CARACTERIZAÇÃO CITOMORFOLÓGICA DA SERINGUEIRA

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

SILVIA MARINA CUCO

Engenheira Agrônoma

Mestra em Agronomia

Orientador: Prof. Dr. GERHARD BANDEL

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura
“Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Doutor em Agronomia.
Área de concentração: Genética e Melhoramento
de Plantas.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil
Setembro - 1 9 9 7

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Cuco, Silvia Marina

Caracterização citomorfológica da seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. ex Adr. de Juss.) Muell. Arg.] / Silvia Marina Cuco. - - Piracicaba, 1997.
137 p. : il.

Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1997.
Bibliografia.

1. Citogenética vegetal 2. Cultivo "in vitro" 3. Fisiologia vegetal 4. Morfologia vegetal 5. Seringueira I. Título

CDD 633.895

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

SILVIA MARINA CUCO

Aprovada em 31/10/97

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Gerhard Bandel	ESALQ
Prof ^a . Dr ^a . Margarida Lopes Rodrigues de Aguiar-Perecin	ESALQ
Prof ^a . Dr ^a . Maria Lúcia Carneiro Vieira	ESALQ
Prof ^a . Dr ^a . Maria Neysa Silva Stort	UNESP
Dr. Paulo de Souza Gonçalves	IAC

Prof. GERHARD BANDEL
Orientador

Ao meu esposo Luiz Fernando e
à nossa pequena Ana Clara,

DEDICO

À minha mãe Lourdes, sempre presente,
em todos os momentos,

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

- Ao Professor Dr. Gerhard Bandel, não somente pela orientação mas também pela amizade, em tantos anos de convívio harmonioso
- À Prof^a Dr^a Margarida L. R. de Aguiar Perecin, por sua colaboração em tantas ocasiões
- À Prof^a Dr^a Maria Lúcia Carneiro Vieira, por suas sempre valiosas sugestões e oferecimento do laboratório e equipamentos sob sua responsabilidade
- Ao Prof. José Dias Costa, do Departamento de Agricultura, pela colaboração em muitas ocasiões, inclusive na obtenção dos materiais biológicos utilizados neste trabalho
- Ao Prof. Dr. Eliot Kitajima e à técnica Silvania Machado, do Núcleo de Apoio à Pesquisa - Microscopia Eletrônica Aplicada à Agropecuária, pelo auxílio nos estudos ali realizados
- Ao Dr. Paulo de Souza Gonçalves, do Instituto Agrônomo de Campinas, por sua cooperação em todas as solicitações
- Aos professores do Curso de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela participação em minha formação
- Aos funcionários Silvia Cristina Menuzzo Molina, Carlos Alberto Veríssimo e Carlos Alberto de Oliveira pelo auxílio técnico e colaboração em tantas ocasiões
- À Neuza Maria Sarto Rocha, por suas tantas gentilezas

- Aos funcionários Antonio de Pádua Gorga (Oberdã), Fernando Leopoldino, Silvana Gregório, Elisabeth da Silva, Carmem M. F. Piloto, M. Adriana R. Ometto, C. Vanderléia de Oliveira e Valdir Próspero, pelos inúmeros favores
- À Adriana Martins Novaes (pós-graduanda) e aos funcionários Marcelo Valente Batista e Celestino Alves Ferreira, do Departamento de Agricultura, pelo auxílio na obtenção dos materiais biológicos
- A todos os funcionários que colaboraram, de forma direta ou indireta, para a realização deste trabalho
- A todos os colegas do curso de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pelo agradável convívio
- À Tamara Canto Fonseca, pela preciosa amizade de todos os momentos
- À Mônica Rosa Bertão pela amizade e tantas colaborações
- Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos
- À minha família, pelo apoio em tantos momentos
- Enfim, a todas as pessoas com quem convivi durante todos estes anos, e que contribuíram com algo positivo nesta coisa fantástica que é a vida,

AGRADEÇO

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE QUADROS	xiii
RESUMO	xiv
SUMMARY	xvi
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1. Citogenética	04
2.1.1. Estudos citogenéticos em <i>Hevea</i>	04
2.1.2. Aplicações da metodologia de bandamento-C	06
2.2. Morfologia floral de <i>Hevea</i>	11
2.3. Emprego da metodologia de clareamento	14
2.4. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Hevea</i>	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1. Materiais biológicos	26
3.1.1. Flores	26
3.1.2. Raízes	28
3.1.2.1. Raízes de sementes	28

3.1.2.2. Raízes obtidas em meio líquido	28
3.1.2.3. Raízes de cultivo <i>in vitro</i>	29
3.2. Métodos	29
3.2.1. Clareamento de óvulos	29
3.2.2. Avaliação de hermafroditismo	31
3.2.3. Caracterização cromossômica	32
3.2.4. Bandamento C	35
3.2.5. Enraizamento em meio líquido	38
3.2.6. Enraizamento <i>in vitro</i>	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1. Caracterização dos cromossomos somáticos	42
4.2. Bandamento C	50
4.3. Enraizamento em meio líquido - Hidroponia	56
4.4. Enraizamento <i>in vitro</i>	63
4.5. Macrosporogênese	81
4.6. Avaliação de hermafroditismo	91
4.7. Considerações finais	103
5. CONCLUSÕES	105
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
APÊNDICE 1	134
APÊNDICE 2	135
APÊNDICE 3	136

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Célula meristemática do clone GT 1 com cromossomos com graus diferente de contração (setas)	44
2. Cromossomos metafásicos (a) de meristema radicular do clone GT 1, de raiz tratada com 8-hidroxiquinolina durante três horas e seu respectivo cariótipo (b)	48
3. Cromossomos metafásicos de ponta de raiz dos clones GT 1 (a), RRIM 527 (b) e RRIM 600 (c), tratadas com cicloheximida por 3 e 4 horas e 8-hidroxiquinolina por 2:30, respectivamente.	49
4. Pró-metáfases com os $2n=36$ cromossomos, após tratamento brando (esquerda) ou forte (direita)	51
5. Cromossomos com algumas marcações leves (setas), após tratamento moderado	52
6. Núcleos interfásicos do clone RRIM 527 mostrando quantidades variáveis de cromocentros	53
7. Células de <i>H. brasiliensis</i> em prófase, mostrando leves marcações após tratamento drástico (a) e sem marcas com desnaturação moderada (b) ou leve (c)	55
8. Plantas de 18 meses de idade, no viveiro do Departamento de A-	

agricultura da ESALQ/USP	56
9. Planta de 18 meses após recepagem para o ensaio. Somente após o início de brotações foi retirada do campo e colocada em meio líquido	57
10. Sistema radicular das plantas de 18 meses, após toalete	57
11. Plantas com 18 meses de idade, logo após retirada do campo e realização de toalete nas raízes. Notam-se três alturas de corte e plantas com folhas já desenvolvidas ou com brotações bem iniciais (ao centro)	58
12. Plantas já preparadas e colocadas em meio líquido, com borbulhamento de ar. À esquerda com 18 meses de idade e à direita, com folhas, com seis meses	59
13. Brotações vigorosas desenvolveram-se sob hidroponia, qualquer que tenha sido a altura de corte	60
14. Sistema radicular desenvolvido sob hidroponia. Nesta planta já foram realizados dois desbastes de raízes; este, portanto, é o terceiro lançamento de raízes	61
15. Ápices caulinares excisados de plantas do viveiro da ESALQ/USP	64
16. Ápices obtidos das brotações resultantes do ensaio de hidroponia	65
17. Sementes em germinação e algumas plântulas em diferentes estádios de desenvolvimento. Todos foram testados <i>in vitro</i>	65
18. Ápices das plântulas obtidas de sementes germinadas, em três	

estádios	66
19. Calos formando-se na base dos explantes (a) e, posteriormente, raízes emergentes de calo (b)	71
20. O mesmo explante da Figura 19b, com raízes já desenvolvidas	71
21. Raízes produzidas <i>in vitro</i> , formadas a partir de calo. Foto obtida em lupa, com aumento de 60 vezes	73
22. Raízes produzidas nos diversos ensaios. Da esquerda para a direita: raiz obtida de semente, obtida por hidroponia (ao centro) e obtida <i>in vitro</i> sem formação de calo. Fotografia obtida em lupa, com aumento de 60 vezes	74
23. As mesmas raízes das Figuras 21 e 22, após reação de Feulgen. Da esquerda para a direita: raiz de semente; obtida por hidroponia; de cultivo <i>in vitro</i> com e sem formação de calo, respectivamente. Nota-se que somente a obtida de calo não apresenta região meristemática evidenciada pelo corante	75
24. Plântula mais desenvolvida, com folhas mais abertas e maiores, que permaneceram maior tempo no telado. Mostraram maiores níveis de contaminações	77
25. Explante sadio, com folhas se desenvolvendo	77
26. Brotações, calos e raízes desenvolvendo-se <i>in vitro</i>	78
27. Explante com brotações desenvolvendo-se e uma raiz (sem calo)	79
28. Uma raiz emergindo de um explante que não recebeu IBA e, portanto, não formou calo	80

29. Plantas do clone RRIM 600, em plantio da ESALQ/USP, em Piracicaba/SP, com andaime montado para coleta de flores (1994) 81
30. Seringueiras plantadas em 1984 na ESALQ/USP, em Piracicaba/SP. Em primeiro plano indivíduos do clone RRIM 527 (1997) 83
31. Botões florais com tamanho próximo do natural em estágio utilizado no estudo da macrosporogênese e para avaliação de hermafroditas. As flores femininas localizam-se nos ápices e duas são apontadas pelas setas (são cinco visíveis na foto). Todas as demais são masculinas 85
32. Algumas fases da macrosporogênese em óvulos clareados, sob contraste de fase. a) prófase I; b) tétrade; c) saco embrionário com um núcleo; d) saco embrionário com dois núcleos 89
33. a) saco embrionário com 3 núcleos; b) saco embrionário tetranucleado; 2 núcleos são bem visíveis; os outros estão no polo oposto, em outro plano; c) oosfera em diferenciação; d) óvulo com 2 sacos embrionários (setas) 90
34. Flores hermafroditas vistas ao microscópio eletrônico de varredura. a) uma antera desenvolvida e duas residuais (setas) na base do ovário; b) ovário circundado por anteras bem desenvolvidas. No detalhe inferior, ampliação das anteras 93
35. a) Flor hermafrodita com anteras funcionais em sua base; b) detalhe da antera onde são vistos grãos de pólen na fenda (seta) 94

36. Ovário do clone RRIM 600 com anteras residuais em sua base (parte superior - setas), visto sob microscopia de varredura 95
37. Epiderme de antera de flor hermafrodita, ao microscópio eletrônico de varredura, com aspecto normal 96
38. Ovário de flor do clone RRIM 600 seccionado transversalmente e visto ao microscópio eletrônico de varredura. Podem ser observados os três óvulos (ov) com os sacos embrionários ao centro. Em um dos óvulos são vistos dois sacos embrionários (seta) 97
39. Ovário de flor essencialmente feminina de RRIM 600 (a) e estames do clone RRIM 527 (b), ao microscópio eletrônico de varredura 100
40. Estames de GT 1 ao microscópio eletrônico de varredura. Nos estames jovens (a), as epidermes das anteras têm aspecto rugoso. Em (b), estames maduros (“chochos”) 101
41. a) inflorescência de GT 1, onde restaram somente as flores femininas (nos ápices); b) inflorescência de RRIM 600 com flores masculinas (numerosas) e femininas (nos ápices) 102

LISTA DE TABELAS

	Página
1. Números de óvulos clareados em que as diversas fases da meiose foram observadas, nos três clones de seringueira. Também computadas flores e CMSE em diferenciação	84
2. Quantificação de flores femininas e hermafroditas (com estames desenvolvidos ou residuais), nos três clones de <i>H. brasiliensis</i>	91

LISTA DE QUADROS

	Página
1. Cronograma de coleta de flores de seringueira no ano de 1994, na ESALQ/USP, em Piracicaba/SP, para o estudo da macrosporogênese	27
2. Ensaio de obtenção de raízes para os estudos citológicos de seringueira no ano de 1995, em Piracicaba/SP	32
3. Ensaio de obtenção de raízes de seringueira no ano de 1996, em Piracicaba/SP	33
4. Ensaio de obtenção de raízes de seringueira no ano de 1997, em Piracicaba/SP	33
5. Tipos de tratamento ácido realizados nas raízes dos clones de seringueira RRIM 527, RRIM 600 e GT 1 e/ou nas lâminas após esmagamento das mesmas, para bandamento C	36
6. Variações em concentração, tempo e temperatura de desnaturação com hidróxido de bário testadas para bandamento C	37
7. Tempos aproximados de resposta dos explantes aos diferentes tratamentos	70

CARACTERIZAÇÃO CITOMORFOLÓGICA DA SERINGUEIRA

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

Autora: SILVIA MARINA CUOCO

Orientador: Prof. GERHARD BANDEL

RESUMO

A seringueira, apesar de sua importância pela produção de borracha natural, é pouco estudada, especialmente em aspectos básicos como citogenética e biologia reprodutiva e isto deve-se, em parte, à dificuldade em se trabalhar com tal espécie arbórea. Porte alto, longos períodos de imaturidade e ciclo biológico, baixa produção de frutos, sementes recalcitrantes, são alguns dos fatores limitantes.

O presente estudo teve como objetivo investigar aspectos citogenéticos (caracterização de cromossomos somáticos e análise da macrosporogênese), morfológicos (estudo da morfologia floral e taxa de hermafroditismo) e fisiológicos (enraizamento de plantas jovens em meio líquido e de ápices caulinares *in vitro*), em *Hevea brasiliensis*. Três clones foram estudados, RRIM 527, RRIM 600 e GT 1 (macho-estéril).

Os cromossomos somáticos foram avaliados por técnicas citológicas convencionais e bandamento C. Foram detectadas algumas regiões heterocromáticas.

Através de metodologia de clareamento de óvulos usando salicilato de metila, observou-se que a macrosporogênese é normal, nos três clones,

culminando com a formação de sacos embrionários octanucleados. A técnica permitiu a observação de grande número de óvulos e nenhuma irregularidade meiótica foi detectada. As alterações observadas (como exceções) foram morfológicas.

Botões florais com morfologia externa de femininos foram analisados sob microscopia eletrônica de varredura quanto à sua estrutura. Os resultados mostraram que do total de flores avaliadas, 71,49% eram hermafroditas e 28,51% exclusivamente femininas. As flores hermafroditas possuem ovário normal em cuja base as anteras dispõem-se, circundando-o completa ou parcialmente. Tais anteras são geralmente menores que as normais, mas em grande parte funcionais e com grãos de pólen. Do total de flores hermafroditas, 29,83% apresentou anteras residuais e 71,17% estames desenvolvidos.

Ensaio de enraizamento de plantas de seis e 18 meses de idade foram realizados em quatro tipos de meio líquido (solução de Sarruge e água, com e sem fornecimento de NAA). Os resultados mostraram que água, com borbulhamento contínuo de ar, foi o melhor meio e grande quantidade de raízes foi obtida nos dois tipos de plantas. Fornecimento de NAA, mesmo em baixas dosagens, inibiu o enraizamento.

Ápices caulinares de diferentes origens foram utilizados em ensaios de enraizamento *in vitro* mas somente aqueles obtidos de plântulas recém germinadas mostraram bons resultados. Foi determinado um protocolo de estabelecimento e enraizamento usando-se este tipo de material como explante.

CYTOMORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF THE RUBBER TREE [*Hevea brasiliensis* (Willd. ex Adr. de Juss.) Müell. Arg.]

Author: SILVIA MARINA CUOCO

Adviser: Prof. GERHARD BANDEL

SUMMARY

Rubber tree, in spite of your importance due to production of natural rubber is little studied, specially in basic aspects like cytogenetics and reproductive biology and this is partially due to the difficulty in working with this species. Height, long imaturity period and biological cycle, low fruit set, recalcitrant seeds are some of the limitant factors.

This study was aimed to investigate cytogenetics (somatic chromosomes characterization and megasporogenesis analysis), morphological (floral morphology and hermaphroditism rates) and physiological (rooting of young plants in liquid medium and of shoots *in vitro*) aspects in *Hevea brasiliensis*. Three clones were studied, RRIM 527, RRIM 600 and GT 1 (male-sterile).

Somatic chromosomes were evaluated by conventional cytological techniques and C-banding. Some heterochromatic regions were detected.

By ovule clearing technique using methyl salicylate it was observed that megasporogenesis is normal in the three clones, culminating with the

formation of octanucleated embryonary sacs. This technique allow the analysis of a great number of ovules and no irregularities were detected. The observed alterations (exceptions) were morphological.

Flower buds with external morphology of female were analysed by scanning electron microscopy with regard of its structure. Results showed that 71,49% of total flowers were hermaphrodites and just 28,51% exclusively females. The hermaphrodite flower has a normal ovary surrounded by stamens. This anthers are generally smaller than those of male flowers, but are functional with polen grains. Of the total number of hermaphrodite flowers 29,83% had residual anthers, not completely developped, but in the great part of the analysed hermaphrodite flowers (70,17%) stamens were developped.

Rooting tests of six and 18 months aged plants were realized in four types of liquid medium (Sarruge's solution, water, with or no NAA). Results showed that water was the best medium and a great number of roots was obtained in the two types of plants. Supplying NAA inhibit rooting even in lower dosage.

Shoots from differents origins were utilized on *in vitro* rooting tests but just that from plantlets showed positive results. It was determinated a protocol of *in vitro* establishment and rooting for this material.

1. INTRODUÇÃO

A seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A.DC.) Muell. Arg.] é uma espécie arbórea de grande importância por ser a principal produtora de borracha em escala comercial. Obtida a partir do látex, um isopreno polimerizado produzido em numerosas células especializadas presentes em todos os órgãos da planta, os vasos laticíferos, a borracha natural apresenta inúmeras aplicações e características especiais únicas na natureza. A estrutura molecular da borracha natural é cis-1,4 polisopreno (Mathew, 1992).

Dentro da família Euphorbiaceae, o gênero *Hevea* possui 11 espécies atualmente conhecidas (Pires, 1973, 1981; Gomes, 1981), com centro de origem e diversidade genética na região amazônica, ocorrendo naturalmente no hemisfério sul em amplitude de 3°N a 15°S (Ortolani, 1986).

A seringueira geralmente produz sementes somente uma vez ao ano. Excepcionalmente, em alguns países como a Malásia, ocorre um segundo período de produção de sementes. Há uma grande variação clonal quanto ao número de sementes produzidas mas a taxa de frutificação natural

é muito baixa, de cerca de 1-2% do total de flores formadas. Uma produção de sementes de 150Kg/ha e taxa de germinação da ordem de 80% são consideradas boas (Simmonds, 1989; Marattukalam & Saraswathyamma, 1992).

As formas usuais de propagação da seringueira são por sementes e por enxertia, seja ela madura (convencional), verde, precoce ou de outro tipo. Outros métodos de propagação têm sido desenvolvidos, tais como enraizamento de estacas (difícil), alporquia e micropropagação, mas ainda não foram adotados comercialmente (Pereira, 1986; Marattukalan & Saraswathyamma, 1992).

No início do século o Brasil era o responsável por 98% da produção mundial de borracha natural, quando este era o segundo produto nacional mais exportado mas, no início dos anos 90 estava produzindo menos de 1% do total mundial e importando cerca de 75% do seu consumo interno (Bernardes et al., 1990). Atualmente, a quase totalidade de borracha natural produzida é oriunda de países do sudeste asiático, principalmente Tailândia, Indonésia, Malásia e Sri Lanka.

Há alguns grupos de pesquisa envolvidos em estudos de biologia e fisiologia da espécie, melhoramento genético e aplicação de técnicas moleculares em seringueira no Brasil, França, Sri Lanka e Malásia, principalmente. Nas últimas décadas, grandes avanços têm sido conseguidos nas áreas de fisiologia, melhoramento genético para desenvolvimento de clones superiores e, mais recentemente, aplicação de técnicas biotecnológicas. Entretanto, ainda há uma carência de estudos básicos em

áreas como citogenética, biologia reprodutiva e fisiologia, que permitam um melhor conhecimento de aspectos básicos da biologia da planta.

Assim, o presente estudo visou um melhor entendimento de aspectos citológicos, fisiológicos e morfológicos da principal espécie do gênero, *H. brasiliensis*. Um dos objetivos foi a caracterização dos cromossomos somáticos, além da análise da gametogênese feminina. Outros objetivos foram avaliação da morfologia floral, com relação à ocorrência de hermafroditismo e estudo de enraizamento de plantas jovens em meio líquido e cultivo *in vitro* de ápices caulinares, a fim de se obter mais informações também sobre a fisiologia da espécie.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Citogenética

2.1.1. Estudos Citogenéticos em *Hevea*

Estudos dos cromossomos somáticos de seringueira são bastante escassos. Ainda no início deste século, as primeiras referências ao assunto mostraram dados equivocados sobre o número de cromossomos de várias espécies de *Hevea* (Heusser, 1919; Bangham, 1931). Posteriormente, outros estudos chegaram à conclusão de que o número correto para o gênero é de $2n = 36$ cromossomos (Ramaer, 1935; Perry, 1943; Paddock, 1943; Ross, 1959; Bouharmont, 1960). Ramaer (1935) sugeriu que a seringueira seria um anfidiplóide natural, com número básico de nove cromossomos.

Explorando quatro espécies de *Hevea*, Majunder (1964) foi um dos poucos autores a estudar a morfologia dos cromossomos. Utilizou meristemas radiculares tratados com paradiclorobenzeno durante três horas. Concluiu que é muito difícil diferenciá-los e atribuiu aos maiores o

comprimento de 3 a 3,5 μ m, aos menores 1 a 1,5 μ m e tamanho médio de 2 a 2,5 μ m. Observou cromossomos com satélites em poucas lâminas e comentou que possivelmente são quatro por célula. Num estudo anterior, Bouharmont (1960) determinou somente o comprimento total para cinco espécies do gênero. Apresentou apenas esquemas dos cromossomos somáticos, mais distendidos, semelhantes aos observados em pró-metáfase. Majunder (1964) apresentou fotomicrografias com os cromossomos bastante contraídos, com difícil caracterização e até mesmo identificação de centrômeros.

Em estudo mais recente, Cuco (1992) analisou os cromossomos somáticos de nove clones de *Hevea brasiliensis* e observou grande variação nas respostas aos agentes de pré-tratamento testados e a presença de somente um par de cromossomos satelitados, discordantemente de Ong (1975) que julgou serem quatro os cromossomos com satélite.

Além destes, outros poucos estudos avaliaram o comportamento dos cromossomos meióticos na microsporogênese (Warmke, 1950; Bouharmont, 1960; Majunder, 1964; Leconte, 1984; Cuco, 1992; Cuco & Bandel, 1995) e todos concluíram que a meiose masculina era normal, nas várias espécies estudadas. Um único estudo (Ong, 1975) construiu um idiograma baseado em cromossomos paquitênicos de *H. brasiliensis*. Neste, o autor representou ainda as posições de muitos cromômeros, espalhados pelo genoma, assim como de grandes blocos heterocromáticos na região centromérica de todos os cromossomos.

Irregularidades na gametogênese masculina foram observadas somente em casos especiais, como em clones macho-estéreis naturais (Annamma et al., 1980) ou induzidos (Saraswathy Amma, 1990a e b) e num

triplóide espontâneo (Nazeer & Saraswathy Amma, 1987). Citomixia, no final da microsporogênese, foi observada somente após irradiação de sementes, que resultou em clones macho-estéreis (Rajagopal et al., 1988; Saraswathy Amma et al., 1990b). Alterações numéricas em cromossomos somáticos apenas foram observadas em casos de indução artificial à poliploidia (Saraswathy Amma et al., 1980; Gonçalves et al., 1983b, 1989; Nazeer & Saraswathy Amma, 1987) e após cultura de pólen (Cheng-Hua et al., 1979; Chen et al., 1982).

Estudos que tenham avaliado o processo todo de gametogênese feminina e formação do saco embrionário inexistem. Avaliações parciais têm mostrado megásporos normais e sacos embrionários octanucleados (Warmke, 1950; Bouharmont, 1960; Leconte, 1984; Cuco, 1992). Somente um trabalho (Bouharmont, 1960) considerou que o saco embrionário de *Hevea brasiliensis* possui cinco núcleos, a saber, duas sinérgides, a oosfera (todos no polo da micrópila) e dois núcleos polares ao centro, sem sinais das três antípodas. Este mesmo estudo constatou comprimento aproximado do saco embrionário de 400 a 450µm.

2.1.2. Aplicações da Metodologia de Bandamento-C

No final dos anos 60 foram desenvolvidas diversas técnicas que permitiram a diferenciação linear dos cromossomos. Tais metodologias baseiam-se nas afinidades diferenciadas das várias sequências de DNA ao longo dos cromossomos a corantes e reagentes específicos, após tratamento especial (Vosa, 1985).

Tais técnicas, chamadas de bandamento, culminaram no aparecimento de regiões dos cromossomos que coravam-se diferencialmente, de acordo com o corante e metodologia empregados (bandas C, Q, G). Dentre estas, o presente estudo limitar-se-á a considerações sobre o bandamento C.

O bandamento C produz bandas fortemente coradas nos cromossomos, em regiões de heterocromatina constitutiva, que consiste de curtas sequências de DNA altamente repetitivo. O procedimento remove o DNA da eucromatina mais rapidamente que o da heterocromatina (Holmquist & Motara, 1987). O DNA é primeiramente quebrado em pequenos fragmentos. A seguir, procede-se uma solubilização diferencial do DNA fragmentado da eucromatina por três tratamentos sequenciais: 1) ácido 2) básico moderado 3) solução salina aquecida. Esta solubilização ocorre por: 1) depurinação 2) denaturação do DNA 3) quebra da cadeia nos sítios depurinados, respectivamente, nos três tratamentos (Holmquist, 1979). Após denaturação, renaturação do DNA em solução salina aquecida, aplicação de solução de Giemsa colore fortemente as regiões que contêm as sequências reassociadas. Durante o tratamento ácido os glicosídeos nitrogenados das purinas são protonados e esta ponte então rompe-se, liberando a purina. As lâminas são então colocadas em solução salina aquecida, onde os sítios despurinados sofrem beta-eliminação. O aldeído ativa os beta-fosfodiester que quebram o DNA em fragmentos de 300pb. No estado de fita simples, tais fragmentos desprendem-se do cromossomo (Holmquist & Motara, 1987).

Por razões não totalmente conhecidas, um ou mais dos processos ocorre mais rapidamente na eucromatina que na heterocromatina. Então, a metodologia requer um ajuste de reações que garanta que as regiões eucromáticas sejam preferencialmente removidas e que alguma heterocromatina permaneça, formando as bandas C. Segundo Holmquist (1979) tratamento ácido com HCl 0,2N depurina o DNA cromossômico a uma taxa de $0,26 \times 10^{-6}$ purinas/dalton.minuto. Vários outros agentes desnaturantes têm sido empregados como NaOH (Arrighi & Hsu, 1971; Comings et al., 1973), hidróxido de bário (Sumner, 1972), formamida (Dev et al., 1973) e bleomicina (Holmquist, 1979).

As bandas C constituem-se de marcadores moleculares microscopicamente visíveis e por isso a principal utilização das técnicas de bandamento C é possibilitar a caracterização cromossômica. O bandamento C permite a identificação do polimorfismo cromossômico, ou seja, mostra que os cromossomos possuem diversas regiões que reagem diferentemente a certos tratamentos. Assim é possível identificar no genoma analisado os diferentes estados da cromatina, formalmente designados eu ou heterocromatina, distinguíveis por seus diferentes ritmo de replicação e grau de compactação.

Os padrões de bandas C podem ser utilizados para caracterização e comparação entre genomas. Somente considerando-se os últimos anos, muitos estudos têm-se utilizado de metodologias de bandamento C para caracterização cromossômica, em várias espécies.

Caracterizações cromossômicas por bandamento C têm sido realizadas com os mais diferentes objetivos, em distintas espécies, tais como milho, para identificação de cromossomos somáticos (Aguiar-Perecin, 1984,

1985; Aguiar-Perecin & Vosa, 1985; Aguiar-Perecin & Decico, 1988); trigo, na identificação de cultivares e avaliação de polimorfismo cromossômico (Endo, 1986; Gill et al., 1991); na composição de heterocromatina de centeio (Cuadrado et al., 1995); caracterização de cromatina de *Hordeum* (Cabrera et al., 1994), *Dasypirum villosum* (Pignone et al., 1995), *Drosera* (Sheikh et al., 1995), *Cicer* sp (Galasso et al., 1996); correlação entre bandas C e sensibilidade ao frio em *Paris tetraphylla* e *Trillium* (Uchino & Wang, 1996); caracterização de sequências altamente repetitivas em *Allium fistulosum* (Irifune et al., 1995) e *Raphanus sativus* (Hirai et al., 1995).

As bandas C podem ser utilizadas como marcadores citológicos no estudo, por exemplo, dos genomas de híbridos interespecíficos, linhas de adição/substituição ou de estoques aneuplóides.

O gênero *Triticum*, por exemplo, é bastante estudado, sob vários aspectos. A metodologia de bandamento C tem sido empregada para análise de pareamento homeólogo em híbridos de *Triticum longissimum* X *T. aestivum* (Naranjo, 1995), em linhas de adição de *T. aestivum* - *T. searsii* (Friebe et al., 1995), na detecção de introgressões interespecíficas em *T. aestivum* (Cuadrado et al., 1996) e identificação de cromossomos de espécies de outros gêneros em *T. aestivum* (Cabrera et al., 1995; Zhong et al., 1996), como exemplos.

Híbridos intergenéricos também têm sido avaliados pela metodologia de bandamento C, como nos cruzamentos realizados entre milho e sorgo, milheto ou *Tripsacum* (Bernard & Jewell, 1985; Furini & Jewell, 1995).

A técnica também permite a identificação de rearranjos cromossômicos tais como translocações e deleções (Gill et al., 1991;

Fernandes-Calvín et al., 1995a; Wei et al., 1995b), trissomias, adições (Sybenga, 1995; Wei et al., 1995a), rearranjos devidos ao cultivo *in vitro* (Aguiar-Perecin & Fluminhan Jr., 1996; Fluminhan Jr. & Kameya, 1996) além, obviamente, de caracterização de diferentes espécies dentro de um gênero, como recentemente em *Drosera* sp (Sheikh & Kondo, 1996).

Foram citados aqui alguns exemplos de aplicação da metodologia em vegetais. No entanto, bandamento C tem sido aplicado também, por exemplo, na caracterização cromossômica de várias espécies de insetos, de diferentes regiões do mundo (Boron, 1995; Chen et al., 1995; Miura, 1995; Papeschi, 1995; Kasahara et al., 1996; Parise et al., 1996; Bertollo et al., 1997).

Na maioria dos casos os padrões de bandas C são obtidos a partir de cromossomos somáticos, mas avaliações em meiose também têm sido realizadas (Aguiar-Perecin, 1985; Baum, 1991; Fernadéz-Calvín et al., 1995a,b; Wei et al., 1995a, b; Köhler et al., 1996).

Uma forma preliminar de avaliar-se o genoma quanto à aplicabilidade da metodologia de bandamento C é através de avaliações dos núcleos interfásicos. Nestes núcleos, a cromatina apresenta três componentes principais, eucromatina difusa, eucromatina condensada e heterocromatina, sendo que esta pode ser identificada por bandamento C. De acordo com a proporção de eucromatina condensada, os núcleos interfásicos podem ser classificados em reticulados, onde a totalidade ou quase totalidade da cromatina está parcialmente condensada, semi-reticulados, onde a proporção de eucromatina condensada é muito variável e intermediária, e arreticulados,

que não apresentam eucromatina condensada, com os cromocentros bem visíveis (Guerra, 1984).

Por sua vez, os cromocentros têm natureza heterogênea. Os intensamente corados, com contornos nítidos e formato regular geralmente correspondem a blocos de heterocromatina. Cromocentros de menor densidade podem ser constituídos somente pela eucromatina condensada (não corável por bandamento C) ou pela união dos dois tipos de cromatina (Guerra, 1984).

Uma vez que a utilidade da metodologia tem-se mostrado muito grande, elevado é o número de publicações relativas ao assunto. Em *Hevea*, no entanto, não há referências disponíveis a trabalhos que tenham empregado tal técnica de avaliação cromossômica.

2.2. Morfologia Floral de *Hevea*

A seringueira, *Hevea* spp., é uma planta monóica, ou seja, apresenta flores dos dois sexos no mesmo indivíduo, dispostas em inflorescências do tipo ráculo (Bouychou, 1963; Compagnon, 1986; Wycherley, 1992). Na panícula, as flores femininas localizam-se nas extremidades dos eixos primários e secundários e as masculinas ocupam todas as demais posições. As flores apresentam pequenas diferenças clonais quanto à forma, tamanho e coloração mas são, de modo geral, bastante semelhantes. Têm 3,5 a 8,0 mm de comprimento (Bouychou, 1963), coloração variando entre diferentes tonalidades de amarelo, extremidade

afilada e são incompletas devido à ausência de corola. As sépalas é que protegem os aparelhos reprodutores, antes da antese.

A flor masculina possui, no geral, dez estames sésseis, com anteras bilobadas e tetraloculadas, diretamente inseridos no andróforo (órgão em forma de coluna que serve de suporte para os estames), dispostos em dois verticilos de cinco estames. Na flor feminina o ovário é normalmente formado por três carpelos soldados e um estigma sésil (sem pedúnculo). Cada carpelo delimita uma loja que, como regra, contém um único óvulo anátropo¹ ligado por um curto pedúnculo, chamado funículo, à columela (Gonçalves et al., 1983 e 1989; Wycherley, 1992). Entre o ovário e o cálice pode haver, sobre o receptáculo, uma coroa de estaminódios, que são estames abortados (dez segundo Bouychou, 1963). No entanto, tal número de estames residuais parece ser variável.

Apesar dos autores descreverem as flores como unisexuais, evidências de hermafroditismo têm sido obtidas ao longo dos anos. Warmke (1950) estudou as flores supostamente femininas de uma árvore de *H. brasiliensis* e observou que 50% delas eram bissexuais, com um número de um a cinco pequenos e funcionais estames, possuindo grãos de pólen aparentemente normais.

Em outra espécie, *H. collina* (atualmente *H. guianensis* Aubl.), Bouharmont (1960) observou a ocorrência frequente de tais flores bissexuais, mas em *H. brasiliensis* afirmou ser mais rara. Constatou que, no

1- Óvulo anátropo: nele há uma curvatura de 180° de forma que a micrópila fica ao lado do funículo. O saco embrionário não sofre curvatura.

geral, haviam pequenas protuberâncias na base do ovário que, em algumas flores, chegaram a desenvolver-se e formar anteras férteis ou estéreis. Este autor comentou que o monoicismo de *Hevea* deve ser secundário, e que as flores masculinas e femininas teriam se derivado das hermafroditas, por redução de um ou outro órgão reprodutor.

Em outro dos poucos estudos sobre o assunto, Bouychou (1963) afirmou que a ocorrência de flores hermafroditas é rara em *Hevea brasiliensis*. Estudo mais recente mostrou 25,81% de flores hermafroditas em quatro clones de *Hevea brasiliensis* (Cuco, 1992; Cuco & Bandel, 1995).

Ao que tudo indica, a anomalia floral mais comum no gênero é um número diferente de carpelos, geralmente quatro ou cinco, ao invés dos três normais (Bouychou, 1963; Compagnon, 1986; Cuco, 1992; Cuco & Bandel, 1995). Cuco (1992) observou também que nas flores hermafroditas os gametas masculinos se formam antes dos femininos. No entanto, tais alterações estruturais parecem ser normalmente encontradas na natureza, em baixas taxas de ocorrência.

Estudos também têm mostrado a ocorrência, embora rara, de dois óvulos numa mesma loja (Cuco, 1992; Cuco & Bandel, 1995), o que possivelmente explica a ocorrência de poliembrionia em *H. brasiliensis* (Mendes, 1947; Menezes & Nunes, 1959). Mendes (1947) afirma que a taxa de poliembrionia na espécie é muito baixa, da ordem de 0,013%.

Num dos raros estudos de florescimento no gênero, Attanayake & Dharmaratna (1984) observaram que em *H. nitida* a abertura das flores ocorre pela manhã, com pico às 9:00h, e em *H. spruceana* e *H. brasiliensis* a antese ocorre à tarde, com pico entre 12:00 e 15:00h.

A seringueira é tida como uma espécie alógama, polinizada por insetos (Warmke, 1951, 1952; Wycherley, 1992) mas autofecundação também ocorre, em níveis variáveis entre indivíduos do mesmo clone (Bouychou, 1963). Também são conhecidos clones autoincompatíveis e macho-estéreis (Dijkman, 1938; Gonçalves, 1986).

2.3. Emprego da Metodologia de Clareamento

O ovário de uma planta é um órgão de grande importância e bastante complexo. Em geral, é relativamente fácil dissecá-lo e retirar-lhes os óvulos, mas é impossível extrair destes os sacos embrionários, intimamente ligados ao nucelo e aos integumentos interno e externo do óvulo.

Na maioria das espécies vegetais o saco embrionário é composto de oito núcleos: duas sinérgides, a oosfera, os dois núcleos polares (que podem ou não fundirem-se) e três antípodas (que podem ser mais numerosas). Estes núcleos não dispõem-se num mesmo plano dentro do saco embrionário, mas distribuem-se por todo o volume do mesmo. Por esta razão, as técnicas clássicas de seccionamento não permitem uma observação apropriada por destruírem a perspectiva tridimensional. Somente as técnicas de clareamento permitem uma melhor avaliação, uma vez que conferem certa transparência aos tecidos o que possibilita a visualização de todo o órgão, em vários planos.

Com o objetivo de superar estes problemas, Herr Jr. (1971) desenvolveu uma técnica, denominada de “clareamento”, que permitiu o

estudo do desenvolvimento de óvulos de duas espécies não relacionadas, *Cassia abbreviata* e *Ludwigia uruguayensis*. A metodologia emprega como agente clarificante uma mistura de ácido láctico, hidrato de cloral, fenol, óleo de cravo e xilol, nas proporções de 2:2:2:2:1, por peso, que mais tarde tornou-se conhecida como fluido de Herr.

A técnica baseia-se no fato de que quando a luz passa por uma célula a fase da onda de luz é alterada de acordo com o seu índice de refração. A luz que passa por uma parte relativamente dura ou densa da célula, tal como o núcleo, é retardada e, conseqüentemente, sua fase altera-se em relação à luz que passa através de região adjacente mais delgada, no citoplasma. Tanto a microscopia de contraste de fase como a de contraste de interferência exploram os efeitos de interferência produzidos quando estes dois tipos de ondas recombina-se, criando uma imagem da estrutura celular (Alberts et al., 1994).

A técnica descrita por Herr Jr. passou então a ser aplicada em estudos ao nível de óvulos, adaptada às mais diversas espécies. Savidan (1975,1980,1982) utilizou o clareamento de óvulos para estudar apomixia em *Panicum maximum* Jacq.; Souza (1987) utilizou a técnica para detectar a ocorrência de poliembrionia em milho; Pellan-Delourme & Renard (1988) estudaram o sistema de restauração da fertilidade em *Brassica* macho-estéril; Delourme & Eber (1992) aplicaram a técnica em estudos de óvulos de *Colza*; Dumas de Vaultx (1992) em Solanáceas; Merdinoglu (1992) em *Beta* sp; Huyghe (1992) em aspargo, *Arachide*, *Colza*, bananeira, chicória, feijoeiro, tremoço, milho e *Petunia*; Christian et al.(1993) estudaram o desenvolvimento de óvulos e sementes em *Populus* sp (metodologias

descritas em Jahier, 1992). Em mandioca, Ogburia & Adachi (1995, 1996) realizaram análise morfológico-estrutural de sacos embrionários e meiose usando o fluido de Herr modificado.

Uma vez estabelecidos os princípios da técnica, novos protocolos e agentes clarificantes foram sendo descobertos e empregados, como por exemplo, óleo de cedro, usado como agente clarificante no estudo da megasporogênese em *Solanum commersonii* (Parrot & Hanneman Jr., 1988).

Outros pesquisadores utilizaram-se de salicilato de metila como substituto do fluido de Herr. Young et al. (1979) estudaram apomixia em forrageiras; Stelly et al. (1984) observaram óvulos de *Solanum* sp; Mariani et al. (1993) detectaram macrosporogênese anormal em mutantes de alfafa; Huyghe (citado em Jahier, 1992) utilizou-o em estudos em *Solanum* sp, *Arachide* sp e grão de bico; Rubio-Cabetas et al. (1996) avaliaram fertilização e desenvolvimento pós-zigótico em híbridos intra e interespecíficos de *Prunus* sp.

Mais recentemente, NaOH 15% ou uma mistura de glicerol e água 1:1 (Cohen et al., 1996) têm sido empregados com a mesma finalidade.

Nos diversos estudos os espécimes foram observados em microscópio óptico, de contraste de fase ou de contraste de interferência (Nomarski). Em todos os casos, a grande vantagem é a possibilidade de avaliação plano a plano, sem quebra do conjunto.

2.4. Cultivo *in vitro* de *Hevea*

A propagação de *Hevea* por estacas não é recomendada por ser difícil a indução de raízes e porque o sistema radicular obtido das mesmas não garante boa sustentação quando a árvore se desenvolve (Yoon & Leong, 1976). A propagação usando técnicas *in vitro* vem sendo estudada desde a década de 70, como uma forma de reduzir a variabilidade intraclonal das plantações e, com isso, aumentar a produtividade. Vários resultados têm sido obtidos desde então, como será mostrado a seguir.

O cultivo *in vitro* de tecidos de espécies arbóreas esbarra em problemas de desinfecção, de proliferação e de regeneração muito mais sérios que em espécies herbáceas (Thorpe et al., 1991; Harry & Thorpe, 1994). Mas, a multiplicação vegetativa por cultura *in vitro* parece ser ideal para árvores, tanto para propagação como para melhoramento genético, uma vez que os ganhos obtidos em muitas espécies usando-se os métodos convencionais são muito baixos, devido a seus longos ciclos vitais. Em seringueira, os métodos convencionais de melhoramento consomem cerca de 30 anos, desde as polinizações controladas até a recomendação de clones para plantios em larga escala (Gonçalves, 1986).

No entanto, apesar do considerável aumento no número de estudos em espécies arbóreas na década passada, pouco sucesso tem-se conseguido na propagação de árvores adultas selecionadas com propósitos silviculturais (Bajaj, 1989). Mas, é mais otimista o ponto de vista de Carron et al. (1992) que dizem que os problemas encontrados durante o

cultivo *in vitro* da maioria das árvores podem ser causados por condições de cultura inadequadas, com relação às necessidades do material vegetal, uma vez que são determinadas, muitas vezes, empiricamente.

Em seringueira é conhecida a dificuldade de enraizamento de estacas. As primeiras tentativas são de 1878 e somente em 1950 conseguiu-se enraizar estacas de plantas jovens. Todos os ensaios realizados com estacas obtidas de plantas adultas fracassaram. As dificuldades de enraizamento de estacas adultas devem ser interpretadas em termos de uma perda de caracteres juvenis (Carron & Enjalric, 1983). Medrado (1992) considera que devem haver barreiras físicas (barreira de esclerênquima) e químicas (alterações na relação carbono/nitrogênio; desbalanço nutricional) que dificultam o enraizamento de estacas de seringueira.

Tradicionalmente, espécies arbóreas são propagadas vegetativamente por enraizamento de estacas ou de ramos e por enxertia. No entanto, para a maioria das árvores a propagação por estacas é caracterizada por uma rápida perda na capacidade de enraizamento dos rametes (estacas) com o aumento da idade do ortete (planta-mãe).

A multiplicação assexuada de árvores via cultura de tecidos pode ser conseguida de três formas: multiplicação de brotações axilares pré-existent, produção de brotos adventícios (a partir de embriões, cotilédones e outros explantes) e embriogênese somática (Thorpe et al., 1994). As duas primeiras possibilidades levam à formação de plântula via organogênese, pela produção de brotações unipolares que devem ser posteriormente enraizadas por um processo que envolve várias etapas. Já a

embriogênese somática leva à formação de um embrião bipolar, através de etapas semelhantes à embriogênese zigótica. Embriogênese somática permite a rápida propagação de um grande número de plantas mas é mais difícil de ser conseguida que outros métodos de regeneração, especialmente em arbóreas. Por outro lado, são grandes a dificuldade e o tempo necessário para o enraizamento de brotos derivados de brotações adventícias.

No entanto, tais técnicas de propagação assexuada *in vitro* já vêm sendo utilizadas em mais de uma centena de espécies arbóreas (Thorpe et al., 1994), inclusive em seringueira.

Em seringueira também tem sido utilizada cultura *in vitro* de anteras e óvulos, com o objetivo de fornecer genótipos superiores, na forma de linhas puras, para programas de melhoramento. Pelos métodos tradicionais é impossível obter-se linhas puras de espécies arbóreas através de endogamias sucessivas. Entretanto, plantas diplóides homozigotas podem ser obtidas pela regeneração de plantas haplóides por cultura de anteras seguida de duplicação dos cromossomos. Por este procedimento pode-se obter linhas puras de diferentes genótipos que podem ser utilizados como base na produção de híbridos de *Hevea* exibindo heterose (Cheng-Hua et al., 1979; Chen et al., 1982).

Vários são os problemas associados à micropropagação de espécies florestais de maneira geral. Um dos principais é a dificuldade de se manipular *in vitro* explantes excisados de árvores adultas; normalmente, somente obtém-se sucesso com o uso de segmentos de embriões ou plântulas como explantes. Outros problemas observados são liberação de

substâncias e pigmentos no meio de cultura, produção de substâncias voláteis, vitrificação e contaminações. Em seringueira, um problema associado à cultura de haplóides é a variação no número de cromossomos, seja pela tendência à duplicação espontânea ou pela ocorrência de mixoploidia, ou seja, presença de células com números variáveis de cromossomos no mesmo tecido (Chen et al., 1990).

Contaminação é um problema constante, que pode comprometer o desenvolvimento de qualquer técnica *in vitro* (Cassells, 1991). É mais sério em espécies arbóreas e ainda mais em ambientes tropicais, que favorecem a proliferação de microrganismos (Thorpe et al., 1991; Harry & Thorpe, 1994). Este é o caso da seringueira. Os tecidos vegetais são o habitat de grande número de microrganismos que vivem na superfície da planta e que podem ser removidos pelos processos de desinfecção. No entanto, há microrganismos endofíticos inter e intracelulares que escapam dos efeitos da desinfecção superficial. Estes acumulam-se especialmente em culturas perenes, principalmente em áreas de grande diversidade biológica (Cassells, 1991). O uso de antibióticos no meio de cultura tem-se mostrado ineficaz em seringueira e em alguns casos com efeito negativo no desenvolvimento de gemas (Enjalric et al., 1988).

A impossibilidade de se utilizar tecidos maduros como fonte de explantes também é fator determinante no sucesso de qualquer técnica de cultivo *in vitro* (Cassells, 1991), especialmente quando se trata de espécies arbóreas (Thorpe et al., 1991; Thorpe, 1994).

Enjalric et al. (1988) estudaram os efeitos de idade da planta-mãe e local, tempo e tamanho dos órgãos utilizados como explantes na taxa de

contaminação e na eficiência de vários métodos de desinfecção. O ambiente parece ser a principal causa de contaminação, direta ou indireta, em seringueira, pela presença de maior população de microrganismos no ar, água e solo, que a encontrada em regiões temperadas. Além do fator ambiente (já esperado), quanto mais velhos os tecidos excisados, maior é a infecção microbiana. Ápices de 1mm apresentaram melhor taxa de desinfecção (74%) quando comparados com ápices de 6 e 30mm (42% e 21%, respectivamente). Os autores observaram também que NaOCl, H₂O₂ e Desogerme (um detergente) foram ineficazes e que tratamentos drásticos foram letais às plantas e ainda assim vários fungos e bactérias permaneceram. Dezenove microrganismos, entre fungos e bactérias, foram isolados de explantes de seringueira contaminados. Outro aspecto é que a adição de antibiótico ao meio de cultura teve efeito negativo no desenvolvimento de gemas e prevaleceu o efeito bacteriostático sobre o bactericida. Comentam ainda que, além dos contaminantes externos, parece haver fungos e bactérias endofíticos, o que agrava a dificuldade na desinfecção. Os melhores resultados foram obtidos com aplicação regular de solução de antibiótico mais fungicida nas plantas, durante os 15 dias que antecedem o cultivo, utilização de tecidos jovens da planta-mãe e realização de desinfecção intensiva.

Lardet et al. (1990) obtiveram porcentagens de desinfecção variáveis entre 60 e 100%, usando explantes nodais. Confirmaram que a idade da planta-mãe e o estágio morfogênético do broto são fatores limitantes à cultura de ápices.

Há um consenso sobre o efeito negativo da utilização de tecidos maduros para técnicas de cultura *in vitro*, seja ela micropropagação, microenxertia ou embriogênese somática (Carron & Enjalric, 1985; Enjalric et al., 1988; Lardet et al., 1990; Etienne et al., 1993 a e b; Perrin et al., 1994). Para embriogênese somática normalmente têm sido usados como explantes segmentos do tegumento interno de sementes imaturas (Enjalric & Carron, 1982; Michaux-Ferrière & Carron, 1989; Auboiron et al., 1990; El Hadrami et al., 1991; Etienne et al., 1991; Carron et al., 1992, 1995; Housti et al., 1992; Michaux-Ferrière et al., 1992; Montoro et al., 1994; Veisseire et al., 1994).

Em seringueira a dificuldade de enraizamento *in vivo* é confirmada *in vitro*. Não se consegue enraizamento de material vegetal maduro. A perda da capacidade rizogênica deve-se a uma redução nos teores de AIA (ácido indolacético) e aumento no de ABA (ácido abscísico). Então, a razão AIA/ABA (um marcador fisiológico de juvenildade) pode ser usado como um marcador da reatividade dos ápices de *Hevea in vitro* (Lardet et al., 1990; Seneviratne et al., 1993; Perrin et al., 1994).

Há controvérsias quanto aos efeitos do fornecimento exógeno de hormônios vegetais para indução de enraizamento *in vitro*. Em alguns estudos foi negativo o efeito de aplicação de auxinas e citocininas (Lardet et al., 1990; El Hadrami et al., 1991; Etienne et al., 1994). Outros obtiveram resultados positivos com suas utilizações em baixas concentrações (Seneviratne & Flegmann, 1996) ou em curto intervalo de fornecimento (Enjalric & Carron, 1982; Seneviratne & Wijesekara, 1994).

Entretanto, ao que tudo indica, o efeito de tais substâncias depende do tipo de tecido vegetal excisado e do estágio de desenvolvimento do mesmo. Brotações jovens, por exemplo, parecem produzir quantidades suficientes de fitormônios e fornecimento exógeno pode ter efeito inibidor de raízes.

A maioria dos estudos sobre cultivo *in vitro* em seringueira está relacionada à embriogênese somática e foi a partir da análise destes trabalhos que foram determinadas as condições experimentais do presente estudo.

Pela literatura observou-se que a utilização de ágar como agente gelificante pode causar necrose, devido à sua composição irregular e presença de substâncias inibitórias (não identificadas). Gelrite parece ser a melhor opção de suporte para a seringueira, especialmente com baixas concentrações hormonais (Carron et al., 1992, 1995; El Hadrami et al., 1993). Visando reduzir a incidência de necrose têm sido avaliados os efeitos de cultura em meio líquido. No entanto, tal método tem resultado na produção de grande número de células poliplóides (Wilson & Street, 1975; Wilson et al., 1976). Mais recentemente, observou-se que imersão temporária em meio líquido, durante alguns minutos por semana, tem-se mostrado melhor (Teisson et al., 1994 e 1995).

As poliaminas (putrescina, espermidina e espermina) têm um importante papel na proliferação e diferenciação celulares e, portanto, podem determinar o sucesso da embriogênese somática (El Hadrami et al., 1989b). Os clones embriogênicos de *Hevea* são mais ricos em poliaminas, especialmente durante a fase de embriogênese ou pré-embriogênese (El Hadrami et al., 1989a). Calos embriogênicos também têm alto teor de

poliaminas (Carron et al., 1992). Gelrite, o melhor agente gelificante para a seringueira, também possui maior teor de poliaminas (El Hadrami et al., 1993).

Vários estudos têm mostrado que os níveis endógenos de AIA e ABA têm um papel importante no controle da capacidade embriogênica de explantes ou células cultivadas. Os dados têm mostrado que o importante é a interação e um balanço de todos os reguladores de crescimento para o controle do desenvolvimento e diferenciação de embriões. Desbalanço na relação auxina/citocinina leva a uma redução na atividade meristemática (Etienne et al., 1993 a; Montoro et al., 1994; Veisseire et al., 1994). Baixos teores de ABA parecem estar associados a várias anomalias observadas em embriões somáticos (Michaux-Ferrière et al., 1992; Etienne et al., 1993b). Por outro lado, fornecimento de auxinas e citocininas em excesso ou por tempo prolongado inibe a capacidade embriogênica dos calos (El Hadrami et al., 1991). Adição adequada de ácido abscísico ao meio aumenta a capacidade de germinação e conversão de embriões em plantas (Etienne et al., 1991 e 1993c) e também o número de calos embriogênicos e prolonga o período de atividade embriogênica (Etienne et al., 1994).

Estudos no ambiente de cultivo têm mostrado que o acúmulo de etileno, assim como baixos teores de oxigênio (2%) afetam negativamente a embriogênese e que, idealmente, a umidade deve estar entre 92 e 97% (Auboiron et al., 1990; Grapin et al., 1994. Jourdan et al., 1994). Além disso, renovação do meio em intervalos de 15 - 30 dias, dependendo do

clone e estágio fisiológico do explante, melhora a capacidade embriogênica (Michaux-Ferrière & Carron, 1989).

O meio MS (Murashige & Skoog, 1962) é o mais frequentemente utilizado em cultura de tecidos de culturas perenes (Mohammed & Vidaver, 1988; Chen & Evans, 1990; Chen et al., 1990). Em seringueira vem sendo amplamente utilizado, seja na sua fórmula original ou modificada de acordo com os objetivos (Chen, 1984; Chen et al., 1990).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais Biológicos

3.1.1. Flores

Os botões florais de seringueira utilizados no presente estudo foram coletados de árvores adultas (plantadas em 1984), dos clones RRIM 527, RRIM 600 e GT 1, em áreas do Departamento de Agricultura da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), em Piracicaba. Nesta localidade, o florescimento da seringueira ocorre entre os meses de agosto e outubro, com pico em setembro. Foram selecionadas as plantas das bordas dos blocos, justamente por receberem maior insolação. No geral, os botões florais foram coletados em dias quentes, com alta luminosidade, entre 9 e 15 horas, nos anos de 1992 a 1996.

Para o estudo da macrosporogênese a coleta foi realizada de forma planejada. Andaimas foram montados de modo a permitirem o acesso aos galhos mais altos. A coleta estendeu-se por nove dias, durante o pico de

florescimento, em setembro de 1994, inicialmente a cada duas horas e, posteriormente, duas vezes ao dia. O esquema de coletas pode ser visualizado no Quadro 1.

Quadro 1 - Cronograma de coleta de flores de seringueira no ano de 1994, na ESALQ/USP, em Piracicaba/SP, para o estudo da macrosporogênese.

Número de dias	Horários de coleta (horas do dia)
2	8-10-12-14-16
1	9-11-13-15
2	10-15
1	9-11-15
3	10-15

Foram coletados botões florais em estágio inicial de desenvolvimento, fase apropriada para análises meióticas conforme estabelecido em estudo anterior (Cuco, 1992; Cuco & Bandel, 1995). Imediatamente após a coleta, as flores foram colocadas em fixador Carnoy (3 etanol : 1 ácido acético glacial), onde permaneceram por 24 horas, e, posteriormente, conservadas em etanol 70%, sob refrigeração.

3.1.2. Raízes

Várias estratégias de coletas de raízes foram adotadas, na intenção de viabilizar o estudo cromossômico.

3.1.2.1. Raízes de Sementes

Sementes dos clones RRIM 527, RRIM 600 e GT 1 foram coletadas do solo nos plantios da ESALQ, em Piracicaba, nos meses de março-abril, nos anos de 1995, 1996 e 1997. Logo após a obtenção foram postas a germinar em bandejas com substrato composto de vermiculita, palha de arroz e matéria orgânica vegetal, em telado do Departamento de Genética da ESALQ.

As raízes foram coletadas à medida em que germinavam, com comprimento de cerca de um centímetro. Imediatamente foram colocadas em substâncias de pré-tratamento (Quadros 2, 3 e 4), que visaram a otimização da morfologia cromossômica, fixadas em etanol-acético 3:1 por 24 horas e conservadas em etanol 70% ou no próprio fixador, em refrigeradores, onde conservam-se por vários meses.

3.1.2.2. Raízes Obtidas em Meio Líquido

Com o objetivo de se obter uma maior quantidade de raízes, uma vez que o período de disponibilidade de sementes de seringueira é muito

restrito, procederam-se vários testes de enraizamento de plantas jovens com seis e 18 meses de idade em meio líquido. A metodologia está descrita no item 3.2.5.

3.1.2.3. Raízes de Cultivo *in vitro*

Para os testes de enraizamento *in vitro* foram utilizados três tipos de ápices caulinares como explantes (ver descrição detalhada no item 3.2.5.):

- ápices caulinares de plantas de viveiro da ESALQ, em ramos de um ano e meio a dois anos e meio com seis a oito lançamentos foliares
- ápices caulinares dos cavalos usados para enraizamento em meio líquido, com seis e 18 meses de idade
- ápices das plântulas das sementes germinadas como no item 3.1.2.1

Os protocolos de estabelecimento dos ápices foliares *in vitro* estão descritos no próximo tópico.

3.2. Métodos

3.2.1. Clareamento de Óvulos

Para o estudo da macrosporogênese os botões florais foram coletados e tratados como explicado no item 3.1.1. a seguir os óvulos foram

cuidadosamente extraídos dos ovários com o auxílio de lupa e então foram testadas várias metodologias de clareamento, empregando diferentes agentes clarificantes como fluido de Herr (Herr Jr., 1971), óleo de cedro (Parrott & Hanneman Jr, 1988) e salicilato de metila após reação de Feulgen. Entretanto, os melhores resultados foram obtidos a partir de uma adaptação da técnica de Jahier (1992), descrita a seguir.

Hidratação: os óvulos armazenados em etanol 70% passaram por uma série

etanol-água, assim:

etanol 50% - 15 minutos

etanol 25% - 15 minutos

água destilada - 15 minutos (duas vezes)

água destilada - 18 a 24 horas

Coloração: hematoxilina de Mayer - 5 horas

Descoloração: ácido acético glacial 2% - 16 a 18 horas

Lavagem: água destilada - 24 horas

Desidratação: série de etanol 25%, 50%, 70%, 95%, 100% - 15 minutos

cada

etanol 100% - duas a quatro horas

Clareamento: etanol 2 : 1 salicilato de metila - 15 minutos

etanol 1 : 2 salicilato de metila - 15 minutos

salicilato de metila puro - 15 minutos (três vezes)

Todas as trocas de soluções foram realizadas com o auxílio de pipetas Pasteur, devido ao reduzido tamanho dos óvulos. Após os tratamentos, os óvulos foram mantidos em salicilato de metila (onde podem permanecer por tempo indeterminado) pois, além de clarificante, tem ação conservante.

Os óvulos clareados foram então colocados em uma lâmina escavada contendo uma gota de salicilato, cobertos com lamínula de forma a serem tocados levemente por ela, e observados em microscópio de contraste de fase, em objetiva de 40X.

As fotomicrografias foram obtidas utilizando-se Fotomicroscópio Nikon - TMS e filme Kodak T-max de ISO 100.

3.2.2. Avaliação de hermafroditismo

Para as análises, as flores previamente coletadas e fixadas foram dissecadas em lupa (imersas em etanol 70%). As avaliações foram realizadas em aumento de 160 vezes, em lupa.

Para os estudos em microscopia eletrônica de varredura as flores armazenadas em etanol 70% foram então desidratadas através de passagem por série de acetona a 30%, 50%, 70%, 95%, 100% (três vezes), durante 10 minutos em cada diluição. A seguir foi realizada secagem ao ponto crítico

(em equipamento Balzers - CPD 030), montagem em porta-espécimes apropriados, usando-se fita de filme de carbono dupla face e metalização com ouro por tempos variando de 180 a 260 segundos (em equipamento Balzers - MED 010).

As fotomicrografias foram obtidas em Microscópio Eletrônico de Varredura Zeiss DSM 940A, usando-se os filmes Ilford FP4 plus 120 ou Fuji Neopan SS 120.

3.2.3. Caracterização Cromossômica

Raízes obtidas de sementes dos clones RRIM 527, RRIM 600 e GT 1, nos anos de 1995, 1996 e 1997, foram pré-tratadas com substâncias inibidoras do fuso mitótico (colchicina e 8-hidroxiquinolina-8HQ) ou inibidora de síntese proteica (cicloheximida). Os Quadros 2 a 4 mostram os ensaios de coletas de raízes, nos três anos.

Quadro 2 - Ensaio de obtenção de raízes para os estudos citológicos de seringueira no ano de 1995, em Piracicaba/SP

Número de sementes postas a germinar	RRIM 527	RRIM 600	GT1	Total
	847	950	981	2778
Agente de pré-tratamento	8-hidroxiquinolina (8HQ) 0,03%			
Tempos de Aplicação (horas)	2:00, 2:30, 3:00, 3:30, 4:00, 4:30 e 5:00			
Horários de coleta	9:00 às 15:00			
% de germinação	RRIM 527	RRIM 600	GT1	Total
	48,06	56,4	60,51	55,66

Quadro 3 - Ensaio de obtenção de raízes de seringueira no ano de 1996, em Piracicaba

Número de sementes postas a germinar	RRIM 527	RRIM 600	GT1	Ilegítimas	Total
	372	392	472	351	1587
Agentes de pré-tratamento	8-hidroxiquinolina 0,03% (8HQ) colchicina 0,05% (C) colchicina 0,01% cicloheximida 90ppm cicloheximida 140ppm (Ci) 8HQ + 10% de C 8HQ + Ci (1:1)				
Tempos de Aplicação (horas)	2:30, 3:00, 3:30, 4:00, 4:30 e 5:00				
Horários de Coleta	9:00 às 16:00				
% de Germinação	RRIM 527	RRIM 600	GT1	Total	
	7,26	3,06	10,59	7,20	

Obs.: Este foi um ano atípico; fortes chuvas na época de maturação de frutos retardaram o processo. Com isso as sementes tiveram quantidade, qualidade e poder germinativo reduzidos.

Quadro 4 - Ensaio de obtenção de raízes de seringueira no ano de 1997, em Piracicaba

Sementes postas a germinar	RRIM 527	RRIM 600	GT1	Total
	588	278	377	1243
Agentes de pré-tratamento e tempos de exposição (horas)	8-hidroxiquinolina - 2:30 cicloheximida 140ppm - 2:00 e 2:30 colchicina 0,05% - 2:30			
Horários de Coletas	11:00 às 18:00			
% de Germinação	RRIM 527	RRIM 600	GT1	Total
	33,84	14,39	41,91	31,94

Obs.: novamente a qualidade e a quantidade de sementes produzidas foi baixa

No primeiro ano foram testados horário de coleta das raízes e tempo de tratamento com 8-HQ a 0,03%, em sementes germinadas em telado e casa de vegetação, como pode ser visto no Quadro 2.

No segundo ano foram avaliados sete diferentes pré-tratamentos, 8-HQ 0,03%, colchicina 0,01% e 0,05%, cicloheximida a 90 e 140ppm, 8-HQ + colchicina (10%) e 8-HQ + cicloheximida 140ppm (1:1), em tempos (em horas) de 2:30, 3:00, 3:30, 4:00, 4:30 e 5:00 (Quadro 3). A ação destes produtos químicos, isolada ou conjuntamente, foi avaliada por Silvarolla (1994).

No terceiro ano o tempo de permanência nos agentes de pré-tratamentos foi fixado em 2:30 (horas) e testados 8-HQ, colchicina 0,05% e cicloheximida 140ppm, responsáveis pelos melhores resultados em anos anteriores (Quadro 4).

Para a confecção das lâminas as raízes pré-tratadas e fixadas foram hidrolisadas em HCl 1N a 60°C por 12 minutos, lavadas em água destilada (várias trocas), coradas com reativo de Schiff por 45 minutos e esmagadas em um gota de carmim acético a 2%. Nas lâminas aproveitadas procedeu-se a descolagem das lamínulas, por imersão em ácido acético 45% ou em nitrogênio líquido. Após secagem foram então feitas montagens permanentes pela aplicação de bálsamo do Canadá. Muitas metáfases assim obtidas foram avaliadas.

As fotomicrografias foram realizadas em Fotomicroscópio Olympus BH-2, com optovar de 1,25, filtro verde Olympus e utilizando-se o filme AGFA Copex pan, de ISO 32.

As medidas cromossômicas nas ampliações fotográficas foram determinadas com auxílio de compasso de pontas secas e papel milimetrado (limite de 0,5mm).

3.2.4. Bandamento C

As raízes, coletadas e pré-tratadas como descrito no item 3.2.3, foram fixadas em fixador Carnoy e mantidas em etanol-acético 3:1, em refrigeradores.

Várias metodologias e modificações foram testadas com base em estudos realizados nas mais diversas espécies vegetais: Tanaka & Taniguchi (1975); Aguiar-Perecin (1985); [Bernard & Bernard, 1992; Robin & Yakovlev, 1992; Seal, 1992, Devaulx, 1992 (In: Jahier, 1992)].

Antes do esmagamento, as raízes receberam tratamento ácido com HCl 0,2N ou 1N, por tempos variando de um a 60 minutos ou ácido acético 45% por cinco minutos a 24 horas. Tentou-se também tratamento ácido nas lâminas, após o esmagamento (Quadro 5).

Os meristemas radiculares foram esmagados sobre lâmina com uma gota de ácido acético 45% e cobertos com lamínulas. A quantidade e qualidade das divisões mitóticas foram então avaliadas em microscópio de contraste de fase. Nas preparações selecionadas, lâminas e lamínulas foram separadas pela imersão em nitrogênio líquido.

Quadro 5 - Tipos de tratamento ácido realizados nas raízes dos clones de seringueira RRIM 527, RRIM 600 e GT 1 e/ou nas lâminas após esmagamento das mesmas, para bandamento C.

Tipos	Tratamento	Tempo de imersão	Material tratado	Temperatura (°C)
1	aac. 45%*	15 minutos	lâminas	TA**, 37, 60
2	aac. 45%	5 min. a 24 horas	raízes	TA
3	HCl 0,2N	05 minutos	lâminas	60
4	HCl 0,2N	5 a 60 minutos	raízes	TA
5	HCl 1N	05 minutos	raízes	TA, 60
6	aac. 45% + HCl 0,2N	5 min. a 24 horas + 5 a 10 minutos	raízes + lâminas	TA TA
7	aac. 45% + HCl 0,2N + (ou não) aac. 45%	5 min. a 24 horas + 5 min. a 60 min. + 15 minutos	raízes raízes lâminas	TA TA TA
8	HCl 0,2N + aac 45% + (ou não) aac. 45%	5 a 60 minutos + 5 a 10 minutos + 15 minutos	raízes + raízes + lâminas	TA TA TA
9	HCl 1N 2 : 1 aac.45%	10 a 30 segundos	raízes	60

* ácido acético 45%

** temperatura ambiente

A desidratação das lâminas era feita a seguir, ao ar e posteriormente em etanol absoluto, por uma noite, no mínimo. Depois de secas, as lâminas eram imersas em solução de hidróxido de bário em concentrações variando de 1,5 a 8%, durante os tempos de 10 a 60 minutos, às temperaturas de 37°C, 60°C ou ambiente (Quadro 6). Foram testadas todas as combinações possíveis dos tratamentos listados nos Quadros 5 e 6, ou seja, todos os tipos de tratamento ácido de raízes e/ou lâminas foram combinados com todos os diferentes tratamentos desnaturantes. Após lavagem abundante com água destilada e desmineralizada eram incubadas em solução salina 2X SSC, a

60°C por 60 ou 120 minutos. Após nova lavagem com água desmineralizada, foi testada passagem por série alcoólica (etanol 70%, 95% e absoluto) ou sua omissão e subsequente coloração com solução de Giemsa a 1% e 2%, usando-se o corante Gurr R66 e tampão Gurr pH 7,0 (BDH) em tempos variáveis de um a 50 minutos.

As preparações selecionadas foram fotomicrografadas em microscópio Olympus BH-2, usando-se filtro verde Olympus e o filme AGFA Copex pan ISO 32.

Quadro 6 - Variações em concentração, tempo e temperatura de desnaturação com hidróxido de bário testadas para bandamento C

Tipo	Concentração	Tempo (minutos)	Temperatura (°C)
1	1,5%	25	TA*
2	1,5%	25	37
3	1,5%	35	37
4	1,5%	10	60
5	1,5%	60	TA
6	1,5%	60	37
7	2,0%	25	TA
8 **	2,0%	25	37
9	2,0%	30	37
10	2,0%	35	37
11	3,0%	25	TA
12	3,0%	25	37
13	3,0%	30	37
14	3,0%	10	60
15	3,0%	20	60
16	3,0%	30	60
17	5,0%	30	60
18	8,0%	05	50

* Temperatura ambiente

** Melhor tratamento

3.2.5. Enraizamento em Meio Líquido

Com o objetivo de se obter raízes em outras épocas que não a de produção de sementes, vários testes de enraizamento de plantas jovens em meio líquido foram conduzidos, nos meses de outubro de 1996 a março de 1997. Ao todo foram 12 testes, realizados com plantas de seis meses (três testes) e 18 meses de idade (nove testes), originadas de sementes ilegítimas obtidas de uma população do clone RRIM 527.

Para tanto, plantas com estas idades foram tomadas do jardim clonal do Departamento de Agricultura da ESALQ. Os testes envolveram três tipos de meio líquido, tratados com hipoclorito de sódio comercial (2% a 2,5%) na concentração de duas gotas por litro, a saber:

- solução nutritiva de Sarruge (Sarruge, 1975). Apêndice 1.
- solução nutritiva de Sarruge complementada com ácido naftaleno acético (NAA) a 0,01%, usando-se o produto comercial NAFUSAKU 20%
- água somente
- água mais NAA 0,01%

Os cavalos pertenciam ao Jardim Clonal do Departamento de Agricultura da ESALQ. Os de seis meses estavam plantados em sacos de polietileno, em ripado, de onde foram retirados, feita toaleta nas raízes e a seguir foram colocados nas soluções. Os de 18 meses foram primeiramente submetidos a recepagem a aproximadamente 50 centímetros do solo, para

indução de brotações, e mantidos no campo. Na região da recepagem foi aplicada fina camada de tinta para evitar perdas de água. Cerca de 20 dias depois, quando do início das brotações, as plantas eram então arrancadas do solo com cerca de 20 centímetros de raiz pivotante e, após toalete das raízes laterais, foram colocadas nas soluções para enraizamento.

Como suporte para as plantas foram utilizadas caixas plásticas com capacidade de 40 litros, pintadas externamente de preto. Para garantir uma boa aeração dos líquidos foram instalados compressores de ar em todas as caixas, para um borbulhamento contínuo.

3.2.6. Enraizamento *in vitro*

Na tentativa de ampliar-se a época de disponibilidade de raízes para as análises, foram realizados ensaios de estabelecimento e enraizamento de ápices caulinares *in vitro*. Ao todo foram 36 testes, assim distribuídos quanto ao tipo de explantes:

- ápices das plântulas das sementes recém-germinadas - 14 testes
- ápices das plantas mantidas em meio líquido - 07 testes
- ápices de ramos de 1,5 a 2,5 anos do viveiro - 15 testes

Desinfecção

Várias alternativas de desinfecção foram avaliadas, a saber: diferentes tempos de imersão (um a cinco minutos) em etanol a diferentes

concentrações (70%, 95% e absoluto), em solução de hipoclorito de sódio a 0,04%, 1,0%, 1,5%, 2,0%, 2,5%, de alguns segundos até 15 minutos e até mesmo sob vácuo de 5 atmosferas por três minutos. Também foram testadas pulverizações com fungicidas oito dias e/ou 24 horas antes da coleta dos brotos, ou mesmo banhos antes da inoculação em meio de cultura, usando-se Benlate ou Dithane (30mg/100ml).

No entanto, os melhores resultados utilizaram o seguinte processo de desinfecção:

- toaleta nos brotos para retirada total das folhas e colocação em água
- lavagem cuidadosa com detergente comercial e escova
- três lavagens com detergente comercial
- uma hora em água corrente
- três lavagens com água destilada
- etanol 70% - um minuto
- três lavagens em água destilada
- hipoclorito de sódio (1-1,5%) + Movadol (0,1ml/100ml) + Tween (2gotas/100ml) - 10 minutos
- cinco lavagens com água esterilizada, em câmara de fluxo contínuo
- inoculação em meio de cultura

Meios de Cultura

Os meios de cultura avaliados foram:

- MS, MS/2 e MS/4¹ com 60g/l de sacarose e 1 μ M de Benziladenina (BA)

- MS/4 + Benlate (40µg/ml) + IBA (ácido indol butílico) - 0,4ml/l + 20g/l de sacarose
- MS/4 + IBA 0,4ml/l + Dithane 4mg/100ml + sacarose 20g/l
- MS/4 com sacarose 5g/l + Dithane + IBA 0,4ml/l
- MS/4 com sacarose 5g/l + Dithane (sem IBA)
- Ágar-água 7 dias, depois MS/2 com Dithane e sem IBA
- MS/2 + IBA (1mg/l) + Dithane
- MS/2 + IBA 0,4mg/l + Dithane

Como agente gelificante utilizou-se ágar para MS/4 e Phytigel (Sigma) para MS/2, ambos a 2g/l.

Após inoculação em meio de cultura os explantes permaneceram em sala climatizada a $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$, sob fotoperíodo de 13 horas de luz.

1 - MS: Meio Murashige e Skoog (1962) - Apêndice 2
MS/2 e MS/4: metade e $\frac{1}{4}$ das concentrações de MS (exceto para sacarose, que variou de acordo com o descrito no texto).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização dos Cromossomos Somáticos

Avaliações realizadas em numerosas pontas de raízes tratadas de diversas formas (Quadros 2, 3 e 4, item 3.2.3.) mostraram que, a cada ano, as respostas dos tecidos vegetais aos agentes de pré-tratamento e/ou tempos de aplicação dos mesmos foram variáveis. No primeiro ano, 1995 (Quadro 2), testaram-se tempos de tratamento com solução de 8-hidroxiquinolina (8HQ) e horários de coleta. Os melhores resultados foram obtidos com os meristemas que haviam sido pré-tratados com 8HQ 0,03% por duas horas e 30 minutos e não observou-se diferença relacionada ao horário de coleta. Com duas horas de tratamento os cromossomos apresentaram-se ainda distendidos, normalmente em pró-metáfase; acima de três horas de imersão o grau de contração foi elevado. Nestes dois casos ficou difícil avaliar a morfologia cromossômica.

No segundo ensaio (1996) de enraizamento de sementes (Quadro 3) testaram-se agentes de pré-tratamento, tempos de aplicação e horários de

coleta. Desta vez, 8HQ não mostrou-se adequada e as melhores lâminas foram obtidas com raízes tratadas com cicloheximida 140ppm, por três a quatro horas, o que garantiu melhor visualização da morfologia e bom espalhamento dos cromossomos. É um tempo relativamente longo para esta concentração do agente inibidor de síntese proteica mas garantiu um bom espalhamento dos cromossomos na célula. O grau de compactação foi um pouco maior em relação ao obtido com o uso de 8HQ mas foram observadas muitas células com cromossomos com ótima morfologia para estudos citológicos. Com este tratamento o número de células em prófase ou pró-metáfase aumentou.

No terceiro ciclo (1997) de coleta de raízes (Quadro 4) utilizaram-se somente três agentes de pré-tratamento, com tempos fixos de aplicação e coleta nos horários mais quentes do dia. Cicloheximida deixou de ser adequada, por tornar os cromossomos altamente contraídos e com espalhamento ruim, mesmo com menores tempos de aplicação. A 8HQ voltou a ser a melhor alternativa para avaliação da morfologia cromossômica, quando utilizada durante 2:30h. Quanto aos demais tratamentos, colchicina não garantiu bom espalhamento e cicloheximida contraiu demais os cromossomos.

As alterações observadas na morfologia cromossômica explicam-se parcialmente pelo tipo de ação dos agentes de pré-tratamento. A cicloheximida penetra rapidamente nas células meristemáticas, impedindo que as células em metáfase continuem o ciclo mitótico. Causa a contração dos cromossomos em prófase e em metáfase e resulta numa supercontração

dos mesmos. A 8-hidroxiquinolina inibe o fuso mitótico, mantendo as células em metáfase. Contrai somente os cromossomos metafásicos e mantém a morfologia dos mesmos (Tlaskal, 1980).

As avaliações realizadas em grande número de células de muitos meristemas radiculares mostraram que, nos três clones estudados, os cromossomos apresentaram compactação variável, o que impediu uma padronização que possibilitasse a determinação dos cariótipos, nos moldes convencionais. Não raro, numa mesma célula metafásica pôde-se notar cromossomos com maior e menor grau de compactação. Um exemplo disto pode ser visto na Figura 1. A comparação entre células tornou o fato ainda

Figura 1 - Célula meristemática do clone GT 1 com cromossomos com graus diferentes de contração (setas). A barra representa 3 μm .

mais evidente. Nem mesmo o exame de muitas células e a aplicação de todos os tratamentos citados (Quadros 2, 3 e 4) permitiram uma homogeneidade na morfologia cromossômica. Não raro, observaram-se alterações que modificaram a classificação dos cromossomos, impossibilitando a determinação dos cariótipos. Um exemplo disto é apresentado no Apêndice 3, que mostra os comprimentos absolutos (em micrômetros) e a relação de braços ($RB = \text{braço longo}/\text{braço curto}$) de dez conjuntos cromossômicos completos. Nota-se que nem mesmo a classificação do cromossomo satelitado é constante (quando este é identificável). Não parece ser função somente dos tratamentos usados uma vez que o efeito dos mesmos afeta o grau de contração como um todo, mas espera-se a mesma relação de braços para os mesmos cromossomos em diferentes células.

Na tabela do Apêndice 3 nota-se que nem sempre são visíveis as constrições secundárias e satélites, como nas células 2, 3, 4, 8 e 10; em outras células somente em um dos homólogos o satélite é visualizado (7 e 9); mesmo quando dois satélites são observados, a classificação do cromossomo é alterada (células 1, 5 e 6). Foi comum o fato de em algumas células não ser possível nem mesmo a identificação do centrômero. O número de cromossomos deste tipo também variou de célula para célula. A diferença de tamanho entre o maior e o menor cromossomo número 36 (do Apêndice 3) foi de $0,42\mu\text{m}$ (células 7 e 8, respectivamente), que representa 66,72% e 40% dos tamanhos médios dos conjuntos cromossômicos das células 8 e 7, respectivamente. De modo semelhante, a diferença de tamanho entre o maior (célula 3) e o menor (célula 6) cromossomo número 1 foi de $0,53\mu\text{m}$, o que corresponde a 33,7 e 38,69% do comprimento cromossômico médio destas

duas células, respectivamente. O tamanho médio (geral) para os cromossomos destas dez células foi determinado como sendo $1,38\mu\text{m}$.

Estudos citológicos em seringueira têm alguns fatores complicantes. Primeiro, a disponibilidade de raízes somente uma vez ao ano, em curtos intervalos de tempo (agosto-setembro), obtidas de sementes recalcitrantes cujo armazenamento por mais de 30 dias é inviável. Além disso, o látex está presente em todas as partes da planta, até mesmo nas raízes. Talvez este látex, que flui em feixes de vasos laticíferos que circundam a raiz periféricamente, aja como uma barreira (embora parcial) contra a passagem do líquido de pré-tratamento, o que pode colaborar para a desuniformidade de resposta das células entre meristemas. E também, os cromossomos da espécie são pequenos (média de $1,38\mu\text{m}$) e, por isso, qualquer alteração na morfologia ou pequenos erros nas medições são muito mais significativos que em cromossomos comparativamente maiores.

A dificuldade de realizar-se estudos citológicos em seringueira é confirmada pela quase inexistência de trabalhos sobre o assunto na literatura internacional. Nas poucas referências encontradas as dificuldades ficam claras (Majunder, 1964; Ong, 1975; Cuco, 1992).

Tendo em vista os aspectos mencionados, não foi possível a confecção dos cariótipos nos moldes formais. Assim, a Figura 2 mostra os cromossomos somáticos ($2n=36$) do clone GT 1 de *H. brasiliensis* e o seu respectivo cariótipo. As medidas cromossômicas desta célula estão na primeira coluna do Apêndice 3.

Observou-se também que para o clone GT 1 obteve-se melhor morfologia cromossômica. Os clones RRIM 600 e RRIM 527 reagiram

diferentemente aos mesmos tratamentos e seus cromossomos mostraram-se ainda menores, mais contraídos e com compactação mais variável, para as mesmas condições experimentais. A Figura 3 exemplifica o fato. Nestes dois casos a realização de medições foi mais difícil em razão das maiores disparidades morfológicas observadas.

Figura 2 - Cromossomos metafásicos (a) de meristema radicular do clone GT 1, de raiz tratada com 8-hidroxiquinolina e seu respectivo cariótipo (b). As barras correspondem a 3 μ m.

Figura 3 - Cromossomos metafásicos de ponta de raiz dos clones GT 1 (a), RRIM 527 (b) e RRIM 600 (c), tratadas com cicloheximida por 3 e 4 horas e 8-hidroxi-quinolina por 2 horas e 30 minutos, respectivamente. As setas mostram os cromossomos satelitados. As barras correspondem a 3 μ m.

4.2. Bandamento C

Dentre as várias metodologias para bandamento C testadas (Quadros 5 e 6), a que resultou em melhores marcações será descrita a seguir. Após pré-tratamento com 8HQ durante 2:30 as raízes foram fixadas e mantidas em etanol-acético 3 : 1. Para a confecção das lâminas as raízes foram então incubadas em ácido acético 45% por 5 minutos e esmagadas em uma gota do mesmo. Após seleção, lâminas e lamínulas foram separadas por imersão em nitrogênio líquido, secas ao ar e deixadas em etanol absoluto durante uma noite, no mínimo. A seguir, foram secas ao ar e imersas em hidróxido de bário diluído a 2% durante 25 minutos a 37°C. Após cuidadosa lavagem com água destilada e desmineralizada foram deixadas em solução salina 2XSSC (solução de cloreto e citrato de sódio) por 60 minutos a 60°C, seguida de novas lavagens em água desmineralizada e desidratação em série alcoólica (etanol 70%, 95% e 100%). A coloração foi realizada por imersão, durante dois a três minutos, geralmente, em solução de Giemsa a 1% em tampão pH 6,8, após o que foram secas ao ar e montadas preparações permanentes por aplicação de bálsamo do Canadá.

Apesar de várias técnicas de bandamento C terem sido aplicadas aos três clones de *Hevea*, novamente não se obteve um padrão comum a qualquer célula. Observaram-se marcações isoladas em algumas células, até mesmo de um único meristema. Tratamento desnaturante brando com hidróxido de bário, como os tipos 1, 2, 3 e 4 do Quadro 6, precedido ou não por incubação em ácidos (HCl 0,2N e ácido acético 45%), não conseguiu extrair a eucromatina e evidenciar a heterocromatina e, como resultado, os

cromossomos apareceram todos fortemente corados como mostra a Figura 4. Por outro lado, desnaturação drástica, como os tipos 15, 16 e 17 do Quadro 6, causou sérias distorções na morfologia cromossômica, descaracterizando-os, embora algumas marcações tenham sido visíveis (Figura 4). Tratamentos moderados mostraram desnaturação irregular e conseguiram marcar somente um ou outro cromossomo, em algumas células (Figura 5).

Mesmo com os melhores tratamentos, que conseguiram extrair a eucromatina e evidenciar as bandas C, os resultados não foram homogêneos, ou seja, as marcações foram eventuais e não generalizadas por todas as células do mesmo meristema ou de outro com tratamento idêntico.

Figura 4 - Pró-metáfases com os $2n=36$ cromossomos, após tratamento brando (esquerda) ou forte (direita). A barra corresponde a $3,5\mu\text{m}$.

Figura 5 - Cromossomos com algumas marcações leves (setas), após tratamento moderado. A barra corresponde a 3,5 μ m.

Em todos os casos, as marcações apareceram como grandes blocos intersticiais, em número reduzido, variável de um a seis.

Avaliações prévias de núcleos interfásicos levaram à suposição da existência de bandas C. Segundo a classificação amplamente utilizada para núcleos interfásicos (Guerra, 1984), os de *Hevea* são arreticulados, ou seja, não apresentam eucromatina condensada e os cromocentros são bem distintos. No presente caso, a maioria dos cromocentros apresentam menor densidade (e são, portanto, negativos para bandas C) mas há alguns de densidade mais alta e formato mais regular, provavelmente de origem heterocromática e, portanto, coráveis por esta técnica de bandamento (Figura

6). Ainda assim, o número de tais cromocentros mostrou-se variável entre diferentes núcleos, como pode-se observar na Figura 6.

Figura 6 - Núcleos interfásicos do clone RRIM 527 mostrando quantidades variáveis de cromocentros. As barras correspondem a 3,5μm.

Devido ao reduzido tamanho dos cromossomos metafásicos, muitas prófases e pró-metáfases também foram avaliadas, com o intuito de se verificar se problemas devidos à grande compactação estavam mascarando os resultados. No entanto, também em células nestas fases do ciclo celular, as observações foram semelhantes às discutidas anteriormente, ou seja, observaram-se leves marcações eventuais após tratamento drástico (Figura 7a) ou coloração uniforme dos cromossomos após desnaturações moderadas (Figura 7b) ou brandas (Figura 7c).

Figura 7 - Células de *H. brasiliensis* em prófase, mostrando leves marcações após tratamento drástico (a) e sem marcas com desnaturação moderada (b) ou leve (c). As barras correspondem a 3,5μm.

4.3. Enraizamento em Meio Líquido - Hidroponia

Com o objetivo de obter raízes para os estudos citológicos em períodos de indisponibilidade de sementes foi realizado o ensaio de enraizamento em meio líquido. As Figuras 8 a 14 mostram as várias etapas da condução do ensaio, como descrito no item 3.2.5. Nas Figuras 8 e 9 são visualizadas as plantas de 18 meses utilizadas, antes da preparação e após a recepagem, respectivamente. Cerca de 20 dias depois, quando do início de brotações as plantas foram retiradas do solo, foi realizada toaleta nas raízes (Figuras 10 e 11) e imediatamente colocadas nas caixas com água (Figura 12). Nesta figura também são vistas as plantas de seis meses de idade, nas quais não se realizou a recepagem. Neste ambiente, raízes e brotações desenvolveram-se vigorosamente (Figuras 13 e 14).

Figura 8 - Plantas de 18 meses de idade, no viveiro do Departamento de Agricultura da ESALQ/USP.

Figura 9 - Planta de 18 meses após recepagem para o ensaio. Somente após o início de brotações foi retirada do campo e colocada em meio líquido.

Figura 10 - Sistema radicular das plantas de 18 meses, após toailete.

Figura 11 - Plantas com 18 meses de idade, logo após retirada do campo e realização de toailete nas raízes. Notam-se três alturas de corte e plantas com folhas já desenvolvidas ou com brotações bem iniciais (ao centro).

Figura 12 - Plantas já preparadas e colocadas em meio líquido, com borbulhamento de ar. À esquerda com 18 meses e à direita, com folhas, com seis meses.

Figura 13 - Brotações vigorosas desenvolveram-se sob hidroponia, qualquer que tenha sido a altura de corte.

Nos vários testes de enraizamento de plantas jovens observou-se que os cavalos de 18 meses responderam melhor a este tipo de tratamento. As plantas de seis meses também responderam positivamente mas, como estão em estágio inicial de desenvolvimento, são ainda pequenas, com cerca de 50cm de altura e duas ou três folhas, a quantidade de raízes produzidas foi pequena. Além disso, essas raízes mostraram-se mais finas e fibrosas, de qualidade ruim para estudos citológicos.

Os cavalos de 18 meses responderam muito bem ao tratamento, tendo produzido grande quantidade de raízes. A Figura 14 mostra o sistema radicular bem desenvolvido, numa das plantas do teste. Vale observar que a

Figura 14 - Sistema radicular desenvolvido sob hidroponia. Nesta planta já foram realizados dois desbastes de raízes; este, portanto, é o terceiro lançamento de raízes.

fotografia foi obtida após duas toaletes, ou seja, representa o terceiro ciclo de emissão de raízes pela planta.

No entanto, apesar da grande quantidade de raízes obtidas, as características das mesmas foram diferentes das obtidas de sementes. A maior parte delas, mais fina e fibrosa, não se prestou a preparações citológicas; aparentemente, desenvolveram-se mais por elongação que por divisões celulares e mostraram, portanto, zonas meristemáticas reduzidas. Há um segundo tipo de raízes, mais vigorosas, semelhantes às obtidas de sementes, e com meristemas maiores, embora não tão grandes como as de sementes, que pode ser visto nas Figuras 22 e 23. Nestas, as avaliações mostraram número considerável de células em divisão, mas suas respostas aos mesmos agentes de pré-tratamento aplicados às raízes de sementes (8-hidroxiquinolina, colchicina e cicloheximida) foram diferentes. O espalhamento e a morfologia cromossômica mostraram-se ruins e isto talvez deva-se a alterações na absorção dos produtos químicos. Uma vez que as raízes desenvolveram-se em meio líquido, supõe-se que suas células estejam túrgidas, o que reduz ou torna mais lenta a taxa de difusão dos produtos até as regiões meristemáticas. No entanto, trata-se de especulações e estudos mais direcionados não foram realizados por fugirem dos objetivos.

Dos quatro tipos de meio líquido empregados, água sozinha mostrou-se a melhor alternativa aos propósitos do estudo. A utilização de solução nutritiva foi descartada logo nos primeiros testes devido ao desenvolvimento de grande quantidade de algas, mesmo com aplicação de hipoclorito de sódio. As algas aderiram-se fortemente às raízes de forma a não poderem ser retiradas sem causar danos às mesmas e,

consequentemente, influenciaram negativamente a qualidade das preparações citológicas obtidas.

A aplicação de NAA (ácido naftaleno acético) também mostrou-se desfavorável, inibindo o enraizamento, mesmo com a aplicação em baixas dosagens, e para as plantas das duas idades. Como foi verificado nos testes subsequentes, a quantidade de fitormônios produzidos pelas plantas em brotação foi mais que suficiente para induzir enraizamento e, neste caso, aplicação exógena de NAA agiu inibindo a formação de raízes.

A utilização de água tratada com hipoclorito de sódio (para o controle do aparecimento de algas e microrganismos) e com borbulhamento contínuo de ar permitiu a formação de sistemas radiculares bem desenvolvidos e com raízes vigorosas e saudáveis.

Foi testada também a retirada das plantas do campo com as brotações ainda pequenas (desde gemas ainda somente intumescidas) e outras já com folhas desenvolvidas (Figura 11). Não se observou diferença de resposta pois em todos os casos o enraizamento foi bom, desde que houvesse ao menos uma gema apta a se desenvolver.

4.4. Enraizamento *in vitro*

Os diferentes tipos de ápices caulinares utilizados nos ensaios de enraizamento de *Hevea in vitro* estão apresentados nas Figuras 15 a 17.

A Figura 15 mostra dois ápices de ramos de dois anos e meio de plantas do viveiro. Na Figura 16 são mostrados três brotos, em diferentes

estádios, retirados das plantas do ensaio de enraizamento em meio líquido (hidroponia - Figura 13). Na Figura 17, as sementes em germinação

Figura 15 - Ápices caulinares excisados de plantas do viveiro da ESALQ/USP.

Figura 16 - Ápices obtidos das brotações resultantes do ensaio de hidroponia.

Figura 17 - Sementes em germinação e algumas plântulas em diferentes estádios de desenvolvimento. Todos foram testados *in vitro*.

que originaram as plântulas cujos ápices foram coletados para cultivo *in vitro* (Figura 18).

Figura 18 - Ápices das plântulas obtidas de sementes germinadas, em três estádios.

Pelo estudo constatou-se que contaminações são realmente um sério entrave à cultura *in vitro* de seringueira, o que concorda com as informações disponíveis (Enjalric et al., 1988; Chen et al., 1990), especialmente quando da utilização de explantes retirados de plantas maduras (Carron & Enjalric, 1985; Enjalric et al., 1988; Lardet et al., 1990; Etienne et al., 1993 a e b; Perrin et al., 1994). No presente trabalho verificou-se que as taxas de contaminação são bastante elevadas quando são utilizados como explantes ápices das plantas do viveiro ou os das plantas do ensaio de hidroponia.

Nestes dois casos ocorreu maior diversidade de patógenos, embora sempre houvesse predominância de um tipo de fungo e um de bactéria, possivelmente endofíticos. Quando são utilizados os tecidos jovens das plântulas como explantes, contaminações também ocorreram mas restringiram-se, basicamente, aos microrganismos endofíticos inerentes à seringueira, pois apresentaram sempre as mesmas características de micélio e/ou colônia. O controle de contaminações causadas por fungos e/ou bactérias endofíticos é bastante complicado, especialmente quando as concentrações de sais e sacarose são reduzidas no meio (Cassells, 1991). Vale ressaltar que as plantas mantidas em hidroponia já haviam sido retiradas de seu ambiente original há no mínimo dois meses quando da excisão dos brotos para introdução *in vitro*. Teoricamente, esperava-se que a mudança de ambiente causasse uma redução na infestação por microrganismos, fato que não ocorreu.

A adição de antibióticos ao meio de cultura tem efeito negativo no desenvolvimento de gemas em seringueira (Enjalric et al., 1988) o que seria prejudicial neste caso e, portanto, não foi utilizada. No entanto, como observou-se que o principal contaminante foi um tipo de fungo, optou-se pela adição de fungicidas ao meio. Dois deles foram testados, Benlate e Dithane. O primeiro mostrou pouca eficiência e foi logo substituído por Dithane. A presença do fungicida no meio de cultura não impediu o aparecimento do fungo mas agiu no sentido de controlar o desenvolvimento do micélio, em grande parte dos casos.

Nos testes iniciais, as contaminações foram muito extensivas, inviabilizando o desenvolvimento das gemas dos explantes. Posteriormente,

com a adequação do método de desinfecção, contaminantes surgiram eventualmente, mesmo depois de 60 dias ou mais de cultivo mas, no geral, conseguiu-se manter os explantes em boas condições de forma que desenvolveram brotações vigorosas e raízes.

Determinado o melhor método de desinfecção, atenção foi voltada ao meio ideal para indução de raízes. Inicialmente, optou-se pela utilização dos meios MS completo (Murashige & Skoog, 1962), MS/2 e MS/4 suplementados com 60g/l de sacarose e 1 μ M de BA (benziladenina), como normalmente realizado para embriogênese somática em seringueira (Michaux-Ferrière & Carron, 1985, 1992; Etienne et al., 1991, 1993 a, b, c; Carron et al., 1995). Não houve brotação de gemas em nenhum caso e sim grande perda de explantes devidas, em parte, aos testes de desinfecção e também por necrose dos explantes.

Posteriormente, passou-se a utilizar o meio MS/4 com 20g/l de sacarose, 4mg/100ml de Dithane (filtrado com filtro Millipore) e 0,4ml/l de IBA, com e sem a aplicação do mesmo fungicida (a 30mg/100ml) nos ápices, 8 dias e/ou 24 horas antes da coleta dos mesmos. Receberam as pulverizações os ápices a serem coletados e as folhas próximas a eles, tanto das plantas do viveiro como das plântulas do telado. Entretanto, verificou-se que tais aplicações não tinham efeito significativo na redução de contaminações. Também tentaram-se banhos rápidos com o fungicida logo após a realização da desinfecção e imediatamente antes da inoculação em meio de cultura mas, da mesma forma, sem sucesso. Alguns explantes colocados neste tipo de meio iniciaram brotações e entumescimento da base

cerca de cinco dias depois das inoculações. Após 30 dias apresentaram calos bem desenvolvidos, com raízes emergentes.

Foi avaliada também a utilização de meio MS/4 com 5g/l de sacarose, Dithane (mesma concentração), sem IBA e com 0,4ml/l de IBA durante 30 dias seguido de troca para meio sem o hormônio. Os explantes colocados em meio com IBA formaram calos por volta do 15º dia de cultura e raízes a partir do 25º. Na ausência de IBA o enraizamento ocorreu de forma direta, sem a formação de calo antes, com 18 a 20 dias de cultivo.

Testes também foram realizados usando-se MS/2 com Dithane, com 0,4mg/l de IBA, com 1mg/l de IBA e sem IBA. Os explantes permaneceram 30 dias no meio com 0,4mg/l de IBA e 7-8 dias em meio com 1mg/l de IBA antes de passarem para meio sem o hormônio, definitivamente. Os resultados foram semelhantes aos obtidos com a utilização do meio MS/4. Além disso, outra tentativa foi deixar os explantes em ágar-água por uma semana, antes de colocá-los em meio MS/2 sem IBA. O objetivo foi o de eliminar os microrganismos pela ausência de nutrientes. Neste caso, aos 45 dias as brotações foram abundantes e sem sinais de contaminação, e ocorreu formação de raízes aos 40 dias de cultura.

Um resumo dos efeitos dos diferentes tratamentos sobre os explantes pode ser visto no Quadro 7.

Quadro 7 - Tempos aproximados de resposta dos explantes aos diferentes tratamentos

Composição do Meio	Formação de calo (dias)	Brotações (dias)	Enraizamento (dias)
MS/4; sacarose 60g/l; BA 1 μ M; Dithane 4mg/100ml	—	—	—
MS/4; sacarose 20g/l; IBA 0,4mg/l; Dithane 4mg/100ml	5	5	15
MS/4; sacarose 5g/l; IBA 0,4mg/l; Dithane 4mg/100ml	15 - 20	10 - 15	60 - 65
MS/4; sacarose 5g/l; Dithane	—	10	15 20
MS/2; IBA 0,4mg/l; Dithane	—	20 - 25	30
MS/2; IBA 1 mg/l; Dithane	—	20 - 25	45 - 50
MS/2; Dithane	—	20 - 25	40 - 45
Ágar-água 8 dias; MS/2; Dithane	—	30 - 40	40

De uma maneira geral, os explantes que receberam tratamento com IBA, na forma de choque (concentração mais alta por 7-8 dias) ou fornecimento de menor dose por maior tempo, formaram calos a partir dos quais as raízes emergiram (Figuras 19 e 20). Nos tratamentos sem aplicação do hormônio ocorreu formação de raízes sem desenvolvimento de calos. Na maior parte dos casos, dos calos saíram várias raízes, mas mais finas e fibrosas, com meristema quase imperceptível (Figura 21). Os explantes que não formaram calo produziram, como regra, somente uma raiz, mais vigorosa e com melhor aspecto (Figura 22).

Figura 19 - Calos formando-se na base dos explantes (a) e, posteriormente, raízes emergentes de calo (b).

Figura 20 - O mesmo explante da Figura 19b, com as raízes já desenvolvidas.

As características das raízes produzidas *in vitro* foram diferentes das normalmente obtidas de sementes, não somente quanto à morfologia como também fisiologicamente. Não responderam da mesma forma aos agentes de pré-tratamento e algumas chegaram a ficar completamente negras após sua aplicação. Além disso, a quantidade de células em divisão foi muito reduzida e a qualidade das preparações citológicas deixou a desejar, com morfologia e espalhamento cromossômicos ruins. Nas Figuras 21 a 23 podem ser visualizados os vários tipos de raízes obtidas, antes e após coloração com reativo de Schiff, fotografadas em lupa, com aumento de 60 vezes. Este corante, que é específico para DNA, foi aplicado com o intuito de se evidenciar a região meristemática e, desta forma, avaliar a quantidade de divisões celulares que ocorrem nos quatro tipos de raízes. Nota-se que na raiz obtida a partir de calo não há coloração de região meristemática; nas demais raízes pode-se observar uma coloração rósea mais intensa nas pontas.

Observou-se que nem todos os explantes desenvolveram raízes, mas alguns mostraram-se bastante rizogênicos, possibilitando até três coletas.

Figura 21 - Raízes produzidas *in vitro*, formadas a partir de calo. Foto obtida em lupa, com aumento de 60 vezes.

Figura 22 - Raízes produzidas nos diversos ensaios. Da esquerda para a direita: raiz obtida de semente, obtida por hidroponia (ao centro) e obtida *in vitro* sem formação de calo. Fotografia obtida em lupa, com aumento de 60 vezes.

Figura 23 - As mesmas raízes das Figuras 21 e 22, após reação de Feulgen. Da esquerda para a direita: raiz de semente; obtida por hidroponia; de cultivo *in vitro* com e sem formação de calo, respectivamente. Nota-se que somente a obtida de calo não apresenta região meristemática evidenciada pelo corante.

Dois tipos de gelificante foram utilizados nos meios de cultura, ágar e fitagel, sendo este último o que confere maior transparência ao meio. No entanto, com as reduzidas quantidades de sais empregadas, fitagel não promoveu boa sustentação dos explantes. Então, alternativamente, optou-se por usar ágar no meio MS/4 e fitagel no MS/2, apesar da possibilidade de influência negativa do ágar no desenvolvimento de gemas (El Hadrami et al., 1993; Carron et al., 1995), que acabou não ocorrendo.

Dos estudos conclui-se que os melhores explantes foram os ápices de plântulas das sementes germinadas. As brotações das sementes que germinaram mais rapidamente e que foram coletadas logo após emergência (Figura 17) apresentaram menores taxas de contaminação. Ao contrário, as rebrotas ou plântulas que permaneceram maior tempo no telado, estando portanto, com folhas mais desenvolvidas (Figura 24), mostraram taxas mais elevadas de contaminação e, conseqüentemente, maior dificuldade de estabelecimento *in vitro*.

Uma vez estabelecidos, os ápices brotaram abundantemente e folhas desenvolveram-se vigorosas, chegando a ocupar grande volume dos frascos (Figuras 25 e 26). A indução de raízes somente ocorreu após o desenvolvimento das gemas apicais (Figura 27). Ao que tudo indica, os hormônios produzidos pelas brotações são suficientes à indução de raízes (Figura 28). Fornecimento exógeno leva primeiramente à formação de calo na base do explante, o que retarda o enraizamento.

Figura 24 - Plântulas mais desenvolvidas, com as folhas mais abertas e maiores, que permaneceram maior tempo no telado. Mostraram maiores níveis de contaminações.

Figura 25 - Explante sadio, com folhas se desenvolvendo.

Figura 26 - Brotações, calos e raízes desenvolvendo-se *in vitro*.

Figura 27 - Explante com brotações desenvolvendo-se e uma raiz (sem calo)

Figura 28 - Uma raiz emergindo de um explante que não recebeu IBA e, portanto, não formou calo.

4.5. Macrosporogênese

Algumas das plantas de onde foram coletadas as flores utilizadas nas diversas etapas do presente trabalho são mostradas nas Figuras 29 e 30.

Figura 29 - Plantas do clone RRIM 600, em plantio da ESALQ/USP, em Piracicaba/SP, com andaime montado para coleta de flores (1994).

Pequenas inflorescências dos clones GT 1 e RRIM 600 e os botões florais utilizados podem ser visualizados nas Figuras 41 e 31, respectivamente.

Foi avaliado o número total de 3384 óvulos, sendo 1506 de RRIM 527, 1149 de RRIM 600 e 729 de GT 1, extraídos de botões florais femininos, como os mostrados na Figura 10.

As diversas etapas da meiose feminina visualizadas nos três clones estão apresentadas na Tabela 1.

Como se verifica pelos resultados obtidos, notou-se que, como relatado em outros trabalhos (Cuco, 1992; Cuco & Bandel, 1995), somente o início da meiose I e a diferenciação pós-meiótica do saco embrionário foram observados, mesmo com o curto intervalo de tempo entre as coletas dos botões florais. Isto corrobora a idéia de que a meiose é bastante rápida enquanto as etapas de diferenciação da célula-mãe do saco embrionário, CMSE, (que a antecede) e do saco embrionário (imediatamente a seguir) consomem maior tempo no processo.

Foram tomados botões florais em vários estádios de desenvolvimento, dentro de limites estabelecidos em estudos anteriores (Cuco, 1992), precedentes à ântese, visando englobar todo o processo de gametogênese feminina. É muito tênue a diferença de tamanho entre os botões florais em diferenciação e os próximos da maturidade. Assim, foram observadas flores cujos tecidos ainda estavam em processo de diferenciação e outras já formadas onde a CMSE estava diferenciando-se (linhas 1 e 2 da Tabela 1).

Figura 30 - Seringueiras plantadas em 1984 na ESALQ/USP, em Piracicaba/SP. Em primeiro plano indivíduos do clone RRIM 527 (1997).

Tabela 1 - Números de óvulos clareados em que as diversas fases da meiose foram observadas, nos três clones de seringueira. Também computadas flores e CMSE* em diferenciação

Estádios	RRIM 527	RRIM 600	GT 1
flor em diferenciação	40	09	10
CMSE em diferenciação	72	58	37
prófase I	168	49	42
leptóteno	121	44	37
zigóteno	35	03	03
paquíteno	12	02	02
telófase I	01	00	00
prófase II	02	00	00
tétrade	15	02	01
pós-meiose	04	04	01
SE 1**	211	163	110
SE 2**	379	390	225
SE 4**	249	148	26
SE 8**	30	03	11
SE incompleto	146	38	06
óvulos com dois sacos embrionários	20	52	00
SE indefinível	83	138	172
SE danificado	37	49	46
SE não diferenciado	47	46	42
pós-fertilização	02	00	00
Totais	1506	1149	729
Σ	3384		

* CMSE - Célula-mãe do saco embrionário

** SE 1, 2, 4, 8 - Saco embrionário uni, bi, tetra e octanucleado

Como se observa na Tabela 1, a maioria dos óvulos diferenciados mostrou-se no início da divisão meiótica, especialmente na primeira subfase da prófase I, o leptóteno. Óvulos em zigóteno e paquíteno também foram visualizados, mas em diplóteno e diacinese não. Dos demais óvulos analisados, raros apresentaram-se em telófase I, prófase II e no final da meiose (tétrade).

Figura 31 - Botões florais com tamanho próximo do natural em estágio utilizado no estudo da macrosporogênese e para avaliação de hermafroditas. As flores femininas localizam-se nos ápices e duas são apontadas pelas setas (são cinco visíveis na foto). Todas as demais são masculinas.

Em pós-meiose enquadram-se os óvulos em diferenciação pós-meiótica, quando três dos conjuntos haplóides formados degeneram-se, restando apenas um que sofrerá, posteriormente, três ciclos de divisões mitóticas que originarão os oito núcleos do saco embrionário.

No item 'saco embrionário incompleto', da Tabela 1 estão computados os óvulos que apresentaram-se em etapas intermediárias entre SE1/SE2/SE4/SE8, ou seja, com número variável de núcleos, como por exemplo SE 2+1 (dois núcleos em um polo e um no outro), SE 1+1+1, SE 1+2+0, SE 3+0, SE 3+1, SE 4+0, SE 3+2, SE 5, SE 3+3, SE 4 + 2 (quatro num polo e dois no outro), SE 6, e assim por diante.

Na linha de SE indefinível estão computados os óvulos para os quais não foi possível a determinação precisa do estágio de desenvolvimento, devido a problemas de anatomia do óvulo, posicionamento dos núcleos no saco embrionário ou mesmo de alterações ocorridas durante o processo de clareamento (este fator com incidência muito baixa).

Qualquer pequena incisão nos óvulos durante a dissecação promove distorções na imagem obtida após o clareamento, o que impede a avaliação dos mesmos. Tais ocorrências foram anotadas como SE danificados.

Além disso, alguns óvulos, apesar de bem desenvolvidos e aparentemente normais na formação de seus vários tecidos, não apresentaram a estrutura típica dos sacos embrionários e de seus núcleos, e foram computados como sacos embrionários não diferenciados.

Vale lembrar que, em situações normais e para a maioria das espécies (70% das angiospermas, segundo Maheshwari, 1950), após a meiose três dos quatro conjuntos haplóides são degenerados, restando

somente um que sofre três divisões mitóticas que originam oito núcleos haplóides que posteriormente rearranjam-se dentro do saco embrionário, sendo duas sinérgides e a oosfera no polo da micrópila, três antípodas na extremidade chalazal e dois núcleos polares ao centro.

No presente caso, apesar de não terem sido observadas todas as fases da meiose feminina, pode-se concluir que a megasporogênese é normal nos três clones, pelo grande número de figuras pós-meióticas padrão observadas. Como regra, o núcleo haplóide resultante da meiose sofre a primeira divisão mitótica; os dois novos núcleos iniciam migração para polos opostos. Na maioria dos casos o saco embrionário tetranucleado mostra dois núcleos em cada polo. Depois de completado o número de mitoses dois núcleos deslocam-se novamente para o centro do saco embrionário e diferenciam-se em núcleos polares. Ao final temos a conformação de 3+2+3 núcleos, provavelmente com duas sinérgides mais oosfera no polo da micrópila, três antípodas no polo oposto e dois núcleos polares ao centro.

A única alteração observada foi a ocorrência de óvulos duplos, ou seja, com dois sacos embrionários, fato aparentemente normal, pois já haviam sido observadas flores com número variável de carpelos, óvulos e/ou sacos embrionários (Bouharmont, 1962; Bouychou, 1963; Compagnon, 1986; Cuco, 1992; Cuco & Bandel, 1995). A Figura 17 mostra um ovário ao microscópio eletrônico de varredura (MEV), em corte transversal, onde são vistos os três carpelos. Num deles há um óvulo com dois sacos embrionários.

A técnica de clareamento de óvulos empregando salicilato de metila permitiu a perfeita visualização de todo o interior dos óvulos e dos sacos embrionários. No entanto, deve-se ressaltar que é imprescindível conhecer-se

muito bem as estruturas florais, para que seja possível uma avaliação, que é realizada plano a plano, sem margens de dúvidas.

Ao microscópio de contraste de fase os sacos embrionários foram claramente visualizados. As fotomicrografias não retratam fielmente as imagens observadas. As Figuras 32 e 33 mostram algumas das etapas da macrosporogênese, observadas em óvulos clareados, no presente estudo.

Figura 32 - Algumas fases da macrosporogênese em óvulos clareados, sob contraste de fase. a) prófase I; b) tétrade c) saco embrionário com um núcleo d) saco embrionário com dois núcleos. A barra representa 10μm.

Figura 33 - a) saco embrionário com 3 núcleos b) saco embrionário tetranucleado; 2 núcleos são bem visíveis, os outros estão no polo oposto, em outro plano c) oosfera em diferenciação d) óvulo com 2 sacos embrionários (setas). A barra representa 10 μ m.

4.6. Avaliação de Hermafroditismo

Um total de 1217 flores, com morfologia externa de femininas, como as visualizadas na Figura 10, foi analisado quanto à sua estrutura, sendo 554 do clone RRIM 527, 378 de RRIM 600 e 285 de GT 1. A Tabela 2 mostra a constituição floral observada para os três clones.

Tabela 2 - Quantificação de flores femininas e hermafroditas (com estames desenvolvidos e residuais), nos três clones de *H. brasiliensis*

Flores Clones	Femininas	Hermafroditas	Hermafroditas com Estaminódios *	Totais
RRIM 527	107 19,31%	447 80,69%	34 7,61%	554
RRIM 600	103 27,25%	275 72,75%	188 68,36%	378
GT 1	137 48,07%	148 51,93%	141 95,27%	285
GERAL	347 28,51%	870 71,49%	363 41,72%	1217

* porcentagens referentes ao total de flores hermafroditas. Nas demais colunas relacionam-se aos totais

O estudo mostrou que grande porcentagem das flores é hermafrodita (Tabela 2), o que confirma estudos anteriores (Cuco, 1992; Cuco & Bandel, 1995). O clone RRIM 527 apresentou 80,70% de flores hermafroditas, sendo que somente 7,61% destas possuíam anteras residuais. Neste caso, as anteras da base do ovário foram mais numerosas e mais desenvolvidas que nos demais clones, ou seja, as flores eram mais

tipicamente hermafroditas. Em RRIM 600 observou-se 27,25% de femininas contra 72,75% de hermafroditas, destas 68,36% com estaminódios. Em GT 1 48,07% eram femininas e 51,93% hermafroditas e, destas, 95,27% com anteras residuais.

Numa avaliação geral (Tabela 2), do total de flores estudadas nos três clones, 28,51% possuíam exclusivamente as estruturas do sistema reprodutor feminino enquanto a maioria, 71,49% eram hermafroditas, sendo 29,83% destas com anteras residuais. Isto concorda parcialmente com a literatura que descreve estaminódios como regra, na base dos ovários. Neste estudo, quantidade alta de flores hermafroditas com anteras residuais foi observada, embora nem sempre em número de dez, como afirmou Bouychou (1963). Além disso, há número considerável de flores essencialmente femininas, sem sinais de estaminódios, a saber, 19,30% em RRIM 527, 27,25% em RRIM 600 e 48,07% em GT 1.

As flores hermafroditas possuem ovário com morfologia normal em cuja base as anteras dispõem-se, circundando-o completa ou parcialmente (Figura 34). Tais anteras são proporcionalmente menores que as normais, de flores masculinas, embora muitas vezes com aspecto de funcionais pois foram observados grãos de pólen naquelas em estágio mais avançado de desenvolvimento (Figura 35).

Figura 34 - Flores hermafroditas vistas ao microscópio eletrônico de varredura (MEV). (a) uma antera desenvolvida e duas residuais (setas) na base do ovário (b) ovário circundado por anteras bem desenvolvidas. No detalhe inferior, ampliação das anteras. As barras representam 200 μ m e 500 μ m, respectivamente.

Figura 35 - a) Flor hermafrodita com anteras funcionais em sua base. b) detalhe da antera onde são vistos grãos de pólen na fenda (seta). As barras representam 200µm e 50µm, respectivamente.

Anteras em número suficiente para circundar toda a base do ovário, como na Figura 34b foram observadas em poucos casos. No geral, nota-se a presença de algumas anteras e, não muito raro, uma ou duas somente. Outra constatação foi que 29,83% do total das flores hermafroditas apresentaram o que se denominou anteras residuais, ou seja, pequenas formações na base dos ovários, com aspecto de anteras que não se desenvolveram completamente (Figura 36). São os estaminódios referidos na literatura (Bouychou, 1963). Examinadas ao microscópio eletrônico de varredura sua epiderme mostra-se normal (Figura 37).

Figura 36 - Ovário do clone RRIM 600 com anteras residuais em sua base (parte superior - setas), visto sob microscopia de varredura. A barra corresponde a 200 μ .

Figura 37 - Epiderme de antera de flor hermafrodita, ao MEV, com aspecto normal. A barra representa 50 μ m.

No clone RRIM 527 raras alterações morfológicas foram observadas, sendo dois casos com dois ovários em uma única flor (um com três; outro com dois óvulos), um ovário com seis óvulos e 20 óvulos com dois sacos embrionários. Em GT 1 tais alterações resumiram-se a 14 ovários com somente dois óvulos.

No clone RRIM 600, várias outras malformações foram constatadas, embora como exceções na maioria dos casos. Os números de ocorrências de tais alterações foram:

- ovários com quatro lojas e quatro óvulos: 26
- dois ovários numa mesma flor: 02
- três ovários numa mesma flor: 01
- ovários com cinco lojas e óvulos: 01
- ovários com seis lojas e óvulos: 01
- ovários com sete lojas e óvulos: 01
- ovários com nove lojas e óvulos: 01
- dois óvulos na mesma loja: 52 (Figura 38)

Figura 38 - Ovário de flor do clone RRIM 600 seccionado transversalmente e visto ao microscópio eletrônico de varredura. Podem ser observados os três óvulos (ov) com os sacos embrionários ao centro. Em um dos óvulos são vistos dois sacos embrionários (seta). A barra representa 200 μ m.

Os dados contrariam relato anterior de que a ocorrência de flores hermafroditas em seringueira é rara (Bouychou, 1963) e corroboram estudos realizados posteriormente àquele (Cuco, 1992; Cuco & Bandel, 1995). No entanto, concordam com Compagnon (1986) com a relação à pequena porcentagem de ocorrência de alterações numéricas e morfológicas, ao nível de ovários e óvulos, e com Bouychou (1963) sobre ser a variação no número de carpelos de ocorrência mais comum em *Hevea*.

Observou-se ao microscópio eletrônico de varredura que os órgãos masculinos e femininos têm aspecto semelhante em flores femininas, hermafroditas e masculinas, como pode ser constatado nas Figuras 36, 37 e 39.

As análises permitiram também observar que no clone GT 1, que é macho-estéril, as flores masculinas iniciam seu desenvolvimento de forma aparentemente normal, com as anteras ainda entumecidas, embora sua epiderme já tenha um aspecto de levemente frouxa (Figura 40), diferentemente das observadas nas Figuras 37 e 39. Ao final, as anteras mostraram-se totalmente enrugadas e vazias, como mostra a Figura 41.

Durante as coletas de flores observou-se que, ao contrário dos demais clones, em GT 1 mesmo os botões florais ainda bem jovens tendem a soltar-se muito mais facilmente dos pecíolos e o manuseio ou mesmo a ação do vento faz com que as flores masculinas caiam. Os ramos chegaram a ficar somente com os botões femininos. Relativamente pequena quantidade de flores masculinas chegam à deiscência, expondo suas anteras “chochas”. A Figura 42 mostra uma inflorescência de GT 1 onde pode-se observar esta abscisão floral. Pode ser comparada à Figura 22 onde está representada uma

inflorescência de RRIM 600, repleta de flores masculinas e femininas. Anteras vazias e abscisão floral precoce levam à suposição de macho-esterilidade citoplasmática (Jain, 1959; Frankel & Galun, 1977; Machado, 1988).

Figura 39 - Ovário de flor essencialmente feminina de RRIM 600 (a) e estames do clone RRIM 527 (b), ao microscópio eletrônico de varredura. As barras representam 500µm e 200µm, respectivamente.

Figura 40 - Estames de GT 1 ao microscópio eletrônico de varredura. Nos estames jovens (a), as epidermes das anteras têm aspecto rugoso. Em (b), estames maduros (“chochos”). As barras representam 100 μ m e 50 μ m, respectivamente.

Figura 41 - (a) inflorescência de GT 1, onde restaram somente as flores femininas (nos ápices). (b) Inflorescência de RRIM 600, com flores masculinas (numerosas) e femininas (nos ápices).

4.7. Considerações Finais

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que é bastante satisfatório o enraizamento de plantas jovens em meio líquido, tendo sido obtidas grandes quantidades de raízes e brotações, saudáveis e vigorosas, embora não adequadas para estudos citológicos. No entanto, este é um fato interessante considerando-se a grande dificuldade de enraizamento de seringueira, tanto *in vivo* como *in vitro*, amplamente comentada na literatura.

Os dados obtidos com cultivo *in vitro* de ápices caulinares concordam com os relatos observados na literatura internacional. Contaminações são realmente um sério problema na cultura *in vitro*, especialmente quando se utiliza como explante material excisado de tecidos maduros. Somente tecidos jovens permitiram uma desinfecção eficiente, estabelecimento e enraizamento *in vitro*. No entanto, a produção de raízes por esta via é pequena e como nem todos os explantes produziram raízes, deve ser grande o número de inoculações para se obter grande quantidade das mesmas, se este for o objetivo.

Para estudos citogenéticos, a melhor fonte de raízes ainda são as sementes, mas desta forma é muito limitado o período de disponibilidade de material biológico. Este trabalho mostrou a possibilidade de obtenção de raízes via hidroponia e cultivo *in vitro*, embora adequações metodológicas

devam ser realizadas para possibilitar a utilização de tais materiais em preparações citológicas.

Além disso, demonstrou-se que a quase inexistência de estudos citogenéticos em seringueira deve-se à grande dificuldade de se trabalhar com esta espécie. Porte elevado, reduzido período de disponibilidade de flores e sementes, sementes recalcitrantes, difícil controle de contaminações, longo ciclo vital, são alguns dos fatores complicantes. Este é o primeiro estudo a aplicar a técnica de bandamento C em *Hevea brasiliensis* e a detalhar aspectos do comportamento cromossômico.

Além disso, as avaliações permitiram um melhor conhecimento da morfologia floral e compreensão de uma face da biologia reprodutiva da espécie, ao demonstrar a ocorrência de elevadas taxas de flores hermafroditas dentre aquelas com morfologia de femininas, e também que a gametogênese feminina (macrosporogênese) é normal, nos três clones estudados (RRIM 527, RRIM 600 e GT 1).

Assim, o estudo foi pioneiro, sob vários aspectos, e vem contribuir para um melhor conhecimento desta importante espécie arbórea, *Hevea brasiliensis*.

5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, pôde-se chegar às seguintes conclusões:

1. A macrosporogênese é normal em seringueira uma vez que nenhuma anomalia foi detectada ao nível de macrósporos e/ou sacos embrionários, nos três clones avaliados.
2. Foi detectada, através de bandamento C, a presença de alguns (poucos) blocos heterocromáticos nos cromossomos.
3. Foi desenvolvido protocolo de estabelecimento e enraizamento *in vitro* para *Hevea brasiliensis*, a partir de ápices caulinares de plântulas recém emergidas.
4. É possível o desenvolvimento de bom sistema radicular de plantas jovens por hidroponia.
5. São elevadas as taxas de ocorrência de flores hermafroditas na espécie.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR-PERECIN, M.L.R. Bandamento-C e tipos de heterocromatina em milho. In: AGUIAR-PERECIN, M.L.R.; MARTINS, P.S.; BANDEL, G. (Ed.). **Tópicos de citogenética e evolução de plantas** - I Colóquio sobre citogenética e evolução de plantas. Piracicaba: RBG, 1984. p.51-67.

AGUIAR PERECIN, M.L.R. C-banding in maize. I. Band Patterns. **Caryologia**, v.38, n.1, p.23-30, 1985.

AGUIAR-PERECIN, M.L.R.; VOSA, C.G. C-banding in maize II. Identification of somatic chromosomes. **Heredity**, v.54, n.1, p.37-42, 1985.

AGUIAR-PERECIN, M.L.R.; DECICO, M.J.U. Preliminary results on the segregation of knobs (C-bands) in inbred lines derived from a flint vari-

ety. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v.62, p.100, 1988.

AGUIAR-PERECIN, M.L.R.; FLUMINHAN JUNIOR, A. Mitotic instability in callus cultures of inbred lines adapted to tropical regions. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v.70, p.87-88, 1996.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. Molecular biology of the cell. 3. ed. New york: Garland 1994. 1294p.

ANNAMMA, Y.; MARKOSE, V.C.; BHASKARAN NAIR, V.K. Meiotic abnormalities in two male sterile clones of *Hevea brasiliensis*. In: Inter-Natural Rubber Conference, India, paper 8, 1980.

ARRIGHI, F.E.; HSU, T.C. Localization of heterochromatin in human chromosomes. **Cytogenetics**, v.10, p.77-79, 1971.

ATTANAYAKE, D.P.S.T.G.; DHARMARATNA, S.C. Preliminary observations on flowering, pollen germination and fruit-set in *Hevea* species. **Journal of Rubber Research Institute of Sri Lanka**, v.62, p.41-46, 1984.

AUBOIRON, E; CARRON, M.P; MICHAUX-FERRIÈRE, N. Influence of atmospheric gases, particularly ethylene, on somatic embryogenesis of

Hevea brasiliensis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.21, n.1, p.31-37, 1990.

BAJAJ, Y.P.S. Biotechnology in agriculture and forestry: 5. Trees II. Berlin, Springer-Verlag, 1989. 622p.

BANGHAM, W.N. Chromosomes of some *Hevea* species. **Journal of the Arnold Arboretum**, v.12, p.287-288, 1931.

BAUM, M. Rye-wheat hybrids: the production of wheat chromosome additions to rye. **Genome**, v.34, n.5, p.840-844, 1991.

BERNARD, S.; JEWELL, D.C. Crossing maize with sorghum, *Tripsacum* and millet: the products and their level of development following pollination. **Theoretical and Applied Genetics**, v.70, n.5, p.474 - 483, 1985.

BERNARDES, M.S.; VEIGA, A.S.; FONSECA FILHO, H. Mercado brasileiro de borracha natural. In: BERNARDES, M. S. (Ed.). **Sangria da seringueira**. Piracicaba. ESALQ/FEALQ, 1990. p.179-206.

BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O.; FONTES, M.S. Karyotypic diversity and distribution in *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae) cytotypes with 2n=40 chromosomes. **Brazilian Journal of Gene-**

tics, v.20, n.2, p.237-242, 1997.

BORON, A. Chromosome banding studies of *Noemacheilus barbatulus* (Linnaeus, 1758) from Poland. **Caryologia**, v.48, n.3/4, p.239-246, 1995.

BOUHARMONT, J. Recherches taxonomiques et caryologiques chez quelques espèces du genre *Hevea*. **INEAC**, Série Scientifique, n.85, 1960, 77p.

BOUHARMONT, J. Fecondation de l'ovule et développement de la graine après croisement et autopollinisation chez *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. **La Cellule**, v.62, p.119-130, 1962.

BOUYCHOU, J.G. La biologie de l'Hévéa. **Revue Générale du Caoutchouc**, n.254, 1963. 17p.

CABRERA, A.; FRIEBE, B.; JIANG, J.; GILL, B.S. Characterization of *Hordeum chilense* chromosomes by C-banding and in situ hybridization using highly repeated DNA probes. **Genome**, v.38, n.3, p.435-442, 1995.

CARRON, M.P.; ENJALRIC, F. Perspectives du microbouturage de l'*Hevea brasiliensis*. **Caoutchoucs et Plastiques**, n.627/628, p.65-68,

1983.

CARRON, M.P.; ENJALRIC, F. Embryogenèse somatique à partir du tégument interne de la graine d'*Hevea brasiliensis*. **Critical Review of Academic Science of Paris**, t.300, n.17, 1985.

CARRON, M.P.; d'AUZAC, J.; ETIENNE, H.; EL HADRAMI, I.; HOUTI, F.; MICHAUX-FERRIERE, N.; MONTORO, P. Biochemical and Histological features of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. **Indian Journal of Natural Rubber Research**, v.5, n.1-2, p.7-17, 1992.

CARRON, M.P.; ETIENNE, H.; MICHAUX-FERRIERE, N.; MONTORO, P. Somatic embryogenesis in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Müell. Arg.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, v.30, p. 333-369, 1995.

CASSELLS, A.C. Problems in tissue culture: culture contamination. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Ed.) **Micropropagation - technology and application**. Netherlands, Kluwer, 1991. Cap.3, p.31-44.

CHEN, Z.; QIAN, C.; QIN, M.; XU, X.; XIAO, Y. Recents advances in anther culture of *Hevea brasiliensis* (Muell.Arg.). **Theoretical and Appli-**

ed Genetics, v.62, p.103-108, 1982.

CHEN, Z. Rubber. In: SHARP, W.R.; EVANS, D.A.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. (Ed.) **Handbook of plant cell culture**. Crop species. New York: Macmillan, 1984. cap19, p.546-571.

CHEN, Z.; EVANS, D.A. General techniques of tissue culture in perennial crops. In: CHEN, Z.; EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P. V.; SONDAHL, M.R. (Ed.). **Handbook of plant cell culture: perenial crops**. New York: Macmillan. 1990. v.6, p.22-61.

CHEN, Z.; XU, X.; PAN, R. Rubber tree: anther and ovule culture. In: CHEN, Z.; EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P. V.; SONDAHL, M.R. (Ed.) **Handbook of plant cell culture - perenial crops**. New York: Macmillan. 1990. v.6, p.453-467.

CHEN, Z.; JIANG, X.; WANG, Y. Karyotype and banding patterns of Fea's tree rat (*Chiromyscus chiropus*). **Caryologia**, v.48, n.1, p.9-16, 1995.

CHENG-HUA, C.; FA-TSU, C.; CHANG-FA, C.; CHUAN-HUA, W.; SHIHCHIEH, C.; HSU-EN, H.; SHIAO-HUEI, O.; YUNG-TAO, H.; TSUNMIN, L. A process of obtaining pollen plants of *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. **Scientia Sinica**, v.22, n.1, p.81-90, 1979.

CHRISTIAN, B.; CHARLETTE, S.; CHRISTIAN, D. Cytological and biochemical calendar of ovule and seed development in *Populus* sp.

Journal of Plant Physiology, v.102, n.3, p.331-337, 1993.

COHEN, A.C.; HENNEBERRY, T.J.; CHU, C.C. Geometric relationships between whitefly feeding behaviour and vascular bundle arrangements.

Entomologia Experimentalis et Applicata, v.78, n.2, p.135-142, 1996.

COMPAGNON, P. **Le caoutchouc naturel**: biologie, culture, production.

Paris: Maisonneuve Larouse, 1986. 595p. Collection Techniques Agricoles et Productions Tropicales.

CUADRADO, A.; CEOLONI, C.; JOUVE, N. Variation in highly repetitive DNA composition of heterochromatin in rye studied by fluorescence in situ hybridization. **Genome**, v.38, n.6, p.1061-1069, 1995.

CUADRADO, A.; RUBIO, P.; FERRER, E.; JOUVE, N. Sequential combinations of C-banding and *in situ* hybridization and their use in the detection of interespecific introgressions into wheat. **Euphytica**, v.89, n.1, p.107-112, 1996.

CUCO, S. M. Citogenética da seringueira. Piracicaba, 1992. 90p. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Uni-

versidade de São Paulo.

CUCO, S. M.; BANDEL, G. Hermaphroditism in the rubber tree *Hevea brasiliensis* (Willd. ex ADR. de Juss.) Müell. Arg. **Brazilian Journal of Genetics**, v.17, n.4, p.413-415, 1994.

CUCO, S.M.; BANDEL, G. Megasporogenesis and microsporogenesis in the rubber tree *Hevea brasiliensis* (Willd. ex ADR. de Juss.) Müell. Arg. **Brazilian Journal of Genetics**, v.18, n.3, p.429-434, 1995.

DEV, V.G.; MILLER, D.A.; MILLER, O.J. Chromosome markers in *Mus musculus*: strain difference in C-banding. **Genetics**, v.75, p.663-670, 1973.

DIJKMAN, M.J. Preliminary data on storage of *Hevea* pollen. **Archives Rubberculture**, v.22, p.239-259, 1938.

EL HADRAMI, I., CARRON, M. P.; D'AUZAC, J. Variabilité clonale du potentiel embryogène chez *Hevea brasiliensis*; relations avec les polyamines (PA) et les peroxydases (PO) des cals. **Comptes Rendus de la Academie des Sciences Paris**, v.308, p.299-305, 1989a.

EL HADRAMI, I.; MICHAUX-FERRIÈRE, N.; CARRON, M. P.; D'AUZAC, J. Les polyamines, facteur limitant possible de l'embryogenèse

somatique chez l'*Hevea brasiliensis*. **Comptes Rendus de la Academie des Sciences Paris**, v.308, p.205-211, 1989b.

EL HADRAMI, I.; CARRON, M.P.; D'AUZAC, J. Influence of exogenous hormones on somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. **Annals of Botany**, v.67, n.6, p.511-515, 1991.

EL HADRAMI, I.; HOUSTI, F.; MICHAUX-FERRIÈRE, N.; CARRON, M.P.; D'AUZAC, J. Effects of gelling agents and liquid medium on embryogenic potential, polyamines and enzymatic factors in browning in *Hevea brasiliensis* calli. **Journal of Plant Physiology**, v.141, n.2, p.230-233, 1993.

ENDO, T.R. Complete identification of common wheat chromosomes by means of the C-banding technique. **Japanese Journal of Genetics**, v.61, n.1, p.89-93, 1986.

ENJALRIC, F.; CARRON, M.P. Microbouturage *in vitro* de jeunes plants d'*Hevea brasiliensis* (Kunth., Müell. Arg.). **Comptes Rendus de la Academie des Sciences Paris**, v. 295, p. 259-264, 1982.

ENJALRIC, F.; CARRON, M.P.; LARDET, L. Contamination of primary cultures in tropical areas: the case of *Hevea brasiliensis*. **Acta Horticulturae**, v.225, p.57-68, 1988.

ETIENNE, H.; BERGER, A.; CARRON, M.P. Water status of callus from *Hevea brasiliensis* during induction of somatic embryogenesis. **Physiologia Plantarum**, v.82, n.2, p.213-218, 1991.

ETIENNE, H.; SOTTA, B.; MONTORO, P.; MIGINIAC, E.; CARRON, M.P. Relations between exogenous growth regulators and endogenous indole-3-acetic acid and abscisic acid in the expression of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Müell. Arg.). **Plant Science**, v.88, n.1, p.91-96, 1993a.

ETIENNE, H.; SOTTA, B.; MONTORO, P.; MIGINIAC, E.; CARRON, M.P. Comparision of endogenous ABA and IAA contents in somatic and zygotic embryos of *Hevea brasiliensis* (Müell.Arg.) during ontogenesis. **Plant Science**, v.92, n.1, p.111-119, 1993b.

ETIENNE, H.; MONTORO, P.; MICHAUX-FERRIÈRE, N.; CARRON, M.P. Effects of desiccation, medium osmolarity and abscisic on the maturation of *Hevea brasiliensis* somatic embryos. **Journal of Experimental Botany**, v.44, n.267, p.1613-1619, 1993c.

ETIENNE, H.; SOTTA, B.; MONTORO, P.; MIGINIAC, E.; CARRON, M.P. Growth regulators in the expression of somatic embryogenesis in *Hevea*. In: TEISSON, C. (Ed.). **In Vitro culture of tropical**

plants. Montpellier: CIRAD, 1994. p.31-35.

FERNÁNDEZ-CALVÍN, B.; BENAVENTE, E.; ORELLANA, J. Meiotic pairing in wheat-rye derivatives detected by genomic in situ hybridization and C-banding - A comparative analysis. **Chromosoma**, v.103, n.8, p.554-558, 1995a.

FERNÁNDEZ-CALVIN, B.; ORELLANA, J.; PIGNONE, D. Genome analysis of triploids using mathematical models. I. Effects of translocations not detected by conventional staining techniques. **Hereditas**, v.122, n.1, p.41-45, 1995b.

FLUMINHAN JUNIOR, A.; KAMEYA, T. Behaviour of chromosomes in anaphase cells in embryogenic callus cultures of maize (*Zea mays* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.92, n.8, p.982-990, 1996.

FRANKEL, R.; GALUN, E. Pollination mechanisms, reproduction and plant breeding. **Monographs on Theoretical and Applied Genetics**, v.2, 1977, 281p.

FRIEBE, B.; TULEEN, N.A.; GILL, B.S. Standard karyotype of *Triticum searsii* and its relationship with other S-genome species and common wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, v.91, n.2, p.248-254, 1995.

FURINI, A.; JEWELL, C. Somatic embryogenesis and regeneration of maize/*Tripsacum* hybrids. **Maydica**, v.40, n.2, p.205-210, 1995.

GALASSO, I.; FREDIANI, M.; MAGGIANI, M.; CREMONINI, R.; PIGNONE, D. Chromatin characterization by banding techniques, in situ hybridization, and nuclear DNA content in *Cicer* L. (Leguminosae). **Genome**, v.39, n.2, p.258-265, 1996.

GILL, B. S.; FRIEBE, B.; ENDO, T.R. Standard karyotype and nomenclature system for description of chromosome bands and structural aberrations in wheat (*Triticum aestivum*). **Genome**, v.34, n.5, p.830-839, 1991.

GOMES, J.I. Estudo anatômico do xilema secundário das espécies de *Hevea* da Amazônia brasileira. Curitiba, 1981. 205p. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná.

GONÇALVES, P.S. Melhoramento genético da seringueira. In: Simpósio sobre a cultura da seringueira no Estado de São Paulo, Piracicaba, 1986, p.95-123.

GONÇALVES, P.S.; PAIVA, J.R.; SOUZA, R.A. Retrospectiva e atualidade do melhoramento genético da seringueira (*Hevea* spp) no Brasil e em países asiáticos. Manaus: EMBRAPA/CNPQ, 1983. 69p.

(Documentos, 2).

GONÇALVES, P.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**, v.18. n.7, p.789-796, 1983b.

GONÇALVES, P.S.; CARDOSO, M.; BOAVENTURA, M.A.M.; MARTINS, A.L.M.; LAVORENTI, C. Biologia, citogenética e ploidia de espécies do gênero *Hevea*. **O Agrônomo**, v.41, n.1, p.40-64, 1989.

GRAPIN, A.; MICHAUX-FERRIÈRE, N.; ETIENNE, H.; CARRON, M. P. Effects of hypoxia on induction and development of somatic embryos in *Hevea brasiliensis*. In: TEISSON, C. (Ed.). **In vitro culture of tropical plants**. Montpellier: CIRAD, 1994. p.23-25.

GUERRA, M.S. Estrutura e diversificação dos núcleos interfásicos em plantas. In: AGUIAR-PERECIN, M.L.R.; MARTINS, P. S.; BANDEL, G. (Ed.). Tópicos de citogenética e evolução de plantas - I Colóquio sobre citogenética e evolução de plantas. Piracicaba: RBG, 1984. p.137-153.

HARRY, I. S.; THORPE, T.A. *In vitro* culture of forest trees. In: VASIL, I.K.; THORPE, T.A. **Plant cell and tissue culture**. Netherlands: Kluwer 1994. cap.21, p.539-560.

- HERR JUNIOR., J.M. A new clearing-squash technique for the study of ovule development in angiosperms. **American Journal of Botany**, v.58, n.8, p.785-790, 1971.
- HEUSSER, C. The reproductive organs of *Hevea brasiliensis*. **Archief voor de Rubbercultuur in Nederlandsch-Indie**, v.3, n.11, p.455-514, 1919.
- HIRAI, K.; IRIFUNE, K.; TANAKA, R.; MORIKAWA, H. Molecular and cytological characterization of a highly repeated DNA sequence in *Raphanus sativus*. **Genome**, v.38, n.6, p.1237-1243, 1995.
- HOLMQUIST, G.P.; MOTARA, M.A. The magic of cytogenetic technology. In: OBE, G.; BASLER, A. (Ed.) **Cytogenetics** - basic and applied aspects. New York: Springer-Verlag, 1987. p.30-47.
- HOUSTI, F.; COUPÉ, M.; D'AUZAC, J. Effect of ethylene on enzymatic activities involved in the browning of *Hevea brasiliensis* callus. **Physiologia Plantarum**, v.83, n.3, p.445-450, 1992.
- IRIFUNE, K.; HIRAI, K.; TANAKA, R.; MORIKAWA, H. Nucleotide sequence of a highly repeated DNA sequence and its chromosomal localization in *Allium fistulosum*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.90, n.3/4, p.312-316, 1995.

JAHIER, J. (Ed.) **Techniques de cytogénétique végétale**. Paris: INRA, 1992, 184p.

JAIN, S.K. Male sterility in flowering plants. **Bibliografia Genética**, v.18, p.101-166, 1959.

JOURDAN, C.; ENJALRIC, F.; LARDET, L.; MICHAUX-FERRIÈRE, N.; BERGER, A.; CARRON, M.P. Micropropagation of *Hevea brasiliensis*: hydric characteristics. In: TEISSON, C. (Ed.). **In vitro culture of tropical plants**. Montpellier: CIRAD, 1994. p.27-30.

KASAHARA, S.; SILVA, A.P.Z.; HADDAD, C.F.B. Chromosome banding in three species of Brazilian toads (Amphibia - Bufonidae). **Brazilian Journal of Genetics**, v.19, n.2, p.237-242, 1996.

KÖHLER, B.; GUTTENBERGER, H.; BORZAN, Z. Giemsa C-banding pattern of the chromosomes in the macrogametophyte of Norway Spruce. **Silvae Genetica**, v.45, n.1, p.16-21, 1996.

LARDET, L.; ENJALRIC, F.; CARRON, M.P. Culture d'apex d'*Hevea brasiliensis* (Müell. Arg.). Influence du stade morphogénétique et de l'âge des explants. **Comptes Rendus de la Academie des Sciences Paris**, n.310, p.195-202, 1990.

LECONTE, A. La reproduction sexuee de l'*Hevea brasiliensis*. **Revue Générale des Caoutchoucs et Plastiques**, n.69, p.70-74, 1984.

MACHADO, J. A. Pleiotropia do gene nuclear RF1 no sistema de esterilidade citoplasmática texas em milho (*Zea mays* L.) na síntese de antocianinas. Piracicaba, 1988. 176p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

MAHESHWARI, P. **An introduction to the embryology of angiosperms**. New york: McGraw-Hill, 1950. 453p.

MAJUMDER, S.K. Chromosome studies of some species of *Hevea*. **Journal of the Rubber Research Institute of Malaysia**, v.18, n.5, p.269-275, 1964.

MARATTUKALAM, J.G.; SARASWATHYAMMA, C.K. Propagation and planting. In: SETHURAJ, M.R.; MATHEW, N.M. (Ed.). **Natural rubber: biology, cultivation and technology**. Amsterdam: Elsevier, 1992. p164-199.

MARIANI, A.; TAVOLETTI, S.; VERONESI, F. Abnormal macrosporogenesis in five alfafa (*Medicago sativa*) mutants producing 4n pollen. **Theoretical and Applied Genetics**, v.85, n.6-7, p.873-881, 1993.

MATHEW, S.M. Physical and technological properties of natural rubber.

In: SETHURAJ, M.R.; MATHEW, N.M. (Ed.). **Natural rubber**: biology, cultivation and technology. Amsterdam: Elsevier, 1992. cap. 18, p.399-425.

MEDRADO, M. J. S. Fatores relacionados ao processo de propagação da seringueira (*Hevea* spp), em Piracicaba, SP. Piracicaba, 1992, 178p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

MENDES, L.O.T. Poliembrionia em *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. **Revista de Agricultura**, v.22, n.4/6, p.161-164, 1947.

MENEZES, O.B.; NUNES, W.O. Poliembrionia, brotação e multiplicação em *Hevea*. **Anuário Brasileiro de Economia Florestal**, n.11, p.244-249, 1959.

MICHAUX-FERRIÈRE, N.; CARRON, M.P. Histology of early somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*: the importance of timing of subculturing. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.19, p.243-256, 1989.

MICHAUX-FERRIÈRE, N.; GROUT, H.; CARRON, M.P. Origin and ontogenesis of somatic embryos in *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaceae).

American Journal of Botany, v.79, n.2, p.174-180, 1992.

MIURA, I. The late replication banding patterns of chromosomes are highly conserved in the genera *Rana*, *Hyla* and *Bufo* (Amphibia: Anura). **Chromosoma**, v.103, n.8, p.567-574, 1995.

MOHAMMED, G.H.; VIDAVER, W.E. Root production and plantlet development in tissue-cultured conifers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.14, n.3, p.137-160, 1988.

MONTORO, P.; ETIENNE, H.; CARRON, M.P. Embryogenèse somatique entretenue chez *Hevea brasiliensis*. **Revue de Cytologie et Biologie Végétale-Botanique**, v.17, p.113-119, 1994.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-407, 1962.

NARANJO, T. Chromosome structure of *Triticum longissimum* relative to wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, v.91, n.1, p.105-109, 1995.

NAZEER, M. A.; SARASWATHY AMMA, C. K. Spontaneous triploidy in *Hevea brasiliensis* (Willd. ex Adr. de Juss.) Muell. Arg. **Journal of Plantation Crops**, v.15, n.1, p.1-71, 1987.

OGBURIA, M.N.; ADACHI, T. Embryo sac morpho-structural analysis of developmental pathways of fertilization failure, seed abortion and poor germination in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Cytologia**, v.60, n.1, p.75-84, 1995.

OGBURIA, M.N.; ADACHI, T. Histological analysis of embryo-sac formation and detection of meiotic diplospory in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Euphytica**, v.88, n.1, p.9-16, 1996.

ONG, S. H. Chromosome morphology at the pachytene stage in *Hevea brasiliensis*: a preliminary report. In: **International Rubber Conference**, 1975, Kuala Lumpur. Proceedings. Kuala Lumpur, RRIM, v.2, p.3-12, 1976.

ORTOLANI, A.A. Agroclimatologia e o cultivo da seringueira. In: Simpósio sobre a cultura da seringueira no Estado de São Paulo, Piracicaba, 1986, p.11-32.

PADDOCK, E.F. On the number of chromosome in *Hevea*. **Chronica Botanica**, v.7, n.8, p.412-413, 1943.

PAPESCHI, A.G. Correspondence between C-banding and Ag-NOR in the sex chromosomes of *Belostoma oxyurum* (Belostomatidae, Heteroptera). **Japanese Mendel Society**, v.60, n.3, p.291-295, 1995.

- PARISE, P.P.; AVANCINI, R.M.P.; RECCO-PIMENTEL, S.M. Karyotypic characterization of *Muscina stabulans* (Fallen) (Diptera: Muscidae) using conventional staining, silver staining and C-banding. **Caryologia**, v.49, n.1, p.13-20, 1996.
- PARROTT, W.A.; HANNEMAN JR, R.E. Megasporogenesis in normal and a synaptic-mutant (sy-2) of *Solanum commersonii* Dun. **Genome**, v.30, p.536-539, 1988.
- PELLAN-DELOURME, R.; RENARD, M. Cytoplasmic male sterility in rapessed (*Brassica napus* L.): female fertility of restored rapeseed with “Ogura” and cybrids cytoplasms. **Genome**, v.30, p.234-238, 1988.
- PEREIRA, J. P. Formação de mudas de seringueira. In: Simpósio sobre a cultura da seringueira no Estado de São Paulo, Piracicaba, 1986, p.139-164.
- PERRIN, Y.; LARDET, L.; ENJALRIC, F.; CARRON, M.P. Rajeunissement de clones matures d'*Hevea brasiliensis* (Müell. Arg.) par microgreffage *in vitro*. **Canadian Journal of Plant Science**, v.74, n.3, p.623-630, 1994.
- PERRY, B.A. Chromosome number relationships in the genus *Euphorbia*. **Chronica Botanica**, v.7, n.8, p.413-414, 1943.

PIGNONE, D.; GALASSO, I.; ROSSINO, R.; MEZZANOTTE, R. Characterization of *Dasypyrum villosum* (L.) Candargy chromosomal chromatin by means of *in situ* restriction endonucleases, fluorochromes, silver staining and C-banding. **Chromosome Research**, v.3, p.109-114, 1995.

PIRES, J.M. Revisão do gênero *Hevea*, descrição das espécies e distribuição geográfica. Belém: SUDHEVEA/DNPEA/IPEAN, p. 6-66. 1973. (Relatório anual)

PIRES, J.M. Notas de herbário I (*Hevea camargoana*). **Boletim do Museu Paraense Emilio Goeldi, Série Botânica**, Belém, v. 52, p. 1-11, 1981.

RAJAGOPAL, R.; DEVAKUMAR, A.S.; VIJAYAKUMAR, K.R.; ANNAMMA, Y.; RAO, G.G.; SETHURAJ, M.R. Cytomixis in *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A.D. de Juss.) Muell. Arg. **Indian Journal of Natural Rubber Research**, v.1, n.2, p.82-83, 1988.

RAMAER, H. Cytology of *Hevea*. **Genetica**, v.17, p.193-236, 1935.

ROSS, J.M. Chromosomes of *Hevea brasiliensis*. **Planter's Bulletin of the Rubber Research Institute of Malaysia**, v.41, p47, 1959.

RUBIO-CABETAS, M. J.; SOCIAS, R. Fertilisation assesment and

postzygotic development in several intra-and interspecific *Prunus* hybrids. **Euphytica**, v.90, n.3, p.325-330, 1996.

SARASWATHY AMMA, C.K.; MARKOSE, V.C.; LICY, J.; ANNAMMA, Y.; PANIKKAR, A.; BHASKARAN NAIR, V.K. Triploidy in *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. In: Inter. Rubber Conf., Índia, paper 8, 1980.

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**, v.55, n.2, p.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. ex Adr. de Juss.) Muell. Arg. **Cytologia**, v.55, n.4, p.547-551, 1990b.

SARRUGE, J.R. Soluções nutritivas. **Summa Phytopathologica**, v.1, p.231-233, 1975.

SAVIDAN, Y. Héredité de l'apomixie. Contribution a l'étude de l'héredité de l'apomixie sur *Panicum maximum* Jacq. (analyse des sacs embryonnaires). ORSTON, sér. Biol. X, v. 2, p. 91-95, 1975.

SAVIDAN, Y. Chromosomal and Embryological Analyses in sexual x Apomitic Hybrids of *Panicum maximum* Jacq. **Theoretical and Applied Genetics**, v.57, n.4, p.153-156, 1980.

SAVIDAN, Y. Embryological Analysis of Facultative Apomixis in *Panicum maximum* Jacq. **Crop Science**, v.22, n.3, p.467-468, 1982.

SENEVIRATNE, P.; WIJESEKARA, G.A.S.; ZOYSA, G.M. Acclimatization of micropropagated plants of *Hevea*. **Journal of the Rubber Research of the Institute of Sri Lanka**, v.73, n.1, p.20-30, 1993.

SENEVIRATNE, P.; WIJESEKARA, G.A.S. The growth phase and its effect on bud proliferation and growth of *in vitro* culture of *Hevea brasiliensis*. **Journal of the National Science Council of Sri Lanka**, v.22, p. 313-324, 1994.

SENEVIRATNE, P.; FLEGMANN, A. The effect of thidiazuron on axillary shoot proliferation of *Hevea brasiliensis in vitro*. **Journal of the Rubber Research of the Institute of Sri Lanka**, v.77, n.1, p.1-14, 1996.

SHEIKH, S. A.; KONDO, K.; HOSHI, Y. Study on diffused centromeric nature of *Drosera* chromosomes. **Cytologia**, v.60, n.1, p.43-47, 1995.

- SHEIKH, S. A.; KONDO, K. Comparative C-banding and fluorescent-banding analysis of seven species of *Drosera* (Droseraceae). **Cytologia**, v.61, n.4, p.383-394, 1996.
- SILVAROLA, M.B. Análise citológica de calos e plantas regeneradas *in vitro* de variedades de cana de açúcar (*Saccharum* spp). Piracicaba, 1989. 160p. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- SIMONDS, N.W. Rubber breeding. In: WEBSTER, C.C.; BAULKWILL, W.J. (Ed.). **Rubber**. cap. 3, p. 85-124, 1989.
- SOUZA, A.P. Estudo do caráter poliembrionia em milho (*Zea mays*, L.). Piracicaba, 1987. 172p. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- STELLY, D.M.; PELOQUIN, S.J.; PALMER, R.G.; CRANE, C.F. Mayer's hemalum-methyl salicylate: a stain-clearing technique for observation within whole ovules. **Stain Technology**, v.59, n.3, p.155-161, 1984.
- SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, v.75, p.304-306, 1972.
- SYBENGA, J. Aneuploid and other cytological tester sets in rye. **Euphyti-**

ca, v.83, n.1, p.53-61, 1995.

TANAKA, R.; TANIGUCHI, K. A banding method for plant chromosomes. **Japanese Journal of Genetics**, v.50, n.2, p.163-167, 1975.

TLASKAL, J. Cycloheximide and 8-hidroxyquinoline pretreatment for study of plant chromosomes. **Stain Technology**, v. 54, p. 313-319, 1980.

TEISSON, C.; ALVARD, D.; CÔTE, F.X.; BERTHOUTY, M.; LARTAUD, M. *In vitro* culture by temporary immersion. In: TEISSON, C. (Ed.). ***In vitro* Culture of Tropical Plants**. Montpellier: CIRAD, 1994, p.7-10.

TEISSON, C.; ALVARD, D.; BERTHOULY, M.; COTE, F.; ESCALANT, J.V.; ETIENNE, H. Culture *in vitro* par immersion temporaire: un nouveau récipient. **Plant Recherche et Devellopment**, v.2, n.5, p.29-33, 1995.

THORPE, T.A. Morphogenesis and regeneration. In: VASIL, I.K.; THORPE, T.A. (Ed.) **Plant cell and tissue culture**. Netherlands: Kluwer, 1994. cap. 2, p.17-36.

THORPE, T.A.; HARRY, I.S.; KUMAR, P.P. Application of micropropagation to forestry. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (Ed.)

Micropropagation: technology and application. Netherlands: Kluwer. 1991. cap. 20, p.311-336.

UCHINO, A.; WANG, L. Comparision of cold-sensitive and C-banded segments of chromosomes in *Paris tetraphylla* A. Gray. **Cytologia**, v.61, n.3, p.321-325, 1996a.

UCHINO, A.; WANG, L. Comparision of cold-sensitive and C-banded segments of chromosomes in Trilliums. **Cytologia**, v.61, n.4, p.415-422, 1996b

VARGHESE, Y.A. Germplasm resources and genetic improvement. In: SETHURAJ, M.R.; MATHEW, N.M. **Natural rubber:** biology, cultivation and technology. Netherlands: Elsevier, 1992. cap. 5, p.88-115.

VEISSEIRE, P.; LINOSSIER, L.; COUDRET, A. Effect of abscisic acid and cytokinins on the development of somatic embryos in *Hevea brasiliensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.39, n.3, p.219-223, 1994.

WARMKE, H.E. Cytological studies in *Hevea*. **Report of Federal Experiment Station in Puerto Rico**, p.11-12, 1950.

WARMKE, H.E. Studies on pollination of *Hevea brasiliensis* in Puerto Ri-

- co. **Science**, v.113, p.646-648, 1951.
- WARMKE, H.E. Studies on natural pollination of *Hevea brasiliensis* in Brazil. **Science**, v.113, p.474-475, 1952.
- WEI, J.; CAMPBELL, W.F.; SCOLES, G.J.; SLINKARD, A.E.; WANG, R.R. Cytological identification os some trisomics of Russian wildrye (*Psathyrostachys juncea*). **Genome**, v.38, n.6, p.1271-1278, 1995a.
- WEI, J.; CAMPBELL, W.F.; WANG, R.R.C. Standard Giemsa C-banded karyotype of Russian wildrye (*Psathrostachys juncea*) and its use in identification of a deletion-translocation heterozygote. **Genome**, v.38, n.6, p.1262-1270, 1995b.
- WILSON, H.M.; STREET, H.E. The growth, anatomy and morphogenetic potential of callus and cell suspension cultures of *Hevea brasiliensis*. **Annals of Botany**, v.39, n.2, p.671-682, 1975.
- WILSON, H.M.; EISA, M.Z.; IRWIN, S.W.B. The effects of agitated liquid medium on *in vitro* cultures of *Hevea brasiliensis*. **Physiologia Plantarum**, v.36, p.399-402, 1976.
- WYCHERLEY, P.R. The genus *Hevea* - Botanical aspects. In: SETHURAJ, M.R.; MATHEW, N.M. (Ed.). **Natural rubber**: biology, cultiva-

tion and technology. Amsterdam: Elsevier, 1992. cap.3, p.50-66.

YOON, P.K.; LEONG, S.K. Induction of pseudo-taproots of cutlings and production of clonal rootstocks in *Hevea*. **International Rubber Conference**, 1975. Kuala Lumpur. Proceedings, RRIM, v. 2, p. 85-108, 1976.

YOUNG, B.A.; SHERWOOD, R.T.; BASHAW, E.C. Cleared-pistil and thick-sectioning techniques for detecting aposporous apomixis in grasses. **Canadian Journal of Botany**, v.57, p.1668-1672, 1979.

ZHONG, S.B.; ZHANG, D.Y.; LI, H.B.; YAO, J.X. Identification of *Haynaldia villosa* chromosomes added to wheat using a sequential C- banding and genomic in situ hybridization technique. **Theoretical and Applied Genetics**, v.92, n.1, p.116-120, 1996.

APÊNDICE 1

Composição química da Solução de SARRUGE (1975), em ml/l:

KH_2PO_4 1M	- 01
KNO_3 1M	- 05
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1M	- 05
MgSO_4 1M	- 01
Fe EDTA	- 01
Micronutrientes	- 01

Composição da solução de micronutrientes (g/l):

H_3BO_3	- 2,86
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	- 1,81
ZnCl_2	- 0,10
CuCl_2	- 0,04
$\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	- 0,02

A solução de Fe-EDTA foi preparada dissolvendo-se 26,1g de EDTA dissódico em 286ml de NaOH 1N e misturando-se com 24,9g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Foi arejada por uma noite e completada a um litro.

APÊNDICE 2

Composição do meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962)

Componentes	Quantidade - mg/l
MACRONUTRIENTES	
NH ₄ NO ₃	1650,00
KNO ₃	1900,00
CaCl ₂ .2H ₂ O	440,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	370,00
KH ₂ PO ₄	170,00
FeEDTA	38,30
MICRONUTRIENTES	
H ₃ BO ₃	6,20
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,30
ZnSO ₄ .7H ₂ O	10,60
KI	0,83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025

REGULADORES DE CRESCIMENTO E SUPLEMENTOS ORGÂNICOS

Inositol	99,00
Cisteína	39,40
Vitaminas	
Tiamina	5,06
Piridoxina	3,84
Ácido Nicotínico	0,92
Pantotenato de cálcio	2,50
Hidrolisado de caseína	20,00
Sacarose	20000,00

APÊNDICE 3

Comprimento total (CT) em micrômetros e Relação de braços (RB) dos 36 cromossomos, em dez células de GT 1, numerados por tamanho

Células	1		2		3		4		5	
N	CT	RB	CT	RB	CT	RB	CT	RB	CT	RB
1	1,82	1,38	2,05	2,90	2,21	2,82	2,00	1,24	1,74	1,54
2	1,82	1,56	1,89	1,25	2,18	4,53	1,89	1,25	1,68	1,56
3	1,79	1,19	1,87	1,37	2,11	1,29	1,87	2,55	1,63	1,14
4	1,71	1,41	1,84	1,33	2,03	1,66	1,76	1,48	1,55	1,03
5	1,66	1,10	1,82	2,83	1,92	1,21	1,71	3,64	1,55*	2,11
6	1,63	1,21	1,79	1,62	1,89	1,48	1,71	1,60	1,42*	2,86
7	1,60	1,18	1,74	1,36	1,84	1,33	1,71	1,60	1,55	2,47
8	1,60	2,21	1,71	1,24	1,82	1,30	1,68	1,91	1,53	1,90
9	1,58	1,00	1,63	1,07	1,79	1,34	1,68	1,91	1,58	2,00
10	1,58	1,86	1,60	1,03	1,76	1,23	1,66	1,74	1,45	2,68
11	1,55	4,36	1,58	1,50	1,76	1,68	1,66	1,74	1,45	1,20
12	1,55	2,69	1,58	1,00	1,68	1,56	1,61	1,18	1,37	1,36
13	1,55*	3,33	1,55	1,46	1,68	1,67	1,60	1,18	1,39	1,65
14	1,53	1,07	1,53	2,05	1,66	2,00	1,60	1,18	1,37	1,00
15	1,53	2,22	1,53	2,05	1,66	1,03	1,60	1,18	1,34	1,43
16	1,45*	2,67	1,53	1,90	1,66	1,10	1,58	1,00	1,32	1,50
17	1,45	1,17	1,53	1,90	1,60	2,05	1,58	1,40	1,32	1,50
18	1,39	1,65	1,53	1,23	1,58	2,00	1,55	1,68	1,32	1,27
19	1,37	1,36	1,45	1,50	1,58	2,16	1,42	1,35	1,29	1,45
20	1,37	2,72	1,39	1,52	1,58	1,00	1,39	1,36	1,26	1,40
21	1,37	3,33	1,37	1,48	1,58	1,40	1,39	1,41	1,26	—
22	1,34	1,43	1,37	1,60	1,47	2,11	1,34	1,68	1,24	4,22
23	1,34	—	1,34	2,92	1,45	1,75	1,32	—	1,18	1,50
24	1,32	1,63	1,32	1,50	1,45	1,20	1,32	1,78	1,18	1,65
25	1,32	1,50	1,26	1,40	1,37	2,47	1,29	—	1,10	1,62
26	1,21	1,71	1,26	2,69	1,34	3,64	1,29	1,58	1,05	—
27	1,21	1,30	1,24	2,36	1,32	1,50	1,26	1,67	1,03	1,29
28	1,18	2,00	1,21	1,77	1,32	1,50	1,24	1,61	1,00	1,11
29	1,11	1,22	1,21	1,71	1,32	—	1,21	2,83	0,97	2,70
30	1,05	1,29	1,16	1,44	1,26	3,80	1,13	1,15	0,97	1,18
31	1,03	2,55	1,03	2,00	1,26	1,53	1,10	1,10	0,95	1,57
32	1,03	1,69	1,03	2,55	1,16	1,93	1,05	2,64	0,95	1,00
33	0,92	1,43	1,03	1,17	1,16	2,58	1,00	1,11	0,92	2,18
34	0,92	1,33	0,97	1,06	1,13	1,93	0,97	1,18	0,87	1,54
35	0,89	2,01	0,92	1,69	1,03	1,79	0,87	1,54	0,82	—
36	0,87	—	0,87	1,20	0,89	1,62	0,84	1,68	0,79	2,00
Médias	1,38		1,44		1,57		1,44		1,26	

APÊNDICE 3 (Continuação)

Células	6		7		8		9		10	
N	CT	RB	CT	RB	CT	RB	CT	RB	CT	RB
1	1,68	1,28	1,92	1,21	2,13	1,45	1,82	1,38	1,79	2,58
2	1,66	1,25	1,84	2,50	1,76	1,91	1,79	2,24	1,66	1,86
3	1,63	2,10	1,82	1,09	1,76	2,35	1,76	1,39	1,66	1,03
4	1,63	2,26	1,82	1,76	1,71	1,60	1,74	1,20	1,63	1,95
5	1,63	1,07	1,79	2,22	1,66	1,33	1,71	2,61	1,55	1,27
6	1,61	1,18	1,76	1,09	1,63	1,70	1,71	1,32	1,55	1,03
7	1,58	2,00	1,71	2,25	1,61	1,10	1,53	2,05	1,53	1,23
8	1,58	1,14	1,71	1,50	1,61	2,21	1,53	1,07	1,48	2,67
9	1,58	1,00	1,68	2,20	1,58	2,00	1,53	1,64	1,47	2,11
10	1,53	1,90	1,68	1,56	1,53	1,90	1,50	1,11	1,47	2,11
11	1,53	2,05	1,66*	2,15	1,47	2,11	1,50	1,37	1,42	1,45
12	1,53	2,05	1,63	1,48	1,47	4,09	1,50	2,17	1,39	1,65
13	1,53*	1,90	1,63	1,58	1,47	1,55	1,47	2,11	1,39	1,65
14	1,50	2,00	1,63	1,48	1,45	2,67	1,42	2,18	1,39	1,12
15	1,50	2,17	1,63	1,82	1,45	1,50	1,39	3,08	1,37	1,36
16	1,50	1,11	1,58	2,00	1,39	1,30	1,39	1,30	1,34	1,55
17	1,47	1,24	1,58	2,00	1,37	3,73	1,39	3,08	1,32	1,50
18	1,45	1,75	1,55	1,95	1,37	1,48	1,37	1,60	1,29	1,33
19	1,42*	2,18	1,55	1,57	1,32	1,50	1,34*	1,83	1,29	1,45
20	1,42	1,45	1,53	1,90	1,32	1,78	1,32	1,50	1,24	1,35
21	1,39	1,65	1,50	1,48	1,29	1,45	1,32	1,50	1,21	1,30
22	1,39	1,65	1,50	1,37	1,29	1,72	1,32	1,50	1,18	2,00
23	1,39	1,41	1,50	1,37	1,29	3,08	1,29	1,45	1,11	1,33
24	1,29	1,45	1,47	2,50	1,24	1,61	1,29	1,45	1,08	1,56
25	1,29	1,33	1,42	1,45	1,21	2,07	1,24	1,61	1,08	1,41
26	1,13	2,58	1,34	—	1,16	1,59	1,21	1,87	1,05	2,08
27	1,13	2,07	1,32	1,50	1,11	2,50	1,21	1,87	1,03	—
28	1,13	—	1,29	1,45	1,08	—	1,13	1,39	1,00	2,45
29	1,03	—	1,26	2,69	1,05	1,22	1,05	—	0,92	1,69
30	1,10	1,10	1,24	1,47	1,03	1,05	1,03	—	0,89	1,43
31	1,05	1,11	1,13	2,12	1,03	1,05	1,00	1,00	0,89	—
32	1,05	1,50	1,11	1,33	1,00	—	0,92	1,33	0,87	1,54
33	1,03	1,29	1,11	2,50	0,92	—	0,84	—	0,87	—
34	1,03	1,17	1,08	1,41	0,84	1,46	0,82	2,10	0,84	2,20
35	1,00	1,11	1,05	—	0,82	1,38	0,82	—	0,84	1,91
36	0,92	1,06	1,05	1,22	0,63	1,40	0,79	—	0,84	—
Médias	1,37		1,41		1,33		1,33		1,25	

Obs.: * marcam cromossomos satelitados

— cromossomos que não permitiram identificação de centrômero

dos mesmos. A 8-hidroxiquinolina inibe o fuso mitótico, mantendo as células em metáfase. Contrai somente os cromossomos metafásicos e mantém a morfologia dos mesmos (Tlaskal, 1980).

As avaliações realizadas em grande número de células de muitos meristemas radiculares mostraram que, nos três clones estudados, os cromossomos apresentaram compactação variável, o que impediu uma padronização que possibilitasse a determinação dos cariótipos, nos moldes convencionais. Não raro, numa mesma célula metafásica pôde-se notar cromossomos com maior e menor grau de compactação. Um exemplo disto pode ser visto na Figura 1. A comparação entre células tornou o fato ainda

Figura 1 - Célula meristemática do clone GT 1 com cromossomos com graus diferentes de contração (setas). A barra representa 3 μ m.