

# ORGANOGENESE EM MERISTEMA APICAL DO CAULE DE SERINGUEIRA<sup>1</sup>

VICENTE H.F. MORAES<sup>2</sup>

**RESUMO** - Os poliplóides de seringueira (*Hevea* sp.) 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 produtividade. São válidos, portanto, esforços no sentido de um melhor conhecimento do meristema apical da *Hevea*, 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: a. ausência de centro quiescente ("mérístème d'attente"), provavelmente em função do formato achatado do promeristema durante todas as fases do desenvolvimento apical; b. relativa uniformidade de tamanho do promeristema em suas fases de atividade e repouso, contendo ao redor de 10.000 células em plantas com 1 m a 1,50 m de altura; c. formação de primórdios de gemas axilares com distância plastocrônica de quatro a seis primórdios foliares; d. ausência de periodicidade mitótica, com índice mitótico entre 4% e 5%, durante um ciclo de 24 horas; e. organogênese mais ativa até o início da fase de rápido alongamento caulinar.

Termos para indexação: poliplóides, clone diplóide, centro quiescente, desenvolvimento apical, promeristema.

## ORGANOGENESIS IN THE APICAL MERISTEM OF HEVEA SP.

**ABSTRACT** - The polyploids of rubber tree (*Hevea* sp.) keep the same degree of resistance to leaf diseases of the diploid original clone, with an expected substancial increase in productivity, unlike the clones obtained through crosses whose increase in productivity is generally associated to a decrease in resistance. It is therefore worthwhile to make an effort towards a better understanding of the apical meristem of *Hevea* as a support to the establishment of polyploidization methods with less erratic results. Under this prospect, the following characteristics determined up to the present state of a current research are considered pertinent: a. absence of a quiescent centre ("mérístème d'attente"), probably as a result of the flat shape of the promeristem throughout the different developmental stages of the shoot apex; b. uniformity of size of the promeristem in resting and active apices, with approximately 10.000 cells in plants 1 m to 1.50 m high; c. appearance of axillary bud primordia with a plastochronic distance of four to six leaf primordia; d. absence of mitotic periodicity, with a mitotic index (between) 4 to 5% during a 24 hours cycle; e. most active organogenesis up to the beginning of the rapid shoot elongation.

Index terms: polyploids, diploid clone, quiescent centre, apical development, promeristem.

## INTRODUÇÃO

Mendes (1946), com base nos resultados de Gunnery (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 à de Sebastiaipillai (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, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária 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 de Seringueira e Dendê, nas quais empregou-se técnica seme-

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 8 de março de 1982. Trabalho realizado com a participação financeira do Convênio SUDHEVEA/EMBRAPA.

<sup>2</sup> Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup>. Pesquisador do Centro Nacional de Pesquisa de Seringueira e Dendê (CNPSP) - EMBRAPA, Caixa Postal 319, CEP 69000 - Manaus, AM.

lhante à de Mendes (1946, 1977), Denne (1966) e Sebastiampillai (1976), com a inclusão de agentes penetrantes na 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 poliplóides de seringueira tem-se concentrado a atenção na técnica de introdução da 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 aprofundadamente 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 Junior & Carson Junior (1971) e Williams (1975), entre outras, e como ponto de partida as informações de Hallé & 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 seqüência de formação de primórdios foliares e primórdios de gemas axilares, foram coletados ápices de plantas, com altura de 1 m a 1,50 m, dos clones IAN 717 (*H. brasiliensis* x *berthamiana*), 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 foliares 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 e 10 h 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 supapical.

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 deter-

minação do tamanho do promeristema (comprimento e largura em cortes medianos). Foram coletados 20 ápices de plantas de viveiro com altura homogênea, ao redor de 1,80 m, em cada uma das seguintes fases: A<sub>1</sub> - início de entumescimento da gema apical; A<sub>2</sub> - abertura das escamas protetoras; A<sub>3</sub> - ápices com cerca de 5 mm de crescimento longitudinal. Esse material foi fixado em Navashin 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 microscópio 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<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, C e D, em amostras de apenas cinco ápices por estágio.

Para efeito de reprodutibilidade 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 (Fig. 1), e situa-se ligeiramente abaixo dos primórdios jovens, afastados consecutivamente para os lados e formando em vista de topo um ângulo de aproximadamente 120° 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.

**Seqüência de formação dos primórdios de gemas axilares.** O primeiro primórdio visível de gema axilar é precedido 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<sub>1</sub> há redução da organogênese, sendo interrompida a formação de novos primórdios a partir da fase de mais rápido alongamento caulinar (B<sub>2</sub>).



FIG. 1. Corte longitudinal de meristema apical do caule de seringueira em fase organogênica.

**Índices mitóticos em diferentes estágios foliares.** A Tabela 1 contém as medidas obtidas de três meristemas por clone com contagens em onze seções medianas de dez micra por meristema. Nos estágios B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> 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<sub>1</sub> e A<sub>2</sub> e A<sub>2</sub> e A<sub>3</sub>. Para as dimensões do promeristema (área), há diferença significativa, ao nível de 0,5%, apenas entre A<sub>1</sub> e A<sub>3</sub>. 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  $10.350 \pm 678$  células.

TABELA 1. Índice mitótico (%) em diferentes estágios foliares (promeristema + primórdios) de clones de seringueira. Manaus, AM, 1980.

Clones	Estágio				
	A	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	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.

Fases	DME (mm)	AP ( $\mu^2$ )
A <sub>1</sub>	5,77	24.756,2
A <sub>2</sub>	6,03	26.255,6
A <sub>3</sub>	6,51	27.000,0

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

**Tamanho do promeristema nos estágios B, C e D.** Em ápices 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 túnica-carpus 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 carpus,

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

Estágios	AP ( $\mu^2$ )*
B	26.639,2
C	24.763,2
D	25.139,6

\* Médias de cinco ápices.

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 & 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 & Morrow 1961, Gifford Junior & Carson Junior 1971, Lyndon 1976 & 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 das gemas axilares, embora, nesse caso, o tamanho do promeristema seja menor que o das gemas apicais.

Isso explica por que nem sempre se obtêm brotações poliplóides da gema axilar de uma folha com características poliplóides formadas por gemas tratadas com colchicina. Pode ter havido poliploidização apenas do primórdio foliar, mas não da gema axilar, que se forma depois. Nesses casos, há maior probabilidade de 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 obtêm-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.

Inferese 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 verde-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 ("mérístème 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 conseqüência 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 espécies de ápices acuminados (Parke 1959, Cannel 1978), mostra que as fases de dormência do ápice

não são devidas à redução do volume da camada organogênica.

### CONCLUSÕES

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

2. Considerando-se que, nos clones poliplóides, não havendo alteração do genoma, a maior produtividade por sangria não é acompanhada de redução da resistência 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).

### REFERÊNCIAS

- BERNIER, G. Absence of rythmic response of the shoot apex of *Sinapis alba* to applied cytokinin. *Ann. Bot.*, 41:1089-90, 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. *Année Biol.*, 31:596-650, 1955.
- CANNEL, M.G.R. Analysis of shoot apical growth of *Picea sitchensis* seedlings. *Ann. Bot.*, 42(182): 1292-305, 1978.
- CLOWES, F.A.L. Duration of the mitotic cycle in a meristem. *J. Exp. Bot.*, 12(35):283-93, 1961.
- CLOWES, F.A.L. Synchronization in a meristem by 5-aminouracil. *J. Exp. Bot.*, 16(49):581-6, 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 plastochron. *N. Z. J. Bot.*, 4:300-11, 1966.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Seringueira, Manaus, AM. Programa de pesquisas com seringueira a cargo da Faculdade de Ciências Agrárias do Pará (FCAP). In: \_\_\_\_\_. Relatório anual 1977/78. Manaus, 1978. p.4-36.
- ESAU, K. *Plant anatomy*. New York, John Wiley & Sons Inc. 1953. 735p.
- GIFFORD JUNIOR, E.M. & CARSON JUNIOR, G.E. 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. Rubber Res. Inst. Malaya*, 6(1):8-20, 1935.
- HALLÉ, F. & MARTIN, R. Étude de la croissance rythmique chez l'hévéa (*Hevea brasiliensis*). *Mull.-Arg. (Euphorbiacées-crotonidées)*. Adansonia, ser. 2, 8(4):475-503, 1968.
- JACOB, W.P. & MORROW, I.B. A quantitative study of mitotic figures in relation to development in the apical meristem of vegetative shoots of *Coleus*. *Dev. Biol.*, 3:569-87, 1961.
- JOHANSEN, D.A. *Plant microtechnique*. New York, McGraw-Hill, 1940. 523p.
- LYNDON, R.F. The shoot apex. In: YEOMANN, N.M. *Cell. division in higher plants*. Londres, San Francisco, Ac. Press, 1976. p.285-312.
- MENDES, L.O.T. Investigações preliminares sobre a duplicação do número de cromossômios da seringueira pela ação da colchicina. Belém, Instituto Agrônômico do Norte, 1946. p.28. (Boletim Técnico, 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*. *Am. J. Bot.*, 46:110-8, 1959.
- SEBASTIAMPILLAI, A.R. A simple technique for the induction of polyploids in tea. *Tea Q.*, 46(182): 12-5, 1976.
- SHEPHERD, R. Induction of polyploids in *Hevea brasiliensis*. Preliminary observations on trials conducted at Prang Besar Estate. *Planters Bull.*, Rubber Res. Inst. Malaya, 104:248-52, 1969.
- WILLIAMS, R.F. *The shoot apex and leaf growth*. Londres, Cambridge Univ. Press, 1975, 258p.