

Nº 7

**Intercâmbio**

27 JUNHO, 1946

BOLETIM TÉCNICO

DO

INSTITUTO AGRONÔMICO DO NORTE

**Investigações preliminares sôbre a duplicação  
do número de Cromosomios da Seringueira  
pela ação da Colchicina**

POR  
**LUIZ O. T. MENDES**



INSTITUTO AGRONÔMICO DO NORTE  
BELEM — ESTADO DO PARÁ  
BRASIL

# MINISTÉRIO DA AGRICULTURA

Ministro — DR. MANUEL NETO CAMPELO JUNIOR

CENTRO NACIONAL DE ENSINO E PESQUISAS AGRONOMICAS

Diretor Geral — DR. HEITOR GRILLO

SERVICÓ NACIONAL DE PESQUISAS AGRONOMICAS

Diretor — DR. ALVARO BARCELÓS FAGUNDES, Ph. D.

**INSTITUTO AGRONÓMICO DO NORTE**

Diretor — FELISBERTO CARDOSO DE CAMARGO, Agrônomo

## SEÇÕES TÉCNICAS

### *Melhoramento de Plantas e Experimentação*

George O'Neill Add. on, Eng. Agr. — Chefe.  
F. Teixeira Alves, Eng. Agr. ....  
Rosendo M. Tavares, Eng. Agr. ....  
Carlos V. Galvão, Eng. Agr. ....  
Sebastião Alves, Eng. Agr. ....

### *Especialização*

Genética  
Citologia  
Genética  
Experimentação  
Experimentação

### *Biologia*

W. Andrew Archer, Ph. D. — Chefe ....  
Harald Sioli, Ph. D. ....  
George Black, B. A. ....  
Bento Dantas, Eng. Agr. ....  
João Murça Pires, Eng. Agr. ....  
Ricardo Fróes, Explorador bot. ....  
Ana Nogueira Ferraz, Desenhista ....  
Antonietta S. Feio, Desenhista ....

Botânica  
Limnologia  
Taxonomia  
Fitopatologia  
Botânica  
Botânica geral  
Desenho técnico  
Desenho técnico

### *Química*

Walter B. Zors, B. Q. — Resp. pela chefia.  
Gerson P. Pinto, Q. I. ....

Química  
Oleos e gorduras

### *Expansão Econômica*

F. C. Camargo, Agr. — Chefe ....  
H. G. Sorensen, M. S. — Colaborador (USA)  
Rui F. Malta, Eng. Agr. ....

Economia  
Economia  
Economia

### *Tecnologia da Borracha*

Norman Bekkedahl, Ph. D. — Chefe ....  
Alfonso Wisniewski, Q. I. ....  
Roberto C. Rohnelt, Q. I. ....

Tecnologia  
Química  
Química

### *Biblioteca*

Francis B. Thorne, B. A. — Bibl.-colab. (USA)  
Paulo Plínio Abreu, Bch. D. — Chefe ....  
Yolanda F. Ribeiro ....  
Zuila O. Mota ....

Biblioteconomia  
Biblioteconomia  
Biblioteconomia  
Biblioteconomia

### *Estações Experimentais*

Belém (Pará) — Luiz R. Alencar, Eng. Agr.  
Ponto Velho (Guaporé) — Edgar Cordeiro,  
Eng. Agr. ....  
Rio Branco (Acre) — J. Jacob Hoelz, Eng.  
Agr. ....  
Rio Branco (Acre) — Rubens R. Lima, Eng.  
Agr. ....

### *Secretaria*

Vicente C. Lima — Chefe ....  
Luiz Lopes de Assis — Contador ....  
M. Passos Tavares — Enc. material ....

### *Colaboradores*

Adolfo Ducke — Naturalista (Serv. Florestal)  
Michael H. Langford, Ph. D. (U. S. Dep. Agr.)

Botânica  
Fitopatologia

INVESTIGAÇÕES PRELIMINARES SOBRE A DUPLICAÇÃO  
DO NÚMERO DE CROMOSSOMOS DA *COFFEA*

## ERRATA

Pg.	Linha	Onde se lê	Leia-se
3	8	malaia	Malaia
7	8-9	mesmes	mesmas
7	12	( <i>Coffea arabica</i> L., $2n = 88$ cromossomos.	("Coffea arabica" L., $2n = 44$ ) pela ação da colchicina, obtendo plantas com $2n = 88$ cromossomos.
7	14	...de algodoeiros com $2n = 52$	...de algodoeiros com $2n = 26$
10	12	...mais adiante di:	...mais adiante diz:
12	10	com fins de melhor aumento	com fins de melhoramento
14	12	general	genera
18	última	estacionária;	estacionára;
20	8	Compinados	Combinados
60	5	EMITH.	SMITH.

**INVESTIGAÇÕES PRELIMINARES SÔBRE A DUPLICAÇÃO  
DO NÚMERO DE CROMOSOMIOS DA SERINGUEIRA —  
HEVEA BRASILIENSIS MUELL. ARG. — PELA AÇÃO  
DA COLCHICINA**

## I — INTRODUÇÃO

A seleção da seringueira, na região compreendida pela Bacia Amazônica, oferece uma série de problemas, bastante complexos — e alguns bastante sérios sob o ponto de vista econômico — que, comumente, não ocorrem em trabalhos dessa natureza, quando efetuados em outras regiões, ou com outras plantas. Podemos assegurar que é mais simples o problema de selecionar a seringueira na malaia, ou em Java, do que na Amazônia, como também é mais simples obter, por seleção, cafeeiros de alta produção que seringueiras de grande rendimento em borracha seca.

Dissemos que é mais simples o problema, no Oriente, porque lá não ocorre a mais grave doença que ataca essa planta, a conhecida “Moléstia das Folhas” ou “South American Leaf Disease”, causada pelo fungo *Dothidella ulei*. Tal moléstia, na Amazônia, como também em vários outros países da América do Sul e América Central, ataca a seringueira num caráter tão sério, com tamanha virulência, que constitui o problema n.º 1 dessa planta; assim, enquanto no Oriente é possível se pensar em selecionar a seringueira, levando-se em conta nas plantas observadas, unicamente sua alta produtividade de latex e características correlatas, aqui na Amazônia, necessário se torna, preliminarmente, escolher plantas que resistam apreciavelmente ao ataque da referida moléstia e, depois, entre estas, selecionar as de alta produção. Não é possível se pensar em selecionar, levando em conta somente os fatores da produção, e isso torna o problema muito mais complexo e de mais difícil solução.

Por outro lado, dissemos ainda, ser mais simples selecionar o cafeeiro (dando como exemplo a planta que sempre serviu de esteio econômico da Nação), pelo fato do cafeeiro começar



a produzir no 3.º ano de vida e já com 6 anos de idade ter fornecido dados de produção suficientes para se conhecer seu valor, como planta econômica. Enquanto isso, de um modo geral e prático, a seringueira exige pelo menos o dobro desse tempo, isto é, começa a produzir aos 6 anos e são necessários outros tantos, de observação sobre sua produção, para se ter uma idéia mais ou menos exata de seu valor comercial.

Verificado esse ponto, um problema se deparou aos investigadores. Como reduzir o tempo necessário para se conhecer si esta seringueira tem maior capacidade de produção que aquela? Vários meios foram idealizados e experimentados. e, sob o ponto de vista científico, o trabalho mais interessante e promissor que foi realizado tem por base o estudo anatômico da casca da seringueira.

Gunnery (10)\*, num programa de investigações relativo à fisiologia da produção do latex, na seringueira, fez um estudo sobre a estrutura dos tubos crivados e dos vasos latíferos existentes na casca da seringueira, ao mesmo tempo que estudou a correlação existente entre essas estruturas e a produção de latex. Após um grande número de observações, chegou às conclusões que traduzimos adiante, tiradas do sumário do seu trabalho publicado no "Journal of the Rubber Research Institute of Malaya" (10):

"Sumário.

"1 — É descrita uma investigação sobre a estrutura anatômica do complexo tubos crivados vasos latíferos da casca de **Hevea brasiliensis**.

"2 — Foram encontrados dois tipos extremos de tubos crivados.

"3 — Nas plantas com baixa capacidade de produção, os tubos crivados, de pequeno diâmetro, estão associados a vasos latíferos finos. Tubos crivados de grande diâmetro, estão associados a vasos latíferos grossos, e todas as plantas de alta capacidade de produção, que foram examinadas na presente investigação, possuem tubos crivados e vasos latíferos desse tipo.

---

\* Os números em itálico referem-se à literatura citada no fim do trabalho.

“4 — A presença de um tipo constante de tubos crivados em todas as partes da planta e a demonstração do adiantado desenvolvimento dos tubos crivados na casca de hastes de plantas com um ano de idade, permite uma imediata análise qualitativa da população mixta de seedlings jovens e sugere um meio pelo qual os indivíduos de baixa produtividade podem ser desde logo eliminados (at a very early stage)”.

As possibilidades que o trabalho de Gunnery abrem para o geneticista, para o especialista na seleção da seringueira, são enormes e a leitura de suas observações não poderia deixar de chamar nossa atenção para o assunto, uma vez que, desde Janeiro de 1942 até Agosto de 1944 a Secção de Melhoramento de Plantas, do Instituto Agrônomico, do Norte, esteve a nosso cargo.

Entre centenas de milhares de seringueiras plantadas de semente, observamos, selecionam-se umas poucas plantas que se mostram bastante resistentes à “Moléstia das Folhas”. Para dar um exemplo: selecionamos pouco mais de 400 plantas, dentro daquele período citado — tidas como resistentes à “Moléstia das Folhas” — de um total de mais de 750.000 seedlings de seringueira plantados em Belém, e examinados para aquele fim. Dessas seleções primárias, fruto de unicamente um ano de observação (as seleções primárias são feitas normalmente em viveiros com um ano de idade), já no segundo ano de observação individual, cerca de 50% mostrou-se mais susceptível à moléstia que no primeiro ano; no 3.º ano, outras plantas também mostraram não ser tão resistentes como a principio se supunha e, finalmente, não restarão talvez 25% das seleções primárias feitas, essas, porém, realmente com alta resistência ao ataque da *Dothidella ulei*. Por esses dados vê-se que podemos contar com aproximadamente 100 a 120 “seleções resistentes” para cada grupo de 1.000.000 de seedlings observados. Obtido esse conjunto de plantas resistentes, será estudada sua produtividade e, finalmente, selecionadas dentre elas as que realmente sejam de alta produção, obtendo-se, assim, clones de alta resistência à “Moléstia das Folhas” e de grande rendimento em latex.

Entretanto, com a eliminação das plantas susceptíveis ao fungo, não teriam também sido eliminadas as plantas com maior capacidade de produção? Provavelmente sim, pois é lógico se supor ser mais fácil encontrar uma planta de alta produção, entre um grupo de um milhão, do que num grupo de unicamente cem, e nada prova que a alta produtividade esteja correlacionada positivamente com a alta resistência à “Moléstia das Folhas”. Antes, pelo contrário, o que se tem notado (porém falta comprovar) é que, no geral os clones de mais alta resistência à moléstia, são de média ou baixa produção, enquanto que os de mais alta produtividade são extremamente susceptíveis à *Dothidella ulei*. Exemplificando: a maioria dos clones resistentes, selecionados pela Companhia Ford Industrial do Brasil, das séries B e F, e altamente resistentes à moléstia, é de baixo ou médio rendimento em latex. Um ou outro clone resistente tem mostrado fendência a uma alta produtividade, como, v.g., F-1620. Por outro lado, quasi sem excepção, todos os clones importados do Oriente, e conhecidos como os de mais alta capacidade de produção, são extremamente susceptíveis à “Moléstia das Folhas” a ponto de não ser possível sua cultura, por enxertia simples, sendo necessária uma segunda operação, de sôbre enxertia (top-working), com um clone de alta resistência àquela moléstia. Por exemplo, são intensamente atacados pela doença: TJ-1, TJ-16, PB-86, PB-186, WAR-4, etc., porém, em Belém, excepcionalmente, tem se mostrado bastante resistente o clone AV-1301, também um dos reconhecidamente de maior rendimento em latex.

Ora, si pelo caminho que trilhamos, em nossos trabalhos de seleção, podemos obter e obtemos um grande número de clones de alta resistência ao fungo, porém, de baixa produtividade, forçoso é concluir que tais clones tenham, na casca, tubos crivados e vasos latíferos de pequeno diâmetro, de acôrdo com o que foi estabelecido pelo trabalho de Gunnery (10).

Não seria possível obter plantas de maior rendimento, partindo-se desses clones, aumentando-se artificialmente o diâmetro de seus tubos crivados e vasos latíferos? Imediata-



mente nos veiu a resposta: sim, pela ação da colchicina, duplicando o número de cromosomios dessas seringueiras.

## II — A COLCHICINA NA DUPLICAÇÃO DO NÚMERO DE CROMOSOMIOS DE PLANTAS. ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM PLANTAS POLIPLÓIDES

Levan <sup>(12)</sup> descrevendo seus trabalhos relativos à ação da colchicina em raízes de *Allium fistulosum* e *A. cepa*, referindo-se à hipertrofia observada nos órgãos tratados, diz: “As mesmas células que no principio continham 16 cromosomios foram adaptadas para conter 500 ou 1.000 cromosomios”.

Mendes <sup>(13)</sup> conseguiu duplicar o número de cromosomios do cafeeiro (*Coffea arabica* L.,  $2n=88$  cromosomios. O mesmo autor, também pela ação da colchicina, obteve plantas com  $2n=52$  cromosomios, partindo de algodoeiros com  $2n=52$  (*G. hirsutum*). Esse autor cita que “a tetraploidia em uma espécie comumente diploide é muitas vezes acompanhada por uma multiplicação das partes florais, tornando as flores muito mais atrativas; os frutos aumentam de volume; as folhas tornam-se carnudas e grossas”.

Noguti et al. <sup>(15)</sup>, trabalhando com o tabaco, observaram que as plantas tetraploides, obtidas pelo tratamento com a colchicina, eram mais robustas e apresentavam folhas mais grossas e de um verde mais escuro, com estomatos e células epidermais maiores, que no caso das plantas normais. O número de estomatos observado era inferior nas plantas poliploides que o observado nas diploides.

Sando <sup>(19)</sup> pela ação da colchicina em trigo sarraceno (buckwheat) observou que os tetraploides obtidos apresentavam a haste principal 33% maior em diâmetro, as folhas mais irregulares em suas margens, mais grossas e 60% maiores em diâmetro do que nas plantas normais. Também o pollen, as flores e sementes se apresentavam apreciavelmente maiores que os de plantas normais.

Franco <sup>(7)</sup> estudou a relação existente entre o número de cromosomios e os estomatos das folhas de *Coffea* spp., lan-

cando mão de uma coleção de várias espécies e variedades desse gênero, existentes no Instituto Agronômico do Estado de S. Paulo, em Campinas. O citado autor contou o número de estomatos e, também, mediu seu tamanho, em folhas colhidas de plantas, que anteriormente, já haviam sido estudadas citologicamente, e das quais já era, portanto, conhecido seu número de cromosomios. A série estudada incluiu plantas com  $2n=22$ ,  $2n=33$ ,  $2n=44$ ,  $2n=66$  e  $2n=88$  cromosomios e, finalmente, o autor concluiu que "The number of stomata in Coffea decreases as the number of chromosomes increases".

Smith (20) em tabaco tratado pela colchicina, observou que nos autotetraploides de *Nicotiana tabacum*, *N. rustica* e *N. glauca* as folhas eram menores e mais grossas, com estomatos maiores que nas plantas diploides.

Graner (8) trabalhando com *Petunia* obteve, pela ação da colchicina, plantas tetra e octoploides, a partir de plantas diploides, e se refere ao fato de ter observado uma planta "com folhas muito mais grossas e mais enrugadas". Faz menção, entretanto, ao fato de não ter podido separar as plantas tetraploides, utilizando-se de observações sobre o tamanho do cálice, pois algumas plantas tetraploides tinham cálice de menor tamanho que outras simplesmente diploides, que serviam de controle. Também, nesse caso, o tamanho do grão de pollen não serviu de indicador para as plantas  $4n$ , o autor aventando a hipótese, porém, de ter havido mistura de tecidos di- com tetraploides. Em virtude dessas observações, o autor diz "Apesar de termos selecionado, como fornecedores de sementes para estas experiências, plantas de um lote bastante grande, onde todos os indivíduos apresentavam bons característicos de plantas diploides, principalmente com relação ao cálice, esta linhagem tinham já nos seus ancestrais plantas com muitos caracteres tetraploides, sendo porém diploides. A falta de correlação entre alterações morfológicas e o número  $4n$  de cromosomios encontrada pode por isso ser em parte atribuída a este fato e, infelizmente, no momento de realizarmos as nossas experiências não dispunhamos de material melhor".

Graner (9) tratou a mandioca pela colchicina, sendo o trabalho feito com a variedade "Vassourinha Paulista". Nessa publicação o autor não revelou o número de cromossomos observado nas plantas tratadas, porém fez um estudo estatístico do tamanho dos estômatos das folhas de plantas tratadas com a colchicina e daqueles de folhas de plantas não tratadas, e pelos resultados obtidos com essa análise separou as 31 plantas examinadas em 3 grupos distintos, de acordo com o tamanho de seus estômatos, e concluiu: "4 — Conforme esta análise preliminar e segundo a correlação entre número de cromossomos e tamanho dos estômatos que se tem verificado para outras plantas, pensamos ter separado um grupo de formas poliploides, provavelmente tetraploides". Um dos grupos das plantas estudadas por Graner tinha a seguinte média para o maior diâmetro dos estômatos,  $\bar{v}=40,7$  micra, enquanto o grupo de plantas controle tinha  $\bar{v}=29,2$  micra. Pela ação da colchicina, portanto, foi obtido um aumento no tamanho dos estômatos.

Dermen (3) referindo-se à ação da colchicina em plantas diz: "Cell division into sister cells is prevented by specifically affecting the mechanism of division, while the chromosomes, genetically the most important constituents in the cells continue to develop. They split into sister chromosomes, but remain together and together go through the nuclear phase. In consequence, chromosomes are doubled in number and the affected cells grow proportionately. The processes of such an increase in number of chromosomes and cellular increase in general may continue as long as the material is exposed to colchicine, and result in enlarged cells with huge chromosome numbers. This continues until some other factors intervene and limit the growth (p. 606)".

Discutindo a poliploidia, Dermen (3) ainda diz: "Polyploidy, being defined as chromosome doubling, is best determined by chromosome counts. Such determination is greatly facilitated by speed methods, and must still be used as a final method of examining plants that are believed to be polyploid.

"There are a number of characteristics that generally express polyploidy and are usually associated with it. One

major characteristic involves change of size: another, change in shape, of plant parts, such as leaves, fruits, etc. There are measurable changes that are used in selecting colchicine-affected plants or parts of plants from those unaffected.

“There is ordinarily a correlation between nuclear volume and cell volume. Thus, if the volume of the nucleus is changed following chromosome doubling the volume of the cell would also change. Often with the change of volume a change in the dimensions of cells occurs, which with a change in size may become apparent in some plant parts, such as leaf, flower, fruit, seeds, etc.” (p. 622).

O mesmo autor acima citado (3) mais adiante diz: “The chromosome duplication may result in one of at least three types of tetraploids: (1) There may occur an appreciable increase in size of each vegetative cell in the tetraploid individual, while the total number of cells making up the plant remains relatively the same as in the diploid form; consequently the tetraploid plant appears larger than the diploid individual. Most of the changes following polyploidy appear to fall into this category. (2) An increase in cell volume may follow a doubling of chromosomes, but there may be a decrease in the total number of cells making up the tetraploid plant; therefore the tetraploid individual will not appear different from the diploid (4). (3) The doubling of chromosomes may not have any effect on the size of the cells. The polyploid individual remains indistinguishable, except probably in sexual and in some obscure physiological behavior” (pp. 623-624).

Mendes (14) referindo-se ao algodoeiro, discutindo os resultados obtidos diz: “The different shape, the larger size, and consequently the increase weight of the seeds are to be interpreted as results of the influence of the octoploid mother plant. The gigantism of the vegetative organs, found in other known polyploids, has not been found in octoploid *Gossypium*”.

Dermen & Bain (4) determinaram o tamanho dos estômatos em seedlings de “cranberry”, tratados pela colchicina, e adotaram o critério de considerar poliploides aqueles que apresentavam estômatos maiores que os observados em plantas não

tratadas. Seis variedades comerciais foram tratadas pela colchicina e em cinco delas "polyploidy effect was discovered by estomatal examination".

Dermen et al. (6) dizem que: "Colchicine, a poisonous medicinal chemical, has been used since 1937 in plant breeding work to produce changes in plants by doubling the number of chromosomes in cells, a condition referred to as **polyploidy**. The increased number of chromosomes usually brings about an increase in size of the affected cells and various degrees of changes in their functions. In contrast with the normal plants, these developed by colchicine treatment often show changes in height and width; in thickness of branches; in size, shape and texture of leaves, flowers, fruits and seeds; in fertility of flowers; and in physiological responses".

Após esse rapido estudo bibliográfico (referente unicamente a uma parte dos trabalhos que citam resultados obtidos, na duplicação do número de cromosomios de plantas, pela ação da colchicina), de obras publicadas até 1941, verificamos que, de fato, pode-se esperar um aumento no tamanho das células de plantas, quando tratadas pelo referido alcalóide.

Ora, tendo Gunnery (10) observado que a produção de latex, na seringueira, estava correlacionada positivamente com um grande diâmetro dos tubos crivados e vasos latíferos, e considerando que um tubo crivado, ou um vaso latífero, nada mais é que uma sucessão de células, e, verificando ainda pela análise bibliográfica feita que, com a duplicação do número de cromosomios, obtida pela ação da colchicina, obtem-se um aumento geral no tamanho das células da planta tratada, concluimos que a duplicação do número de cromosomios de seringueiras selecionadas como altamente resistentes à "Moléstia das Folhas" (porém reconhecidas como de baixo rendimento em latex) deveria acarretar um aumento na sua capacidade produtora de latex, provavelmente sem diminuição alguma na sua resistência ao ataque do fungo causador da mencionada moléstia. Diante disso, demos inicio a investigações sobre a maneira de obter a esperada duplicação do número de cromosomios na se-



ringueira. Os resultados dessas investigações preliminares são apresentados nesta publicação.

### III — O NÚMERO DE CROMOSOMIOS NO GÊNERO *HEVEA*

Sob o ponto de vista citológico, o gênero *Hevea* ainda está muito pouco estudado e, até há alguns anos atrás, praticamente não havia sido feita investigação alguma sobre o assunto.

Heusser <sup>(11)</sup> fez observações superficiais sobre a meiose em *Hevea brasiliensis*, quando estudou os órgãos reprodutivos dessa espécie, como trabalho básico para um programa de cruzamentos, com fins de melhor aumento. Nesse trabalho Heusser sempre apresenta figuras meioticas com 8 cromosomios. É interessante se notar que, até hoje, nenhum outro autor pode encontrar seringueiras com número tão baixo de cromosomios.

Muitos anos se passaram, sem que aparecesse na literatura trabalho algum sobre a citologia de *Hevea*, quando em 1931, Bangham <sup>(2)</sup> publicou um pequeno artigo, cujo tema foi o número de cromosomios em *Hevea*. Esse autor estudou quatro espécies: *Hevea brasiliensis* Muell. Arg., *H. collina* Huber, *H. guianensis* Aubl. e *H. spruceana* (Benth.) Muell. Arg., tendo nelas encontrado  $2n=34$  cromosomios. Como contraprova estudou a meiose em *H. brasiliensis* encontrando  $n=17$  cromosomios.

Assim, surgiu uma dúvida quanto ao número básico do gênero, pois a contagem de Bangham entrava em conflito com o número obtido por Heusser.

Coube a Ramaer <sup>(18)</sup> elucidar a questão, com um ótimo estudo publicado em "Genetica". Esse autor fez uma investigação que podemos considerar como básica para qualquer outro trabalho que se queira efetuar sobre a mesma questão. Aliás, antes da execução desse estudo, esse autor esteve trabalhando, durante vários anos, no Oriente, em investigações ligadas a cruzamentos artificiais da seringueira, surgindo daí seu interesse pelo assunto, principalmente pelo fato de ter encontrado algumas formas com polen degenerado. Um estudo preliminar mos-

trou que um engano deveria ter havido no trabalho de Bangham e, diante disso, resolveu o autor levar a efeito uma investigação citológica mais completa, a qual foi em sua maioria executada no Laboratório Botânico de Utrecht, com material levado do Oriente e, também, com material recebido de Surinam e do Brasil. Ramaer estudou citologicamente *Hevea brasiliensis* Muell. Arg., *H. spruceana* (Benth.) Muell. Arg., *H. guianensis* Aubl., *H. collina* Huber e, ainda, híbridos de *H. colinna* x *H. brasiliensis* e *H. spruceana* x *H. brasiliensis*. Para todos os casos Ramaer encontrou  $n=18$  e  $2n=36$  cromosomios. De nenhuma maneira pode esse autor concluir, pelas suas investigações, que o número 18, apesar de bastante alto, pudesse deixar de ser o número básico para *Hevea*, pois poder-se-ia supor se tratasse de diploidia (sendo  $n=9$ ) ou triploidia (sendo  $n=6$ ), mas isso de maneira alguma pode ser provado. Assim, concluiu o autor que o número haploide é 18 e que no tecido somático foi encontrado o número diploide  $2n=36$  cromosomios.

Perry (17) fez um estudo citológico bastante amplo dentro da família *Euphorbiaceae*, tendo êle próprio feito contagens em tecido somático de *H. brasiliensis* Muell. Arg., *H. spruceana* (Benth.) Muell. Arg., encontrando  $2n=36$  cromosomios. Entretanto, analisando os trabalhos de outros autores, (Heusser, 1919, Bangham, 1931 e Ramaer, 1935) concluiu de maneira diferente dêste último autor, considerando que as espécies estudadas, com  $n=18$  cromosomios devem ser tetraploides. Suas conclusões são: "Ramaer considered 18 as the basic number for *Hevea*. However, he pointed out that this is a rather high basic number, and that only a few plants have a similar basic number, e. g. 19 in *Salix* and 17 in *Pyrus*. In the study of partially or totally male sterile forms and hybrids of *H. spruceana* x *H. brasiliensis* (Ramaer, 1935) meiosis was often irregular and multivalent associations frequent. Ramaer pointed out that the occurrence of multivalents might be an indication of polyploidy. The writer would consider the species of *Hevea* with  $n=18$  to be tetraploid on the basis of the knowledge of

chromosomal relationships in the Euphorbiaceae as a whole, the observations of Heusser (1919) and the presence of multivalents in meiotic material studied by Ramaer”.

Paddock (16) contou o número de cromosomios em pontas de raízes de *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. cultivadas de sementes recebidas da Liberia, África, obtendo sempre  $2n=36$  cromosomios. Esse autor diz: “Since Perry’s suggestion that species of *Hevea* with  $n=18$  are tetraploids is probably correct, it is to be expected that colchicine doubling will not produce plants of commercially advantageous yielding capacity. Studies of series of polyploids produced experimentally in various general indicate that tetraploidy is the optimum level. It apparently is possible to test this expectancy by the colchicine → induction of doubled chromosome number. Current preliminary experiments by the writer show that *Hevea* plants do produce what appears to be mixoploid tissue after rather severe applications of the drug (stem tips immersed in 1,0% aqueous solution for 24 hours)”.

Nós fizemos várias contagens de cromosomios em tecido somático de *Hevea* spp., seguindo uma técnica de Baldwin (1) algo modificada, a qual vai detalhadamente exposta em outro capítulo. Em *Hevea brasiliensis* sempre encontramos  $2n=36$  cromosomios, quer em plantas cultivadas a partir de sementes colhidas em várias regiões da bacia do rio Amazonas, quer em enxertos de clones importados da Cia. Ford Industrial do Brazil, em Belterra (rio Tapajoz), de Costa Rica e do Oriente (no capítulo apropriado é apresentada uma relação do material examinado).

Assim, de acôrdo com os resultados obtidos, até o presente, o que se sabe a respeito do número de cromosomios no gênero *Hevea* é o que se encontra apresentado no quadro I, dado a seguir:

QUADRO I — NÚMERO DE CROMOSOMIOS NO GÊNERO **HEVEA**

ESPÉCIE	n	2n	AUTOR
<b>Hevea brasiliensis</b> Muell. Arg. ....	8	—	Heusser, 1919
	17	34	Bangham, 1931
	18	36	Ramaer, 1935
	—	36	Perry, 1943 <sup>1</sup>
	—	36	Paddock, 1943
	—	36	Mendes
<b>Hevea spruceana</b> (Benth.) Muell. Arg. ...	—	34	Bangham, 1931
	18	36	Ramaer, 1935
	—	36	Perry, 1943
	—	36	Mendes
<b>Hevea guianensis</b> Aubl. ....	—	34	Bangham, 1931
	18	36	Ramaer, 1935
<b>Hevea collina</b> Huber .....	—	34	Bangham, 1931
	18	36	Ramaer, 1935
<b>H. spruceana</b> x <b>H. brasiliensis</b> .....	18	36	Ramaer, 1935
<b>H. collina</b> x <b>H. brasiliensis</b> .....	18	36	Ramaer, 1935

IV — TÉCNICA PARA A CONTAGEM DE CROMOSOMIOS  
EM TECIDO SOMÁTICO DE **HEVEA**.

Para o caso de nossos estudos, necessário se tornou fazer contagens de cromosomios em tecido somático, pois não nos seria possível esperar pelo florescimento de vários clones de seringueira (com os quais desejavamos trabalhar) recentemente introduzidos no Instituto Agrônomo do Norte, para, então, dar inicio ao trabalho. A seringueira floresce, quando plantada de semente, com 5 a 6 anos de idade, algumas plantas ainda mais tarde, havendo, entretanto, plantas mais precoces, como

uma, por exemplo, que vimos florescer pela primeira vez quando tinha apenas 2 1/2 anos de idade. Quando enxertada, o florescimento se dá com 3 a 5 anos, raramente se encontrando plantas que florescem com 2 anos após a enxertia.

Não poderíamos esperar examinar pontas de raízes de seringueiras, pois pretendíamos trabalhar principalmente com plantas propagadas vegetativamente, por meio da enxertia. Assim, resolvemos adotar a técnica recomendada por Baldwin (1), que recomenda estudar cromosomios de certas plantas examinando folhas jovens e fazendo as preparações por meio de uma técnica de Warmke (21), devidamente modificada.

Para o caso da seringueira adotamos a seguinte técnica, com resultados verdadeiramente surpreendentes:

1 — Folhas novas, com 10 a 15 mm. de comprimento, são colhidas com uma tesourinha e imediatamente lançadas num tubo contendo fixador de Carnoy preparado na seguinte proporção: clorofórmio, 3 partes, álcool absoluto, 2 partes e ácido acético glacial, 1 parte. Nesse líquido as folhas podem ficar de 5 minutos até vários dias, sem prejuízo algum para os resultados obtidos. (Em certos casos deixamos as folhas nesse fixador durante até duas semanas, antes de manipulá-las, e sempre obtivemos preparações bastante boas com o material assim tratado).

2 — Num vidro de relógio (devidamente coberto para evitar que os vapores do ácido prejudiquem o material existente no Laboratório) ou num pesa-filtros, colocamos uma pequena quantidade de uma solução preparada com 3 partes de HCl concentrado e 4 partes de álcool a 95%. As folhas, anteriormente fixadas, são transferidas para essa solução, onde permanecem exatamente 1 minuto. (Uma solução contendo HCl concentrado e álcool a 95% na proporção de 1:1 abrevia o espaço de tempo em que o material deve nela permanecer para 30 a 40 segundos; da mesma forma, uma solução preparada na proporção de 1:2, prolonga esse tempo para mais de 2 minutos).

3 — Da solução alcoólica de ácido clorídrico as folhas voltam para o fixador de Carnoy. Si se vai fazer exame do mate-



rial imediatamente depois, pode o tecido voltar para o mesmo fixador anteriormente usado, aí permanecendo pelo menos 10 minutos. Caso contrário, é conveniente passar o material para esse fixador, deixá-lo aí durante uns 3 a 5 minutos (para lavar o excesso da solução anterior) e, em seguida, passá-lo para um novo tubo contendo fixador ainda não usado. Nesse tubo o material poderá ser conservado até duas semanas, sem maiores inconvenientes. Quando se desejar conservação por maior espaço de tempo, o material deverá ser então transferido para álcool 70%.

4 — Preparar material para exame microscópico, com aceto-carmim-férrico, da maneira usual, tendo o cuidado de deixar de lado a nervura principal da folha. Nós temos usado, com bons resultados, a seguinte marcha: um pequeno pedaço do limbo da folha é transferido para uma lâmina, e sôbre êle lançamos um pequeno excesso de aceto-carmim-férrico; passamos a lâmina umas 3 ou 4 vezes sôbre uma chama de álcool, removemos o tecido para a orla do corante, com um pedaço de mataborrão enxugámo-lo quasi totalmente, empurramos o tecido para o lado oposto, acabamos de enxugar o corante e então lançamos uma nova gota de aceto-carmim-férrico sôbre o material. Com um pequeno escalpelo comprimimos o tecido de modo a começar a se desagregar. Passamos uma laminula duas vezes por uma chama de álcool e colocámo-la sôbre o material e, com o fundo de um lápis, ou instrumento semelhantemente macio, aplicamos suficiente pressão para que todas as células se soltem e fiquem numa única camada; enxugamos o excesso de carmim, que se espalhou pelos bordos da laminula, passamos a lâmina, mais uma ou duas vezes, pela chama de álcool e a preparação está pronta para ser examinada ao microscópio. No geral, a preparação está em seu ponto ótimo, para exame, com 24 a 48 horas depois de terminada. Para evitar a entrada de ar, lutamos os bordos da laminula com vaselina, lanolina, parafina, ou qualquer outro lutante. Em certos casos temos podido ainda examinar lâminas assim manipuladas, com relativo sucesso, mais de quinze dias depois de preparadas.

## V — A APLICAÇÃO DA COLCHICINA NA DUPLICAÇÃO DO NÚMERO DE CROMOSOMIOS DA SERINGUEIRA

No Instituto Agrônomo do Norte fizemos várias experiências com o fito de verificar de que maneira se poderia aplicar a colchicina na seringueira, para a obtenção de plantas poliploides. Esses ensaios são adiante resumidos. Antes, porém, não podemos deixar de mencionar que, não dispondo, a princípio, de colchicina, enquanto esperavamos que chegasse dos U.S.A. a quantidade por nós encomendada, recorreremos ao engenheiro agrônomo Antonio José Teixeira Mendes, Chefe da Seção de Citologia do Instituto Agrônomo do Estado de S. Paulo, em Campinas, que graciosamente nos cedeu 3 gramas de alcalóide, para o início dos nossos trabalhos.

### 1.º ENSAIO

A 1.<sup>a</sup> experiência foi iniciada a 23 de Novembro de 1942. Para esse fim nos utilizamos de 12 seedlings ilegítimos de PB-86, com aproximadamente 6 meses de idade, plantados em pequenos cestos e mantidos a meia sombra. Usamos uma solução aquosa de colchicina a 1%, que era diretamente aplicada por meio de um contagotas, numa gema da planta, anteriormente escolhida (apical ou lateral, dependendo do estado de desenvolvimento dessa gema). Sempre aplicávamos unicamente uma gota, mas quando esta escorria, não deixando molhado o lugar da aplicação, lançávamos outra e, nesse caso, era sempre difícil que a gota se mantivesse no lugar. Notamos, então, que era bastante difícil obter, todos os dias, que a gota da solução permanecesse no lugar da aplicação tempo suficientemente prolongado para que o uso da droga surtisse o desejado efeito. Depois de 15 aplicações, notamos, numa planta com brotação adiantada, algumas alterações morfológicas nas folhas (deformações), sendo por isso interrompido o tratamento dessa planta. Ao fim de 23 aplicações, uma outra planta apresentava os folíolos com sua forma alterada e aparentemente mais espessos; na referida planta o crescimento de uma folha estacionária; nessa mesma data foi suspenso o trata-

mento dessa planta. Nas demais plantas fizemos ainda mais 4 tratamentos, sendo, finalmente, suspenso o trabalho a 26 de Dezembro de 1942.

Somente foram notadas alterações morfológicas nas duas plantas já citadas. Esperamos que viesse uma segunda brotação, para examiná-las citologicamente e, assim, em 20 de Janeiro de 1943 examinamos os folíolos de uma delas, contando  $2n = 36$  cromosomios. Em 12 de Fevereiro examinamos a outra planta, encontrando também  $2n = 36$  cromosomios.

**Conclusão** — Pelo método adotado, parece, não foi obtida duplicação do número de cromosomios. Foram notadas pequenas alterações morfológicas nas folhas, as quais, entretanto, não persistiram. Os seedlings de seringueira examinados tinham  $2n = 36$  cromosomios.

## 2.º ENSAIO

Para êste ensaio preparamos primeiramente uma solução aquosa de colchicina a 1%. Dessa solução, por sucessivas diluições, obtivemos soluções com 0,5 - 0,25 - 0,125 - e 0,0625%.

O ensaio foi iniciado em 24 de Novembro de 1942, também sendo utilizados seedlings ilegítimos de PB-86, plantados em número de 3 em cada cesto, mantidos a meia sombra e com idade aproximada de 6 meses.

Afim de forçar a brotação, em certos casos, estrangulamos as plantas, com um pequeno fio de arame, nos lugares adiante mencionados.

O ensaio foi assim organizado:

- |              |   |  |
|--------------|---|--|
| Tratamento 1 | — | Aplicação de solução aquosa de colchicina a 1% |
| "            | 2 | — Idem, a 0,5%                                 |
| "            | 3 | — Idem, a 0,25%                                |
| "            | 4 | — Idem, a 0,125%                               |
| "            | 5 | — Idem, a 0,0625%                              |

Sub-tratamento A — 60 plantas contidas em 20 cestos, foram estranguladas logo abaixo do ponto de inserção de uma folha, na haste. A uma distância de 2 a 3 folhas, acima do ponto estrangulado, foi a haste podada.

Sub-tratamento B — 60 plantas, contidas em 20 cestos, foram estranguladas logo abaixo do ponto de inserção de uma folha, na haste.

Sub-tratamento C — 60 plantas, contidas em 20 cestos, foram podadas num ponto situado duas a 3 folhas acima da gema escolhida para ser tratada.

Sub-tratamento D — 60 plantas, contidas em 20 cestos, sem preparo prévio algum.

Combinados os tratamentos e sub-tratamentos, tivemos  $5 \times 4 = 20$  variantes totais, cada uma constituída por 12 plantas, contidas, portanto, em 3 cestos. Cada variante foi então numerada em código e o tratamento iniciado, sendo a colchicina semple aplicada pela manhã, com um conta-gotas, como no Ensaio n.º 1.

Com o desenvolvimento do ensaio, à medida que as plantas apresentavam um broto tratado com suficiente desenvolvimento, era cessada a aplicação da colchicina nessa planta, que recebia, então, uma etiqueta indicando o número de vezes que havia sido tratada.

Com 12 dias de tratamento, suspendemos a aplicação em 10 plantas; com 18 dias, o tratamento foi suspenso em mais outras 8 plantas; com 22 dias, o tratamento foi suspenso em outras 4 plantas; com 25 dias, em mais 20 plantas; e, finalmente, com 26 dias, foi o tratamento suspenso em todas as outras plantas, independentemente do estado de desenvolvimento do broto em operação.

Em várias plantas notamos deformações nas folhas e em muitas observamos que o tratamento com a colchicina redunda em grande atrazo da brotação. Quanto mais elevada a concentração do alcalóide, tanto maior era o atrazo verificado na brotação.

Durante o mês de Janeiro de 1943, examinamos citologicamente os folíolos de todas as plantas em que havíamos notado alterações morfológicas e, ainda, grande número de plantas tratadas, porém que não haviam mostrado alteração alguma. Em todos os casos encontramos sempre  $2n = 36$  cromosomios.

**Conclusão** — Nas condições do ensaio, solução aquosa de colchicina em concentração variando de 0,0625% a 1%, aplicada por meio de conta-gotas, em gemas apicais ou laterais de

seedlings de seringueira cultivados em cestos, à meia sombra, não conduziu à duplicação do número de cromosomios do tecido somatico tratado, sendo unicamente observadas algumas alterações morfológicas nos folíolos dêle resultantes.

### 3.º ENSAIO

Para a montagem dêste ensaio nos utilizamos de um viveiro de seedlings ilegítimos de Tj-1, plantados no campo, da maneira usual. O ensaio foi iniciado a 14 de Dezembro de 1942, quando as plantas tinham aproximadamente 7 meses de idade. É bom notar-se que as plantas estavam com um desenvolvimento bastante bom nessa época, incomparavelmente superior ao daquelas utilizadas nos ensaios anteriores.

Foram escolhidas 40 plantas com a gema apical prestes a brotar, sendo que algumas plantas já apresentavam inicio de brotação. Foram todas numeradas (de 1 a 40) e as que já estavam brotando tinham os números: 1 - 3 - 4 - 7 - 8 - 14 - 16 - 19 - 29 - 30 - 31 - 35 - 36 (13 plantas).

O tratamento foi iniciado a 14 de Dezembro de 1942, constando de algumas gotas de uma solução aquosa de colchicina a 1%, lançada diariamente, pela manhã, na gema apical das seringueiras. Tal solução foi aplicada 11 vezes, sendo interrompido o tratamento no dia 26 de Dezembro.

No dia em que o tratamento foi interrompido, organizamos um protocolo geral do estado de brotação das plantas, sendo verificado que das 13 plantas, anteriormente citadas, 10 apresentavam folíolos aparentemente alterados morfológicamente; nas outras 3 plantas dêsse grupo, os folíolos pareciam normais (4 - 8 - 36). Das 27 outras plantas, cujo tratamento foi iniciado antes da brotação da gema, 14 estavam apenas brotando, e entre as 13 restantes somente 7 apresentavam alterações morfológicas nos folíolos (6 - 17 - 21 - 24 - 33 - 34 e 38).

Novo protocolo foi feito 21 dias depois de cessado o tratamento, isto é, a 16 de Janeiro de 1943. Em resumo o que se observou nas plantas, nessa data, foi o seguinte:



- N.º 1 — Duas folhas gigantes, com gemas axilares brotando (sinal de que a gema apical estava com seu desenvolvimento atrasado).
- N.º 2 — Dois brotos novos.
- N.º 3 — Folhas levemente alteradas.
- N.º 4 — Brotação atrasada.
- N.º 5 — Brotação, muito nova.
- N.º 6 — Duas folhas gigantes e duas com tamanho reduzido, cada uma com unicamente 2 folíolos, morfologicamente alterados; gemas axilares brotando.
- N.º 7 — Folhas levemente alteradas; gema apical dando início a nova brotação.
- N.º 8 — Folhas levemente alteradas; gemas axilares dando início a nova brotação.
- N.º 9 — Brotação nova.
- N.º 10 — Idem, com folhas alteradas.
- N.º 11 — Broto novo muito robusto.
- N.º 12 — Brotação nova.
- N.º 13 — Gemas axilares das folhas mais apicais, começando a brotar; gema apical com indícios de nova brotação.
- N.º 14 — Três folhas grandes e três folhas pequenas, alteradas; segunda brotação em início.
- N.º 15 — Duas folhas gigantes, alteradas; gemas axilares e apical começando a brotar.
- N.º 16 — Últimas folhas levemente alteradas.
- N.º 17 — Duas folhas gigantes alteradas e, também, uma pequena; gemas axilares brotando.
- N.º 18 — Algumas folhas grandes, aparentemente normais, outras alteradas.
- N.º 19 — Duas folhas gigantes e duas pequenas, alteradas; gemas axilares brotando.
- N.º 20 — Leves alterações morfológicas nas folhas.
- N.º 21 — Uma folha normal; segunda brotação em início.
- N.º 22 — Muitas folhas, algumas grande e outras pequenas, com alterações morfológicas.
- N.º 23 — Duas folhas gigantes, uma delas alterada; gemas axilares e apical brotando.
- N.º 24 — Algumas folhas alteradas.
- N.º 25 — Gemas axilares, próximas do ápice, brotando; gema apical em início de brotação.
- N.º 26 — Broto novo, com folhas alteradas.
- N.º 27 — Gema apical e axilares, próximas do ápice, brotando.
- N.º 28 — Idem.
- N.º 29 — Três folhas gigantes e uma pequena, alteradas; gemas axilares começando a brotar.

- N.º 30 — Cinco folhas normais e duas alteradas; gemas axilares começando a brotar.  
N.º 31 — Folhas normais.  
N.º 32 — Brotação nova, uma folha com 4 folíolos; examinada citologicamente revelou ter  $2n = 36$  cromosomios.  
N.º 33 — Duas folhas gigantes; gema apical começando a brotar.  
N.º 34 — Duas folhas gigantes; gema apical e axilares começando a brotar.  
N.º 35 — Seis folhas agigantadas, alteradas.  
N.º 36 — Brotação nova, folhas alteradas.  
N.º 37 — Gemas axilares, próximas do ápice, brotando; gema apical em início de brotação.  
N.º 38 — Folhas levemente alteradas; uma gema axilar brotando.  
N.º 39 — Folhas alteradas, gema apical brotando.  
N.º 40 — Uma folha gigante, alterada.

Após esse protocolo, passamos a examinar citologicamente os folíolos novos, da segunda brotação, das plantas tratadas, à medida que êles se apresentavam com bom desenvolvimento para esse exame. Assim, de 20 de Janeiro a 19 de Fevereiro de 1943, examinamos todas as plantas e em todas elas encontramos mitose normal e  $2n = 36$  cromosomios. Após esses estudos, examinamos, ainda, folíolos novos de 4 seedlings ilegítimos de Tj-1, não tratados, de mesmo viveiro, encontrando também  $2n = 36$  cromosomios. Na figura 1 apresentamos metafase observada em folha de segunda brotação, da planta número 34, onde se vêem  $2n = 36$  cromosomios.

Apesar dos exames terem revelado, sempre, unicamente 36 cromosomios em todas as folhas examinadas, por meio de uma lupa de bolso notamos que, em certas plantas, havia folhas com estomatos maiores do que nas folhas normais, não tratadas.

Para o caso da planta n.º 1, por exemplo, colhemos uma folha tratada e uma não tratada (da roseta anterior), e procedemos à medição dos estomatos. De cada folha medimos 50 estomatos e obtivemos as seguintes médias para a dimensão do maior diâmetro dos estomatos: folha gigante, tratada 26,65 micra;

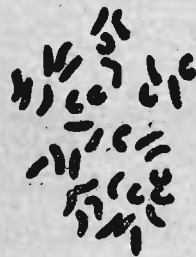


Fig. 1

*Hevea brasiliensis*  
— Seedling ilegítimo de Tj-1. Metafase somática em meristema de folha nova (2.ª brotação) de gema tratada com solução aquosa de colchicina a 1%.  
 $2n = 36$ . 1650 x.

folha normal, não tratada, 21,56 micra. Houve, portanto, um aumento no tamanho dos estomatos e, também, foi observado que na folha tratada havia menor número dêles, por determinada área, que na folha não tratada, porém não foi contado seu número.

**Conclusões** — A) A aplicação da colchicina, em solução aquosa a 1%, por meio de um conta-gotas, em gemas apicais de seedlings ilegítimos de TJ-1, com aproximadamente 7 meses de idade, aparentemente não levou à duplicação do seu número de cromosomios (segundo observações feitas em folíolos obtidos da brotação seguinte à que havia sido tratada).

B) De 13 plantas tratadas, quando a gema apical já estava em desenvolvimento, em 11 foram notadas alterações morfológicas nas folhas, ou sejam 86%, enquanto em 27 outras plantas, identicamente tratadas (porém antes de iniciado o desenvolvimento da gema tratada) foram notadas alterações morfológicas em 16, ou sejam em somente 59% das plantas.

C) A aplicação da colchicina, em certos casos, levou à obtenção de folhas gigantes, em outros à diminuição ou aumento do número de folíolos das folhas, em outros, atrazou a brotação da gema apical (tratada), provocando a brotação de gemas axilares.

D) Em certo número de folhas tratadas foi observado um aumento no tamanho dos estomatos. Nesse caso, foi medido o maior diâmetro dos estomatos de uma planta tratada, sendo observado que em folha não tratada tal dimensão era em média de 21,56 micra, enquanto em folha tratada era de 26,65 micra.

E) É provável que o tratamento tenha dado em resultado uma duplicação do número de cromosomios, somente na parte mais acessível do tecido tratado (epiderme das folhas), alteração essa que se mostrou de caráter temporário, advindo daí o fato de termos encontrado plantas com estomatos maiores em folhas tratadas (primeira brotação) que nas folhas não tratadas, porém com o número normal de cromosomios ( $2n = 36$  cromosomios) na segunda brotação.

#### 4.º ENSAIO

Diante dos resultados obtidos com os ensaios anteriores, verificamos que a técnica da aplicação da colchicina teria que ser grandemente alterada, para a obtenção de alterações somáticas profundas e permanentes. Assim, neste outro ensaio, resolvemos trabalhar de uma maneira diferente e, neste caso, já com clones enxertados, não somente porque já podíamos dispor de um lote deles, plantado próximo ao nosso laboratório, como também porque tínhamos esperança de obter modificações permanentes na constituição cromosômica dessas plantas e, nesse caso seria possível melhor aproveitar o material para estudos comparativos futuros. De uma coleção de 77 enxertos de vários clones, devidamente numerados, 39 foram tratados de várias maneiras e, adiante, apresentamos os resultados das observações feitas nessas plantas. O trabalho foi iniciado a 21 de Agosto de 1943.

CLONE F-315 — Desses clone foram tratadas as seguintes 8 plantas:

N.º 2 — Em 21 e 22 de Agosto a gema apical foi tratada com uma solução aquosa de colchicina a 1%, e a 23 o broto recebeu uma injeção de colchicina a 1% em solução aquosa de glicerina a 10%. Como consequência do tratamento, as folhas se desenvolveram acima do normal e as suas gemas axilares brotaram. Em 3 folhas desenvolveram-se as gemas axilares e os seus folíolos foram citologicamente examinados em 19 de Setembro; em duas delas foram observados  $2n = 36$  cromosomios; no broto axilar da maior folha, porém, foram contados  $2n = 36-72$  cromosomios, isto é, os folíolos apresentavam-se de constituição mixoploide. Em 9 de Novembro foram examinados citologicamente os folíolos de uma nova brotação do ramo n.º 3, sendo determinados  $2n = 36$  cromosomios, isto é, a planta voltou à sua constituição normal.

N.º 4 — Idêntico tratamento ao da planta n.º 2. Em 26 de Agosto exame citológico revelou algumas células com  $2n = 72$  cromosomios. As folhas se desenvolveram com deformações, crescendo acima do normal. Uma das folhas apresentou um folíolo com 40 cm. de comprimento. Em 9 de Outubro as gemas axilares das folhas alteradas começaram a brotar e em 7 de Novembro foram os folíolos novos examinados citologicamente, revelando constituição normal, isto é,  $2n = 36$  cromosomios.

N.º 5 — Idêntico tratamento ao da planta n.º 2. Em 26 de Agosto fizemos um exame citológico nos folíolos do broto tratado, encontrando

algumas células com  $2n = 144$  cromosomios. Em uma célula só conseguimos contar 139 e noutra contamos 146 cromosomios (?). Na figura 2 apresentamos uma metafase, onde se contam aproximadamente 144 cromosomios (há uma dúvida em certo ponto da placa, onde não se encontram perfeitamente individualizados os cromosomios).

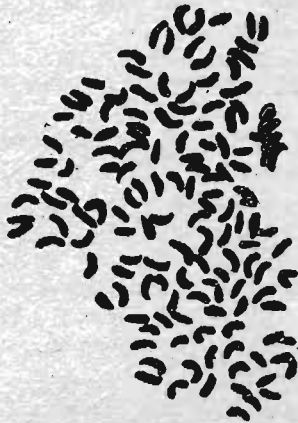


Fig. 2

*Hevea brasiliensis* — Enxerto de F-315. Metáfase somática em meristema de folha nova (1.ª brotação) de gema tratada com solução de colchicina a 1%.  $2n = 138 + ?$  (dupla duplicação). 1350 x.

As folhas primárias que se desenvolveram do broto tratado apresentaram-se deformadas, e as secundárias caíram. A gema axilar de uma das folhas se desenvolveu e, em 27 de Setembro, exame citológico de seus folíolos revelou  $2n = 36$  cromosomios, talvez de mistura com células contendo  $2n = 72$  cromosomios (?). Desse broto uma folha apresentou metade da lâmina com estomatos maiores que na outra metade.

N.º 15 — Em 28 de Outubro de 1943 a gema apical estava começando a brotar. As últimas folhas do crescimento anterior foram cortadas próximo à base do pecíolo e o ponteiro foi então envolvido numa camisa de colódio, contendo dentro algodão embebido numa solução aquosa de colchicina a 0,5%. Tal camisa foi assim mantida durante 24 horas. Quando foi retirada, o algodão ainda se encontrava úmido. Folíolos novos, da segunda brotação, foram examinados em 17 de Novembro, sendo encontrados  $2n = 36$  cromosomios.

N.º 16 — A gema apical foi tratada com gotas de uma solução de colchicina a 0,5% em solução aquosa de glicerina a 5% três vezes, de 31 de Agosto a 2 de Setembro de 1943. Depois desse tratamento, a brotação se desenvolveu com aspecto normal. Em 9 de Setembro um folíolo foi examinado citologicamente, sendo encontrado  $2n = 36-72-144$  cromosomios. O tecido apresentava-se, portanto, mixoploide em sua constituição. A brotação desenvolveu-se vigorosamente e a 14 de Setembro o exame citológico de um outro folíolo, da última folha da roseta, também revelou tecido mixoploide, com  $2n = 36-72-144$  cromosomios. As folhas tomaram um aspecto característico, em mosaico, com manchas de um verde mais intenso contrastando com fundo de verde mais claro. As últimas folhas apresentavam-se aparentemente mais espessas (ao tacto). Em 28 de Setembro medimos o maior diâmetro dos estomatos de folhas tratadas e de folhas não tratadas, e, também, contamos o número de estomatos por área, achando os seguintes valores: folha tratada, 147 estomatos por  $\text{mm}^2$ , maior diâmetro 29,47 micra; folha não tratada, 351 estomatos por  $\text{mm}^2$ , maior diâ-



metro 20,31 micra. Em 9 de Outubro a gema apical estava novamente brotando, e a 17 desse mesmo mês encontramos  $2n = 36$  cromosomios, num folíolo de uma das folhas dessa brotação. O broto, porém, começou a se desenvolver mais rapidamente num setor que noutro, encurvando-se por isso, para o lado do menor desenvolvimento. Tal fato sugeriu logo que tal broto estivesse constituído por tecidos de constituição citológica diferente, isto é, que uma parte fosse diplóide, portanto com  $2n = 36$  cromosomios, e outra parte tetraplóide, com  $2n = 72$  cromosomios. Em 20 de Outubro examinamos citologicamente folíolos originados da parte externa daquele broto (parte onde o desenvolvimento foi mais rápido) encontrando  $2n = 36-72$  cromosomios (com maior proporção de células com 72 que com 36 cromosomios); nessa mesma data examinamos folíolos originados da parte interna (de crescimento mais lento), tendo encontrado unicamente células com  $2n = 36$  cromosomios; tais resultados vieram confirmar a suposição anteriormente feita.

N.º 17 — Idêntico tratamento ao da planta n.º 2. As folhas primárias apresentaram-se deformadas e as secundárias caíram. Uma das folhas apresentava unicamente um folíolo. Os folíolos da primeira brotação, isto é, originados do tecido tratado, não foram examinados citologicamente. Quando se deu a segunda brotação examinamos um folíolo (27 de Outubro) e encontramos  $2n = 36$  cromosomios. Exame de uma folha da brotação anterior, entretanto, revelou que ela apresentava estomas bem maiores e em menor número que em folhas não submetidas a idêntico tratamento.

N.º 55 — Em 3 de Setembro a gema apical recebeu uma injeção de colchicina a 0,5%, em solução aquosa de glicerina a 5%. A 12 do mesmo mês a brotação progredia lentamente, o broto apresentando-se um tanto encurvado. A 22 do mesmo mês foi feito exame citológico, sendo encontradas células com  $2n = 36$  e  $2n = 72$  cromosomios. A 18 de Outubro verificamos que, na roseta tratada, somente as folhas primárias se apresentavam com alterações morfológicas.

N.º 56 — Nessa planta fizemos em dois dias consecutivos (1.º e 2 de Setembro de 1943) injeção com colchicina a 0,5% em solução aquosa de glicerina a 5%. Foi tratada uma gema lateral. A 10 de Setembro pudemos examinar folíolo tratado, encontrando  $2n = 36-72-144$  cromosomios. O broto desenvolveu-se vigorosamente e a 21 de Setembro ainda encontramos um folíolo com  $2n = 36-72-144$  cromosomios (mixoplóide). As folhas que se desenvolveram apresentavam-se morfológicamente bastante alteradas, algumas em mosaico, outras deformadas, principalmente as que se desenvolveram por último. As folhas cresceram bastante, atingindo tamanho acima do normal, e um caso interessante foi observado numa folha: dois folíolos se soldaram, costacosta. A 26 de Outubro a gema apical começou a brotar novamente e a 2 de Novembro exame citológico de um folíolo revelou unicamente  $2n = 36$  cromosomios.

**CLONE GS-16** — Desse clone tratamos as seguintes 3 plantas:

N.º 21 — Em 28 de Outubro de 1943 envolvemos o ápice de um pequeno ramo lateral, com um broto em desenvolvimento já com aproximadamente 1 cm. de comprimento numa camisa de colódio, contendo algodão bem embebido numa solução de colchicina a 0,5% em solução aquosa de glicerina a 5%. O tratamento prolongou-se por 24 horas, e quando o algodão foi retirado, ainda se encontrava umedeado. O broto, em consequência desse tratamento, não se desenvolveu e morreu.

N.º 31 — Em 3 de Setembro de 1943 procedemos a uma injeção no broto apical, com uma solução de colchicina a 0,5%, em solução aquosa de glicerina a 5%. A brotação desenvolveu-se normalmente e em 18 do mesmo mês determinamos  $2n = 36$  cromossomos, em folíolo. Observamos, nesse caso, que a cicatriz da injeção, no broto, quasi já havia desaparecido completamente, depois de 20 dias daquela operação e, ainda, que todos os folíolos se desenvolveram do lado oposto ao que recebeu a injeção. As folhas obtidas dessa brotação todas tinham aspecto normal. Na figura 3 apresentamos uma metafase observada a 18 de Setembro de 1943.

N.º 35 — Em 18 de Outubro de 1943 a gema apical estava brotando. O ápice da planta, devidamente desprovido das últimas folhas do crescimento anterior, recebeu uma camisa de colódio contendo em seu interior solução aquosa de colchicina a 0,25%. A camisa foi protegida do sol, por meio de sombra produzida por folhas de seringueira, convenientemente dispostas. No dia seguinte a camisa foi novamente cheia com solução de colchicina com a mesma concentração. As 14 horas desse dia, toda a solução já havia desaparecido (por evaporação e absorção). Em 28 de Outubro colhemos material desse broto, que se apresentava um pouco encurvado, porém, somente encontramos células com  $2n = 36$  cromossomos.

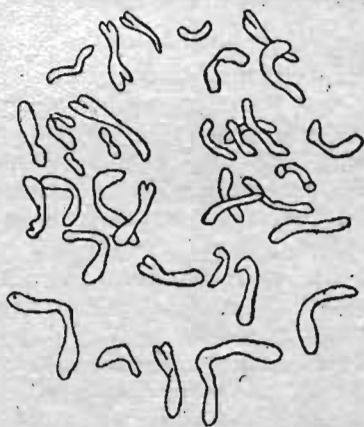


Fig. 3

**Hevea brasiliensis** — Enxerto de GS-16. Metafase somática em meristema de folha nova (1.ª brotação) de gema tratada com solução de colchicina a 1%.  $2n = 36$ . 2750 x.

**CLONE B-14** — Desse clone tratamos 3 plantas:

N.º 36 — Numa gema lateral, com um conta-gotas, aplicamos, durante dois dias (1 e 2 de Setembro de 1943) colchicina a 0,5% em so-

lução aquosa de glicerina a 5%. A brotação decorreu normalmente e vários exames citológicos feitos revelaram mitose normal e  $2n = 36$  cromosomios.

N.º 37 — Idêntico tratamento ao da planta anterior. A brotação decorreu normalmente e com o vigor característico desse clone. No mês de Setembro foram feitos 4 exames citológicos, em todos sendo encontradas unicamente células com  $2n = 36$  cromosomios. Duas folhas primárias aparentemente estavam alteradas, porém exame citológico feito em folíolos da segunda brotação, também revelaram  $2n = 36$  cromosomios. Exame feito com lupa revelou que algumas folhas da primeira brotação (tratadas) apresentavam estomatos maiores que os observados em folhas não tratadas da mesma planta.

N.º 38 — Idêntico tratamento ao da planta n.º 36. O broto desenvolveu-se lenta, porém normalmente, e exame citológico posterior deu em resultado unicamente células com  $2n = 36$  cromosomios.

#### CLONE B-3363 — Desse clone tratamos 7 plantas:

N.º 39 — Gema lateral recebeu uma injeção de colchicina a 0,5% em solução aquosa de glicerina a 5%, no dia 3 de Setembro de 1943. O broto desenvolveu-se lentamente, porém com aparência normal apesar de um tanto encurvado. Em 25 de Setembro encontramos um folíolo com tecido mixoplóide, revelando  $2n = 36-72$  cromosomios. Exames citológicos procedidos em folíolos da brotação seguinte, nos dias 3 e 7 de Novembro, revelaram somente tecido normal, com  $2n = 36$  cromosomios.

N.º 40 — Tratamento idêntico ao da planta anterior, efetuado nos dias 1.º e 2 de Setembro de 1943. As folhas primárias cresceram com alterações morfológicas deformadas, em mosaico, enquanto as secundárias apresentavam-se normais. Em 3 de Novembro, exame citológico de folíolos da segunda brotação, revelaram unicamente células com  $2n = 36$  cromosomios.

N.º 41 — Tratamento idêntico ao da planta n.º 39. O broto desenvolveu-se vigorosamente e a 22 de Setembro encontramos tecido mixoplóide num folíolo examinado, com  $2n = 36-72$  cromosomios. As folhas se desenvolveram deformadas, principalmente as primárias. A 18 de Outubro, da segunda brotação, aparentemente normal, colhemos material e encontramos realmente  $2n = 36$  cromosomios.

N.º 42 — Tratamento idêntico ao da planta n.º 39. Também neste caso obtivemos tecido mixoplóide, com  $2n = 36-72$  cromosomios, e na segunda brotação unicamente tecido normal, com  $2n = 36$  cromosomios.

N.º 43 — Em 21 de Agosto de 1943 a gema apical foi tratada com gotas de uma solução aquosa de colchicina a 1%. Esse tratamento foi repetido no dia seguinte e no dia 23 fizemos uma injeção com colchicina a 1% em solução aquosa de glicerina a 10%. Nada de anormal

foi observado no desenvolvimento da brotação dessa planta, e exames citológicos revelaram unicamente células com  $2n = 36$  cromosomios.

N.º 44 — Em 21 de Agosto de 1943 a gema apical foi tratada com gotas de uma solução aquosa de colchicina a 1%, tratamento esse que foi repetido no dia seguinte. Em 23 de Agosto o tratamento foi feito com colchicina a 1% em solução aquosa de glicerina a 10%. A brotação decorreu normalmente e a 3 de Outubro examinamos um folíolo da brotação seguinte, encontrando  $2n = 36$  cromosomios. Entretanto, exame de uma folha da roseta anterior (tratada), feita em 26 de Outubro, revelou estomatos maiores que os encontrados em folhas não tratadas.

N.º 45 — Idêntico tratamento ao da planta n.º 39, feito a 3 de Setembro de 1943. A brotação decorreu normalmente e, durante ela, nos dias 10 a 24 de Setembro, foram examinados vários folíolos, sendo encontradas células com  $2n = 36$  e  $2n = 72$  cromosomios. As folhas cresceram normalmente e uma delas foi observada ter 5 folíolos, em lugar do número normal, que é 3. Em Novembro, nova contagem, revelou unicamente células com  $2n = 36$  cromosomios.

CLONE B-3381 — Desse clone sòmente foi tratada uma planta.

N.º 46 — Uma gema lateral foi tratada com gotas de colchicina a 0,5%, em solução aquosa de glicerina a 5%, nos dias 1.º e 2 de Setembro de 1943. Em 11 de Setembro examinamos um folíolo, encontrando  $2n = 36$  cromosomios. Em 18 desse mesmo mês encontramos um folíolo com células tendo tanto 36 como 72 cromosomios, e a 22 do mesmo mês encontramos um folíolo com  $2n = 36-72-144$  cromosomios. As folhas desenvolveram-se com alterações morfológicas, em mosaico. Em 18 de Outubro começou segunda brotação, e em fins desse mês determinamos  $2n = 36$  cromosomios em folíolos dessa brotação.

CLONE B-3384 — Trabalhamos com 4 plantas desse clone.

N.º 47 — Em 3 de Setembro uma gema lateral recebeu uma injeção de colchicina a 0,5% em solução aquosa de glicerina a 5%. A brotação desenvolveu-se lentamente, e sòmente foi obtida uma folha, e esta rudimentar. A brotação estacionou, e outra gema, situada próxima do local tratado, desenvolveu-se. Em 27 de Outubro examinamos um folíolo dessa nova brotação, encontrando  $2n = 36$  cromosomios.

N.º 48 — Idêntico tratamento ao da planta n.º 47. A brotação desenvolveu-se naturalmente e a 11 de Setembro pudemos examinar citologicamente um folíolo tratado, encontrando  $2n = 36$  cromosomios. O broto desenvolveu-se bem, porém sòmente com uma folha primária de aspecto normal e as folhas secundárias todas com alterações morfológicas, bastante espessas e deformadas. Observamos estomatos



muito grandes nessas folhas, porém em folíolos obtidos da brotação seguinte, sòmente observamos células com  $2n = 36$  cromosomios.

N.º 49 — Um broto com 2 cm. de comprimento foi envolvido em uma camisa de colódio, contendo algodão embebido em uma solução aquosa de colchicina a 1%. O tratamento prolongou-se por 24 horas e quando o algodão foi retirado ainda estava bastante húmido. Um contra-tempo não nos permitiu examinar material colhido dessa planta.

N.º 50 — Idêntico tratamento ao da planta n.º 47. A brotação decorreu normalmente e sempre encontramos  $2n = 36$  cromosomios. Em 26 de Outubro examinamos algumas folhas primárias, da roseta tratada, encontrando estomatos maiores que em folhas não tratadas. Exame dos folíolos da segunda brotação, porém, revelaram sòmente células com  $2n = 36$  cromosomios.

#### CLONE F-212 — Tratamos as 3 plantas seguintes:

N.º 52 — Durante dois dias seguidos, 1.º e 2 de Setembro de 1943, uma gema lateral foi tratada com gotas de colchicina a 0,5% em solução aquosa de glicerina a 5%. Posteriormente desenvolveram-se 7 brotos nessa planta, e tendo sido perdida a etiqueta correspondente, não pudemos distinguir aquele que havia sido tratado. Entretanto, um dêles, examinado, revelou unicamente células com  $2n = 36$  cromosomios.

N.º 53 — Tratamento idêntico ao da planta n.º 52. A brotação decorreu normalmente, sendo encontradas unicamente células com  $2n = 36$  cromosomios.

N.º 54 — Em 21 de Agosto de 1943 a gema apical foi tratada com uma solução aquosa de colchicina a 1%. No dia seguinte foi repetido o tratamento, e no dia 23 de Agosto a gema recebeu uma injeção de colchicina a 1% em solução aquosa de glicerina a 10%. Em 31 de Agosto examinamos um folíolo do broto tratado, encontrando  $2n = 36$  cromosomios. O broto desenvolveu-se encurvado, com as folhas primárias externas um tanto deformadas; as internas apresentavam-se com desenvolvimento atrasado. Em 6 de Setembro examinamos um folíolo da parte interna da curvatura do broto, encontrando  $2n = 72$  cromosomios. Foi observado que no lado da cicatriz deixada pela injeção, não havia folhas, e que as do lado oposto se apresentavam deformadas, em mosaico. Outros exames citológicos revelaram tecido somático com  $2n = 36-72$  cromosomios. Na figura 4 apresentamos uma metafase de célula normal dessa planta.

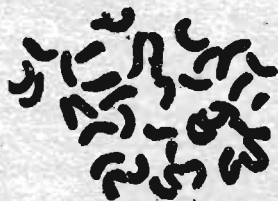


Fig. 4

*Hevea brasiliensis* — Enxerto de F-212. Metafase somática em meristema de folha nova (1.ª brotação) de gema tratada com solução de colchicina a 1%.  $2n = 36$ . 1650 x.



velou  $2n = 36-72$  cromosomios. Na figura 6 apresentamos uma metafase em célula com 36 cromosomios.

**CLONE F-1710** — Também somente uma planta deste clone, foi tratada.

N.º 71 — Em 21 de Agosto de 1943 a gema apical foi tratada com gotas de uma solução aquosa de colchicina a 1% e esse tratamento foi repetido no dia seguinte. No dia 23 foi feita uma injeção com colchicina a 1% em solução aquosa de glicerina a 10%. O broto desenvolveu-se muito lentamente e somente a 20 de Outubro foi possível colher material em boas condições para exame citológico, que revelou  $2n = 36-72$  cromosomios. Na figura 6 apresentamos uma metafase em célula com 36 cromosomios.

**CLONE GX-349** — Trabalhamos com 3 plantas desse clone.

N.º 75 — Em 19 de Outubro de 1943 o broto apical, com mais ou menos 3 cm. de comprimento, foi envolvido numa camisa de colódio, contendo algodão embebido em colchicina a 1% em solução aquosa de glicerina a 10%. O tratamento prolongou-se por 24 horas. No dia 26 de Outubro foi verificado que a parte apical do broto estava completamente queimada e que as gemas estavam mortas.

N.º 76 — Em 19 de Outubro de 1943, o broto apical, que estava com aproximadamente 3 cm. de comprimento, foi envolvido numa camisa de colódio, contendo algodão bem embebido numa solução aquosa de colchicina a 0,25%. A camisa foi protegida do sol, por meio de sombra. O tratamento durou 48 horas. Em 26 de Outubro o broto tinha aproximadamente 6 cm. de comprimento e apresentava leves sinais de queimadura. Em 7 de Novembro foi possível colher material em condições de ser estudado citologicamente, sendo encontradas unicamente células com  $2n = 36$  cromosomios.

N.º 77 — Em 21 de Agosto de 1943 a gema apical foi tratada com gotas de uma solução aquosa de colchicina a 1%, e esse tratamento foi repetido no dia seguinte. Em 23 de Agosto foi feita uma injeção com colchicina a 1% em solução aquosa de glicerina a 10%. Em 5 de Novembro foi observado que as folhas secundárias haviam caído e que as folhas primárias apresentavam-se algo deformadas, e com suas gemas axilares já brotando. Da brotação dessas gemas axilares, bem como da de outras gemas laterais, foi colhido material e feito exame citológico, sendo sempre encontrados 36 cromosomios.

### Tamanho e número de estomatos em folhas tratadas com colchicina.

De acôrdo com as observações descritas nos períodos anteriores, em muitas plantas foi observado que o tratamento havia conduzido a um aumento no tamanho dos estomatos das folhas e, ao mesmo tempo, a uma redução no seu número.

Resumindo, tal fato foi observado nas seguintes plantas: Clone F-315, n.º 5, n.º 16 e n.º 17; Clone B-14, n.º 39 e n.º 44; Clone F-1620, n.º 64 e n.º 65.

Tais resultados não indicam que em outras plantas também não tivessem ocorrido as mesmas alterações morfológicas aqui citadas, pois, nesse ponto, nosso protocolo de campo foi falho, pelo fato de não termos examinado todas as folhas tratadas, de todas as plantas estudadas, o que deveria ter sido feito, si se quizesse obter resultados mais conclusivos sobre esse assunto.

Para o caso da planta n.º 16, do Clone F-315, tomamos uma folha tratada, em que havíamos observado as mencionadas alterações morfológicas, e uma folha não tratada, colhida da roseta anterior, e estudamos esse material em laboratório. Em primeiro lugar determinamos o número de estomatos por milímetro quadrado, o que foi feito por contagem do número encontrado em 15 pontos diversos de cada uma das folhas. Na folha tratada com colchicina, encontramos uma média de 146,65 estomatos por  $\text{mm}^2$ , enquanto na folha não tratada essa média se elevou a 351,10. Houve, portanto, uma redução no número de estomatos, na proporção de aproximadamente 2,5:1.

Em seguida, determinamos a dimensão do maior diâmetro dos estomatos, o que foi feito em 50 estomatos de cada folha em estudos. Nos quadros II e III apresentamos os resultados dessas medidas, que são apresentados em unidades do micrometro ocular usado.

QUADRO II — Comprimento de 50 estomatos de uma folha, tratada com colchicina, da planta DC4-16 (F-315), em unidades do micrometro ocular (Média — 18,95).

19,0	19,0	19,0	18,5	20,5
21,0	19,0	19,0	18,5	19,0
17,0	17,0	18,0	19,0	19,0
20,5	21,0	17,5	21,5	19,5
18,5	19,0	20,0	19,0	19,5
18,0	16,5	19,0	19,0	20,0
19,5	18,0	20,5	17,5	21,0
17,0	17,0	18,0	18,5	19,5
17,0	20,0	20,0	17,0	19,0
17,5	20,5	18,5	20,0	20,5

Como para o aumento em que foram feitas as observações, uma divisão do micrometro ocular equivalia a 1,555 micra, obtivemos para a média da folha tratada

$$18,95 \times 1,555 = 29,47 \text{ micra}$$

QUADRO III — Comprimento de 50 estomatos de uma folha normal (não tratada) da planta n.º DC4-16 (F-315), em unidades do micrometro ocular (Média — 13,06).

12,0	13,5	13,0	13,5	14,0
13,0	12,5	13,0	13,0	12,5
13,0	14,0	12,0	13,0	13,0
14,5	13,0	14,5	13,0	14,5
12,0	13,0	12,0	15,0	13,0
13,0	12,0	12,0	13,0	14,0
14,0	13,5	13,0	13,0	14,0
13,0	13,0	13,5	14,0	13,0
12,5	13,0	13,5	13,0	12,5
10,0	12,5	13,0	14,0	13,0

Tendo sido feitas as medidas, sob o mesmo aumento que no caso anterior, o comprimento médio dos estomatos dessa folha era portanto

$$13,06 \times 1,555 = 20,31 \text{ micra}$$

Esses resultados mostram que, enquanto numa folha normal os estomatos tinham um comprimento médio de 20,31 micra, numa folha tratada com colchicina tal dimensão havia crescido para 29,47 micra, ou seja um aumento de quase 50% nessa medida linear.

### CONCLUSÕES:

a) 39 enxertos de seringueira, representando 12 clones, foram tratados com colchicina, de várias maneiras. Da brotação desenvolvida de gemas tratadas, foram examinados citologicamente vários folíolos de cada planta, sendo encontradas células com  $2n = 36$  cromossomos em todos os clones estudados (F-315, GS-16, B-14, B-3363, B-3381, B-3384, F-212, F-1620, F-1705, F-1710 e GX-349) menos no clone F-409 (em que só foram observadas células com  $2n = 72$  cromossomos). Folíolos contendo células com  $2n = 72$  cromossomos foram observados nos clones F-315, B-3363, B-3381, F-212, F-409, F-1620 e F-1710. Folíolos com células contendo  $2n = 144$  cromossomos somente foram observados nos clones F-315 e F-3381.

b) Das 39 plantas tratadas, em 16 foram observados folíolos contendo células com  $2n = 72$  ou  $2n = 144$  cromossomos, isto é, em 16 plantas houve duplicação e re-duplicação do seu número de cromossomos.

c) Com exceção do clone F-409, em todos os casos em que foi observada alteração no número de cromossomos, os folíolos examinados citologicamente apresentavam tecido de constituição mixoplóide.

d) Em todos os casos, após novo desenvolvimento das plantas (segunda brotação), somente foram encontrados folíolos contendo células com  $2n = 36$  cromossomos.

e) Em certos casos, apesar de não ter sido observada duplicação do número de cromossomos da planta, foram observadas alterações morfológicas nas folhas (deformações, aumento ou diminuição do número de folíolos, etc.) e, também, alteração no tamanho e número dos estomatos, que se apresentavam maiores e em menor quantidade, em folhas tratadas, que naquelas que não haviam recebido tratamento.

f) Na planta n.º 16 (clone F-315) verificamos que numa folha normal, não tratada, havia 351,10 estomatos de 20,31 micra de comprimento, por mm.<sup>2</sup>, enquanto que numa folha tratada, dessa mesma planta, havia unicamente 146,65 estomatos de 29,47 micra, por mm.<sup>2</sup>.

g) Os 12 clones examinados têm, normalmente,  $2n = 36$  cromosomios em seu tecido somatico.

### 5.º ENSAIO

Diante dos resultados obtidos com os ensaios anteriores, que revelaram muitas falhas na técnica da aplicação da colchicina, resolvemos — antes de montarmos um outro ensaio com enxertos de seringueira — trabalhar ainda com plantas obtidas de sementes, para estudos também de técnica. Com o fito de se poder aproveitar o material tratado, em estudos posteriores, resolvemos, também, trabalhar com sementes colhidas de seringueiras conhecidas. Antes, porém, de darmos início a essas investigações, resolvemos fazer ainda algumas experiências preliminares, com sementes de seringueiras quaisquer.

Em 15 de Janeiro de 1944 tomamos 60 sementes de seringueira, procedentes da região "Ilhas", e as descascamos cuidadosamente. Em seguida, colocamos grupos de sementes — 10 em cada caso — em caixas de Petri, contendo o seguinte:

- a) 25 cc. de solução aquosa de colchicina a 0,25%
- b) idem, a 0,125%
- c) idem, a 0,063%
- d) idem, a 0,032%
- e) idem, a 0,016%
- f) 25 cc. de água destilada.

No dia seguinte foi feita a seguinte observação:

- a) 1 semente embolorada e 1 podre
- b) idem
- d) 2 sementes emboloradas
- f) 2 sementes emboloradas, 1 podre e 1 machucada.



Depois de 48 horas das sementes permanecerem imersas no líquido, foram lavadas e colocadas em outras caixas de Petri, contendo 25 cc. de água destilada. Nessa ocasião (17 de Janeiro) foi observado:

- a) 1 semente podre
- e) 2 sementes podres

As sementes permaneceram na água durante dois dias, sendo, então, colocadas em câmara húmida, sobre algodão hidrófilo humedecido e recoberto por papel de filtro. Nessa ocasião (4 dias depois de iniciado o ensaio), 3 sementes da série f estavam começando a germinar.

Em 22 de Janeiro era a seguinte a situação da experiência (resumo das observações feitas até essa data):

- a) 6 sementes podres e 1 embolorada
- b) 8 sementes podres e 1 embolorada
- d) 5 sementes podres e 2 emboloradas
- e) 2 sementes podres
- f) 5 sementes podres e 2 emboloradas e sementes germinando.

Uma das sementes em germinação, da série f, já apresentava radícula com 3 mm. do comprimento.

Dessa data em diante foi-se verificando a germinação de mais algumas sementes, das várias séries, todas elas com as raízes de aspecto normal. Vimos, então, que o método apresentava um grande inconveniente, pelo fato das raízes da seringueira (como normalmente acontece) se desenvolverem sempre com vários dias de antecedência sobre o caule e, para o nosso caso, era este que nos interessava tratar com colchicina. Lembramos, então, que talvez o caminho a seguir fosse, primeiramente, por a germinar as sementes e, depois, proceder ao tratamento com solução de colchicina, nas plantas já com o caule fóra da proteção proporcionada pela casca da semente. Assim, as sementes que posteriormente germinaram, foram

tratadas com solução de colchicina, e as plantas transferidas primeiramente para um caixão contendo serragem de madeira humedecida e, depois, para o campo. Por falta de tempo e em virtude do material não oferecer interesse, não foram elas examinadas citologicamente, apesar de em algumas notarmos engrossamento do caule.

Para o tratamento de sementes clonais, recorremos à Cia. Ford Industrial do Brasil, em Belterra pedindo que nos enviasse sementes colhidas de clones de seringueira reconhecidos como resistentes à "Moléstia das Folhas". O pedido foi satisfeito, tendo-nos sido enviadas sementes ilegítimas dos clones F-170 (I-2279 em 3 de Abril de 1944, e I-2294, em 12 do mesmo mês); F-351 (I-1957 em 8 de Fevereiro de 1944), F-409 (I-2266 em 22 de Março de 1944 e I-2284 em 3 de Abril de 1944) e F-489.

Em Fevereiro e Março de 1944 trabalhamos com as sementes ilegítimas dos clones F-351, F-409 e F-489. As sementes foram postas a germinar em caixas contendo serragem de madeira humedecida. Quando a germinação estava suficientemente adiantada, eram as plantinhas completamente mergulhadas em solução de colchicina contida em vaso de vidro, com o caule voltado para baixo, mas sempre de maneira que as raízes, também, ficassem completamente mergulhadas na solução. As plantas foram quasi que exclusivamente tratadas com solução aquosa de colchicina a 0,25%, sendo 9 delas (F-351) tratadas durante 7 horas em solução aquosa de colchicina a 0,50%. O tempo do tratamento variou de 6 a 21 horas. Depois do tratamento foram as plantas novamente plantadas em caixas contendo serragem de madeira humedecida, e assim mantidas em laboratório por espaço de tempo suficiente para verificação daquelas que morreram em virtude do tratamento. Mais tarde, foram transplantadas para cestos contendo terra e, finalmente, transplantadas para o campo, juntamente com outras, dos mesmos clones, que não haviam sido tratadas. Assim, num dos atuais lotes destinados a experimentação com híbridos I.A.N., no Instituto Agrônômico do Norte, em Belém, na última linha foram assim dispostas as plantas obtidas dessa série de tratamentos:

- F-351 — 53 plantas — 0,25% durante 6 a 21 horas
- F-351 — 27 plantas — sem tratamento
- F-351 — 9 plantas — 0,50% durante 7 horas
- F-409 — 23 plantas — sem tratamento
- F-409 — 7 plantas — 0,25% durante 6 horas
- F-489 — 5 plantas — 0,25% durante 6 horas
- F-489 — 7 plantas — sem tratamento.

Em virtude de acúmulo de serviço, nessa época, tal material não pode ser examinado citologicamente e mesmo mais tarde não pode ele ser convenientemente estudado. Muitas morreram, e em várias das atualmente existentes, se notam alterações morfológicas. Em tempo oportuno será estudado esse material.

#### Seedlings ilegítimos de F-170

Em 3 de Abril recebemos um lote de 169 sementes ilegítimas de F-170, e no dia 12 desse mesmo mês um outro lote, de 66 sementes, nos veio ter às mãos (respectivamente I-2279 e I-2294). Logo após o recebimento desse material, puzemos as sementes a germinar, em caixas contendo serragem de madeira convenientemente humedecida, mantidas dentro do próprio laboratório.

A medida que as sementes iam germinando, e o caulículo atingia aproximadamente 2 cm. de altura, eram as plantas cuidadosamente retiradas da serragem, lavadas e colocadas em vasos, de vidro contendo a solução de colchicina na concentração desejada, onde totalmente mergulhadas permaneciam tempo previamente determinado. As plantas, no recipiente contendo a solução, eram colocadas com o caule para baixo, afim de evitar que, por qualquer motivo, ficasse sua extremidade fóra do líquido. Depois de terminado o tratamento, as plantinhas eram passadas em água corrente e novamente plantadas em caixas contendo serragem de madeira humedecida, também mantidas no laboratório.

Sempre que os folíolos das plantas tratadas atingiam bom desenvolvimento para isso, era coletado material e feito exame

citológico, recebendo então, cada planta, uma etiqueta com o resultado desse exame.

Muitas sementes germinaram e as plantas se desenvolveram sem que houvesse oportunidade de tratá-las. Esse lote ficou constituindo as testemunhas do ensaio.

O tratamento dos seedlings e seu exame citológico foi feito durante os meses de Abril a Junho de 1944. Posteriormente, em Julho, foram as plantas, num total de 190, plantadas a meia sombra, num dos ripados do Instituto Agrônômico do Norte, para posteriores estudos.

De um total de 235 sementes recebidas de Belterra, germinaram 190, ou 80,8%. Dos seedlings obtidos, 88 não puderam ser tratados, constituindo o lote testemunha, e os demais foram tratados da maneira descrita adiante.

**Tratamento 1** — 13 seedlings foram tratados com uma solução aquosa de colchicina a 0,20%, durante 3 horas. Em 12 deles observamos células normais com  $2n = 36$  cromossomos, e somente num verificamos duplicação desse número ( $2n = 72$ ), as folhas em mosaico (planta n.º 90) (\*). As 13 plantas estão vivas.

**Tratamento 2** — 28 seedlings foram tratados com uma solução aquosa de colchicina a 0,20%, durante 6 horas. Foi observada duplicação do número de cromossomos em 3 plantas ( $2n = 72$ ). Atualmente estão vivas 19 plantas desse lote, tendo morrido 9, entre as quais duas que tinham  $2n = 72$  cromossomos. Somente resta viva uma planta com  $2n = 72$  cromossomos (n.º 79).

**Tratamento 3** — 19 seedlings foram tratados com uma solução aquosa de colchicina a 0,20%, durante 9 horas. Em duas plantas (n.º 125 e 133) foi observada duplicação de seu número de cromossomos ( $2n = 72$ ). Dessas 19 plantas, 2 morreram, e as demais estão vivas, inclusive aquelas duas com  $2n = 72$  cromossomos.

**Tratamento 4** — 12 seedlings foram tratados com uma solução aquosa de colchicina a 0,20%, durante 24 horas. Em

---

(\*) A numeração das plantas é atual (Outubro de 1945) e não a primitiva, de 1 a 190 (feita quando foram os seedlings transferidos para o ripado).

8 plantas não foram notadas alterações citológicas, em duas encontramos  $2n = 72$  cromosomios e em duas  $2n = 72-144$  cromosomios. Dessas 12 plantas, 7 morreram e entre elas as 4 que tinham mostrado alterações citológicas.

**Tratamento 5** — 4 seedlings foram tratados com uma solução aquosa de colchicina a 0,25% durante 6 horas. Em duas dessas plantas observamos  $2n = 72$  cromosomios. Atualmente estão vivas somente 2 plantas desse lote, inclusive uma com  $2n = 72$  cromosomios (n.º 135).

**Tratamento 6** — 4 seedlings foram tratados com uma solução aquosa de colchicina a 0,25% durante 9 horas. Não foram notadas alterações citológicas e atualmente se encontram vivas 3 dessas plantas.

**Tratamento 7** — 9 seedlings foram tratados com uma solução aquosa de colchicina a 0,40%, durante 3 horas. Em 3 plantas foi observada duplicação do seu número de cromosomios ( $2n = 72$ ). Atualmente estão vivas 6 plantas desse lote, entre as quais as 3 em que havia sido notada alteração citológica (ns. 151, 154 e 155).

**Tratamento 8** — 10 seedlings foram tratados com uma solução aquosa de colchicina a 0,40%, durante 6 horas. Em 3 plantas foi observada duplicação do seu número de cromosomios ( $2n = 72$ ). Atualmente estão vivas 9 plantas desse lote, incluindo as 3 atrás mencionadas (ns. 144, 145 e 146).

**Tratamento 9** — 3 seedlings foram tratados com uma solução aquosa de colchicina a 0,40%, durante 9 horas. Em 2 plantas observamos duplicação no seu número de cromosomios ( $2n = 72$ ). Desse lote só resta viva uma planta com  $2n = 72$  cromosomios (n.º 140).

**Tratamento 10** — 88 seedlings sem tratamento com solução de colchicina. Restam vivas 80 plantas desse lote.

No quadro IV apresentamos um resumo dos resultados obtidos com a série de tratamentos atrás mencionada.



QUADRO IV — Resultados obtidos com o tratamento de seedlings ilegítimos de F-170, com solução aquosa de colchicina a várias concentrações e durante vários tempos.

TRATAMENTO	SEEDLINGS		% de alt.	N.º DE PLANTAS		% de mortas	Plantas vivas alt.
	Tratados	Alterados		Vivas	Mortas		
1 - 0,20% - 3 h.	13	1	7,8	13	0	0,0	n.º 90
2 - 0,20% - 6 h.	28	3	10,7	19	9	32,1	n.º 79
3 - 0,20% - 9 h.	19	2	10,5	17	2	10,5	n.º 125 n.º 133
4 - 0,20% - 24 h.	12	4	33,3	5	7	58,3	—
5 - 0,25% - 6 h.	4	2	50,0	2	2	50,0	n.º 135
6 - 0,25% - 9 h.	4	0	0,0	3	1	25,0	—
7 - 0,40% - 3 h.	9	3	33,3	6	3	33,3	n.º 151 n.º 154 n.º 155
8 - 0,40% - 6 h.	10	3	30,0	9	1	10,0	n.º 144 n.º 145 n.º 146 n.º 140
9 - 0,40% - 9 h.	3	2	66,6	1	2	66,6	
Total .....	102	20	18,7	75	27	24,2	
10 - s/ trat., .....	88	—	—	80	8	9,1	

Apesar dos dados apresentados no quadro IV não serem conclusivos; alguma orientação pode ser obtida para futuros ensaios, em que se deseje tratar sementes de seringueira com colchicina.

### CONCLUSÕES

a) Para o tratamento de sementes de seringueira, com colchicina, o melhor método consiste em primeiramente pô-las a germinar, e somente iniciar o tratamento quando o caulículo tem aproximadamente 2 cm. de comprimento e está com o tecido meristemático completamente livre da proteção fornecida pela semente (nesse estadio a radícula tem, geralmente, mais de 5 cm. de comprimento).

b) Dos 4 tempos estudados para tratamento de sementes com solução aquosa de colchicina a 0,20%, o que maior porcentagem de alterações produziu foi 24 horas, porém a porcentagem

gem de plantas que morreram, depois do tratamento, foi muito grande, e nenhuma das que se encontravam alteradas citologicamente, resistiu. Ao mesmo tempo, o mesmo tratamento, durante unicamente 3 horas, conduziu à obtenção de uma porcentagem muito baixa de plantas alteradas citologicamente, porém todas as plantas que assim foram tratadas, ainda estão vivas.

c) Para a concentração de 0,20% de colchicina, em solução aquosa, o tempo ótimo para a duração do tratamento de sementes de seringueira parece estar entre 6 e 9 horas.

d) O número de sementes tratadas com solução aquosa de colchicina a 0,25% (nos tempos de 6 e 9 horas) foi muito pequeno para se pretender concluir algum fato de seus resultados.

e) Para uma concentração de colchicina a 0,40%, em solução aquosa, bons resultados foram obtidos quando as sementes foram tratadas durante 3 a 6 horas.

## VI — AS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS OBSERVADAS NUM GRUPO DE SEEDLINGS DE SERINGUEIRA, TRATADOS PELA COLCHICINA

Em capítulos anteriores já nos referimos a vários tipos de alterações morfológicas observadas em seringueiras tratadas pela colchicina, e aqui não convém novamente tratar desse assunto. Apenas queremos fazer um ligeiro apanhado de uma população de seedlings de seringueira, tratados pela colchicina, entre os quais existem plantas com  $2n = 72$  cromossomos e plantas normais, com  $2n = 36$  cromossomos.

Os 190 seedlings ilegítimos de F-170, constantes do quadro IV, foram plantados em ripado, como já foi anteriormente mencionado. Desse grupo de plantas, 102 haviam sido tratadas com solução aquosa de colchicina, a várias concentrações e durante vários tempos, e 88 não haviam recebido tratamento algum. Dessas plantas, estão atualmente vivas (Outubro de 1945) 75 das que foram tratadas, e 80 das não tratadas, e entre aquelas 75, em 12 havíamos anteriormente determinado  $2n = 72$  cromossomos em tecido somático (folíolos novos).

Observações feitas nessas plantas revelaram que quasi todas as que tinham, anteriormente, revelado  $2n = 72$  cromosomios, apresentavam folhas mais espessas ao tacto. Para uma verificação mais exata do fato, foi medida a espessura de folíolos colhidos dessas plantas (\*).

Como já foi dito atrás, todas as plantas encontram-se plantadas em ripado, e, por isso, aproximadamente sujeitas a condições idênticas de insolação. O ripado é de tal forma construído que as plantas recebem cerca de 50% da luz que receberiam si fossem plantadas a pleno sol. Esse fato deve ser levado em conta, pois os resultados que vamos apresentar não podem ser comparados com os obtidos de plantas cultivadas a pleno sol que, parece, normalmente apresentam maior espessura nas folhas, que nas cultivadas na sombra, ou a meia sombra.

A principio pretendíamos medir a espessura de 10 folíolos de cada planta (10 mensurações em cada folíolo), porém mais tarde decidimos medir 10 folíolos unicamente de 50 plantas (não tratadas pela colchicina, e que serviriam de testemunhas), e, também, 10 folíolos de todas as plantas em que, anteriormente, havíamos observado duplicação do seu número de cromosomios. Também foram, ainda, feitas 10 mensurações em 1 folíolo de cada uma das demais plantas (tratadas pela colchicina, porém com número normal de cromosomios).

O trabalho foi iniciado em Outubro de 1945, por nós, porém, depois, resolvemos entregá-lo ao assistente Rubens Lima, que desconhecia por completo quais plantas haviam sido tratadas, e quais as que não o haviam. Todas as medidas de espessura das folhas, das quais tiramos as médias apresentadas neste trabalho, foram efetuadas pelo referido agrônomo.

Após as mensurações referidas, quando recebemos os dados obtidos, para serem analisados, verificamos logo: a) grande uniformidade na espessura das folhas de plantas normais; b) em quasi todas as plantas que, anteriormente, haviam revelado  $2n = 72$  cromosomios, a espessura das folhas era sobremaneira

---

(\*) Para isso nos servimos de um oporelho fabricado por Henry L. Scott, em uso no Laboratório, de Tecnologia da Borracha do Instituto Agrônomo do Norte. Esse aparelho dá os resultados em  $5/10.000''$  (0,127 mm.) e a leitura pode ser feita com aproximação de  $1/2$  divisão, isto é,  $25/100.000''$  (0,00635 mm.).

maior que a de plantas com unicamente  $2n = 36$  cromossomos (confirmando, portanto, o que havíamos notado pelo simples tacto).

Os dados colhidos são de tal fôrma interessantes que resolvemos proceder a um estudo mais detalhado do assunto, ficando sua análise completa para um trabalho posterior, no qual pretendemos adicionar algumas outras observações de interesse. Assim, neste trabalho, deixamos de lado o estudo de 50 seedlings não tratados, e de 1 planta que não apresentava folhas, sob o ripado, em condições normais para serem examinadas, e nos referiremos unicamente às demais 104 plantas.

No quadro V apresentamos o resumo das observações feitas em 92 seedlings ilegítimos de F-170, tratados com colchicina a várias concentrações e durante vários tempos, plantas essas em que não foram notadas alterações morfológicas e, nas quais, anteriormente, observáramos o número normal de cromossomos ( $2n = 36$ ). Nesse quadro os valores obtidos já foram convertidos para o sistema métrico, sendo tabulados em mm.

QUADRO V — Espessura de folhas de seedlings ilegítimos de F-170, tratados e não tratados com colchicina, porém todos com  $2n = 36$  cromossomos.

TRATAMENTO		N.º de plantas	ESPESSURA DAS FOLHAS — mm.		
Conc. %	Tempo - h.		Mínima	Máxima	Média
0,20	3	12	0,107	0,143	0,129
0,20	6	18	0,109	0,142	0,129
0,20	9	15	0,109	0,145	0,130
0,20	24	5	0,118	0,146	0,129
0,25	6	1	—	—	0,122
0,25	9	3	0,123	0,147	0,136
0,40	3	2	0,120	0,131	0,126
0,40	6	6	0,115	0,128	0,118
Total .....		62	0,107	0,147	0,128
Testemunhas ....		30	0,108	0,143	0,127
Gde. Total .....		92	0,107	0,147	0,128

Pelos resultados apresentados no quadro V verifica-se a mencionada uniformidade da espessura das folhas. As variações são muito pequenas e, no geral, as médias são todas muito próximas entre si. É interessante notar-se que, nesse caso, de cada planta tinha sido colhida uma amostra muito reduzida, constante de um único folíolo, no qual foram efetuadas 10 mensurações, ao acaso. Vê-se que o tratamento das plantinhas com colchicina, não levou a alterações morfológicas em plantas nas quais não havia sido notada duplicação do seu número de cromosomios.

No quadro VI apresentamos os resultados obtidos nas mensurações da espessura de folhas colhidas de plantas tratadas pela colchicina e nas quais havíamos, anteriormente, contado  $2n = 72$  cromosomios. Para cada planta foram efetuadas 10 mensurações em cada um dos 10 folíolos colhidos.

QUADRO VI — Espessura de folhas de seedlings ilegítimos de F-170, tratados com colchicina e com o número duplicado de cromosomios ( $2n = 72$ ).

N.º DA PLANTA	ESPESSURA DAS FOLHAS — mm.		
	Mínima	Máxima	Média
79	0,189	0,209	0,197
125	0,189	0,204	0,196
133	0,176	0,192	0,183
135	0,174	0,193	0,179
145	0,154	0,168	0,160
151	0,169	0,182	0,175
155	0,157	0,169	0,164
Média . . .	0,154	0,209	0,179

O estudo dos resultados apresentados no quadro VI mostra maior variabilidade na espessura das folhas dessas plantas, com  $2n = 72$  cromosomios, que na de plantas com  $2n = 36$  cromosomios (quadro V). Também, verifica-se que a espessura



das folhas foi grandemente aumentada, em todos os casos, e que a média da espessura dessas folhas — 0,179 mm. — aumentou de 39% em relação à média da espessura das folhas normais — 0,128 mm.

Nesse quadro não foram incluídos os resultados observados em outras plantas, nas quais, também, havíamos anteriormente encontrado  $2n = 72$  cromosomios, pelo seguinte: a) em 3 delas, a espessura observada nas folhas, si bem que superior à notada em plantas com  $2n = 36$  cromosomios, mostrou-se bastante inferior à observada nas demais plantas com número duplicado de cromosomios (plantas 140, 144 e 154); possivelmente o tratamento não havia sido completo, isto é, é provavel que tenha se desenvolvido uma gema de tecido com  $2n = 36$  cromosomios (tal fato procuraremos verificar mais tarde); b) em 2 delas (90 e 146) observamos mosaico; na planta n.º 90 as folhas são geralmente de uma coloração verde clara, com áreas de um verde mais escuro; na planta n.º 146 há folhas com espessura inteiramente normal (finas) e folhas inteiramente alteradas (grossas), evidentemente parecendo tratar-se, em ambos os casos, de quimeras.

No quadro VII apresentamos os resultados obtidos com as medidas feitas em 10 folíolos de cada uma das plantas 140, 144 e 154 (10 mensurações em cada um).

QUADRO VII — Espessura das folhas de seedlings ilegítimos de F-170, tratados com colchicina e nos quais havíamos observado duplicação no seu número de cromosomios ( $2n = 72$ ).

N.º DA PLANTA	ESPESSURA DAS FOLHAS — mm.		
	Mínima	Máxima	Médio
140	0,141	0,151	0,147
144	0,130	0,156	0,140
154	0,127	0,144	0,135

No quadro VIII apresentamos as observações feitas nas plantas 90 e 146.

QUADRO VIII — Espessura das folhas de quimeras obtidas de seedlings ilegítimos de F-170, tratados pela colchicina.

N.º da planta	ESPESSURA DAS FOLHAS — mm.			OBSERVAÇÕES
	Mínimo	Máxima	Média	
90	0,095	0,152	0,100	Manchas verde-claro
90	0,108	0,152	0,127	Manchas verde-esc.
146	0,116	0,142	0,125	Folhas normais
146	0,157	0,166	0,162	Folhas alteradas

A planta n.º 90, em Outubro de 1945, somente apresentava folhas na última roseta, e em número de 13. Dessas 13 folhas, 6 eram de coloração verde-claro, sem mancha alguma na página superior, e com raras áreas de um verde mais escuro, irregulares, na página inferior. As outras 7 folhas eram assim constituídas (página superior): 1) 1 folíolo verde-claro, folíolo central metade verde-escuro e metade verde-claro, outro folíolo verde-escuro; 2) 1 folíolo lateral metade verde-claro e metade verde-escuro, os outros 2 verde-escuro; 3) os dois folíolos laterais com mancha grande verde-escuro, o folíolo central inteiramente verde-claro; 4) dois folíolos laterais verde-claro, o central com pequena mancha verde-escuro; 5) 1 folíolo lateral verde-claro e o outro com pequena mancha verde-escuro, e o central metade verde-claro e metade verde-escuro; 6) 1 folíolo lateral verde-claro, e outro metade verde-claro e metade verde-escuro, o central com pequena mancha verde-escuro; 7) 1 folíolo lateral verde-claro e o outro e o central com pequenas manchas verde-claro. Na página inferior os folíolos apresentam manchas verde-escuro, irregulares (mais claras que as da página superior) cuja posição independe da posição das manchas localizadas na página superior; os estomatos são mais conspícuos nas manchas escuras que nas claras.

A planta n.º 146 não mais tem folhas nas 3 primeiras rosetas; as duas seguintes apresentam folhas de tamanho normal; em seguida há duas outras rosetas com folhas de tamanho reduzido (aproximadamente 1/3 de comprimento das folhas normais); a última roseta tem folhas todas com tamanho normal, e delas é que foram colhidos os folíolos para estudos sobre sua espessura. Entre estas há folhas com os 3 folíolos de pequena espessura (normais), folhas com os 3 folíolos com grande espessura (alterados) e, também, folhas com 1 folíolo lateral normal, o central metade normal e metade alterado, e o outro folíolo lateral inteiramente alterado. Neste caso, parece estarmos em presença de uma quimera sectorial.

## VII — SUMARIO E CONCLUSÕES

1 — Em trabalhos de seleção da seringueira à “Moléstia das Folhas”, causada pelo fungo *Dothidella ulei*, encontram-se aproximadamente 100 a 120 plantas suficientemente resistentes à moléstia, para cada grupo de 1.000.000 de seedlings estudados.

2 — A seleção de seringueiras de alta capacidade de produção exige o estudo de grandes populações de plantas e, para o caso de regiões onde ocorre a “Moléstia das Folhas”, necessário se torna dispor, portanto primeiramente de grandes populações de plantas já anteriormente selecionadas como resistentes à referida moléstia, o que torna a investigação excessivamente trabalhosa e consumidora de tempo.

3 — Segundo estudos anatômicos da casca da seringueira, realizados por Gunnery (10), em plantas de alta capacidade de produção se encontram tubos crivados de grande diâmetro associados a vasos latíferos grossos, enquanto em seringueiras de baixa capacidade de produção os tubos crivados são de pequeno diâmetro e associados a vasos latíferos finos.

4 — Lançando-se mão da correlação atrás mencionada, será possível a eliminação, com pequena idade, de grande número de seringueiras nada prometedoras quanto a sua futura produtividade.

5 — Investigações feitas em grande número de plantas revelam que, com a duplicação do seu número de cromosomios, pela ação da colchicina, no geral obtem-se plantas com estomatos maiores, folhas mais grossas, etc., enfim, obtêm-se plantas com células maiores que nas plantas normais, não tratadas.

6 — O autor, considerando que um tubo crivado ou um vaso latífero nada mais é sinão uma sucessão de células e, considerando o que foi discutido em 3, supõe que será possível obter-se um aumento na produção de latex de seringueiras de baixa produção, pela duplicação do seu número de cromosomios, pela ação da colchicina. Assim, será possível abreviarem-se os trabalhos de seleção, pelo aproveitamento de grande número de clones de seringueira, já selecionados como resistentes à "Moléstia das Folhas", porém de baixo rendimento em latex, duplicando-se o seu número de cromosomios e, conseqüentemente, aumentando-se sua capacidade de produção.

7 — De acôrdo com investigações anteriormente efetuadas por outros autores, *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. tem  $2n = 36$  cromosomios, e isso é confirmado pelos estudos que o autor efetuou no Instituto Agrônomico do Norte. Também tem 36 cromosomios em seu tecido somático *Hevea spruceana* (Benth.) Muell. Arg. As opiniões ainda não são concordes si tais seringueiras, com  $2n = 36$  cromosomios, são di — ou tetraploides.

8 — Para a contagem do número de cromosomios em tecido somático da seringueira o autor adotou a técnica de Baldwin (1), com ligeiras modificações, sempre com ótimos resultados. As preparações eram feitas a partir de folíolos bastante novos, com 10 a 15 mm. de comprimento.

9 — Vários ensaios foram efetuados pelo autor, em Belém, com o fito de obter duplicação do número de cromosomios de *Hevea brasiliensis*, tanto a partir de plantas novas, como de enxertos, de sementes ainda não germinadas e de sementes em germinação. Uma técnica que deu bons resultados foi desenvolvida a partir de sementes em germinação. Para o caso do tratamento de plantas já enxertadas, a técnica adotada não deu resultados satisfatórios, necessário se tornando modificá-la convenientemente.

10 — Pela ação da colchicina o autor pode obter tecido somático da seringueira com células contendo  $2n = 72$  e  $2n = 144$  cromosomios. Na maioria dos casos, porém, o tecido resultante do tratamento com colchicina era de constituição mixoplóide ( $2n = 36$  e  $2n = 72$ , ou  $2n = 36$ ,  $2n = 72$  e  $2n = 144$  cromosomios, num mesmo folíolo).

11 — Os seguintes clones de *Hevea brasiliensis* têm  $2n = 36$  cromosomios: B-14, B-3363, B-3381, B-3384, F-212, F-315, F-1620, F-1705, F-1710, GS-16 e GX-349. Seedlings ilegítimos dos seguintes clones também apresentaram  $2n = 36$  cromosomios: PB-86, TJ-1, F-170, F-351, F-409 e F-489.

12 — Foram observados vários tipos de alterações morfológicas em plantas tratadas pela colchicina: folhas gigantes; alteração no número de folíolos (que normalmente é de 3), sendo observadas folhas com 1 a 7 folíolos; deformações dos folíolos (alterações na forma, tamanho e textura); soldagem de folíolos, costa-a-costa; maior espessura das folhas; maior tamanho dos estomatos com consequente redução do seu número relativo, etc.

13 — Numa folha tratada pela colchicina, do clone F-315, foi observado que os estomatos tinham 29,47 micra no seu maior diâmetro, e eram em número de 146,65 por mm.<sup>2</sup>, enquanto em folha não tratada, da mesma planta, os estomatos tinham 20,31 micra em seu maior diâmetro e eram em número de 351,10 por mm.<sup>2</sup>.

14 — Em 92 seedlings ilegítimos de F-170, com  $2n = 36$  cromosomios, o autor encontrou uma espessura média de 0,128 mm., nas folhas desenvolvidas a meia sombra, em ripado; em 7 seedlings ilegítimos do mesmo clone, com  $2n = 72$  cromosomios (duplicação obtida artificialmente por meio da colchicina) o autor obteve uma espessura média de 0,179 mm. em folhas também desenvolvidas a meia sombra, no mesmo ripado.

15 — Em dois casos, de um grande lote de seedlings ilegítimos de F-170, obtidos a partir de sementes em germinação e tratadas com solução de colchicina, o autor obteve quimeras. Ainda não foi verificado de que tipo são essas quimeras, parecendo que uma é do tipo sectorial.



16 — O autor tem fundadas esperanças em conseguir aumentar a produção de latex de seringueiras de baixa produção, e altamente resistentes à “Moléstia das Folhas” — sem, com isso, torná-las mais susceptíveis a essa enfermidade — por meio da duplicação do seu número de cromosomios, obtida a partir de uma adequada técnica de tratamento, e sua sucessiva multiplicação por enxertia.

17 — É pensamento do autor dar prosseguimento ao trabalho da seguinte fórmula:

a) multiplicar, por enxertia, as plantas ilegítimas de F-170, com  $2n = 72$  cromosomios e, também, uma série de plantas desse mesmo lote, porém com  $2n = 36$  cromosomios, e instalar um ensaio para estudar comparativamente sua produção e resistência à “Moléstia das Folhas”;

b) para o caso da quimera n.º 146, parece possível dela obterem-se por enxertia, plantas com  $2n = 36$  e plantas com  $2n = 72$  cromosomios. Nesse caso, multiplicá-las em escala conveniente e estudar comparativamente seu rendimento em latex e, ainda, a influência da duplicação do número de cromosomios na sua resistência às moléstias;

c) duplicar o número de cromosomios de vários clones de seringueira, já provados como resistentes à “Moléstia das Folhas”, e posteriormente, estudar a produtividade de cada clone, com o número normal de cromosomios, em comparação com material obtido desse mesmo clone, porém com número duplicado de cromosomios;

d) duplicar o número de cromosomios de vários clones de seringueira, de alta produtividade, porém muito susceptíveis à “Moléstia das Folhas”, como, por exemplo: TJ-1, TJ-16, PB-186, WAR-4, etc. e estudar as consequências dessa duplicação no grau de resistência à referida moléstia.

## VIII — SUMMARY

1 — During the selection work of *Hevea brasiliensis* strains, resistant to the Leaf Blight (*Dothidella ulei*), it was found that the number of resistant plants per one million seedlings studied was about 100 to 120.

2 — Because of the low percentage of resistant seedlings it will be understood that, in regions where the Leaf Blight exists, the total number of plants to be studied in order to obtain yield as well as resistance becomes enormous. Yield investigations, of course, can take place only among seedlings which previously have been selected for resistance.

3 — According to the studies of the bark of *Hevea brasiliensis* made by Gunnery (10) it was found that the sieve tubes and latex vessels in high yielding clones were of larger diameter than they were in low yielding clones, or seedlings.

4 — Making good use of the knowledge just mentioned it should be possible to eliminate the larger part of a seedling population and carry along only the promising ones.

5 — Investigations made in a large number of plants reveal that a doubling of chromosomes by the use of colchicine generally produces plants with larger stomata, thicker leaves, etc. As a whole, colchicine treated plants have larger cells than untreated plants have.

6 — Considering that the sieve tubes and the latex vessels are nothing but a series of cells, and considering the fact discussed under 3, the author believes that it will be possible to increase the production of latex in the somewhat lower yielding resistant selections by the usage of colchicine and thereby a doubling of the chromosomes. If so, the selection work would be considerable easier since the better ones of the large number of resistant selection already made could be utilized directly for field plantations.

7 — A number of authors who have made studies of the *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. have given the chromosome number of this species as  $2n = 36$ . This was confirmed by the author during his studies made at the Instituto Agrônômico do Norte. The *H. spruceana* also has 36 chromosomes. There is still some indecision among the various authors if those plants are di - or tetraploid.

8 — The method employed in the determination of chromosomes in the somatic tissues of *H. brasiliensis* was a slight modifications of that used by Baldwin (1). The results were always satisfactory. The preparations for the counts were

made from very young leaflets, at a time when they were about 10 to 15 millimeter long.

9 — Various experiments were run by the author at the Belém Institute in order to obtain a doubling of chromosomes in the *H. brasiliensis*. The experiments included young seedlings and budded stumps as well as germinated and ungerminated seeds. The best results were obtained with germinated seeds. In the case of budded stumps, the results were not satisfactory and experiments with these will be continued under modified procedures.

10 — By the action of colchicine the author was able to obtain a chromosome number of  $2n = 72$  and  $2n = 144$  in the cells of the somatic tissues. In the majority of cases however, the colchicine treatment caused a mixoploid condition of  $2n = 36$  and  $2n = 72$ , or  $2n = 36$ ,  $2n = 72$  and  $2n = 144$  in the same leaflet.

11 — The following clones of *H. brasiliensis* have  $2n = 36$  chromosomes: B-14, B-3363, B-3381, B-3384, F-212, F-315, F-1620, F-1705, F-1710, GS-16 and GX-349. Illegitimate seedlings of clones PB-86, TJ-1, F-170, F-351, F-409, also have  $2n = 36$ .

12 — Various morphological changes were observed in the colchicine treated plants, such as: gigantic leaves, deformation of leaflets (form, size and texture), fusion of the leaflets and thicker leaves. Also the number of leaflets, which normally is 3, could be found in numbers from 1 to 7. As mentioned under 5, the stomata often were found to be considerably larger than in untreated leaves but at the same time the number per area was reduced.

13 — By examination of a leaf from a colchicine treated plant of F-315, it was found that the average, largest diameter, of the stomata was 29,47 micra with a number of 146,65 per  $\text{mm}^2$ . The corresponding figures from an untreated leaf of the same plant were 20.31 micra and 351.10 per  $\text{mm}^2$ .

14 — Among 92 illegitimate seedlings of F-170 with  $2n = 36$  chromosomes, the author encountered an average leaf thickness of 0.128 mm. The plants from which the leaves

were taken were growing under half shade in a green house (slat construction). Among 7 illegitimate colchicine-treated seedlings of the same clone and growing under the same conditions the chromosome number was  $2n = 72$  and the average leaf thickness was 0.179 mm.

15 — In a large plot of illegitimate seedlings of F-170, colchicine-treated at the time of germination, the author obtained two chimeric plants. Up to this time the chimeric type has not been verified but one of them is believed to be of the sectorial type.

16 — The author has great expectation that colchicine treatments, and thereby doubling of the chromosomes, may increase the production of latex in clones ordinarily low in yield and also increase the resistance to the leaf blight. It is yet necessary to improve the tecnic of the colchicine treatment but it is firmly believed that once the stabilization of the increased chromosome number has taken place, by seed treatment or treatment of buddings, this new character will reproduce without change in the buddings made thereafter.

17 — It is the author's plan to proceed with these new studies in the following manner:

a) To multiply, by buddings, the illegitimate and colchicine-treated seedlings of F-170 that have been found to possess a chromosome number of  $2n = 72$ . At the same time an equal number of untreated seedlings from the same source will be budded and planted under equal condition. By the time the two series come into production a comparison can be made between both yield and resistance.

b) In the case of the chimeric plants mentioned under 15, it is reasonable to expect that plants of different chromosome number can be obtained. That is, some of the buds of the plants may give a  $2n = 36$  value and others a  $2n = 72$  value. If so, each of the two categories will be multiplied in convenient number later to be compared in regard to yield and resistance.

c) To make a comparative test between two groups of the same clones, highly resistant to the Leaf Blight. The same number of each clone will be represented in each of the two

groups. One group will have colchicine-treated plants with doubled number of chromosomes while the other will remain as an untreated check in order to compare the yields of one group to the yields of the other.

d) To make a comparative test between two groups of the same clones, high in yield but low in resistance. For instance TJ-1, TJ-16, PB-186, WAR-4, etc. The test will be carried along as under c.

## IX — AGRADECIMENTOS

O autor deseja aqui deixar consignados seus agradecimentos aos senhores:

a) Antonio José Teixeira Mendes, Chefe da Secção de Citologia do Instituto Agronômico do Estado de S. Paulo, em Campinas, pelo fornecimento que fez de 3 gramas de colchicina, para início de seus trabalhos;

b) Companhia Ford Industrial do Brasil, em Belterra, pelo fornecimento de sementes ilegítimas de vários clones de seringueira resistentes à “Moléstia das Folhas”;

c) Rosendo Miranda Tavares, Assistente da Secção de Melhoramento de Plantas do Instituto Agronômico do Norte, que efetuou o plantio, no campo e em ripado, dos seedlings de seringueira mencionados no 5.º ensaio;

d) Rubens Lima, Assistente do Instituto Agronômico do Norte, pelas mensurações efetuadas em folhas de seringueira;

e) Hans G. Sorensen, do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América do Norte, pelo auxílio prestado na confecção do sumário em língua inglesa.

## X — LITERATURA CITADA

1. BALDWIN, J. F. (1939) — Chromosome from leaves. *Science*, vol. 90 (2332):240.
- (\*) 2. BANGHAM, W. N. (1931) — Chromosome of some *Hevea* species. *Journ. Arnold Arb.* 12:287-288.
3. DERMEN, HAIG (1940) — Colchicine polyploid and technique. *Bot. Rev.* 6(11):599-635.



4. DERMEN, HAIG & HENRY F. BAIN (1941) — Periclinal and total polyploidy in cranberries induced by colchicine U.S.D.A. Bur. Pl. Ind., Mim. Note from Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 38:400.
5. DERMEN, HAIG (1941) — Simple and complex periclinal tetraploidy in peaches induced by colchicine. U.S.D.A. Bur. Pl. Ind. Mim. Note from Proc. Agr. Soc. Hort. Sci., 38:141.
6. DERMEN, HAIG, HAROLD H. SMITH & S. L. EMSWELLER. (1942) — The use of colchicine in plant breeding. U.S.D.A. Bur. Pl. Ind. Mim. Note, 1-6.
7. FRANCO, COARACY (1939) — Relation between chromosome number and stomata in coffee. Bot. Gaz. 100 (4):817-827, 2 tab., 2 fig.
8. GRANER, E. A. (1940) — Obtenção de petúnias poliploides por meio da colchicina. Journ. Agron. 3 (1):43-68, 4 tab., 39 fig.
9. GRANER, E. A. (1940) — Tratamento da mandioca pela colchicina. I. Nota preliminar sobre poliploidia indicada pela diferença do tamanho dos estomatos. Journ. Agron. 3 (2):83-98, 4 quadros.
10. GUNNERY, H. (1935) — Yield prediction in *Hevea*. A study of sieve-tube structure in relation to latex yield. Journ. Rub. Inst. Malaya. 6 (1):8-20, 1 tab., 2 fig., 10 est.
- (\*) 11. HEUSSER, C. (1919) — Over de voortplantingsorganen van *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. Arch. v. d. Rubberc. 3:456-514.
- (\*) 12. LEVAN, ALBERT. (1938) — The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*. Hereditas 24 (4):471-486.
13. MENDES, A. J. T. (1939) — Duplicação do número de cromossomos em café, algodão e fumo, pela ação da colchicina. Inst. Agr. Est. S. Paulo. Bol. Técn. 57:1-21, 5 tab., 17 fig.
14. MENDES, A. J. T. (1940) — Polyploid cottons obtained through use of colchicine. I. Cytological observations in octoploid *Gossypium hirsutum*. Bot. Gaz. 102 (2):287-294, 20 fig.
- (\*) 15. NOGUTI, YAKITI, KIDUO OKUMA & HIDETO OKA. (1939) — Studies on the polyploidy in *Nicotiana* induced by the treatment with colchicine. I. General observations on the autotetraploid of *Nicotiana rustica* and *N. tabacum*. Jap. Journ. Bot. 30 (3):309-319, 4 fig.
16. PADDOCK, ELTON F. (1943) — On the number of chromosomes in *Hevea*. Chron. Bot. VII (8):412-413, 1 fig.
17. PERRY, BRUCE A. (1943) — Chromosome number and phylogenetic relationships in the *Euphorbiaceae*. Amer. Journ. Bot. 30 (7):527-543, 2 tab., 90 fig.

---

(\*) As referências precedidas de um asterístico não foram lidas em seu original.

18. RAMAER, H. (1935) — Citology of *Hevea*. *Genetica*. XVII: 193-236, 23 fig., 2 tab.
19. SANDO, W. J. (1939) — A colchicine-induced tetraploid in buckwheat. *Journ. Hered.* 30 (6):271-272, 1 fig.
20. EMITH, HAROLD H. (1939) — The induction of polyploidy in *Nicotiana* species and species hybrids by treatment with colchicine. *Journ. Hered.* 30 (7):291-306, 9 fig.
21. WARMKE, HARRY E. (1935) — A permanent root tip smear method. *Stain Techn.* 10 (3):101-103.

# ÍNDICE

	Pág.
I. Introdução .....	3
II. A colchicina na duplicação do número de cromosomios de plantas. Alterações morfológicas em plantas poliploides..	7
III. O número de cromosomios no gênero <b>Hevea</b> .....	12
IV. Técnica para a contagem de cromosomios em tecido somático de <b>Hevea</b> .....	15
V. A aplicação da colchicina na duplicação do número de cromosomios da seringueira .....	18
VI. Alterações morfológicas observadas num grupo de seedlings de seringueira ( <b>Hevea brasiliensis</b> ) tratados pela colchicina	45
VII. Sumário e Conclusões .....	51
VIII. Summary .....	54
IX. Agradecimentos .....	58
X. Literatura citada .....	58

FIM