um tamanho de 1 a $1,5\mu\text{m}$. Cromossomos com satélites foram observados em poucas preparações e o autor afirma que há provavelmente quatro em cada célula. Uma única célula com $2n=72$ cromossomos foi encontrada em ponta de raiz de uma plântula de Tjir 1, mas estava circundada por células normais ($2n=36$).

De um modo geral, plantas normais de seringueira apresentam nos tecidos somáticos os 36 cromossomos característicos da espécie. Discrepâncias neste número ocorrem somente em casos especiais.

BALDWIN JR (1947) encontrou um clone triplóide natural de H. guianensis com $2n=3x=54$ cromossomos. Quatro décadas depois, NAZEER & SARASWATHY AMMA (1987) encontraram um clone triplóide de H. brasiliensis na Índia.

Triplóides artificiais com 54 cromossomos também já foram obtidos através de cruzamentos entre clones tetraplóides resultantes de tratamento com colchicina e clones

normais, diplóides (SARASWATHY AMMA et alii, 1980; NAZEER & SARASWATHY AMMA, 1987; GONÇALVES et alii, 1989).

Além disso, clones tetraplóides com $2n=72$ cromossomos vêm sendo produzidos artificialmente pela ação da colchicina, tendo como finalidade principal um aumento da produção (MENDES, 1946, 1969, 1971, 1975; MENDES & MENDES, 1963; ONG et alii, 1984; SARASWATHY AMMA, 1984).

GONÇALVES et alii (1983b) trataram gemas de vários ramos do clone IAN 717 com solução de colchicina e DMSO (dimetil sulfóxido) no intuito de induzir poliploidia. As brotações que apresentaram alterações morfológicas foram multiplicadas assexuadamente como novos clones. Estudos citológicos destes, realizados em células de folhas, revelaram considerável variação no número de cromossomos, entre 53 e 72.

Números cromossômicos diferentes do normal também são observados em plantas obtidas a partir de cultura de pólen. Neste caso, o objetivo é a obtenção de plantas haplóides, mas em preparações de pontas de raízes aparecem muitas células aneuplóides, entre as quais células com 72 cromossomos são as mais comuns e células com o número haplóide $n=18$ aparecem em menor frequência (CHENG-HUA et alii, 1979; CHEN et alii, 1982).

2.4. Biologia floral

BOUYCHOU (1963) e, posteriormente, COMPAGNON (1986) fornecem uma descrição detalhada da morfologia das flores de seringueira.

Hevea é planta monóica, ou seja, apresenta flores dos dois sexos no mesmo indivíduo. As flores são unissexuadas e reunidas em inflorescências do tipo rácemo. BOUY-CHOU (1963) encontrou uma proporção média de uma flor feminina para cada 60 masculinas. Em inflorescências de grandes dimensões podem ser encontradas cerca de 3000 flores masculinas, segundo o referido autor.

As flores, tanto masculinas como femininas, apresentam algumas pequenas diferenças entre os diferentes clones e entre espécies quanto à forma, tamanho e coloração. Mas, de modo geral, são bastante semelhantes. Têm 3,5 a 8 mm de comprimento, coloração variável entre diferentes tonalidades de amarelo e são afiladas em sua extremidade. As flores masculinas são menores, mais estreitas e mais pontiagudas que as femininas (Figura 1). O envelope é diretamente inserido no pedúnculo. As flores femininas distinguem-se pela presença de um disco entumecido em sua base, de onde parte o envelope floral. O envelope, ou perianto, é composto de cinco peças, as sépalas. Não há pétalas, não há corola. São cobertas por pelos bem finos e todas as partes florais possuem estruturas laticíferas, de forma que qualquer pequena incisão faz aparecer o látex. As flores masculinas possuem dez estames sésseis diretamente inseridos no andróforo (órgão em forma de coluna que transporta os estames) e dispostos em dois verticilos, cada um contendo cinco estames.

A flor feminina é essencialmente constituída por um ovário triangular formado por três carpelos soldados e um estigma sésil (sem pedúnculo). Cada carpelo delimita uma loja contendo um único óvulo ligado por um curto pedúnculo, o funículo, à columela. Entre o ovário e o cálice há, so

FIGURA 1 - Esquemas de flor masculina e feminina de seringueira (FONTE: BOUYCHOU, 1963)

bre o receptáculo, uma coroa de dez estaminódios, que são estames abortados. A flor feminina pode, portanto, ser considerada como uma flor hermafrodita cujos órgãos masculinos não são desenvolvidos.

BOUYCHOU (1963) relata que flores hermafroditas ocorrem em Hevea, mas muito raramente. A anomalia mais frequente, segundo o autor, é um número diferente de carpelos, e não é muito raro encontrar-se frutos com quatro carpelos, que originarão quatro sementes, em particular no clone Tjir 1, ou mesmo com cinco carpelos, especialmente no clone PR 107.

De acordo com COMPAGNON (1986) somente cerca de 3% das flores podem apresentar quatro e, excepcionalmente, cinco carpelos. Em certos clones há uma grande tendência de ocorrer tal anomalia. Ainda segundo o mesmo autor, as flores masculinas produzem 50 grãos de pólen, em média, por loja, o que dá um número da ordem de 200 por antera e 2000 por flor. O conteúdo celular do grão de pólen apresenta uma pressão osmótica alta, de cerca de 20 atmosferas o que o torna muito frágil à umidade. Como sua pressão interna é maior que a da solução, o grão de pólen pode absorver água. Chuvas no momento da floração são desfavoráveis para a fecundação, pois destroem os grãos de pólen. Isto explica porque em países onde chove durante a floração a fecundação é ineficiente e as plantas não produzem sementes.

De modo geral a fecundação é cruzada, mas a autofecundação é possível. Entende-se por fecundação cruzada a fertilização de flores femininas de uma árvore pelo pólen de outra, ou de um clone por outro clone. Autofecundação é a fertilização de flores femininas de uma árvore por masculini

nas da mesma, ou entre indivíduos de um mesmo clone. Certos clones não sofrem autofecundação (BOUYCHOU, 1963).

De acordo com WEBSTER & PAARDEKOOPE (1989) o florescimento geralmente se dá durante cerca de duas semanas em uma árvore. Em uma inflorescência, algumas flores masculinas abre-se primeiramente e caem depois de um dia. A seguir, flores femininas abrem-se e permanecem abertas por três a cinco dias, após o que as demais flores masculinas se abrem. Portanto, segundo os autores, há protandria incompleta e relativamente grande proporção de polinização cruzada geralmente ocorre em uma plantação.

COMPAGNON (1986) afirma que em plantações a fecundação de flores femininas é fraca, cerca de 1% e, eventualmente, 1,5 a 2% em certos clones. Ocorre, portanto, 98 a 99% de abscisão de flores, número bastante elevado.

SEDGLEY & ATTANAYAKE (1988) comentam que o principal problema encontrado no melhoramento da seringueira é o baixo sucesso de polinizações controladas. Esta baixa produção de sementes a partir de parentais conhecidos tem limitado os progressos no melhoramento e dificultado o entendimento da genética da seringueira. No Sri Lanka a porcentagem de frutos obtidos por polinizações controladas é inferior a 2%. YEANG & ONG (1988) dizem variar de 3 a 8% a produção de frutos por polinizações manuais. No Brasil, o Centro Nacional de Pesquisa de Seringueira e Dendê (CNPQ) obtém um sucesso de polinizações controladas de cerca de 2 a 2,5% (GONÇALVES et alii, 1983a).

Sabe-se que, geralmente, as plantas produzem uma quantidade de flores em excesso. Este fenômeno é uma garantia natural contra a pequena produção de frutos por flo-

res individuais. Há a necessidade de ajustar a quantidade produzida de frutos à capacidade de suporte da planta. Este ajuste pode ser conseguido por uma falha no desenvolvimento de flores polinizadas ou abscisão do fruto se este já iniciou seu desenvolvimento. A finalidade é uma otimização reprodutiva compatível com os recursos disponíveis.

Na Malásia, Hevea brasiliensis produz uma grande quantidade de flores na estação principal de florescimento e, dependendo do clone, menos na estação secundária. Entretanto, como já foi dito, a produção de frutos é pequena. Processo de polinização ineficiente e ataque de patógenos parecem ser parcialmente responsáveis e autoincompatibilidade também tem sido proposta (YEANG & ONG, 1988).

Os mesmos autores (YEANG & ONG, 1988), em trabalho de análise de pegamento de frutos sob polinizações controladas concluem que a produção de frutos não ocorre ao acaso, mas eles tendem a se agregar em inflorescências particulares onde há melhor disposição de frutos. Dizem ainda que a competição entre frutos em desenvolvimento na mesma inflorescência não é a principal razão da falha no pegamento, mas ocorre. E também afirmam que certas inflorescências são melhor dispostas para o sucesso no pegamento que outras, o que leva a um agregado de frutos em inflorescências favorecidas. Mas, a razão porque algumas inflorescências são mais favorecidas para o pegamento não é clara.

SEDGLEY & ATTANAYAKE (1988) afirmam que há diferenças na fertilidade entre clones, tanto masculina como feminina, e que o mecanismo de autoincompatibilidade na seringueira não é devido à incompatibilidade entre o pólen e o estilo ou estigma, mas opera no ovário, e não se sabe se é

pré ou pós-zigótico. Eles afirmam que um entendimento da biologia floral é fundamental para o estabelecimento de técnicas eficientes de cruzamento.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste trabalho foram utilizados botões florais e sementes de clones de seringueira pertencentes à coleção do Centro Experimental de Campinas (CEC), do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). As plantas têm aproximadamente 30 anos de idade e apresentam, anualmente, floradas abundantes durante a estação principal de florescimento cujo pico, nas condições de Campinas/SP, compreende os meses de agosto a outubro. Trata-se basicamente de clones primários e secundários (híbridos intraespecíficos) de Hevea brasiliensis, havendo como única exceção um clone híbrido interespecífico de Hevea brasiliensis com Hevea benthamiana. Os materiais foram posteriormente estudados no Laboratório de Citogenética, na ESALQ, em Piracicaba.

3.1. Biologia floral, macrosporogênese e microsporogênese

Na análise da estrutura interna das flores, assim como para o estudo da gametogênese (tanto masculina como feminina), foram utilizadas flores, em vários estádios de

desenvolvimento (mas sempre antes da antese), dos clones relacionados a seguir. Os significados das siglas referentes aos clones estão relacionados no Apêndice.

AVROS 1328: genótipo resultante do cruzamento intraespecífico dos clones primários de H. brasiliensis AVROS 214 e AVROS 317. Origem indonésia.

GT 711: clone primário de H. brasiliensis obtido na Malásia.

PR 107: clone primário de H. brasiliensis, selecionado na Indonésia.

RRIM 526: genótipo resultante do cruzamento intraespecífico dos clones primários de H. brasiliensis Pil B 58 e Pil B 65. Origem malaia.

RRIM 600: genótipo malaio obtido pelo cruzamento intraespecífico dos clones primários de H. brasiliensis Tjir 1 e PB 86.

Fx 25: genótipo de origem amazônica resultante de cruzamento intraespecífico dos clones primários de H. brasiliensis F 351 e AVROS 49.

PB 86: clone primário de H. brasiliensis. Origem malaia.

IAN 2652: clone terciário de origem amazônica, obtido por cruzamento do clone secundário Fx 4098 (híbrido intraespecífico de H. brasiliensis obtido pelo cruzamento dos clones primários PB 86 e FB 110) e Tjir 1.

IAN 2813: clone terciário de origem amazônica, obtido por cruzamento de Fx 516 X PB 86. O clone Fx 516 é secundário, originado do cruzamento interespecífico entre F 4542, clone primário de H. benthamiana, e AVROS 363, clone primário de H. brasiliensis.

Tjir 16: clone primário de H. brasiliensis originado na Malásia.

Tjir 1: clone primário de H. brasiliensis de origem malaia.

IAC 1: clone primário de H. brasiliensis de origem brasileira.

IAC 2: clone primário de H. brasiliensis de origem brasileira.

Uma grande quantidade de flores foi coletada nos períodos de florescimento nos anos de 1988 a 1990. Os botões florais eram colhidos e imediatamente colocados em fixador Carnoy (uma mistura de três partes de álcool etílico absoluto e uma parte de ácido acético glacial 100%), onde permaneciam por 24 horas. A seguir, os materiais eram transferidos para álcool etílico a 70% e colocados em refrigeradores, onde se conservam por tempo indeterminado. As flores eram então dali retiradas e utilizadas de acordo com as necessidades.

A seguir, as flores eram seccionadas ao microtomo, com a aplicação de técnica adequada, tradicionalmente utilizada na ESALQ, em Piracicaba (AGUIAR-PERECIN & BANDEL, 1980). Para tanto, inicialmente as flores individualizadas passavam por uma bateria de álcoois (com concentrações de

80%, 95% e álcool etílico absoluto), para desidratação, e depois por misturas de álcool etílico absoluto e xilol (álcool 3 : 1 xilol; álcool 1 : 1 xilol; álcool 1 : 3 xilol) até xilol puro, para uma preparação dos tecidos florais para a impregnação dos mesmos com parafina, substância de preenchimento que fornece suporte para que os cortes possam ser realizados. As flores permaneciam em parafina líquida (a 57°C) durante 24 horas, quando então eram transferidas para caixinhas apropriadas, onde se permitia a solidificação da parafina. Depois disso, cubinhos de parafina contendo as flores individualizadas eram montados em pequenos cubos de madeira, de tamanho exato para o encaixe no micrótomo.

Os botões florais eram então seccionados ao micrótomo, com espessura de corte de 10µm. Assim, eram obtidas fitas de parafina mais material, com as quais eram montadas lâminas de cortes sequenciais. A seguir, a parafina era removida por imersão em xilol, de forma que restavam na lâmina somente as secções das flores, que eram então coloridas com hematoxilina férrica de Heidenhein e cobertas com lamínula, após a aplicação de uma fina camada de bálsamo do Canadá. As preparações eram então analisadas ao microscópio e as melhores arquivadas para posteriormente serem fotografadas.

As fotomicrografias foram obtidas em fotomicroscópio ZEISS, do Laboratório de Citogenética, usando-se objetivas com aumentos de 6,3X, 40X e 100X (imersão). Para tanto, foram utilizados dois tipos de filmes, o Kodak Plus-X Pan de ISO 125 e o Kodak Panatomic-X com ISO 32.

3.2. Cromossomos somáticos

Para o estudo dos cromossomos somáticos foram utilizadas sementes dos clones PR 107, Tjir 16, RRIM 526, GT 711, IAC 2 e AVROS 1328, já caracterizados no item anterior, e ainda outros três:

RRIM 513: genótipo malaio resultante de cruzamento intraespecífico entre os clones primários de H. brasiliensis Pil B 16 e Pil A 44.

RRIM 509: clone secundário desenvolvido na Malásia, derivado de cruzamento intraespecífico entre os clones primários de H. brasiliensis Pil A 44 e Lun B 84.

C 297: clone primário de H. brasiliensis originado nas Filipinas.

As sementes foram coletadas (também no IAC) no estágio de maturidade fisiológica, ou seja, os frutos ainda não haviam sofrido deiscência mas as sementes já se encontravam completamente formadas. Isto ocorre aproximadamente cinco meses após o florescimento, de acordo com BARRUETO et alii (1986).

Foram previamente tratadas com fungicida (Captan) e colocadas a germinar em bandejas com um substrato que mistura serragem e areia, no próprio laboratório, à temperatura ambiente. Diariamente, também se fez aplicação de Nistatina, na tentativa de se controlar o ataque fúngico.

À medida em que iam germinando, suas raízes eram cortadas e colocadas em soluções de pré-tratamento, cuja função é tornar os cromossomos mais condensados e melhor

espalhados na placa celular e, conseqüentemente, mais facilmente individualizados e analisados. Como drogas de pré-tratamento foram utilizadas a colchicina em concentração de 0,5% durante períodos variáveis de 3, 4, 5, 6 e 8 horas, e hidroxiquinoleína a 0,03% por 3, 4, 5, 8 e 24 horas.

Depois de pré-tratadas, as raízes passavam para a solução de Carnoy (fixador), onde permaneciam por 24 horas. A seguir, eram armazenadas em frascos contendo álcool a 70% de concentração, sob refrigeração, até sua utilização.

Para o estudo dos cromossomos mitóticos foram feitas preparações pelo método do esmagamento ("squash"). Consiste primeiramente de uma hidrólise dos materiais em HCl 1N, a quente, por 15 minutos. A seguir, as pontas de raízes ficam submersas em reativo de Schiff durante 45 minutos, e então são esmagadas sobre uma lâmina contendo uma gota de carmim acético a 1%, cobertas com lamínula e imediatamente examinadas ao microscópio.

As melhores preparações tiveram suas lamínulas retiradas por imersão em solução de ácido acético 45% e, após secagem ao ar, lâminas e lamínulas foram transformadas em preparações permanentes por montagem em bálsamo do Canadá. Estas foram então arquivadas para posteriormente serem fotografadas.

As fotomicrografias dos cromossomos somáticos foram obtidas em fotomicroscópio ZEISS, do laboratório de Citologia, com optovar 1,60 e objetiva de 100X (imersão). O filme utilizado foi AGFA Copex Pan (belga), de ISO 32. Também foram utilizados os filtros verdes números 56 e 58 da Kodak.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Biologia floral

Sob a denominação biologia floral entenda-se o estudo da morfologia das flores de Hevea, tanto masculinas como femininas, e o arranjo dos diversos tecidos nestas estruturas.

Este tópico é importante para a visualização da estrutura floral como um todo e também para dar subsídios ao entendimento da discussão posterior sobre macrosporogênese e microsporogênese. A literatura fornece esquemas de flores masculinas e femininas, mostrando a organização interna, mas o presente trabalho é pioneiro na documentação fotográfica de cortes histológicos dos vários tipos de flores que ocorrem em Hevea brasiliensis.

No presente trabalho observou-se que inflorescências de grandes dimensões (com cerca de 50 a 70cm de comprimento) possuem várias centenas de flores masculinas, contra uma ou duas centenas de flores femininas. No entanto, trata-se de estimativas uma vez que contagens deste tipo não foram realizadas. Estas observações concordam com a afirmação

de BOUYCHOU (1963) que relata a ocorrência de cerca de 3000 flores masculinas numa inflorescência grande.

Este estudo concorda com a literatura com relação à disposição das flores masculinas e femininas na inflorescência (SEIBERT, 1947; BOUHARMONT, 1960; SCHULTES, 1977b; YEANG & ONG, 1988; ALBUQUERQUE, 1978; COMPAGNON, 1986). As flores femininas, de tamanho maior, localizam-se sempre nas extremidades dos eixos primários e secundários, enquanto as masculinas ocupam todas as demais posições na inflorescência.

SEIBERT (1947), BOUHARMONT (1960) e SCHULTES (1977b) afirmam que há diferenças entre espécies quanto à morfologia da planta, inclusive em relação às flores. BOUYCHOU (1963) e COMPAGNON (1986) relatam a existência de pequenas diferenças clonais quanto à forma, tamanho e coloração das flores. No presente estudo, observou-se tais tipos de diferenças entre os clones, no que diz respeito à coloração de flores, que varia do amarelo claro, tendendo a branco, ao amarelo mais intenso ou com leve tonalidade esverdeada. Apesar de, no geral, as flores terem um tamanho reduzido, observou-se pequenos diferenciais de tamanho entre os diversos materiais. A forma das flores é basicamente a mesma entre os clones, considerando-se as diferenças no tamanho. Não há dados na literatura sobre diferenças na fertilidade ou taxa de abscisão de flores ou frutos entre estes materiais sob investigação.

Em linhas gerais, 408 flores masculinas e 155 femininas foram aproveitadas e estão arquivadas em lâminas permanentes, e este valor corresponde a cerca de 40 a 50% do

total de flores analisadas. Das flores masculinas, 317 tiveram seus diâmetros medidos (o que corresponde a 77,70% do total) e obteve-se um valor médio de 1,235mm de diâmetro. Dentre as flores femininas, 60 foram medidas (38,71%) e o diâmetro médio observado foi de 2,385mm. As medidas foram obtidas com micrômetro, sempre nos pontos de maior diâmetro das flores.

O total de flores aproveitadas (40 a 50%) no estudo tanto de biologia floral como na macro e microsporogênese corresponde, aproximadamente, a 1060 lâminas de cortes histológicos de flores masculinas e 720 lâminas de cortes de flores femininas. Cerca de 50 a 60% das preparações citológicas foram descartadas por não apresentarem os botões florais nos estádios adequados ao estudo ou por alterações em suas estruturas por questões de ordem técnica ou outras.

4.1.1. Flores masculinas

Em todos os clones estudados, a estrutura da flor masculina mostrou-se semelhante às descrições anteriormente citadas (BOUYCHOU, 1963; COMPAGNON, 1986), e é apresentada nas Figuras 2 e 3.

A Figura 2 mostra uma flor masculina do clone AVROS 1328 em corte transversal onde são vistos os cinco estames com as anteras bilobadas, tetraloculadas, cujos sacos polínicos estão preenchidos por células-mães dos grãos de pólen (CMGP) em prófase I. Na Figura 3 observa-se um corte longitudinal de flor masculina do clone PR 107. Nesta também vêem-se as anteras ligadas ao andróforo, contendo grãos de pó

Figura 2 - Corte transversal de flor masculina do clone AVROS 1328 mostrando os cinco estames com anteras bilobadas e tetraloculadas, com CMGP em prófase I.

Figura 3 - Corte longitudinal de flor masculina do clone PR 107 mostrando os sacos polínicos (sp) com grãos de pólen maduros.

Figura 4 - Corte transversal de flor masculina do clone PR 107 com seis anteras tetraloculadas preenchidas por grãos de pólen maduros.

Figura 5 - Corte transversal de flor masculina do clone GT 711 onde uma das anteras possui seis lóculos (SETA).

len maduros em suas lojas.

Observou-se a estrutura típica de flor masculina de seringueira (apresentada na Figura 1), nos clones estudados. Nenhuma grande alteração morfológica foi encontrada, com exceção de flores com seis estames circundando o andróforo (ao invés de cinco que seria o normal), no clone PR 107 (Figura 4) e outras cujas anteras possuem seis lojas (e não quatro como seria o esperado), no clone AVROS 1328 (Figura 5).

Vale ressaltar que tais flores eram sempre exclusivamente masculinas, não tendo sido observado um caso sequer de hermafroditismo, em todos os clones estudados.

4.1.2. Flores femininas

As Figuras 6 e 7 mostram a estrutura típica de uma flor feminina, nos clones GT 711 e Fx 25, respectivamente. Esta estrutura é comum a todos os demais clones analisados.

A Figura 6 apresenta um corte transversal de flor feminina onde são vistas as sépalas circundando externamente o ovário trilocado cujas lojas encerram as células-mães dos sacos embrionários (CMSE) em prófase I. Na Figura 7 ve-se uma flor feminina em corte longitudinal que possibilita a visualização de um dos óvulos do ovário contendo uma CMSE.

De um modo geral, esta é a estrutura característica de flores femininas (apresentada na Figura 1), presente em todos os clones sob investigação.

Figura 6 - Corte transversal de flor feminina do clone GT 711 onde são vistas as sépalas (s) circundando externamente o ovário (o) com três carpelos (c), com um óvulo (ov) mostrando uma CMSE ao centro.

Figura 7 - Corte longitudinal de flor feminina de Fx 25 mostrando um só óvulo com sua CMSE indicada por uma seta.

Figura 8 - Corte transversal de flor hermafrodita onde aparece o ovário triloculado circundado pelos estames (es) com grãos de pólen maduros. Clone Tjir 16.

Figura 9 - Flor hermafrodita de GT 711 em corte transversal mostrando ovário tetraloculado e estames (es) com grãos de pólen maduros.

Diferentemente do que se esperava e contradi-
zendo a afirmação de BOUYCHOU (1963) de que a ocorrência de
flores hermafroditas é rara, foram observadas 40 flores femi-
ninas contendo anteras com grãos de pólen, o que corresponde
a 25,81% do total de flores femininas avaliadas, nos clones
GT 711, AVROS 1328, PR 107 e Tjir 16. Na Figura 8 nota-se o
ovário circundado por anteras com grãos de pólen maduros (clo-
ne Tjir 16). Visualmente é impossível a distinção entre flo-
res femininas e hermafroditas, pois externamente apresentam
a mesma morfologia.

Ao contrário, as flores analisadas nos clones
Fx 25 e RRIM 526 foram sempre exclusivamente femininas ou
masculinas.

Uma segunda modificação estrutural encontrada
foi a ocorrência de ovário tetralocado (ao invés de trilo-
culado), como o ilustrado na Figura 9. Este tipo de alteração
foi observado nos clones GT 711, RRIM 526, AVROS 1328 e PR
107. Segundo BOUYCHOU (1963) o ovário com número diferente
de três carpelos é a anomalia mais comum em Hevea.

Além disso, foram encontradas duas flores, u-
ma no clone GT 711 e outra no RRIM 526, possuindo dois óvu-
los (e não um) em um mesmo lóculo, como comprova a Figura 10
(RRIM 526). No entanto, este tipo de anormalidade foi obser-
vado somente em dois casos, podendo ser considerada de ocor-
rência mais rara.

Um fato interessante observado é que na maior
parte das flores hermafroditas os grãos de pólen já estavam
maduros ou em diferenciação pós-meiótica enquanto as CMSE,
na maioria dos casos, ainda estavam em prófase I meiótica.
Em muito poucas flores tanto CMSE como CMGP encontravam - se

Figura 10 - Corte transversal de flor feminina mostrando dois óvulos em um único lóculo, no clone RRIM 526.

ambas em divisões meióticas. Observou-se somente um caso em que o saco embrionário estava formado e as CMGP em metáfase. Portanto, há evidências de ocorrência de protandria em seringueira, ou seja, os estames amadurecem e produzem pólen antes da maturação do pistilo.

É importante ressaltar que todas as flores (tanto masculinas como femininas) utilizadas no presente estudo foram coletadas antes da ocorrência da antese, ou seja, analisaram-se botões florais ainda fechados.

A possibilidade de ocorrer protandria somente é válida para as flores hermafroditas analisadas no estudo, uma vez que as estruturas reprodutivas masculinas e femininas são avaliadas simultaneamente neste tipo de flores. Inflorescências e/ou plantas como um todo não foram avaliadas quanto a este aspecto, não podendo, portanto, serem feitas generalizações quanto à protandria. WEBSTER & PAARDEKOOOPER (1989) afirmam que há protandria incompleta em seringueira. Segundo os autores, algumas flores masculinas abrem-se primeiramente e caem após um dia. A seguir as flores femininas abrem-se e assim permanecem por três a cinco dias, quando então as demais flores masculinas abrem-se.

Como todos os botões florais foram estudados antes da antese e, em muitos casos os grãos de pólen já estavam maduros e o desenvolvimento em andamento, há evidências de que ocorra cleistogamia na flor hermafrodita, ou seja, a polinização ocorre antes da abertura da flor. No entanto, estudos direcionados são necessários para conclusões seguras. A literatura internacional nada relata a respeito destes aspectos.

A ocorrência de 25,81% de hermafroditismo em quatro dos clones estudados, aliada à possibilidade de cleistogamia, leva à suspeita de que ocorra autofertilização em níveis maiores, nesta espécie considerada alógama, se não houver autoincompatibilidade. SEDGLEY & ATTANAYAKE (1988) afirmam que há um mecanismo de autoincompatibilidade que opera no ovário, mas não se sabe se é pré ou pós-zigótico, e que não há incompatibilidade entre o pólen e o pistilo. Mas, como há diferenças entre clones quanto à fertilidade, segundo os autores, há a necessidade de estudos sobre sistemas de incompatibilidade presentes na espécie. No entanto, neste caso, assim como na verificação de protandria são necessários estudos mais detalhados e direcionados para se poder chegar a conclusões.

Estudos mais apurados no sentido de determinação da porcentagem de flores hermafroditas na espécie, confirmação ou não de protandria e, finalmente, de sistemas de autoincompatibilidade presentes deverão ser conduzidos para a confirmação da hipótese de alteração na taxa de cruzamento. Dados reais sobre taxa de cruzamento inexistem na literatura sobre seringueira.

4.2. Gametogênese

4.2.1. Microsporogênese

Microsporogênese, ou seja, a gametogênese masculina, é o processo de formação dos grãos de pólen. O estudo citológico de botões florais masculinos dos diversos clo-

nes, em vários estádios de desenvolvimento, permitiu a visualização de todo o processo meiótico envolvido.

Como regra geral, a microsporogênese mostrou-se absolutamente normal em todos os materiais envolvidos neste estudo, não tendo sido detectada nenhuma irregularidade no ciclo meiótico. Será feita uma discussão geral, única, abrangendo todos os clones estudados. Como o comportamento cromossômico na microsporogênese foi semelhante em todos os clones, as ilustrações e os comentários sobre as diferentes fases do ciclo valem para todos os materiais.

Ao contrário do que afirma RAMAER (1935), na grande maioria das flores analisadas as células - mães dos grãos de pólen (CMGP) de um botão apresentam-se todas na mesma fase do ciclo meiótico. Excepcionalmente, observou-se diferentes fases em uma mesma flor ou até mesmo em uma antera. As Figuras 11 e 12 (assim como a Figura 2) ilustram este sincronismo das fases da meiose masculina.

Na Figura 11 observa-se uma antera do clone IAC 2 em corte transversal onde são vistas as CMGP recém-formadas. Na Figura 12, também um corte transversal mas no clone AVROS 1328, vêem-se as CMGP em prófase I (paquíteno). Em ambos os casos observa-se que todas as células apresentam-se no mesmo estágio do ciclo celular.

A distinção das cinco subfases da prófase I (leptóteno, zigóteno, paquíteno, diplóteno e diacinese) é difícil de ser conseguida, uma vez que os cromossomos apresentavam-se sempre enovelados, muitas vezes formando uma massa complicada onde os filamentos não podem ser individualizados. Somente no estágio de paquíteno os cromossomos podem ser vi-

Figura 11 - Secção de uma antera do clone IAC 1 com células-mães dos grãos de pólen (CMGP) recém formadas.

Figura 12 - Corte de uma antera do clone AVROS 1328 mostrando CMGP em prófase I (paquíteno).

Figura 13 - Corte em antera do clone PR 107 com CMGP em início de prófase.

Figura 14 - Paquíteno bem caracterizado no clone AVROS 1328.

sualizados com um pouco mais de clareza. As Figuras 13, 14 e 15 ilustram como é difícil reconhecer-se as sub-fases da pró fase I da meiose masculina. Tal dificuldade também é relatada na literatura (RAMAER, 1935).

Na Figura 11 as CMGP estão em intérfase pré-meiótica. Nota-se que as células ainda estão muito próximas, indicando que o processo de diferenciação que as originou foi recente. Na Figura 13 os cromossomos apresentam-se um pouco mais compactados, estando no início da prófase I, no estágio de leptóteno ou zigóteno. A fibra cromossômica continua o processo de compactação e na fase de paquíteno é que sua estrutura começa a ser visualizada, como se observa nas Figuras 12 e 14. Posteriormente, com o aumento na compactação os cromossomos são vistos como fibras mais grossas, como na Figura 15, apesar de formarem uma massa enovelada (diplóteno ou diacinese).

RAMAER (1935) afirma que no diplóteno o conteúdo nuclear se espalha por toda a célula, o nucléolo desaparece. No entanto, no presente estudo não se observou configuração deste tipo, mas sim um embaralhamento de fibras ma is compactadas, justamente circundando o nucléolo, como visto na Figura 15.

A prófase é a fase mais longa do ciclo celular e, conseqüentemente, foi a mais observada durante todo o estudo. De acordo com DE ROBERTIS et alii (1977), o leptóteno e o zigóteno duram poucas horas, mas o paquíteno é um estágio de longa duração, podendo demorar dias, semanas e, inclusive, anos. O diplóteno também tem longa duração. O processo tem tempos de duração muito variáveis, de espécie para espécie.

Figura 15 - Cromossomos visíveis como uma massa enovelada e mais compactada no clone PB 86.

Em nenhum caso, e isto vale para todos os clones, observou-se qualquer alteração na prófase I. Foi possível a análise desta etapa da meiose em todos os clones investigados.

Na metáfase I, que é a fase seguinte à prófase, os cromossomos atingem o grau máximo de compactação. A Figura 16 mostra uma célula do clone IAC 1 em metáfase I, em vista polar. Note-se o tamanho reduzido dos cromossomos e o alto nível de condensação. A dificuldade na contagem deve-se ao tipo de técnica empregada, uma vez que as preparações citológicas possuem várias camadas de células o que resulta em alterações na focalização ao microscópio. Além disso, os cromossomos também podem ser seccionados e isto dificulta ainda mais a visualização e contagem dos mesmos. Na Figura 17 observa-se outra metáfase I, em vista lateral, e no clone AVROS 1328. A Figura 16 na realidade apresenta 18 bivalentes, mas os cromossomos estão tão intimamente pareados (sinapse cromossômica) que não é possível a distinção. Também nesta etapa do ciclo não se notou irregularidades na meiose. A metáfase tem menor duração que a prófase e, conseqüentemente, é mais rara, não sendo possível sua visualização em todos os materiais. As metáfases I foram observadas em AVROS 1328, IAC 1, IAC 2 e Tjir 16.

A fase seguinte, anáfase I, pode ser visualizada na Figura 18, em fotomicrografia também do clone AVROS 1328. Observa-se a segregação cromossômica para os polos da célula. A "explosão anafásica" é ainda mais rápida que a metáfase, mas também foi possível sua detecção em Fx 25, Tjir 16 e IAC 1.

Como única irregularidade na anáfase I foram

Figura 16 - Metáfase I, em vista polar, no clone IAC 1. Notese os bivalentes bem compactados.

Figura 17 - Metáfase I, em vista lateral, no clone AVROS 1328.

Figura 18 - Anáfase I observada no clone AVROS 1328.

Figura 19 - Fotomicrografia do clone GT 711 mostrando uma célula em anáfase I com dois cromossomos retardatários ("laggards").

observadas células com um ou alguns cromossomos retardatários ("laggards"), perdidos na placa celular, como aparecem na Figura 19, e somente no clone GT 711. MAJUMDER (1964) também observou casos de um ou dois "laggards".

Em telófase I os cromossomos agrupam-se normalmente nos polos da célula, como o esperado, conforme observado nos clones AVROS 1328, IAC 1 e IAN 2652 (Figura 20). Aqui termina a primeira divisão meiótica ou segregação reducional.

Após um segundo período de intérfase (não detectado neste estudo), que normalmente tem curta duração, de acordo com RAMAER (1935), inicia-se a divisão meiótica II, ou segregação equacional. A prófase II (Figura 21) foi observada em células-mães do clone AVROS 1328 e outros materiais. Novamente, os cromossomos apresentam-se descondensados, sendo visíveis somente partes dos filamentos. Vêm-se os dois núcleos "novos", mas não há citocinese.

Na metáfase II os cromossomos se organizam na placa celular (Figura 22). A Figura 22 mostra uma CMGP em metáfase II, do clone AVROS 1328, em vista polar, onde podem ser visualizados os cromossomos.

A seguir, ocorre a segregação cromatídica na anáfase II (Figura 23) e em telófase II são vistos quatro pequenos grupos de cromossomos, como aparecem na Figura 24, em uma preparação com o clone AVROS 1328.

No geral, o comportamento cromossômico, em todos os clones, foi absolutamente normal, não tendo sido constatada nenhuma irregularidade meiótica que justifique o baixo pegamento de frutos da espécie.

As tétrades resultantes do processo meiótico

Figura 20 - Fotomicrografia mostrando duas CMGP em telófase I, no clone AVROS 1328.

Figura 21 - No destaque (seta), uma CMGP em prófase II, no clone AVROS 1328. Notam-se os dois núcleos com nucléolos evidentes. Não há citocinese.

Figura 22 - CMGP em metáfase II, em vista polar, no clone AVROS 1328.

Fígura 23 - Anáfase II no clone AVROS 1328, mostrando a segregação cromatídica.

Figura 24 - Telófase II bem caracterizada no clone AVROS 1328.

Figura 25 - Tétrade resultante do processo meiótico no clone IAC 1.

Figura 26 - Micrósporos ainda envolvidos pela parede celular da CMGP, no clone AVROS 1328. A seta mostra uma tétrade.

Figura 27 - Grão de pólen maduro do clone PR 107 mostrando os dois núcleos, vegetativo e generativo (seta).

foram sempre normais (Figura 25). O próximo passo é a separação dos quatro micrósporos (Figura 26), e diferenciação dos mesmos até completa maturação, que resulta em grãos de pólen binucleados (Figura 27). LECONTE (1984), em estudo de reprodução sexuada em clones de Hevea brasiliensis, também descreve a formação de grãos de pólen como um processo normal.

O presente estudo não confirma a tese de que a alta taxa de abscisão de flores e frutos em Hevea seja devida a problemas meióticos. Ao contrário, em todo o trabalho observou-se que as diversas etapas do ciclo meiótico dão-se de forma absolutamente normal, sem qualquer irregularidade, tanto a nível celular como no comportamento cromossômico, em todos os clones sob investigação. Isto confirma a idéia anteriormente proposta por vários autores, RAMAER (1935), WARMKE (1950), BOUHARMONT (1960), MAJUMDER (1964), LECONTE (1984).

Um detalhe interessante foi a constatação, nos clones AVROS 1328, Tjir 1 e GT 711, da presença de dois nucléolos por núcleo. Vale lembrar que a metodologia empregada não é especial para este tipo de observação e, portanto, não permite a visualização de todo o núcleo, mas sim de uma sequência de secções, daí o fato dos nucléolos não serem facilmente fotografados juntos (podem estar seccionados também e dificilmente encontram-se no mesmo corte). Além disso, não foi utilizada coloração específica para sua análise. O fato de possuírem dois nucléolos pode indicar a presença de dois complementos cromossômicos, o que corrobora sua origem tetraplóide. No entanto, estudos dirigidos devem ser realizados neste sentido. A análise do cariótipo e do idiograma da espécie pode determinar o seu grau de ploidia. A existência de dois nucléolos por núcleo na seringueira é uma evidência (a

ser provada) de tetraploidia. A Figura 28 mostra uma célula do clone AVROS 1328 onde são vistos dois nucléolos em um núcleo em início de prófase I.

4.2.2. Macrosporogênese

Da gametogênese feminina nada consta na literatura internacional e para isto há uma explicação. Enquanto a microsporogênese ocorre em muitas células de uma flor, simultaneamente, o processo de formação do saco embrionário, no caso da seringueira, ocorre somente em três células de cada flor, em condições normais, ou, no máximo, em quatro ou cinco células, se for o caso de ovários com quatro ou cinco carpelos, respectivamente. Consequentemente, um estudo em flores femininas é muitas vezes mais exaustivo e difícil de ser concluído com sucesso. Centenas de lâminas foram preparadas neste estudo.

Com relação a este aspecto, ou seja, a macrosporogênese em seringueira, o trabalho é pioneiro.

No presente estudo foi possível a observação de algumas das etapas na formação dos gametas femininos. Da mesma forma que na microsporogênese, nenhuma anormalidade meiótica foi detectada.

A prófase foi a fase da meiose feminina mais encontrada. A distinção entre as diferentes subfases da prófase I é difícil. As Figuras 29, 30 e 31 mostram células prófásicas com cromossomos em diferentes níveis de compactação. Na Figura 29 observa-se uma célula-mãe do saco embrionário (CMSE) do clone PR 107 em início de prófase I onde os cromos

Figura 28 - Célula-mãe do grão de pólen (CMGP) do clone AVROS 1328 mostrando dois nucléolos em um núcleo em início de prófase I.

Figura 29 - Célula-mãe do saco embrionário do clone PR 107 em início de prófase I.

Figura 30 - Paquíteno em CMSE do clone RRIM 526.

Figura 31 - CMSE do clone RRIM 526, mostrando os cromossomos mais condensados, em final de prófase I.

Figura 32 - CMSE do clone GT 711 em anáfase I.

somos, aqui presentes como filamentos delgados, são indistiguíveis e o nucléolo é bem evidente. O paquíteno (Figura 30) é a única fase identificável, com a fibra cromossômica visível e ainda com o nucléolo bem evidente. Este corresponde ao clone RRIM 526. A Figura 31 mostra os cromossomos mais condensados, possivelmente em final de prófase, no clone RRIM 526.

A prófase foi observada em vários clones, IAN 2813, RRIM 526, Tjir 16, PR 107, Fx 25, AVROS 1328, Tjir 1.

Uma única CMSE na transição anáfase/telófase I foi observada (Figura 32). Outras fases da meiose feminina não foram observadas e há duas razões para se justificar este fato: a) a meiose é um processo rápido; b) há um número reduzido de células-mães dos sacos embrionários.

A meiose feminina termina com a formação de quatro células, a tétrade, três das quais se degeneram. A célula restante (macrósporo) sofre três divisões mitóticas que originam os oito núcleos n (haplóides) do saco embrionário.

O saco embrionário no estágio binucleado foi observado em AVROS 1328, Tjir 16, GT 711 e PR 107, e corresponde ao resultado da primeira divisão mitótica após a meiose (Figura 33).

O saco embrionário binucleado sofre mais duas divisões mitóticas, originando primeiro o estágio tetranucleado (Figura 34), observado nos clones AVROS 1328, Fx 25, GT 711 e Tjir 16 e, posteriormente, o estágio octanucleado (Figura 35), como detectado em GT 711, Fx 25, RRIM 526, AVROS 1328 e Tjir 16. Aqui o saco embrionário está completo e entrará em processo de diferenciação, ou seja, um rearranjo dos núcleos dentro do mesmo. Como se trata de uma estrutura gran

Figura 33 - Saco embrionário no estágio binucleado (pós-meio-tico) no clone Tjir 16.

Figura 34 - Saco embrionário tetranucleado no clone AVR0S 1328. A seta indica o quarto núcleo cujo nucléolo não é visível em função do corte.

Figura 35 - As fotomicrografias mostram os oito núcleos do saco embrionário completo, no clone Tjir 16. Devido ao seu tamanho, não é possível sua visualização em um único corte. a) quatro núcleos b) um núcleo c) um núcleo d) dois núcleos.

de, não é possível a observação de todo o saco embrionário, devido à técnica utilizada, ficando os núcleos separados em distintas secções do botão floral, como evidenciado na Figura 35.

Também na macrosporogênese não há subsídios para a tese de irregularidades meióticas sendo a causa de altas taxas de abscisão de flores na espécie. Apesar de nem todas as fases da meiose feminina terem sido observadas, as etapas analisadas mostraram um comportamento cromossômico regular e consequente formação de sacos embrionários normais.

É importante ressaltar que este é o primeiro estudo sobre a macrosporogênese em seringueira. Um estudo mais aprofundado sobre a meiose feminina em H. brasiliensis deve ser realizado. Se em outros trabalhos a serem realizados, com outros clones de seringueira, também forem observados sacos embrionários normais, com oito núcleos haplóides, deve-se então conduzir pesquisas visando o estudo da formação do zigoto, embrião e endosperma.

A meiose normal, tanto masculina como feminina, evidencia a não ocorrência de esterilidade, ou seja, gametas estéreis e/ou zigotos inviáveis, nos clones investigados. A literatura concorda com esta observação, como anteriormente relatado. Meiose normal foi evidenciada pela ocorrência de somente bivalentes na metáfase I (não foi observado nenhum univalente) e pela formação de tétrades normais. Tudo indica que ocorre formação normal de zigoto, embrião, sementes e frutos. As altas taxas de abscisão de flores e frutos podem não deverem-se a problemas citológicos ou genéticos,

mas tratar-se de um problema de limite fisiológico da planta..

4.3. Cromossomos somáticos

Foi realizada a contagem e a análise dos cromossomos somáticos nos clones citados no capítulo "Material e Métodos". A relação dos pré-tratamentos utilizados nas preparações citológicas referentes às figuras apresentadas neste item estão na Tabela 1.

Tabela 1 - Relação de pré-tratamentos e tempos de aplicação das drogas (em horas).

Figura	Clones	Pré-tratamento	Tempo
36	PR 107	Hidroxiquinoleina 0,03%	5
37	C 297	Colchicina 0,5%	5
38	RRIM 513	Hidroxiquinoleina 0.03%	4
39	RRIM 526	Colchicina 0,5%	3
40	AVROS 1328	Colchicina 0,5%	4
41	GT 711	Colchicina 0,5%	8
42	AVROS 363	Colchicina 0,5%	6
43	Tjir 16	Colchicina 0,5%	8
44	IAC 2	Colchicina 0,5%	3
45	PR 107	Hidroxiquinoleina 0,03%	5
46	RRIM 526	Colchicina 0,5%	5
47	RRIM 526	Colchicina 0,5%	6

Todos os resultados apresentados referem-se a contagens cromossômicas realizadas em metáfases mitóticas de células de pontas de raízes submetidas a pré-tratamentos com drogas (colchicina ou hidroxiquinoleína) que auxiliam o estudo citogenético, melhorando o espalhamento e acentuando a contração dos mesmos.

Não houve a possibilidade de conclusões sobre efeito de pré-tratamentos, uma vez que os resultados obtidos foram bastante variáveis, em todos os casos.

A seguir, será discutida a morfologia dos cromossomos nos diversos materiais investigados. Nas Figuras 36 a 44 observam-se os cromossomos metafásicos dos nove clones analisados.

Na Figura 36 observam-se os 36 cromossomos do clone PR 107. É possível a identificação de cada um isoladamente, bem como de sua cromátides e da região centromérica. Note-se que há uma variação considerável no tamanho dos mesmos. Neste caso, o pré-tratamento utilizado foi a hidroxiquinoleína a 0,03% de concentração, durante cinco horas.

A Figura 37 mostra o complemento cromossômico do clone C 297, em ponta de raiz pré-tratada com colchicina 0,5%, durante cinco horas. Observa-se um diferente grau de contração dos cromossomos, mas o número é o mesmo (36). A figura permite também a identificação de dois satélites (indicados por setas), diferentemente de ONG (1975) que encontrou quatro satélites no complemento cromossômico de Hevea brasiliensis. Vale lembrar que o número de satélites é constante em um complemento cromossômico e, portanto, o número deles presente nos tecidos somáticos de uma espécie pode indicar o seu nível de ploidia.

Figura 36 - Cromossomos metafásicos do clone PR 107. Observam-se os $2n=36$ cromossomos.

Figura 37 - Complemento cromossômico do clone C 297, com os $2n=36$ cromossomos. As setas indicam a localização de dois satélites.

Figura 38 - Metáfase mitótica do clone RRIM 513, com 36 cromossomos.

Figura 39 - Cromossomos somáticos de RRIM 526 ($2n=36$).

36

5 μm

37

5 μm

38

5 μm

39

5 μm

No clone RRIM 513 os cromossomos têm a conformação metafásica apresentada na Figura 38, após o uso de hidroxiquinoleína 0,03% por quatro horas, e é possível o reconhecimento de cada um deles. De forma semelhante mostram-se os cromossomos de RRIM 526 (Figura 39), apesar do pré-tratamento utilizado ter sido outro, colchicina 0,5% por três horas.

Já os cromossomos de AVROS 1328 (Figura 40) revelam um nível diferente de compactação e o tratamento usado foi colchicina 0,5% em tempo de quatro horas.

Um grau de contração ainda maior é notado nos cromossomos de raiz de GT 711 tratada com colchicina a uma mesma concentração (0,5%), por oito horas. Aparecem como pontos circulares (anéis), como na Figura 41.

A Figura 42 mostra os cromossomos de AVROS 363, sob tratamento com colchicina 0,5% durante seis horas. Nota-se também aqui uma considerável diferença de tamanho entre eles.

Com grau diferente de contração são vistos os 36 cromossomos de Tjir 16 pré-tratados com solução a 0,5% de colchicina, por oito horas (Figura 43).

Finalmente, na Figura 44 são mostrados os cromossomos do clone IAC 2, sob tratamento, durante três horas, com colchicina 0,5%.

Vale observar que todas estas figuras apresentam a mesma ampliação, portanto as diferenças constatadas devem-se ao espalhamento diferenciado de cada complemento na placa celular, assim como aos diferentes níveis de contração.

Uma das alterações observadas nos cromossomos

Figura 40 - Metáfase com $2n=36$ cromossomos em célula de ponta de raiz do clone AVROS 1328.

Figura 41 - Cromossomos metafásicos do clone GT 711, com $2n=36$.
Note-se o alto grau de condensação.

Figura 42 - Célula somática de AVROS 363, mostrando 36 cromossomos.

Figura 43 - Complemento cromossômico com os 36 cromossomos do clone Tjir 16.

40

5 μm

41

5 μm

42

5 μm

43

5 μm

Figura 44 - Fotomicrografia mostrando os 36 cromossomos de IAC 2.

Figura 45 - Célula de ponta de raiz do clone PR 107 com número duplicado de cromossomos. Nota-se o tamanho reduzido dos mesmos.

Figura 46 - Cromossomos "pulverizados": número duplicado e tamanho reduzido. Clone RRIM 526.

Figura 47 - Telófase no clone RRIM 526 mostrando distribuição irregular dos cromossomos, alto grau de contração e presença de cinco "laggards".

mitóticos foi a duplicação do seu número em algumas células das raízes. A Figura 45 mostra uma célula de ponta de raiz do clone PR 107, sob pré-tratamento com hidroxiquinoleína a 0,03% por oito horas, em que o número de cromossomos ($4n=72$) está duplicado. Nota-se também o tamanho reduzido dos mesmos, em comparação com os da Figura 36 (que mostra os cromossomos deste mesmo clone), o que indica uma maior contração. Como o tempo de tratamento com a droga foi elevado neste caso, pode-se pensar que a duplicação e a grande contração sejam devidas a um efeito de tratamento (colchicina e hidroxiquinoleína são agentes que induzem poliploidia).

Um outro tipo de configuração dos cromossomos é visto na Figura 46, onde além da duplicação estão em grande contração, tomando o aspecto de "pulverizados". Este tipo de diferença foi observado em células de raízes que sofreram tratamento com colchicina durante quatro, cinco e seis horas, nos clones AVROS 1328, RRIM 526 e AVROS 363, respectivamente.

Parece, portanto, que a observação de células tetraplóides em raízes de seringueira deve-se a um efeito de tratamento, mas para conclusões desta natureza outros estudos devem ser conduzidos.

Sabe-se que condições de estresse podem induzir à poliploidia parcial, ou seja, em algumas células, também chamado de mosaicismo. Este estresse pode ter várias causas físicas como umidade, temperatura, fotoperíodo.

Além disso, notou-se células onde os cromossomos se apresentam bastante compactados e muito agregados, e outras em que há a ocorrência de cromossomos retardatários, perdidos na telófase. A Figura 47 ilustra estes dois aspectos, simultaneamente.

O objetivo do estudo citogenético da seringueira foi a determinação do número correto de cromossomos nos vários clones, bem como a observação de aspectos do comportamento dos mesmos através do ciclo mitótico.

Observaram-se 36 cromossomos em todos os materiais, concordando com resultados anteriormente obtidos por RAMAER (1935) em H. brasiliensis, PERRY (1943) para H. brasiliensis e H. spruceana, PADDOCK (1943) e ROSS (1959) para H. brasiliensis, MAJUMDER (1964) para H. brasiliensis, H. benthamiana, H. pauciflora e H. spruceana. O comportamento cromossômico mostrou-se normal e as irregularidades, constatadas como exceções, foram as células com número duplicado de cromossomos e com aspecto "pulverizado", como verificado nas Figuras 44 e 45, respectivamente, e células onde a fibra cromossômica sofre uma compactação excessiva, além da ocorrência de cromossomos perdidos no fuso ("laggards"), como vistos na Figura 47.

5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, as seguintes conclusões podem ser tiradas:

- 5.1. Não foram observadas irregularidades meióticas na gametogênese masculina. Portanto, o estudo não confirma a tese de que irregularidades na meiose masculina são responsáveis pelas altas taxas de abscisão de flores e frutos em Hevea brasiliensis. Todas as fases do ciclo meiótico foram analisadas.
- 5.2. Na macrosporogênese também não se observou nenhuma anormalidade que justifique o baixo pegamento de frutos. Nas fases estudadas da meiose feminina o comportamento cromossômico foi normal.
- 5.3. A contagem cromossômica confirma a presença dos 36 cromossomos somáticos nos clones investigados, a saber: PR 107, C 297, RRIM 513, RRIM 526, AVROS 1328, GT 711, IAC 2, AVROS 363 e Tjir 16.

- 5.4. A estrutura típica da flor masculina consta de dez estames dispostos em dois verticilos, com cinco anteras bi-lobadas e tetraloculadas em cada plano. Modificações como seis anteras em um plano e anteras hexaloculadas são exceções.
- 5.5. A estrutura da flor feminina típica contém um ovário tri-loculado com um óvulo em cada lóculo e uma célula - mãe do saco embrionário em cada óvulo. Ovário tetraloculado e dois óvulos por lóculo são exceções.
- 5.6. Encontrou-se quantidade considerável do flores hermafroditas (25,81%) nos clones GT 711, AVROS 1328, PR 107, Tjir 16, ao contrário do que se esperava.
- 5.7. Nos clones Fx 25 e RRIM 526 as flores foram sempre exclusivamente femininas ou masculinas.
- 5.8. Na grande maioria dos casos, nas flores hermafroditas o androceu encontra-se em fase mais adiantada de desenvolvimento que o gineceu. Isto leva à possibilidade de protandria em Hevea. Como os botões florais foram analisados antes da antese, é possível que também ocorra cleistogamia.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR-PERECIN, M.L.R. & BANDEL, G. Citologia - Apostila de Aulas Práticas. Publicação Didática, IGEN, Piracicaba, nº 19, 1980, 140p.

ALBUQUERQUE, J.M. Segmento de Botânica. In: IX Curso de Especialização em Heveicultura, Belém, 1981.

ANNAMMA, Y.; MARKOSE, V.C.; BHASKARAN NAIR, V.K. Meiotic abnormalities in two male sterile clones of Hevea brasiliensis. In: Int. Natl. Rubber Conference, Índia, paper 8, 1980.

BALDWIN JR., J.T. Hevea: a first interpretation. The Journal of Heredity, New Jersey, 38(2): 54-64, 1947.

BANGHAM, W.N. Chromosomes of some Hevea species. Journal of the Arnold Arboretum, Lancaster, 12(4): 287-288, 1931.

- BARRUETO, L.P.; PEREIRA, I. da P.; NEVES, M.A. Influência da maturação fisiológica e do período entre a coleta e o início do armazenamento sobre a viabilidade da semente de seringueira. Turrialba, 36(1): 65-75, 1986.
- BERNARDES, M.S.; VEIGA, A.S.; FONSECA FILHO, H. Mercado brasileiro de borracha natural. In: BERNARDES, M.S. (Ed.). Sangria da Seringueira. Piracicaba, Publicação ESALQ/FEALQ, 1990, p. 179-206.
- BOUHARMONT, J. Recherches taxonomiques et caryologiques chez quelques espèces du genre Hevea. Publications de l'Institut National pour l'etude Agronomique du Congo Belge (I.N.E.A.C.). Serie Scientifique nº 85, 1960.
- BOUYCHOU, J.G. La biologie de l'Hevea. In: Manuel du Plan-teur d'Hevea, Paris, 1963.
- CARDOSO, M. Importância econômica e social da borracha natural. O Agrônomo, Campinas, 41(3): 211-212, 1989.
- CHEN, Z.; QIAN, C.; QIN, M.; XU, X.; XIAO, Y. Recents advances in anther culture of Hevea brasiliensis (Muell. Arg.). Theoretical and Applied Genetics, Berlin, 62: 103 - 108, 1982.

- CHENG-HUA, C.; FA-TSU, C.; CHANG-FA, C.; CHUAN-HUA, W.; SHIH CHIEH, C.; HSU-EN, H.; SHIAO-HUEI, O.; YUNG-TAO, H.; TSUN MIN, L. A process of obtaining pollen plants of Hevea brasiliensis Muell.-Arg. Scientia Sinica, Beijing, 22(1): 81-90, 1979.
- COLOMBO, C.A.; GONÇALVES, P. de S.; CARDOSO, M.; BOAVENTURA, M.A.M.; MARTINS, A.L.M. Importância, conservação e uso de germoplasma de Hevea spp. O Agrônômico, Campinas, 41 (3): 215-225, 1989.
- COMPAGNON, P. Le caoutchouc naturel - Biologie, culture, production. Collection "Techniques Agricoles et Productions Tropicales", Paris, 1986.
- CONAGIN, C.H.T.M. Microsporogênese em clones normais e tetraplóides de Hevea brasiliensis Muell. Arg. Bragantia, Campinas, 30(2): 11-17, 1971.
- DEAN, W. A luta pela borracha no Brasil. Um estudo de história ecológica. São Paulo, Ed. Nobel, 1989, 286p.
- DE ROBERTIS, E.D.P.; SAEZ, F.A.; DE ROBERTIS, E.M.F. Biologia celular. Rio de Janeiro, Livraria "El Ateneo" do Brasil Ltda, 1977, 566p.
- DUCKE, A. Novas contribuições para o conhecimento das Seringueiras da Amazônia brasileira II. Boletim Técnico do Instituto Agrônômico do Norte, Belém, nº 10, 1946, p. 1-24.

- EGLER, W.A. & PIRES, J.M. Notas sobre a redescoberta de Hevea camporum Ducke. Série Botânica. Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, nº 13, Belém, 1961.
- GONÇALVES, P. de S. Melhoramento genético da seringueira (Hevea spp). In: Simpósio sobre a Cultura da Seringueira no Estado de São Paulo, Piracicaba, 1986, p. 95-123.
- GONÇALVES, P. de S.; PAIVA, J.R.; SOUZA, R.A. Retrospectiva e atualidade do melhoramento genético da seringueira (Hevea spp) no Brasil e em países asiáticos. Série Documentos, EMBRAPA/CNPDS, nº 2, Manaus, 1983a, 69p.
- GONÇALVES, P. de S.; VALOIS, A.C.C.; PAIVA, J.R. Induction and investigation of polyploidy in IAN 717 rubber tree clone. A preliminary study. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 18(7): 789-796, 1983b.
- GONÇALVES, P. de S.; CARDOSO, M.; BOAVENTURA, M.A.M.; MARTINS, A.L.M.; LAVORENTI, C. Biologia, citogenética e ploidia de espécies do gênero Hevea. O Agrônomo, Campinas, 41(1): 40-64, 1989.
- HEUSSER, C. The reproductive organs of Hevea brasiliensis. Archives Rubberculture, Batavia, 3: 455, 1919.
- LECONTE, A. La reproduction sexuee de l'Hevea brasiliensis. Revue Generale des Caoutchoucs et Plastiques, nº 69, PARIS, 1984, p. 70-74.

MAJUMDER, S.K. Chromosome studies of some species of Hevea. Journal of Rubber Research Institute of Malaysia, Kuala Lumpur, 18(5): 269-275, 1964.

MAJUMDER, S.K. Male sterile clones in Hevea brasiliensis. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 45: 145-146, 1967.

MENDES, L.O.T. Investigações preliminares sobre a duplicação do número de cromossomos da seringueira pela ação da colchicina. In: Boletim Técnico do Instituto Agrônômico do Norte, Belém, nº 7, 1946, 60p.

MENDES, L.O.T. Duplicação do número de cromossomos da seringueira. Um novo teste precoce para determinação da capacidade de produção da seringueira e resultados obtidos em plantas normais e depois de sua poliploidização. In: Anais da Academia Brasileira de Ciência, Rio de Janeiro, 41(3): 487-488, 1969.

MENDES, L.O.T. Poliploidização da seringueira: um novo teste para determinação da capacidade de produção de seringueiras jovens. Polímeros, 1: 22-30, 1971.

MENDES, L.O.T. Clones poliplóides de seringueira. Elastômeros, São Paulo, 1(3): 12-13, 1975.

MENDES, L.O.T. & MENDES, A.J.T. Poliploidia artificial em seringueira (Hevea brasiliensis Muell.-Arg.). Bragantia, Campinas, 22(30): 383-392, 1963.

- NAZEER, M.A. & SARASWATHY AMMA, C.K. Spontaneous triploidy in Hevea brasiliensis (Willd. ex Adr. de Juss.) Muell. Arg. Journal of Plantation Crops, Kerala, 15(1): 1-71, 1987.
- ONG, S.H. Chromosome morphology at the pachytene stage in Hevea brasiliensis - A preliminary report. In: International Rubber Conference, Kuala Lumpur, 2: 3-12, 1975.
- ONG, S.H. Cytology of Hevea. In: Rubber Research Institute of Malaysia Hevea Breeding Course. Lecture Notes, Kuala Lumpur, 1980.
- ONG, S.H.; IBRAHIM, N.; GHANI, M.N.A.; TAN, H. Results of RRIM work on induced mutation and polyploidy breeding. In: Colloque, Exploitation, Physiologie et Amelioration de l'Hevea, Montpellier, 1984, p. 383-399.
- PADDOCK, E.F. On the number of chromosomes in Hevea. Chronica Botanica, Leiden, 7(8): 412-413, 1943.
- PERRY, B.A. Chromosome number and phylogenetic relationships in the Euphorbiaceae. American Journal of Botany, New York, 30(7): 527-543, 1943.
- PIRES, J.M. Notas de herbário I. In: Boletim do Museu Paraense Emilio Goeldi. Série Botânica, Belém, 52: 1-11, 1981.
- RAMAER, H. Cytology of Hevea. Genetica, Gravenhage, 17: 193-236, 1935.

- ROSS, J.M. Chromosomes of Hevea brasiliensis. In: Planter's Bulletin of Rubber Research Institute of Malaysia, Kuala Lumpur, 41: 47, 1959.
- SARASWATHY AMMA, C.K.; MARKOSE, V.C.; LICY, J.; ANNAMMA, Y.; PANIKKAR, A.; BHASKARAN NAIR, V.K. Triploidy in Hevea brasiliensis Muell. Arg. In: International Rubber Conference, India, paper 8, 1980.
- SARASWATHY AMMA, C.K.; MARKOSE, V.C.; LICY, J.; PANIKKAR, A. Cytomorphological studies in an induced poliploid of Hevea brasiliensis Muell. Arg. Cytologia, Tokyo, 49: 725-729, 1984.
- SARASWATHY AMMA, C.K.; NAMBOODIRI, A.N.; PANIKKAR, A.O.N. Meiotic abnormalities in a sterile clone of Hevea brasiliensis (Willd. ex Adr. de Juss.) Muell. Arg. Cytologia, Tokyo, 55(2): 225-229, 1990a.
- SARASWATHY AMMA, C.K.; NAMBOODIRI, A.N.; PANIKKAR, A. O. N.; SETHURAJ, M.R. Radiation induced male sterility in Hevea brasiliensis (Willd. es Adr. de Juss.) Muell. Arg. Cytologia, Tokyo, 55(4): 547-551, 1990b.
- SCHULTES, R.E. The history of taxonomic studies in Hevea. The Botanical Review, Lancaster, 36(3): 197-276, 1970.
- SCHULTES, R.E. Wild Hevea: an untapped source of germ plasm. Journal of the Rubber Research Institute of Sri Lanka, 54(1): 227-257, 1977a.

SCHULTES, R.E. The odyssey of the cultivated rubber tree. Endeavour, London, 1(3/4): 133-138, 1977b.

SEDGLEY, M. & ATTANAYAKE, D.P.S.T.G. The breeding system of rubber (Hevea brasiliensis): an evaluation of controlled hand pollination methods. Euphytica, Wageningen, 39: 83-91, 1988.

SEIBERT, R.J. A study of Hevea (with its economic aspects) in the Republic of Peru. In: Annals of the Missouty Botanical Garden, 34: 261-349, 1947.

WARMKE, H.E. Cytomorphological studies with Hevea. In: Report of Federal Experiment Station in Puerto Rico, 1950, p. 11-12.

WEBSTER, C.C. & PAARDEKOOPEER, E.C. The botany of the rubber tree. In: WEBSTER, C.C. & BAULKWILL, W.J. (Ed.). Rubber, Tropical Agriculture Series, 1989.

WYCHERLEY, P.R. The genus Hevea. In: Workshop on International Colaboration in Hevea Breeding and the Collection and stablishment of Materials from the Neo-tropics, Malaysia, 1977.

YEANG, H.Y. & ONG, S.H. Low fruit-set from Hevea hand-pollination: fruit load and propensity of floral shoots to fruit-bearing. Journal of Natural Rubber Research, Kuala Lumpur, 3(3): 143-154, 1988.

7. APÊNDICE

Significado das siglas referentes aos clones utilizados neste estudo e respectivos locais de origem.

AVROS: Algemene Vereniging Rubberplanters Oostkust Sumatra,
Indonésia

GT: Godang Tapen, Malásia

RRIM: Rubber Research Institute of Malaysia, Malásia

Fx: Ford Cruzamento, Brasil

Tjir: Tjirandji, Malásia

IAC: Instituto Agrônômico de Campinas, Brasil

IAN: Instituto Agrônômico do Norte, Brasil

PB: Prang Besar, Malásia

PR: Proefstation voor Rubber, Indonésia

C: Clone, Filipinas

F: Ford, clone primário, Brasil

FB: Ford Belém, Brasil

Pil: Pilmoor, Malásia

Lun: Lunderston, Malásia