ORGANOGÊNESE EM MERISTEMA APICAL DO CAULE DE SERINGUEIRA (*Hevea* spp)[1]

Vicente H.F. Moraes[2]

RESUMO

Os poliplóides de seringueira mantêm o mesmo grau de resistência às doenças das folhas do clone diplóide original, com um esperado aumento substancial de produtividade, ao contrário dos clones obtidos por cruzamentos, em que a regra geral é a redução da resistência com o aumento da produvididade. São válidos, portanto, esforços no sentido de um melhor conhecimento do meristema apical, como suporte ao estabelecimento de técnicas de poliploidização cujos resultados sejam menos erráticos que os atuais. São pertinentes, sob esse aspecto, as seguintes características determinadas até a presente fase de estudo em andamento:

- Ausência de centro quiescente (meristema "d'attente"), provavelmente em função do formato achatado do promeristema durante todas as fases do desenvolvimento apical.

- Relativa uniformidade de tamanho de promeristema em suas fases de atividade e re

---

[1] Trabalho realizado com a participação financeira do Convênio SUDHEVEA/EMBRAPA.

[2] Engº Agrº., Pesquisador do Centro Nacional de Pesquisas da Seringueira, Cx. Postal 319. 69.000- Manaus (AM).

pouso, contendo ao redor de 10.000 células com 1,00m a 1,50m de altura.

- Formação de primórdios de gemas axilares com distância plastocrônica de quatro a seis primórdios foliares.

- Ausência de periodicidade mitótica, com Índice Mitótico entre 4% e 5% durante um ciclo de 24 horas.

- Organogênese mais ativa atéo início da fase de rápido alongamento caulinar.

ABSTRACT

ORGANOGENESIS IN THE APICAL MERISTEM OF (Hevea spp)

The polyploids of Hevea keep the same degree of resistance to leaf diseases as the original diploid clone, with an expected substancial increase in productivity, unlike the clones obtained thorough crosses whose increase in productivity is generally associated to a decrease in disease resistance. It is therefore worthwile to obtain a better understanding of the apical meristem of Hevea, as a support to the establisment of polyploidization methods with less erratic results. The following characteristics, determined up to the present state of a current research, are considered pertinent:

- Absence of a quiescent centre (meristem d'attente) probably as a result of the flat shape of the promeristem throughout the different developmental stages of the shoot apex.

- Uniformity of size of the promeristem in both resting and active apices, with aproximately 10.000 cells in plants 1.00m to 1.50m high.

- Appearance of axillary bud primordia with a plastochronic distance of 4 - 6 leaf primordia.

- Absence of mitotic periodicity, with a Mitotic Index between 4 to 5% during a 24 hours cycle.

- Most active organogenesis up to the beginning of the rapid shoot elongation.

INTRODUÇÃO

MENDES (1946), com base nos resultados de GUNVERY (1935), foi o primeiro a sugerir a idéia da indução de poliploidia em seringueira para o aumento da produtividade de látex. No Brasil, MENDES (1977), com técnica semelhante à de DENNE (1966), para a poliploidização de Trifolium repens, e de SEBASTIAMPILLAI (1976), para a poliploidização de Tea sinensis, conseguiu um certo número de poliplóides do clone IAN 873, ainda não testados em sangria em condições de árvores adultas, porém com elevados índices de produtividade em testes precoces de curta duração MENDES (1977); EMBRAPA (1978).

Na Malásia, SHEPHERD (1969) obteve também poliplóides a partir de clones e de plântulas de seringueira com quatro a dez dias após a germinação, na Estação Experimental de Prang Besar. As árvores adultas desses poliplóides, submetidas à sangria, vêm apresentando graves defeitos de regeneração de casca e de esgotamento fisiológico VASQUEZ CORTEZ (1979), comunicação pessoal.

Em todos esses casos, a percentagem de sucesso dos tratamentos para poliploidização tem sido muito baixa e o mesmo ocorreu com as tentativas feitas no Centro Nacional de Pesquisa da Seringueira, nas quais empregou-se técnica semelhante à de MENDES (1946, 1977), DENNE (1966) e SEBASTIAMPILLAI (1976), com a inclusão de agentes penetrantes à solução aquosa de colchicina e, em alguns casos, prévio tratamento das gemas e da haste clonal com cinetina (furfurilaminopurina).

Nesse esforço para a obtenção de poliplói

des de seringueira tem-se concentrado a atenção na técnica de introdução de colchicina nos ápices caulinares com muito pouca preocupação quanto aos detalhes específicos de estrutura e funcionamento do próprio meristema apical do caule da seringueira. Considerando que essa tendência tem sido a causa primária da baixa frequência de sucesso dos tratamentos e das decepções posteriores, provavelmente devidas à mixoploidia, decidiu-se estudar mais profundamente o meristema apical da seringueira, tendo como ponto de apoio a expressiva literatura existente sobre esse assunto para outras espécies, tal como a compilada nas revisões de CUTTER (1965), GIFFORD e CARSON (1971) e WILLIAMS (1975), entre outras, e como ponto de partida as informações de HALLE e MARTIN (1968) sobre o meristema apical do caule da seringueira, em trabalho voltado para a periodicidade de crescimento do caule.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o estudo da sequência de formação de primórdios foliares e de primórdios de gemas axilares, foram coletados ápices de plantas com altura de 1,00m a 1,50m, dos clones IAN 717 (H. brasiliensis x benthamiana), IAN 873 (H. brasiliensis) e Fx 3864 (H. brasiliensis).

Para cada um dos estágios foliares, A, B, C e D, foram estudados cinco ápices de cada um desses clones, com dissecação sob binocular estereoscópica e observação sobre a forma de aparecimento dos primórdios de gema axilar visíveis, em relação com o número de primórdios fo-

liares pré-formados.

O Índice Mitótico (percentagem de células em mitose, em relação ao total de células) foi determinado de acordo com o método descrito por CLOWES (1961). Foram feitas determinações desse índice em amostras de três meristemas colhidas entre 9;00 e 10;00 horas da manhã, para cada fase A, B, C e D de estágio foliar, compreendendo o promeristema e os primórdios que o envolvem, com exclusão do meristema subapical.

As determinações do Índice Mitótico do promeristema, num ciclo de 24 horas, a intervalos consecutivos de três horas, foram feitas em ápices no estágio A de plantas de viveiro (provavelmente H. brasiliensis) com dez meses de idade. Esse mesmo tipo de material serviu para determinação do tamanho do promeristema (comprimento e largura em cortes medianos). Foram coletados 20 ápices de plantas de viveiro com altura homogênea, ao redor de 1,80m, em cada uma das seguintes fases: A_1 - início de intumescimento da gema apical; A_2 - abertura das escamas protetoras; A_3 - ápices com cerca de 5mm de crescimento longitudinal. Esse material foi fixado em Nava - shin de Belling (JOHANSEN, 1940), tendo sido medidos com paquímetro os dois diâmetros máximos a partir das escamas protetoras originais.

Em secções medianas feitas a mão livre , foram medidas, em micróscopio com ocular micrométrica, a distância entre os dois primórdios foliares mais jovens e a largura da faixa do promeristema. As comparações em teste estatístico basearam-se nos valores obtidos da multiplicação do comprimento pela altura do promeristema.

Para efeito de comparação mais grosseira, esse mesmo procedimento foi repetido nos estágios foliares B_1, B_2, C e D, em amostras de apenas cinco ápices por estágio.

Para efeito de reprodutividade dos resultados, deve ser esclarecido que as amostras dos ápices caulinares foram colhidas na posição intermediária dos intervalos de cada estágio, com exceção de pequena amostragem para determinação de atividade mitótica em ápices prestes a iniciar a abertura das escamas.

RESULTADOS

- Formato do promeristema: Em todos os estágios foliares nos três clones estudados, o promeristema apresenta-se achatado, e situa-se ligeiramente abaixo dos primórdios jovens, afastados consecutivamente para os lados e formando em vista de topo um ângulo de aproximadamente 120º entre si. Com o crescimento longitudinal, os primórdios já diferenciados passam a ocupar posições abaixo do nível do promeristema. O mesmo formato do promeristema foi encontrado em plantas de viveiro (pés-francos) e em gemas axilares dormentes em início de brotação.

- Sequência de formação dos primórdios de gemas axilares: O primeiro primórdio visível de gema axilar é procedido de quatro a seis primórdios foliares (distância plastocrônica). Algumas células da base do primórdio foliar permanecem meristemáticas e dão origem aos primórdios das gemas. Os primeiros primórdios foliares recém-formados aparecem a partir do início do estágio A, que se caracteriza

como a fase organogênica mais ativa. No estágio B_1 há redução da organogênese, sendo interrompida a formação de novos primórdios a partir da fase de mais rápido alongamento caulinar (B_2).

- Índices Mitóticos em diferentes estágios foliares: A Tabela 1 contém as medidas obtidas de três meristemas por clone com contagens em onze secções medianas de dez micra por meristema. Nos estágios B_1 e B_2 predominam as mitoses nos primórdios foliares e de gemas axilares.

- Índice Mitótico durante um ciclo de 24 horas: Não se verificou periodicidade mitótica, de acordo com os dados da Tabela 2. As diferenças entre médias não foram significativas ao nível de 0,5%.

- Variações de tamanho durante o estágio A: A Tabela 3 apresenta as médias dos resultados obtidos. As diferenças de diâmetro médio externo são altamente significativas entre A_1 e A_2 e A_2 e A_3. Para as dimensões do promeristema' (área), há diferença significativa, ao nível de 0,5%, apenas entre A_1 e A_3. Com base no tamanho médio do promeristema, calculado como o volume de um cilindro, e no tamanho médio das células, estimou-se que o promeristema das plantas com a mesma altura e vigor dos indivíduos estudados deve conter cerca de 10.350 ± 678 células.

- Ausência de centro quiescente: Em nenhuma das seções estudadas para a contagem de mitose foi encontrada qualquer evidência de centro quiescente (meristema "d'attente").

- Tamanho do promeristema nos estágios B, C e D: Em ápides caulinares de diâmetro externo do mesmo tamanho dos estudados no estágio A (Tabela 3) também não foi encontrada grande variação de tamanho do promeristema (Tabela 4).

- Constituição histogênica do promeristema: A proposição de estrutura "tunica-corpus" ajusta-se ao promeristema da seringueira, que nas plantas estudadas é composto de uma camada de dez a doze células. Não é possível porém delimitar com precisão o número de camadas da túnica e do "corpus", uma vez que nas posições onde se devem formar os novos primórdios são encontradas divisões periclinais' mais próximas à superfície, reduzindo-se a túnica a 2 - 3 camadas onde as divisões são sempre anticlinais.

- Reinício de atividade mitótica após a dormência: Em gemas com topo alargado, mas com escamas externas ainda fechadas, portanto classificadas como no final do estágio D, já é bastante nítida a atividade mitótica.

DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho confirmam as informações de HALLÉ e MARTIN (1968) quanto à predominância da atividade organogênica e da atividade mitótica do promeristema no estágio A.

O formato achatado do promeristema, semelhante ao descrito para Helianthus, LYNDON (1976), GINKGO e CYCAD (ESAU, 1953), torna difícil a exclusão cirúrgica de suas camadas externas conforme a técnica descrita por MENDES (1977) com base numa suposta forma acuminada.

As dimensões do promeristema, apesar de relativamente pequenas (em média 260 micra de largura por 100 micra de altura), correspondem a um grande número de células com mitose não sincronizada e mesmo sem qualquer tendência de periodicidade mitótica diária, o que está de acordo com o padrão geral da maioria das plantas (JACOB e MORROW (1961); GIFFORD e CARSON (1971); LYNDON (1976) e BERNIER (1977). Essas condições tornam extremamente difícil a poliploidização homogênea de todas as células da camada organogênica (promeristema), devendo a atenção ser concentrada nas gemas axilares neoformadas após a aplicação da colchicina. É importante nesse particular o fato de que a "distância plastocrônica" para o aparecimento dos primórdios das gemas axilares é de quatro a seis primórdios foliares. Igual raciocínio aplica-se para o tratamento de gemas axilares, embora, nesse caso, o tamanho do promeristema seja menor que o das gemas apicais.

Isso explica porquê nem sempre se obtém brotações poliplóides da gema axilar de uma folha com características poliplóides formadas por gemas tratadas com colchicina. Pode ter havido polipoidização apenas do primórdio foliar, mas não da gema axilar, que se forma depois. Nesses casos, há maior probabilidade de se encontrar brotações poliplóides de gemas axilares situadas em folhas mais abaixo.

Dirigindo-se a atenção para as gemas axilares, fica-se menos distante da situação descrita por BROETJES (1974), em que facilmente obtém-se poliplóides de gemas adventícias de Begonia formadas a partir de uma única célula. Gemas adventícias são formadas da cicatriz

de brotações podadas de porta-enxertos jovens de seringueira, mas não de clones enxertados.

Infere-se também que o tratamento de gemas nas primeiras fases do estágio A não deve ser eficiente , sendo mais lógico aguardar a plena expressão do estágio A (abertura total das escamas protetoras e aparecimento dos primeiros primórdios verdes-claros dos catáfilos), quando já ocorreu a iniciação dos primeiros primórdios das gemas axilares. Aparentemente mais como uma contingência de ajuste às técnicas de aplicação da colchicina, os métodos descritos de poliploidização estão corretos quanto a esse detalhe.

A ausência no promeristema de zona de células com menor atividade mitótica ("meristeme d'attente") BUVAT (1955) é fator favorável à obtenção de poliplóides homogêneos. De acordo com LYNDON (1976), os ápices achatados têm crescimento isotrópico e o centro quiescente seria consequência da geometria triangular dos ápices acuminados.

A alteração inexpressiva de tamanho do promeristema durante um ciclo de crescimento, em comparação com aumentos de até quatro vezes em especies de ápices acuminados PARKE (1959); CANNELL (1978), mostra que as fases de dormência do ápice não são devidas à redução do volume da camada organogênica.

CONCLUSÕES

- As informações contidas neste trabalho podem contribuir para a orientação e maior eficiência das técnicas de obtenção de poliplóides da seringueira.

- Considerando-se que, nos clones poliplói - des, não havendo alteração do genoma, a maior produtividade por sangria não é acompanhada de redução da resistên - cia a doenças, como no caso dos clones obtidos por cruzamentos, serão válidos os esforços para um melhor controle da ação da colchicina, particularmente no tocante à indução de sincronização das mitoses, através de agentes químicos CLOWES, (1965) ou redução da intensidade luminosa' LYNDON (1976).

Tabela 1 - Índice Mitótico (%) em diferentes estágios foliares (promeristema + primórdios) e de clones de seringueira. Manaus (AM), 1980.

CLONES	ESTÁGIO				
	A	B_1	B_2	C	D
IAN 717	5,3	2,3	0,8	0	0
IAN 873	4,1	2,2	1,1	0	0
Fx 3864	4,5	1,8	0,7	0	0

Tabela 2 - Índice Mitótico durante um ciclo de 24 horas, em meristemas de seringueira no estágio A. Manaus (AM), 1980.

HORAS	9	12	15	18	21	24	03	06
I.M.%	4,5	4,4	4,3	4,2	4,3	4,5	4,7	4,0

Tabela 3 - Diâmetro médio externo dos ápices caulinares - (DME) e área do promeristema (AP) em três fases do estágio A de clones de seringueira. Manaus (AM), 1980.

F A S E S	DME (mm)	AP (μ^2)
A_1	5,77	24.756,2
A_2	6,03	26.255,6
A_3	6,51	27.000,0

Tabela 4 - Área do promeristema (AP) nos estágios B, C e D de clones de seringueira. Manaus (AM),1980.

E S T Á G I O S	AP (μ^2)*
B	26.639,2
C	24.763,2
D	25.139,6

* Médias de cinco ápices.

LITERATURA CITADA

BERNIER, G. Absence of rythmic response of the shoot apex of Sinapis abba to applied cytokinin. Ann. Bot. 41: 1089-1090, 1977.

BROETJES, C. Production of polyploids by the adventitious bud technique. In: International Atomic Energy Agency. Polyploidy and induced mutation in plant breeding, Viena, 1974, p. 29 - 34.

BUVAT, R. Le méristème apicale de la tige. Annèe Biol., 31: 596 - 650, 1955.

CANNEL, M.G.R. Analysis of shoot apical growth of Picea sitchensis seedlings. Ann. Bot., 42 (182): 1291 - 1305, 1978.

CLOWES. F.A.L. Duration of the mitotic cycle in a meristem. J. Exp. Bot., 12: 283 - 293, 1961.

CLOWES, F.A.L. Synchronization in a meristem by 5-aminouracil. J. Exp. Bot., 16: 1965.

CUTTER, E.G. Recent experimental studies of the shoot apex and shoot morphogenesis. Bot. Rev., 31: 7-113, 1965.

DENNE, M.P. Morphological changes in the shoot apex of Trifolium repens L. 1 - Changes in the vegetative apex during the pastochron. New Zeland. J. Bot., 4: 300 - 311, 1966.

EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa da Seringueira. Programa de pesquisas com seringueira a cargo da Faculdade de Ciências Agrárias do Pará (FCAP) In: Relatório Anual 1977/78, Manaus, 1978, p. 04-36.

ESA , K. Plant anatomy. New York, John Wiley & Sons Inc.; Londres, Chapmam & Hall, 1953, 735 p.

GIFFORD, E.M. Jr. and CARSON, G.E. JR. The shoot apex in seed plants. Bot. Rev., 37: 143 - 229 , 1971.

GUNNERY, H. Yield prediction in Hevea: A study of sieve tube structure in relation to latex yield. J. Rubb. Res. Inst. Malaya, 6 (1): 8 - 20 , 1935.

HALLÉ, F. et MARTIN, R. Étude de la croissance rythmique chez l'hévea (Hevea brasiliensis) Mull-Arg. (Euphorbiacées - crotonidées). Adansonia, ser. 2. 8 (4): 475 - 503, 1968.

JACOB, W.P. and MORROW, I,B. A quantitative study of mitotic figures in relation to development in the apical meristem of vegetative shoots of Colens Develop. Biol., 3: 569-587, 1961.

JOHANSEN, D.A. Plant microtechnique. New York e Londres, McGraw Hill, 1940., 523 p.

LYNDON, R.F. The shoot apex In: YEOMANN, N.M. Cell division in higher plants. Londres, São Francisco, Ac. Press, New York, 1976, p. 285-312.

MENDES, L.O.T. Investigações preliminares sobre a duplicação do número de cromossomos da seringueira pela ação da colchicina. Belém, Instituto Agronômico do Norte, 1946, p. 28 (B. Téc. nº 7).

MENDES, L.O.T. Técnica para poliploidização da seringueira. I. Elastômeros . 3 (3): 3-10, 1977.

PARKE, R.V. Growth periodicity and the shoot tips of Abies concolor. Amer. J. Bot., 46: 110-118, 1959.

SEBASTIAMPILLAI, A.R. A simple technique for the induction of polypoids in tea. Tea Quarterly, 46 (182): 12-15 , 1976.

SHEPHERD, R. Induction of polyploidy in Hevea brasiliensis. Preliminary observation on trials conducted at Prang State. Rubb. Res. Inst. Malaya. Planter's Bulletin , (104): 248-252, 1969.

WILLIAMS, R.F. The shoot apex and leaf growth. Londres e New York, Cambridge Univ. Press, 1975. 258 p.