

ONTOGÊNESE DOS LATICÍFEROS CONTÍNUOS

FERNANDO ROMANO MILANEZ

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual
de Campinas para obtenção do titu
lo de DOUTOR EM CIÊNCIAS.

Campinas - SP - Brasil

1974

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

E R R A T A

- Pg. 1, linha 4º, ler: "articulado das *Asclepiadaceae*, *Apocynaceae*, *Euphorbiaceae*, etc."
- Pg. 4, linha 16º, ler: "nerogâmicas e de muitas das filicíneas; dentre estas, ao".
- Pg. 6, linha 8º, ler: "Anônimo (UNGENANNT, 1846) após investigar diversas espê-"
- Pg. 25: eliminar as duas primeiras linhas (simples repetição).
- Pg. 27, linha 23º, ler: "ce, máxime pela pressão dos tecidos secundários"
- Pg. 67, linhas 7 a 9, ler: "laticíferos dos embriões de *Euphorbia marginata*, ambos em colaboração (MAHLBERG e SABHARWAL, 1966 e 1967). O primeiro foi simples nota prévia;"
- Pg. 80, penúltima linha, ler: "so; sua presença ocasional serve, por isso mesmo, para"
- Pg. 105, linha 16º, ler: "mento, foi levado MAHLBERG (1963) a cometer imperdoável"
- Pg. 107, linha 3º, ler: "Vegetationskegel schritt haltend sich ihre Spitzen"
- Pg. 108, linha 12º, ler: "quente dos lipídios nas zonas superficiais do"
- Pg. 120, acrescentar ao fim da última linha: "ca.960x"
- Pg. 122, linha 4º, ler: "dio, à direita do observador, vê-se a extremi-"
- Pg. 126, linha 2º, ler: "ram. Assim, em *E. pepplus*, acharam respectivamente, 4"
- Pg. 128, penúltima linha, ler: "d'un grand Mûrier, par exemple, c'est par Kilomètres"
- Pg. 130: eliminar todo o último parágrafo (repetição, sob outra forma).
- Pg. 139, antepenúltima linha, ler: "SCHMIDT, A. (1924) Histologische Studien an"

C O N T E Ú D O

AGRADECIMENTOS	i
1. INTRODUÇÃO	1
2. I PARTE (Revisão Bibliográfica)	2
Trabalhos anteriores aos nossos CAP. I.	3
Nossos trabalhos CAP. II.	29
Fotomicrografias	45
Trabalhos ulteriores aos nossos CAP. III.	59
3. II PARTE (Estudo inédito sobre <i>Nerium oleander</i> L.	75
Fotomicrografias	108
4. III PARTE (Considerações Finais e Conclusões).	124
5. Referências Bibliográficas	134

AGRADECIMENTOS

Muitos agradecimentos são devidos a diversas pessoas pela execução do presente trabalho; na impossibilidade de expressá-los todos, apenas mencionaremos os mais imperiosos:

À Esposa dedicada, por ter concordado em acompanhar-nos à antiga Brasília, permitindo-nos o acesso definitivo ao Magisterio Superior;

Ao Prof. Dr. F. G. Brieger por nos haver propiciado esse acesso, convidando-nos para Professor da Universidade de Brasília;

Ad Prof. Dr. A. B. Jolly, pela leitura do manuscrito e pelas criticas justas e sugestões uteis.

Ao Diretor do Instituto de Botânica, Dr. Alcides Ribeiro Teixeira, pelas facilidades oferecidas gentilmente para impressão desta Tese.

INTRODUÇÃO

A presente tese pode resumir-se em uma proposição que há muito tempo vimos defendendo em diversos trabalhos de pesquisa, a saber: o laticífero contínuo ou não-articulado das *Asclepiaceae*, *Apocynaceae* e *Euphorbiaceae* é um sincício (no qual podem observar-se mitoses, em certas fases da diferenciação) constituído pela fusão rápida e completa de células (ou porções de células) e não uma célula, como pensavam os Autores antigos, ou um cenócito, como afirmam os Botânicos contemporâneos.

Desde que iniciamos nossos estudos sobre os tubos de látex, há mais de vinte anos, empenhamo-nos por demonstrar dois pontos de vista que julgamos fundamentais: o primeiro, hoje plenamente aceito pela maioria dos especialistas, diz respeito à natureza plasmática (não vacuolar) do látex, em geral; o segundo, referente apenas aos laticíferos contínuos, como foi acima mencionado, é objeto deste escrito.

Consta o presente trabalho de tres partes:

I - Curto esboço bibliográfico, comentado no que se refere aos tubos contínuos, visando sobretudo à histogênese;

II - Pesquisas inéditas sobre a histogênese dos la-

laticíferos de *Nerium oleander* L., realizadas nesta Universidade - UNICAMP.

III - Considerações finais e Conclusões.

I PARTE

Nesta parte inicial, de revisão bibliográfica, após rápido bosquejo histórico dos primeiros conhecimentos sobre o látex e respectivos ductos, fazemos uma apreciação mais minuciosa, comentada, das publicações referentes aos laticíferos contínuos ou não-articulados, sobretudo no que se refere à histogênese.

Como também realizamos pesquisas sobre o assunto e comunicamos os resultados em "Arquivos do Jardim Botânico" e "Rodriguesia", esta resenha bibliográfica está subdividida em tres capítulos, nos quais são examinados sucessivamente, por ordem cronológica, os trabalhos anteriores aos nossos, os nossos, e os posteriores, considerados mais expressivos para nossa tese.

As ilustrações do segundo Capítulo são, em grande parte, fotomicrografias antigas, já publicadas; outras, porém, mais belas e maiores (Figs. 1,2,3,4,5,6 e 11) são inéditas e devidas à proficiência técnica e à amizade de Raul Dodsworth Machado, a quem muito agradecemos esta colaboração.

CAPÍTULO I

O látex já era certamente conhecido desde tempos imemoriais; não passou despercebido, com mais forte razão, aos filósofos gregos e sobre ele há referências precisas em TEOFRASTO. Foi necessário, porém, que se encetasse o estudo microscópico das plantas para que se pudessem conhecer os tubos que o contêm.

A primeira observação desse gênero parece ter sido feita por MALPIGHI (1675) o qual pôde verificar que o líquido mencionado, a que chamou de "suco próprio", para distinguir da seiva, estava no interior de recipientes peculiares - os vasa propria. É compreensível que MALPIGHI, à falta de dados objetivos, julgasse estarem tais vasos presentes em todos os vegetais e, bem assim, comparasse essa duplicidade vascular à existente nos animais, de acordo com tendência da época de concluir, pelo método analógico, destes seres para as plantas.

GREW (1682), aceitando a ocorrência generalizada desses vasos de látex, duvidou todavia que possuissem paredes: seriam, antes, simples lacunas dos tecidos.

Por um movimento de reação, muito compreensível nas circunstâncias, contra a presença universal, apenas suspeitada, dos vasos de látex, diversos botânicos chegaram a negar por completo sua existência real em quais

quer plantas. Numerosos anatomistas, no entanto, continuaram a dar realce aos mencionados vasos em suas descrições das estruturas vegetais, o que levou a Academia de Ciências de Paris a incluir uma questão sobre o assunto no concurso que realizou em 1833. SCHULTZ (1839) foi o Autor premiado por seu trabalho onde se encontram, pela primeira vez, as expressões "vaso laticífero" e simplesmente "laticífero" que desde então passaram a ser usadas com exclusividade. Pouco depois, publicou em alemão um trabalho mais elaborado -SCHULTZ (1841) onde já restringia a ocorrência dos laticíferos, dados como completamente ausentes nos vegetais que chamou de "Homogênicos" por serem formados apenas de células semelhantes entre si. Mas ainda apontava como laticíferos representantes de quase todas as famílias fanerogâmicas de muitas das filicíneas; dentre estas, ao que se sabe ainda hoje, só o gênero *Regnellidium* conta com uma única espécie que produz látex, descoberta independentemente por MAHABALE (1949) e por LABOURIAU (1952) - *R. diphyllum*, da família *Marsiliaceae*.

Para SCHULTZ (1841) que conseguiu observar o movimento de tipo browniano das partículas de látex, no interior dos respectivos tubos, estes e seu conteúdo assumiram grande importância biológica, tendo ele comparado tais movimentos aos da ciclose (razão porque denominou seu mencionado trabalho "Die cyclose des Lebensaftes in

den Pflanzen"), e esta à circulação dos animais, em particular dos que não possuíam coração ou, quando o possuíam, à circulação do sistema capilar.

Vários autores adotaram com entusiasmo esse ponto de vista, em particular TRÉCUL que o defendeu em sucessivas publicações.

A primeira observação correta sobre a ontogênese dos laticíferos é devida a MOLDENHAWER (1779) que verificou resultarem, em espécies de *Musa* e de *Chelidonium*, da fusão de pequenos ductos que se comunicam uns com os outros. Esta é uma forma precursora da doutrina de UNGER que provavelmente sob a influencia da teoria celular, enunciada pouco antes, atribuiu em várias comunicações (1840), (1855) e (1843), esta em colaboração com ENDLICHER, a origem dos laticíferos, mormente em *Ficus*, à fusão de células de parenquima dispostas em fileira, com desaparecimento das paredes separadoras.

Por paradoxal que se nos afigure, quem logo se opôs a essa concepção foi SCHLEIDEN (1839), co-autor da teoria celular, que a propósito dos tubos de látex das *Cactaceae* escrevia (citado em UNGENANNT, 1846): "Mir erschienen in allen Fällen die Milchsaftegefäße in ihren jungsten Zustand (aus dem sie bei *Rhus coriaria* nie heraustreten) als erweiterte Intercellulargänge, in denen sich erst allmählig aus dem in sie abgesonderten Safte, eine Membran organisiert". Resta acrescentar que se sabe hoje da

existencia real de verdadeiros canais intercelulares onde se acumula o látex secretado pelas células que os limitam, tanto em *Mamillaria* (*Cactaceae*) como em *Rhus* (*Anacardiaceae*). Foi, portanto, um acaso infeliz que levou SCHLEIDEN a examinar justamente tais plantas no seu estudo ontogenético.

Certamente sob a influência desta publicação, um Anônimo UNGENANT (1846) após investigar diversas espécies de *Apocynaceae*, *Asclepiadaceae*, *Euphorbiaceae*, *Papaveraceae*, *Urticaceae* e *Moraceae*, especialmente do gênero *Ficus*, chegou a conclusões que na época alcançaram grande repercussão. A primeira reforça o ponto de vista de SCHLEIDEN, acima aludido, por ter sido baseada na observação de grande número de espécies: é desnecessário dizer que diversos microscopistas confirmaram tais resultados e afirmaram que os laticíferos eram simples espaços intercelulares ou lacunas nos tecidos... A outra conclusão é digna de interesse porque válida ainda hoje: (pg. 869) "Das Milchsaftgefäss ist eines der allerfrühesten Elementarorgane der Pflanze". A dúvida que pode assaltar os pesquisadores que vêm, todos, confirmada essa sentença, é quanto à necessidade de discernir em que medida ela retrata a realidade do fenômeno ou resulta simplesmente da mais pronta percepção do processo, por muito peculiar.

Pouco tempo depois, o próprio SCHLEIDEN em seus "Grundzüge" (1849, 3a. ed.) modificava seu ponto de vis

ta primitivo, expressando-se assim: "Milchsaftgefäße (vasa latescentia) sind langgestreckte, häufig vielfach nach allen Richtungen hin verastelte Röhren (ob Zellen ist zweifelhaft)..."

De certo trecho deste livro, entretanto, nasceu novo equivoco. Ao descrever as células liberianas (fibras) das Apocinaceas e Asclepiadaceas, afirma SCHLEIDEN que seu conteúdo é genuino látex (pg. 264); refere-se às mesmas, duas páginas adiante já como "Milchsaft fuhrenden Bastzellen", acrescentando que "Die Configuration ihrer Wände ist ganz dieselbe, wie bei echten alten Milchsaftgefäßen". É claro que aqui está em germe a concepção equivocada que SCHACHT (1851) enunciou pouco depois: "...die vermeintlichen Milchsaftgefäße sind Milchsaft fuhrenden sich häufig verzweigenden Bastzellen." Esse extranho conceito que também consta de seu "Pflanzenzelle", publicado posteriormente, teve o mérito de realçar a natureza celular dos laticíferos, sobre a qual insiste, apoiando-se na presença de grãos de amilo no seu conteúdo. Mais tarde, porém, corrige seus enganos em minucioso estudo sobre os laticíferos do mamoeiro (SCHACHT, 1856).

Ainda desse período obscuro é o novo trabalho citado por SCHMALHAUSEN (1877) onde TRÉCUL (1866) tenta, mais uma vez, restabelecer a velha e desmoralizada teoria da circulação semelhante à dos animais, por ter-lhe

parecido que os laticíferos (sistema venoso) adjacentes aos vasos lenhosos espiralados (sistema arterial) com estes se comunicavam através de aberturas das paredes.

Nos anos de 1864 e 1865 apareceram as teses premiadas de HANSTEIN e de DIPPEL, respectivamente, iniciando-se novo período no estudo dos laticíferos, agora mais objetivo e menos sujeito, por conseguinte, às especulações teóricas, graças à melhor técnica e sobretudo aos microscópios mais perfeitos: em ambas se concluiu que todos os laticíferos provinham da fusão de células dispostas em fileiras. HANSTEIN, 1864 salientou que em alguns casos, como nas espécies de *Euphorbia*, era tão completa a fusão que dela não restavam vestígios; argumentava DIPPEL (1865) para provar a realidade das fusões celulares, com a presença de finas paredes transversais (que provavelmente pertenciam a células de outro plano) e com a largura dos tubos, comparável, em geral, à das células vizinhas (esta, uma razão válida).

Deve-se a DIPPEL a distinção dos dois tipos principais de laticíferos: os do primeiro, ramificam-se mas não se anastomosam, ao passo que os do segundo, constituem retículo por suas anastomoses. Daqueles que denominou de "simples" (einfach) dizia: "... niemals aber mittelst Anastomosen zu ein Netze vereinigt sind.." (pg. 101), acrescentando na página seguinte: "Verastellungen begegnet man nur bei den einfachen Milchsaftgefäße, der Euphorbiaceen, der Asclepiaden und

Apocyneen, sowie der Moreen in allen Theilen..." Quanto aos do segundo tipo, definia-os como "netzformig miteinander verbundene Milchsaftgefäße".

Embora tenha sido geralmente rejeitada sua teoria ontogenética no que diz respeito aos tubos contínuos ou não-articulados, sua discriminação morfológica foi por todos aceita, atribuindo-se-lhe um valor muito maior que o imaginado pelo próprio Autor: este nunca pensara relacionar de maneira estrita as peculiaridades morfológicas dos dois tipos de laticíferos com a posição sistemática das espécies em que ocorrem. Prova-o sua afirmativa, a página 103, de que ambos podiam ocorrer lado a lado: "Dagegen spricht ausserdem auch schon der Umstand, dass beide nebeneinander vorkommen", e mais adiante, a propósito dos tubos anastomosados "Ebenso kommen sie in der Blättern der Euphorbien vor".

A tendência para considerar esses dois tipos como nitidamente separados já surge no tratado clássico de DE BARY, em 1877: "Die ungegliederten Milchröhren zeigen in nicht keinen sicher constatierten Falle Netzanastomosen, alle ihre oft sehr zahlreichen Verzweigen endigen blind." (pg. 199). A medida que se firmava o ponto de vista clássico (de que se tratará a seguir) sobre a ontogênese dos laticíferos segundo dois processos muito diferentes, exigia-se paralelamente que uma rígida distinção morfológica correspondesse àquela

diversidade de origem, e vice-versa. Supunha-se que os tubos contínuos não deveriam possuir a capacidade de fusão, nem mesmo em suas extremidades, para se enquadrarem com exatidão no esquema tal como fôra concebido pelos teóricos. Eis porque dois anos apenas eram passados da comunicação de MAYUS (1905) que estudara o trajeto e a distribuição dos laticíferos nas folhas de diversas espécies de *Apocynaceae*, *Asclepiadaceae*, *Moraceae*, etc, verificando a ocorrência frequente de anastomoses, e já surgia o escrito de RENNER (1907), onde tais observações eram contestadas. Este Autor, após afirmar não ter observado essas anastomoses, pondera com penetração que MAYUS, pretendendo tê-las visto, parecia não se aperceber de que se colocava em oposição a um conceito solidamente estabelecido havia muito tempo.

O conceito solidamente estabelecido, de que falava RENNER (1907), teve origem no trabalho de DAVID (1872), cujas conclusões significavam o reconhecimento de uma diferença fundamental entre a ontogênese dos tubos das *Euphorbiaceae*, *Apocynaceae* e *Asclepiadaceae*, e a que havia sido divulgada nas teses de HANSTEIN e de DIPPEL, atrás mencionadas. O item 5 dessas conclusões resume os pontos importantes da nova concepção sobre a origem dos laticíferos contínuos: "Sie entstehen aus einzelnen Zellen, welche aufhören sich zu teilen und ⁱⁿ die Länge ~~gezogen werden~~ ^{wachsen...}. Sie sind also Zellen, nicht Zellfusionen" (segundo SCHULLERUS, 1882, pg. 31). As novidades

ãí sugeridas, depois adotadas por SCHMALHAUSEN (1877) são, essencialmente, a cessação das divisões das iniciais laticíferas, contidas no meristema apical, seu alongamento acentuado e sua penetração nos espaços intercelulares de certos tecidos.

Muito singular é a apreciação que este último Autor fez do trabalho de DAVID (1872). Começa por afirmar: "Dass die Milchsaftschläuche hier eine andere Entwicklung haben, wird noch klarer aus der Arbeit David's, in welcher sie als milchsaftfuhrenden Zellen bezeichnet und mit verzweigten Zellen des Grundgewebes verglichen werden" (pg. 2). Não obstante, na mesma página, pouco abaixo, o método usado pelo Autor-maceração, pela potassa, dos cortes e dissecação destes com agulhas finas e pressão da lâmina - é vivamente criticado por SCHMALHAUSEN, quando este justifica a divergência entre o ponto de vista do Autor criticado e o seu próprio. Em outras palavras: as investigações pelas quais "tornou-se ainda mais claro que os laticíferos (nas Apocináceas, etc.) têm um outro desenvolvimento", basearam-se em uma técnica que para "as partes mais jovens dos tecidos não é apropriada." Continua SCHMALHAUSEN: "Parece que DAVID considerou como primeiros estádios do desenvolvimento das células laticíferas células quaisquer do tecido meristemático e tomou por células laticíferas desenvolvidas, fragmentos resultantes do processo de preparação, de tubos laticíferos ramificados." Na

verdade, a concepção de DAVID era inadmissível porque as células laticíferas e suas ramificações, muito numerosas, formadas sucessivamente nos meristemas apicais, eram dotadas relativamente de pouco látex e permaneciam incomunicáveis, estanques o que, de toda evidência, é contrário à realidade.

As pesquisas de SCHMALHAUSEN 1877, das quais surgiu a teoria ainda hoje dominante, merecem exame mais atento. Muito rudimentar ainda é a técnica que usou, limitando-se à retirada dos conteúdos celulares de cortes longitudinais de material fresco: "Entfern man den Inhalt der Zellen so gut wie möglich mittelst eines feinen Pinsels und behandelt dann den Schnitt mit Aether, darauf abwechselnd mit Kalilösung und Essigsäure, so kann man ziemlich reine Präparate erzielen" (pg. 4). Apesar da precariedade da técnica, afirma poder distinguir as iniciais laticíferas -Urzellen der Milchsaftgefäße- desde a fase em que começam a delinear-se as duas saliências dos futuros cotilédones (embrião cordiforme), em virtude do maior volume das referidas células e da refringência mais acentuada de suas paredes. A seguir, tais células se tornam mais conspícuas porque, ao contrário das demais, crescem sem sofrer divisões e começam a emitir prolongamentos; estes, verdadeiras ramificações, são dotados de crescimento apical autônomo e penetram nos espaços intercelulares. Alguns descrevem arcos no plano de inser

ção dos cotilédones e aī, os provenientes de varias células laticíferas, se entrelaçam, formando anel que corresponde a verdadeiro plexo, pela existência de anastomoses: "Wahrscheinlich ist mir, dass eine Verbindung der Schläuche statt findet, um dass durch den Ring eine Verbindung sammtlicher im Embryo vorhandenen Hauptschläuche hergestellt wird" (pg. 10). Cumpre salientar, a esse propósito, que em diversas oportunidades refere-se SCHMALHAUSEN às fusões que foram negadas in totum por DAVID (1872) e que voltarão a se-lo ulteriormente pelos ortodoxos, por não se ajustarem ao esquema pelos mesmos construído. É assim a página 9: "... dass 2 Hauptstämme mit ihren noch fort wachsenden Spitzen aneinander stossen und mit einander verschmelzen...", a página 12: "In einzelnen seltenen Fällen findet man Verbindungen zwischen den äusseren und den inneren Schläuche der Wurzelendes..."; e finalmente na já citada pg. 9, quando descreve o retículo que descobriu, de ramos finíssimos, sob a epiderme dos cotilédones: "... und in Aeste überzugehen scheinen, welche unter der Epidermis ein Netz von feinen Milchsafschläuche bilden."

Merece especial atenção certo trecho do trabalho em análise; após declarar, no parágrafo anterior, que todo sistema laticífero provém do desenvolvimento e ramificação das iniciais laticíferas do embrião, já que nunca se formam iniciais laticíferas novas, nas fases

ulteriores do desenvolvimento, acrescenta:" Die Milchsafschlauche der Euphorbien waren demnach vielleicht nicht unpassend mit interzellulardwachsenden Pilzhyphen zu vergleichen, mit dem Unterschiede jedoch, dass sie nur in meristematischen Gewebe wachsen und sich verzweigen, bald aber die Fahigkeit, Seitenaste zu treiben, verlieren" (pg. 17). Aqui ha duas proposioes que convem examinar em separado. Na primeira, sugere SCHMALHAUSEN (1877) "que nao seria talvez descabido, por conseguinte, (isto é, tendo em vista o que fora dito no paragrafo anterior) comparar as células laticíferas das *Euphorbiae*, a hifas de fungos parasitas que crescessem e se disseminassem nos espaos intercelulares...". Como afirmamos em um dos nossos trabalhos (MILANEZ, 1952) foi esta comparaao uma das principais razões do sucesso da teoria, por lhe dar a aparência de simples transposiao de fatos ja conhecidos na área da patologia, para a da ontogênese. Entretanto, sao enormes as diferenas de condioes biológicas: nos tecidos parasitados as células cedem alimentos, perdem turgescência, diminuem de volume e nao raro sao penetradas pelas hifas ou mesmo por elas substituidas parcialmente. Nada disso se observa nas células vizinhas dos laticíferos. SPERLICH (1939) resalta que a comparaao justifica-se so à primeira vista, acrescentando que a penetraao harmonica na estrutura dos rgoes do corpo vegetal por um sistema de tubos de latex em crescimento, bem como por suas numerosas e su-

cessivas ramificações, obriga a admitir-se a existência, entre os referidos tubos e os tecidos circunvizinhos, de relações muito mais estreitas e de natureza muito diversa das que se encontram entre o parasita e seu hospedeiro. Na segunda proposição salienta SCHMALHAUSEN (1877) que a capacidade dos tubos de crescer e de ramificar-se só se manifesta quando no interior dos tecidos meristemáticos, perdendo-se esta capacidade em condições outras.

Nas publicações que vieram a lume ulteriormente, há quase sempre confirmação dos fatos principais descritos por SCHMALHAUSEN (1877), mas, ao mesmo tempo, são rejeitadas algumas de suas asserções. SCHULLERUS(1882), por exemplo, no seu célebre trabalho sem gravuras, depois de concordar com SCHMALHAUSEN quanto aos pontos essenciais da ontogênese, apresenta diversas restrições a algumas de suas assertivas. Insurge-se, em primeiro lugar, contra a suposta ausência de laticíferos nas radículas, afirmando à página 47 "... das alle Wurzeln bis in ihre Enden Milchsaftsläuche besitzen...". É verdade que essa presença de tubos nas radículas, bem como nos primórdios dos rebentos laterais, que também verificou, estavam em desacordo com a afirmação de SCHMALHAUSEN sobre a perda da capacidade de crescimento dos mencionados tubos nos tecidos já diferenciados. Eis porque assegura SCHULLERUS que a analogia entre as hifas parasitas e os laticíferos é maior do que supunha o

aludido Autor, podendo estes crescerem mesmo fora dos meristemas. Difícil de entender-se, a não ser por motivos puramente teóricos, é sua intransigência com respeito às anastomoses. Recusa-se a aceitar, inclusive, o anel laticífero do plexo nodal, à página 41-

"Anastomosen finden sich aber weder in der Axe noch in den Kotedonen... Auch von einen Ring, der nach SCHMALHAUSEN im Knoten des Embryo ausgehen einander wachsenden Fortsatsen des Urzellen der Milchsaftschlauche entstehen soll, fand ich keine Spur, weder im Embryo noch in einer Keimpflanze ...". Nem uma palavra escreve sobre o retículo subepidérmico dos cotilédones, descoberto por SCHMALHAUSEN, porque declara, quanto às ramificações: "Alle endigen hochstens unter dem einschichtigen Pallisaden Parenchym..." (pg. 41). Confessa ter encontrado em suas observações, com certa frequência, tubos em forma de H que são tidos, com razão, como resultado de anastomose, mas explica seu aparecimento por um processo diferente, inverossímil: certo tubo daria origem a um ramo perpendicular a sua própria direção (radial, em relação ao eixo vegetativo); este ramo, após curto trajeto, por divisão dicotômica, produziria dois outros, ambos perpendiculares ao que lhes dera origem e dispostos na mesma direção, de modo a simular um so tubo. Nesta explicação, forjada  evidência para adaptar os fatos a um esquema preconcebido (e ainda hoje adotada por varios Autores), como em va-

rias outras passagens de seu escrito, considera SCHULLERUS como fator preponderante da distribuição dos laticíferos a resistência que os mesmos encontram à penetração nos tecidos, mais frouxos ou mais compactos (pg. 36): "... zugleich wurde das parenchymatischer Gewebe lockerer, welcher Umstand die Milchzellen nun auch zu einem Wachstum in die Kotyledonen hinein anregt"; e mais adiante, à página 40: "Verzweigungen finden sich erst in dem oberen Teile des hypokotylen ^{h/} Gliedes, wo das Gewebe lockerer ist."

Deve-se reconhecer que o trabalho acima apreciado não se limita à descrição morfológica do desenvolvimento de algumas *Euphorbiae*; também inclui capítulos interessantes sobre o próprio látex, em relação a diversas fases da vida do vegetal.

Ao contrário, a tese de CHAUVEAUD (1891) é meramente morfológica: compraz-se o Autor em descrever com minúcias a origem do sistema laticífero de várias espécies de *Euphorbia* (e de outros gêneros que não nos interessam), procurando tirar algumas conclusões de importância taxonômica. Adota, quanto à formação dos tubos, os princípios aceitos pelos dois ilustres predecessores de que se tem tratado; quando encontra divergências entre ambos, procura explicá-las, exceto no caso das radículas, quando se coloca decididamente ao lado de SCHULLERUS, contra SCHMALHAUSEN. Na questão das anastomoses, por exemplo, admite a existência de um anel la-

ticífero em *Euphorbia peploides*, espécie não estudada por SCHULLERUS que por essa razão, o rejeitou, mas concorda com este Autor em que não há verdadeira anastomose (pg. 44): "Comme ils décrivent autant d'arcs à la périphérie du cylindre central, il en résulte que leur ensemble forme un anneau entourant celui-ci. C'est l'aspect qui a été figuré par M. SCHMALHAUSEN. Mais cet Auteur trompé par l'apparence, a représenté un anneau véritable formé d'après lui, par la fusion des prolongements arrivés en contact." Semelhante é sua atitude na discordância relacionada com o retículo subepidérmico dos cotilédones. Admite que os ramos cheguem sob a epiderme, mas supõe que não se dêm fusões (pg. 48): "Ils s'élèvent sous l'épiderme, à l'intérieur des cotylédons et fournissent de petits rameaux dont les uns s'égarerent au milieu du parenchyme, tandis que les autres demeurent sous l'épiderme, où s'enchevêtrèrent en donnant l'apparence d'un réseau. Mais nulle part ils ne s'anatomosent entre eux, et l'on ne peut accepter l'opinion de M. SCHMALHAUSEN à cet sujet."

Os resultados até agora resumidos e apreciados foram obtidos ao fim do século passado ou início do atual, com o emprego de técnica muito rudimentar: os cortes feitos a mão livre eram examinados depois de retirados ou destruídos os conteúdos celulares. Revestem-se, por isso mesmo, de maior importância as pesquisas expostas a seguir, nas quais foram usados os recursos da técnica

moderna.

As primeiras desse período são devidas a SCHAFFSTEIN (1932) que em grande parte do trabalho se ocupa com os aspectos descritivos da embriogênese de algumas espécies do gênero *Euphorbia*. Examina, mais adiante, a questão do crescimento dos tubos do caule, oportunidade em que assegura repetidas vezes que as extremidades jovens dos mesmos, de que não dá sequer uma representação clara, em fotomicrografia ou desenho, estão no interior do meristema terminal, em flagrante contradição com seus próprios desenhos esquemáticos: "Bei allen untersuchten Pflanzen waren die Milchsaftschläuche bis in den Vegetationskegel hinein zu verfolgen" (pg. 212); ou mais adiante (pg. 217): " Es ist durchaus möglich, dass diese Milchröhren alle oder jedenfalls zum Teil ihr Wachsthum eingestellt haben, weil sie hinter der Teilungszone des Vegetationskegel, innerhalb der sie allein wachsthumsfähig sind, zuruckgeblieben sind..."; ou ainda: "Mit dem Wachsthum des Vegetationskegel Schritt haltend, befinden sich ihre Spitzen stets innerhalb der Hauptteilungszone, was ein immerfortdauerndes Wachsthum der Milchröhren ermöglige." Se nas duas primeiras citações ainda poderia ter alguma dúvida, ficou bem claro na terceira que se trata do promeristema.

Vale a pena recapitular os pontos de vista dos Autores citados, a propósito das dificuldades da teoria

em voga, quanto ao crescimento apical dos tubos nos órgãos em alongamento. SCHMALHAUSEN (1877), partindo do embrião, não chegou a perceber as possíveis objeções e não se deteve na consideração minuciosa do processo: as extremidades jovens penetrariam nos tecidos meristemáticos e só aí teriam capacidade de crescimento e ramificação, o que, de certo modo, serviria para controlar a expansão dos laticíferos. Com isso, as radículas ficariam desprovidas desses tubos. Reconheceu SCHULLERUS (1882) posteriormente que as mesmas possuíam látex e ainda, que as gemas se encontravam em situação análoga. Foi obrigado, portanto, a rejeitar a assertiva daquele Autor, afirmando que a semelhança entre as hifas parasitas e os tubos era muito maior do que o mesmo suspeitava, para justificar o crescimento apical dos laticíferos fora dos meristemas. Agora, SCHAFFSTEIN (1932), para explicar o insucesso dos seus ensaios de enxertia, de que se falará adiante, volta à opinião de SCHMALHAUSEN (1877) e tenta superar as já aludidas dificuldades. Assim, no que tange ao crescimento dos tubos nos órgãos que se alongam, descreve as extremidades dos laticíferos como situadas no interior dos meristemas ou, mais precisamente, do promeristema. Este ponto de vista obriga o Autor a extensos circunlóquios para esclarecer por que razão ditas extremidades, apesar das divisões, do crescimento e da diferenciação das células dos meristemas, mantêm sua posição: - é que o crescimento to-

tal dos meristemas iguala exatamente o das extremidades! Essa conclusão valeria tanto para o caule como para a raiz. Quanto às gemas, suas ramificações também se formariam no meristema do cone vegetativo: "Die Seitenzweige der Milchrohren wurden, jedenfalls in Sprosse, schon im Vegetationskegel angelegt" (pg. 212). Com base nesta última suposição, chega SCHAFFSTEIN (1932), mediante sutil raciocínio, à demonstração do crescimento apical dos laticíferos, à página 216: "Dass die Milchrohren ein Spitzenwachstum besitzen, erkennt man aus der Art der Verzweigungen; diese werden oft unmittelbar an der Spitze der Rohre angelegt, so dass es sich hier eher um Gabelung des Hauptstammes als um Abzweigung eines Seitenzweiges handelt". De fato: se a ramificação se faz no meristema, deve ocorrer próxima da ponta do tubo e neste caso, é mais uma dicotomia do que ramificação lateral. Infelizmente não nos mostra uma só dessas dicotomias.

A parte mais original e valiosa do trabalho em análise dá conta das investigações realizadas em dois indivíduos de *Euphorbia esculenta*, enxertados cinco ou seis meses antes. Era esta, com toda evidência, uma oportunidade excepcional para provar a realidade do crescimento apical dos tubos e estudar a origem das ramificações dos mesmos. Depois de apontar as causas que impediram a obtenção de cortes em série, perfeitos (a sinuosidade dos laticíferos e a dureza excessiva de cer-

tos elementos tissulares) apresenta o Autor um relato honesto de suas observações, onde transparecem argumentos contrários ao crescimento apical. Na verdade, nunca um ramo laticífero passou de um indivíduo para outro, embora estivessem ambos reunidos por um calo formado pela divisão das células situadas na proximidade das superfícies em contacto, resultantes do corte. Nestas, as mitoses dão origem a um calo primário que promove a adesão entre as duas faces justapostas; a seguir, para dentro do mesmo, constitui-se, de cada lado, um calo secundário, com a intervenção do câmbio, de células totipotentes; somente aqui surgem os laticíferos que, como já foi dito, não atravessam o calo primário cujas células deixaram de dividir-se. Alega SCHFFSTEIN (1932) /A que apenas no calo secundário é suficiente a concentração de hormônios para estimular o crescimento apical dos laticíferos. Já no final do trabalho, apresenta nova interpretação dos fatos observados quando afirma que a simples formação de uma raiz lateral produz a ramificação dos laticíferos da raiz principal, estimulando a penetração desses ramos na radícula, e termina assegurando que o crescimento dos laticíferos é diretamente provocado pelo crescimento e pela capacidade de divisão dos tecidos vizinhos. Poder-se-ia objetar, todavia, que essa interpretação não se aplica ao calo primário...

Credite-se a este Autor (1932) haver reconhecido, pela primeira vez, a existência de laticíferos formados

pela fusão de protoplastos parenquimáticos diferenciados, ao lado dos mais numerosos que se constituíram pelo processo, por ele considerado normal, isto é, por crescimento apical intrusivo, em *Stapelia bella* e *Trichocaulon* spp.

Os trabalhos de que nos temos ocupado até agora não aludiam sequer aos laticíferos da estrutura secundária. Supunha-se, em geral, que os mencionados tubos atravessassem toda a estrutura secundária mediante crescimento apical, ligando o sistema laticífero medular ao liberiano, através dos raios do lenho, sem se cogitar do modo ou da época desse crescimento.

WOODSWORTH (1932) parece ter sido o primeiro a preocupar-se seriamente com o assunto no seu trabalho sobre *Beaumontia grandiflora*, no qual ressalta a precocidade da formação das células que denominou de "diaxylary laticiferous cells"; reconheceu, além disso, que "As cambial activity increases the size of the stem, the latex cell also apparently grows at the cambial region".

Não se apercebeu BLASER (1945) deste crescimento dos tubos ao nível do câmbio, ou não quis tomar conhecimento do mesmo; na verdade, afirma que todos os tubos, mesmo da estrutura secundária, são meros ramos dos primitivos, mas confessa sô ter examinado exemplares com dois anos de idade, no máximo!

Descreve, como WOODSWORTH (1932), a penetração do procâmbio pelos ramos transestelares, atribuindo-a ao

crescimento apical dos mesmos. Parece supor que todo o crescimento ulterior desses ramos através do lenho, do câmbio e do liber se faça pelo mesmo processo, pois não cogita, como vimos, do crescimento intercalar e acrescenta: "The cytological basis for tremendous cell elongation of the látex tubes presents a problem of interest and importance. That early elongation is in conjunction with axial growth seems more compreensible than the persistent elongation and embedding of tubes in the secondary tissue".

Partidário convicto da teoria clássica, assegura: "There is no evidence of fusion of adjacent tubes, nor is there any evidence that new látex cells arise in apical or lateral meristems". Quanto às fusões, tendo encontrado formas em H que denunciam processo anastomótico, esforça-se por explicá-las à luz da teoria em voga, inclusive com desenhos, tal como vimos no trabalho de SCHULLERUS, páginas atrás. Na exposição de nossos estudos sobre a mesma espécie de *Cryptostegia*, páginas adiante, faremos menção a outras conclusões de BLASER.

Finalmente admite: "It is probable that some parenchyma cells function as accessory laticiferous elements, but they are not anatomically specialized". Isto significa que o Autor deve ter observado tubos cuja origem estava indiscutivelmente relacionada com fusões de protoplastos, mas preferiu supô-los pouco frequentes e acessórios, estimando, como normal, o processo descrito por SCHMALHAUSEN (1877).

ou acessórios, estimando, como normal, o processo descrito por SCHMALHAUSEN (1877).

Logo no ano seguinte, foi editado o Boletim Técnico numero 915 no qual ARTSCHWAGER (1946), em suas próprias palavras, "apresenta uma detalhada exposição sobre a anatomia e a ontogênese dos tecidos de *Cryptostegia grandiflora*" (pg. 1). A par de minuciosa descrição anatomica do caule (inclusive do ápice vegetativo em vários níveis), das folhas e da raiz, ministra, de modo sucinto, informações sobre o processo de desenvolvimento do sistema laticífero, baseado no trabalho de CHAUVEAUD (1891), sem qualquer originalidade. Mas a propósito dos laticíferos da estrutura secundaria, ignorados ou negados por diversos antecessores, reafirma sua presença no liber secundario e apresenta para explicá-la diversas sugestões. Já quando trata da estrutura primaria e início da secundaria (pg. 11), declara: "Some of the latex cells are so close to the cambium that from a casual observation one would consider them a product of the cambium. They are, however, just the extensions of an intricate branch system that ramifies the entire plant body from the pith to secondary phloem". É realmente ao fim da estrutura primaria que aparecem, plenamente diferenciados, os ramos transestelares no interior de alguns raios primários. Estes raios são poucos e seu numero será proporcionalmente cada vez menor, à medida que aumenta o volume do corpo secun

dario, ao contrario do numero dos raios secundarios do lenho e ϕ liber que constantemente se torna maior. / do
ARTSCHWAGER não ignora essa dificuldade: "The latex cells in the secondary phloem are rather limited in number and are not regularly distributed. As the stem increases in thickness, these cells should become increasingly fewer or disappear altogether from the youngest secondary phloem, since the cambium is not concerned in their development. The fact remains however, that all secondary phloem includes some latex cells, as testified by microscopic examination and panel tapping of old trunks". Feita esta declaração a bem da verdade, procura ele harmonizar tais fatos de observação corrente com a teoria em voga: Their presence may be account for by assuming a progressive branching of existing latex cells, however far advanced their state of maturity" (pg. 29).

Estribado neste principio da capacidade de ramificação dos tubos, qualquer que seja seu estado de maturação, em desacordo, aliás, com o que pensavam quase todos os pesquisadores, apresenta na mesma página, as seguintes sugestões: "The wall of latex cells passing horizontally from the pith to the cortex must remain meristematic in the region of the cambium, allowing for expansion as the trunk increases in diameter". Admite, portanto com WOODSWORTH (1932), o crescimento intercalar dos laticíferos ao nível do cambio, indispensavel

mesmo para a teoria clássica, pois qualquer que fosse a época do crescimento apical até o liber, daí por diante seria necessário fazer apelo ao intercalar para manter a continuidade dos tubos. Dã mais um passo na direção certa, ao dizer que as paredes desses tubos permanecem meristemáticas na região do câmbio, mas deixa sem qualquer esclarecimento essa nova modalidade de crescimento que substitui a apical. Aduz, logo a seguir: "Tangential sections through the cambium regions occasionally show a branching of the látex cells in the ray. Such branches, by changing their course to the vertical, could easily account for the presence of some látex cells in the new secondary phloem; also, látex cells already present in the old phloem may send out branches in the direction of the cambium." É pena que não tenha observado um só dos casos de ramificação em direção vertical (nós também não observamos) para apoiar sua primeira sugestão; quanto à segunda, faltam igualmente observações sobre a possível emissão de ramos dos elementos laticíferos mais velhos do liber para a região mais jovem, o que, além do mais, se nos afigura pouco verossimil porque o liber primário rapidamente envelhece, maxima pela pressão dos tecidos secundarios.

Antes de encerrarmos o presente capítulo, convem referir as interessantes investigações de SNYDER(1955), não obstante a data de sua publicação, porque foram realizadas de acordo com métodos e finalidade diferentes

dos nossos. Propôs-se o Autor a cultivar assêticamente os tecidos da medula do caule de *Cryptostegia grandiflora*, constituídos por células parenquimáticas e tubos laticíferos; o crescimento apical destes últimos poderia, assim, manifestar-se plenamente, esclarecendo em definitivo o processo. Transcrevemos do Summary os tópicos mais importantes:

1. Portions of stem pith from *Cryptostegia grandiflora* (Roxb.) R. Br., approximately 4 mg. in fresh weight, were grown on various media in culture tubes which were placed on an Auxophyton at room temperature in diffuse light. (pg. 151).

.....

3. Copious proliferation of parenchymatous cells of the pith was obtained on a medium containing modified Knop's solution, 2% sucrose and 5-7,5% coconut milk by volume. Indolacetic acid (IAA) was a relatively poor growth stimulator. (pg. 152).

.....

5. No growth of the portions of latex tubes present in the pith explants was detected. (pg. 152).

CAPÍTULO II

Nossas primeiras investigações sobre os laticíferos contínuos tiveram por objeto a *Euphorbia phosphorea* Mart. (MILANEZ 1952, 1952a, e 1953-4) da qual estudamos sucessivamente a ontogênese dos laticíferos do caule, alguns aspectos das alterações nucleares desses mesmos tubos e a formação de suas ramificações. Já no primeiro trabalho podíamos assinalar dois fatos singelos, mas de capital importancia, quanto ao meristema apical: 1º As porções mais jovens dos tubos de látex situam-se sempre em espaços que por suas dimensões devem ser considerados celulares (e não intercelulares); 2º As referidas porções não se situam no promeristema, em oposição às constantes afirmativas de SCHAFFSTEIN, atingindo, apenas, seus limites com o meristema primário; aí novas células lhes são incorporadas, promovendo seu crescimento longitudinal. Ainda nesse trabalho mostravamos que o aumento de diametro de certos tubos era devido à fusão com células vizinhas, situadas lateralmente e mais, que as ramificações laterais eram provenientes de processo análogo.

Este último processo foi estudado mais detidamente no terceiro trabalho, no qual afirmavamos, no item 3 do respectivo Resumo: "As observações realizadas sobre ramos corticais mostram que o início do processo se reve-

la, nas preparações microscópicas, por projeção do protoplasma do laticífero, a qual atua, provavelmente mediante uma substância difusível, sobre células vizinhas imediatas e mediatas" (dispostas na direção da dita projeção).

Alterações nucleares observadas nos tubos da mesma espécie constituíram o segundo trabalho; comparamo-las às descritas por MOLISCH (1901) em espécies de *Euphorbia* e às mencionadas por outros Autores nos laticíferos de diferentes famílias. Distinguimos, então, esses nucleos alterados, primitivos, dos tubos ("pioneiros"), dos que provinham das células incorporadas posteriormente ao sincício laticífero ("adventícios"). Assinalamos, por fim, a ausência de mitoses no referido sincício, bem como a frequente associação dos amiloplastos característicos do gênero com um núcleo, ou mais raramente, com dois.

Em nossas pesquisas "Sobre os laticíferos foliares de *Ficus retusa*" (MILANEZ 1954) confirmamos a natureza sincicial dos laticíferos contínuos e a ocorrência de anastomoses eventuais entre esses tubos. Procuramos, ademais, conhecer melhor o processo da diferenciação laticífera, observando em especial as transformações do vacuoma dos elementos celulares integrantes dos tubos e verificamos que o vacuolo único, inicial subdividia-se em unidades menores que a pouco e pouco tendiam a desaparecer. Finalmente, adotamos o ponto de vista da pro-

vável origem dos glóbulos de látex em plastos, comparilhado, na época, por cientistas de mérito, como PROKOFÉV (1939), BLOKHINTSEVA (1940) e outros.

Com a colaboração de um Naturalista, Honorio Monteiro Neto, estudamos a "Origem dos laticíferos do Embrião de *Euphorbia pulcherrima* Willd". (MILANEZ e MONTEIRO NETO, 1956) em quinze embriões, em várias fases de desenvolvimento. Usamos, como fixador, a mistura de Benda, com uma só gota de ácido acético glacial para 20 ml. A fixação foi realizada diretamente sobre o embrião isolado, ou após imersão por 24 horas em solução nutritiva hipotônica, ou ainda, em solução nutritiva durante 7-10 dias. Podem resumir-se do seguinte modo, nossas conclusões:

1. A formação do sistema laticífero tem início no plano nodal (inserção dos cotilédones) em seis regiões bem limitadas que denominamos "focos" para evitar o termo "inicial laticífera", que não julgamos legítimo até que novas pesquisas sobre essas fases iniciais esclarecessem definitivamente o processo; pareceu-nos que as fusões ocorriam desde o princípio, para a formação das "vesículas", tornando inadequado o conceito de "inicial".

2. Dos mencionados focos e respectivas vesículas a diferenciação laticífera se propaga, no próprio plano nodal, através de ramos que se encurvam, entrecruzam-se e eventualmente contraem anastomoses, consti-

tuindo o "plexo nodal"; estendem-se ao hipocôtilo mediante os ramos "procambiais" e "corticais" que mais tarde atingem a radícula e os cotilédones (ramos "cotiledonares").

3. A origem e o crescimento desses tubos estão relacionados a fusões de protoplastos; algumas das células que participam do processo, ainda muito estreitas, são provenientes de divisões recentes, como por exemplo, as que dão origem ao "retículo subepidêmico" descoberto por SCHMALHAUSEN (1877) e confirmado, inclusive por fotomicrografia, à luz dessas observações.

4. Foram ainda apreciados alguns fenômenos citológicos, como alterações nucleares semelhantes às descritas para *Euphorbia phosporea* Mart., inclusive com a presença de núcleos gigantes, relativamente frequentes.

Sobre esse assunto, apenas exibimos nesta tese, como ilustração, quatro fotomicrografias inéditas de cortes de embriões de *Euphorbia pillulifera* que nos parecem bastante expressivas para nossa teoria sincicial.

A fig. 1, de um corte do hipocôtilo, em nível próximo ao do plano nodal, obtida com dispositivo de contraste de fase, mostra alguns ramos do plexo nodal, já com os leucoplastos alongados, típicos desse gênero. A largura frequentemente considerável desses ramos, comparativamente à das células vizinhas, sem que estas apresentem quaisquer sinais de compressão, deformação ou deslocamento, parece-nos ponderável argumento contrário

ao pretense crescimento intrusivo dos ramos, através dos meatos (?) do meristema. Além disso, porções assinaladas desses ramos sugerem, por sua forma e dimensões, sejam células recentemente incorporadas ao sincício laticífero, vendo-se, em uma delas, vestígios da primitiva parede separadora.

Na fig. 2, também obtida com contraste de fase, mas com maior aumento, assiste-se ao início da dissolução da porção mediana da parede que separa um laticífero de uma célula do meristema fundamental, que lhe está sendo incorporada. Como se pode notar, as partes em dissolução tornam-se muito mais refringentes; também forte refringência possuem os grãos de amilo em bastão deste laticífero e os do tubo da parte superior da fig. Na célula prestes a ser anexada, percebe-se já o alongamento dos amiloplastos.

A electromicrografia da fig. 3, de um corte longitudinal do hipocótilo, mostra as células contendo quantidade variável de reservas proteicas (grãos) e lipídicas, já parcialmente consumidas pela germinação. Tais reservas são bem mais escassas no interior dos laticíferos.

A importância desta fig., porém, está na área de dissolução da parede do laticífero maior, que ela exhibe de face: aí já existe uma perfuração, limitada por pequena orla de substância densa aos electrons. A mesma substância se estende sobre a porção vizinha da pa-

rede, vendo-se no seu interior o início de novas perfurações.

Tais perfurações, que em geral acabam por atingir toda a extensão das paredes separadoras, ocorrem na anexação de nova célula ao sincício laticífero ou nas anastomoses que eventualmente contraem os tubos entre si.

A fig. 4, é uma eletromicrografia de um corte transversal do hipocotilo, próximo ao plano nodal. Há numerosos laticíferos em crescimento (embrião germinado) mostrando vários estádios da incorporação de novas células ao sincício. No laticífero maior que atravessa obliquamente a fig., podemos distinguir: uma célula recentemente incorporada (3) com paredes separadoras parcialmente intactas; outra célula vizinha do tubo (4) cujas paredes de contacto já se revelam menos resistentes e, por isso mesmo, evaginadas - primeiro sinal visível de seu comprometimento; e por fim, na parede entre as duas porções do laticífero (5) início de alteração, com aparecimento localizado de substância muito densa aos eletrons.

No protoplasma dos laticíferos deste embrião, já em processo de germinação, o corte do material previamente à fixação rompeu o equilíbrio dinâmico do sistema laticífero, pela perda de látex. Não se pode, por isso, ter uma idéia de sua infraestrutura. É possível distinguir, todavia, numerosas mitocôndrias, vários amiloplastos em diversas fases de sua evolução para a forma típi

ca, alongada, de que se tem na marca 1, uma etapa bem avançada; é preciso lembrar, ainda, que eles aparecem seccionados sob várias direções, o que dificulta seu reconhecimento nos cortes ultrafinos. Notam-se também corpusculos densos aos electrons, arredondados, prováveis precursores dos corpusculos do látex, de cuja natureza e origem nada se pode dizer com segurança. São ainda bem visíveis os núcleos, em geral muito mais volumosos que os das outras células, alongados, com um nucléolo e sobretudo hipocromáticos, parecendo pobres em cromatina.

Os estudos que fizemos a seguir, dos laticíferos continuos de uma planta já estudada sob esse aspecto - "Contribuição ao Conhecimento Anatômico de *Cryptostegia grandiflora*" I, II, e III - são expostos agora, com o auxílio de micrografias, tendo em vista as questões que mais de perto interessam à teoria sincicial. Além de 14 fotomicrografias já publicadas, há tres micrografias maiores, ainda inéditas.

No primeiro trabalho (MILANEZ, 1959) examinamos o embrião imaturo, maduro e já em desenvolvimento durante a germinação. O corte transversal do terço superior do hipocôtilo maduro (fig. 5), pouco abaixo do plano nodal, deixa ver até seis círculos concêntricos de tubos; o número desses círculos diminui à medida que a seção se distancia do citado plano, onde a indução laticífera é máxima e a partir do qual se inicia a diferenciação dos

tubos, tanto em direção à radícula, quanto na dos cotilédones. Os laticíferos mais largos e mais constantes que constituem o círculo interno, foram denominados pericíclicos por CHAUVEAUD (1891) e básicos por BLASER (1945); todos os outros seriam simples ramos destes tubos, mais comumente em número de trinta a trinta e cinco.

A seção que aparece na fig. 5, do terço médio, aproximadamente, do hipocótilo, mostra nove tubos básicos: de dois destes já partem ramos horizontais, ainda curtos, cuja largura indica claramente que se formaram pela incorporação de células do meristema fundamental do córtex; no maior dos dois, notam-se vestígios de parede separadora, além da parede alterada do elemento que está sendo anexado lateralmente.

Esse é o processo mais simples de formação de laticíferos: incorporação de novas células ao sincício, o que pressupõe destruição das paredes separadoras, provavelmente por meio de enzimas, e fusão do protoplasto celular ao sincicial. Algumas vezes, como no caso apresentado na fig. 6, esse processo é facilitado por ser mínima a extensão da parede a dissolver-se: a célula entra em contacto com o sincício através de um meato, situado no ponto de encontro do mesmo com três células.

Mais complicado é o processo de formação dos ramos finos, aqueles em que realmente pensam os adeptos da teoria clássica, como se fossem os únicos. Mesmo para

estes, como escrevi naquela época "presta-se à maravilha o embrião desta espécie ao esclarecimento da gênese dos laticíferos e isso sobretudo porque a formação de muitos ramos do hipocótilo ainda está em marcha, mesmo na semente quase madura. Se, além desta, também se examina o embrião imaturo, obtêm-se certos aspectos que completam o quadro dessa formação" (MILANEZ 1959, pg. 354). Assim, as figs. 7 e 8 representam a formação de ramos horizontais dos tubos básicos, em corte transversal do hipocótilo de um embrião imaturo, com cerca de 2/3 do comprimento normal. Na primeira (fig. 7) observam-se protoplastos estreitos, provenientes das células do meristema fundamental, que se fusionam entre si e ao sincício do tubo. O interesse maior desta fotomicrografia está no fato de ainda serem visíveis os limites desses protoplastos. Na segunda (fig. 8) o processo é mais complexo: apesar de se perceber melhor a filiação dos protoplastos, estes são menos distintos, parecendo ocorrer também fusão lateral de alguns protoplastos. Também de um embrião imaturo é o corte longitudinal do hipocótilo, visível na fig. 9: os protoplastos estreitos que aparecem como simples segmento das células subepidérmicas, ainda mostram muito nitidamente sua filiação e estão começando a se fusionar para formar o ramo laticífero cujo conteúdo reduz o ácido ôsmico. Vale a pena assinalar que esta mesma propriedade permite, frequentemente, observar

fatos semelhantes em ramos formados muito mais tarde, na plântula, como aparece com clareza na fig. 10: aqui os protoplastos provenientes de células subepidérmicas e da camada vizinha interna, de filiação ainda bem perceptível, se fusionam para formar um ramo cortical, longitudinal.

São necessárias novas pesquisas para esclarecer certos fatos desse processo e principalmente para verificar o comportamento do núcleo das células de que provêm os protoplastos estreitos ou segmentos: em muitos casos, estes possuem núcleo nítido, embora muito pequeno; em outros, este não se percebe claramente. No primeiro caso parece haver mitose previa. No segundo, faltará mesmo o núcleo? Têm sido observadas, apenas, as alterações estruturais do citoplasma, cujas reservas são mobilizadas e cujos vacúolos tendem a desaparecer; segue-se a dissolução das paredes separadoras dos segmentos e o surgimento da nova parede, a principio muito delgada, que separa o "protoplasto estreito" do que lhe deu origem. Na electromicrografia da fig. 11, de um hipocótilo de embrião da semente germinada, há duas células vizinhas, assinaladas (1 e 2) já divididas por indução laticífera. Na primeira, maior, é bem perceptível a dissolução da parede que a separava de um laticífero seccionado transversalmente (L 1). Percebe-se, em ambas, a parede fina que separa a futura célula laticífera e nesta, além das alterações estrutu-

rais acima citadas, curiosa modificação que parece localizar-se no sistema vacuolar e no RE. Nas células vizinhas, vêm-se proplastídios com grãos de amilo relativamente volumosos, além de reservas lipídicas e proteicas que faltam quase completamente nos futuros elementos laticíferos. Infelizmente não foram abrangidos nos cortes os núcleos das células em foco.

No segundo trabalho (MILANEZ, 1961) que trata da estrutura primária, consideraremos apenas dois assuntos: o crescimento dos tubos no meristema apical e a formação dos tubos transtelares.

Com respeito ao primeiro, estampamos tres fotomicrografias de um mesmo ápice vegetativo do caule adulto, com aumentos crescentes e focalização algo diferente. (Figs. 12, 13 e 14); como é habitual ao nível da inserção das folhas, vários ramos oblíquos convergem para a medula e aí constituem um plexo pouco denso que está em relação com tubos da medula, das folhas (ã direita, o corte passa pela lacuna foliar e permite a observação dos tubos que a atravessam) e com a base do promeristema, mediante ramos curtos. Estes são os responsáveis pelo crescimento longitudinal do sistema laticífero durante o alongamento do caule. A propósito, limita-se BLASER (1945) a dizer: "The tips of the tubes extend to within a few cells of the surface of the apical meristems", sem apresentar qualquer representação, em desenho ou fotografia, das aludidas extre

midades. Afirmam os adeptos da teoria clássica que estas penetram entre as células do promeristema, pelo espaço intercelulares (praticamente inexistentes), conforme ressaltamos páginas atrás; sustentamos, ao contrário, que elas atingem apenas os limites do promeristema, onde se confrontam com células e, não, com espaços intercelulares; tais células vão sendo incorporadas pelo sincício, propiciando-lhe o crescimento longitudinal.

O segundo assunto focalizado diz respeito aos latífíferos transestelares, assim denominados porque atravessam o estelo. Muitos Autores, como vimos, a eles se reportam como se tivessem realmente atravessado, por crescimento apical, o lenho e o liber, inclusive secundários e o próprio câmbio. É obvio, porém, que qualquer que fosse a época em que o fizessem, terminado o trajeto, precisariam de crescimento intercalar, na zona do câmbio, para permanecerem contínuos apesar do espessamento produzido por esse meristema secundário. Já ressaltamos que WOODSWORTH (1932) e ARTSCHWAGER (1946) chamaram atenção para a necessidade lógica desse crescimento intercalar; os mesmos, tal como BLASER (1945), ainda verificaram que a formação dos tubos transestelares é sempre precoce, ocorrendo na estrutura primária. Essas duas conclusões afastam a necessidade de explicar a penetração dos tubos em meatos mais estreitos que eles próprios, frequentemente limitados por paredes lig

nificados, mas introduzem um novo tipo de crescimento, ainda não cogitado para os laticíferos - o intercalar.

Pudemos comprovar no estudo em pauta, que embora sempre primária, a formação do ramo pode dar-se em várias fases do desenvolvimento, sobretudo do procâmbio. Quando este já se acha em fase avançada da diferenciação, o processo formador é mais complexo; suas células se dividem, por paredes transversais ou oblíquas, dando origem a elementos curtos que sofrem a diferenciação laticífera, fusionando-se seus protoplastos para constituírem o sincício do tubo transestelar. Com rara felicidade pudemos encontrar um aspecto típico desta fase, apresentado na fig. 15. É licito afirmar-se, portanto, que não é um tubo de látex que cruza o procâmbio, mas a indução laticífera. Convém assinalar que fase um pouco mais avançada do mesmo processo pudemos observar no meristema primário de *Nerium oleander*, fotografando o aspecto em duas secções adjacentes (figs. 47 e 48) do mesmo bloco. Aí as células curtas já estão parcialmente diferenciadas, mas ainda deixam perceber seus limites.

Nas fases ulteriores, o crescimento dos tubos é intercalar, ao nível do câmbio. Os Autores citados que reconheceram a necessidade desse crescimento tão diferente do apical, não se preocuparam com sua explicação; ARTSCHWAGER (1946) apenas declara que suas paredes permanecem pectocelulósicas, o que é evidentemente

/c/e

muito pouco. Em nosso trabalho (MILANEZ, 1966) já havíamos verificado que "Nesses tubos as paredes tornam-se, com o tempo, mais finas, conservando-se celulosopécticas (inicialmente são espessas, embora da mesma natureza). Aparentemente conservam eles suas conexões internas, com as porções verticais situadas no lenho primário, e externas, com os trechos localizados no floema primário, crescendo ao nível do câmbio. Este é um fato que está a merecer estudo acurado. Dos numerosos cortes que examinamos, colhemos a impressão de que tal crescimento é, de certo modo, reativado periodicamente pela anexação de células meristemáticas da região cambial ao sincício laticífero. É esta, pelo menos, a interpretação mais consentânea com os aspectos exibidos por certas preparações" (pag. 336).

No corte transversal da fig. 16, executado na região do câmbio, estão assinaladas duas células (1 e 2) da região, em processo de incorporação. Da primeira só se vê, no momento, seu perfil, ao passo que da segunda ainda se vê o protoplasto. No corte análogo da fig. 17, também estão assinaladas duas células que parecem sofrer o mesmo processo de anexação; é digna de nota, aqui, a irregularidade dos limites do tubo, ao nível do câmbio, sugerindo tenham sido algumas células pequenas, adjacentes ao sincício, incorporadas por ele. Mais expressiva, ainda, se nos afigura a fig. 18, de um corte longitudinal radial que interessa um tubo de

lãtex. Assinaladas duas células do meristema cambial, salientes na cavidade do tubo, que provavelmente serão a seguir, incorporadas ao sincício.

Quanto aos laticíferos do liber secundário, oriundos do câmbio, voltamos a transcrever um trecho de nosso já aludido trabalho (MILANEZ, 1966): "A esse respeito é interessante lembrar que vários Autores antigos referiram-se aos laticíferos contínuos do liber secundário, atribuindo sua formação à atividade cambial. Sobressai entre esses DIPPEL (1865) que os descreveu em alguns representantes das Moráceas e Asclepiadáceas, aceitando por líquida sua origem a partir do cambio. Já diferente é a atitude de DE BARY (1877), em cujos laboratórios SCHMALHAUSEN realizou suas investigações clássicas. Tendo observado, ele próprio, os laticíferos contidos em abundância na casca de *Morus*, *Ficus*, *Maclura* e *Nerium* confessa sua incapacidade para decidir se os mesmos se originavam *de novo* do câmbio, ou se constituíam meros ramos dos tubos primitivos (embrionários) que tivessem penetrado na casca. Entretanto, após a divulgação dos trabalhos já apreciados de SCHMALHAUSEN (1877) e de CHAUVEAUD (1891), firmou-se a convicção da impossibilidade de se formarem novos laticíferos contínuos, além dos embrionários, ponto de vista que foi adotado por HABERLANDT (1928) e pela quase totalidade dos anatomistas modernos.

Do exame do material mais velho e das estacas fixa

das por inteiro, coloridos os cortes por Sudan IV e Hematoxilina de Delafield, pudemos assegurar-nos que se formam no liber secundário, a partir das derivadas do cambio, células laticíferas que logo se fusionam verticalmente em tubos contínuos. As fotomicrografias obtidas dessas preparações com filtro verde, fazem sobressair em negro o látex, permitindo o reconhecimento das respectivas células. No corte transversal da Fig. 19, observam-se alguns desses tubos em formação, próximos do cambio: são mais estreitos que os do liber primário e estão situados na faixa de liber secundário caracterizada pela presença dos raios secundários. Mais convincente, ainda, parece a Fig. 20, de um corte longitudinal: no limite do liber secundário, em região muito próxima do cambio, assiste-se à formação de um tubo secundário por fusão de células cujos limites ainda são visíveis e cujas dimensões correspondem às das iniciais fusiformes. Nos cortes mais finos de material fixado com Benda e cortado em micrótomo rotatório, conseguimos focalizar aspectos como o da Fig. 21 que mostra a comunicação de duas células laticíferas secundárias através de perfuração (assinalada) das paredes radiais. Note-se que no liber somente células laticíferas poderiam apresentar perfuração na parede, tal como a mostrada na fig. 21.



Fig. 1. Seção transversal do hipocôtilo de *Euphorbia pillulifera*, próxima do plano nodal. Laticíferos contendo amiloplastos alongados, típicos, visivelmente incorporam duas células, assinaladas (setas). Também são visíveis quatro feixes líbero-lenhosos em fases diferentes de diferenciação, sobretudo com relação aos vasos do lenho. (contraste de fase) ca. 800 x.



Fig. 2. Seção transversal do hipocôtilo de *E. pillulífera*, próxima do plano nodal. Incorporação ao sincício de uma célula vizinha: início da dissolução da porção mediana da parede intermediária, a qual se torna bem mais refringente. Note-se que na célula incorporada já se alongam os amiloplastos. Na parte inferior da fig. vê-se o corte de um feixe libero-lenhoso em diferenciação. (contraste de fase) ca. 3.000 x.

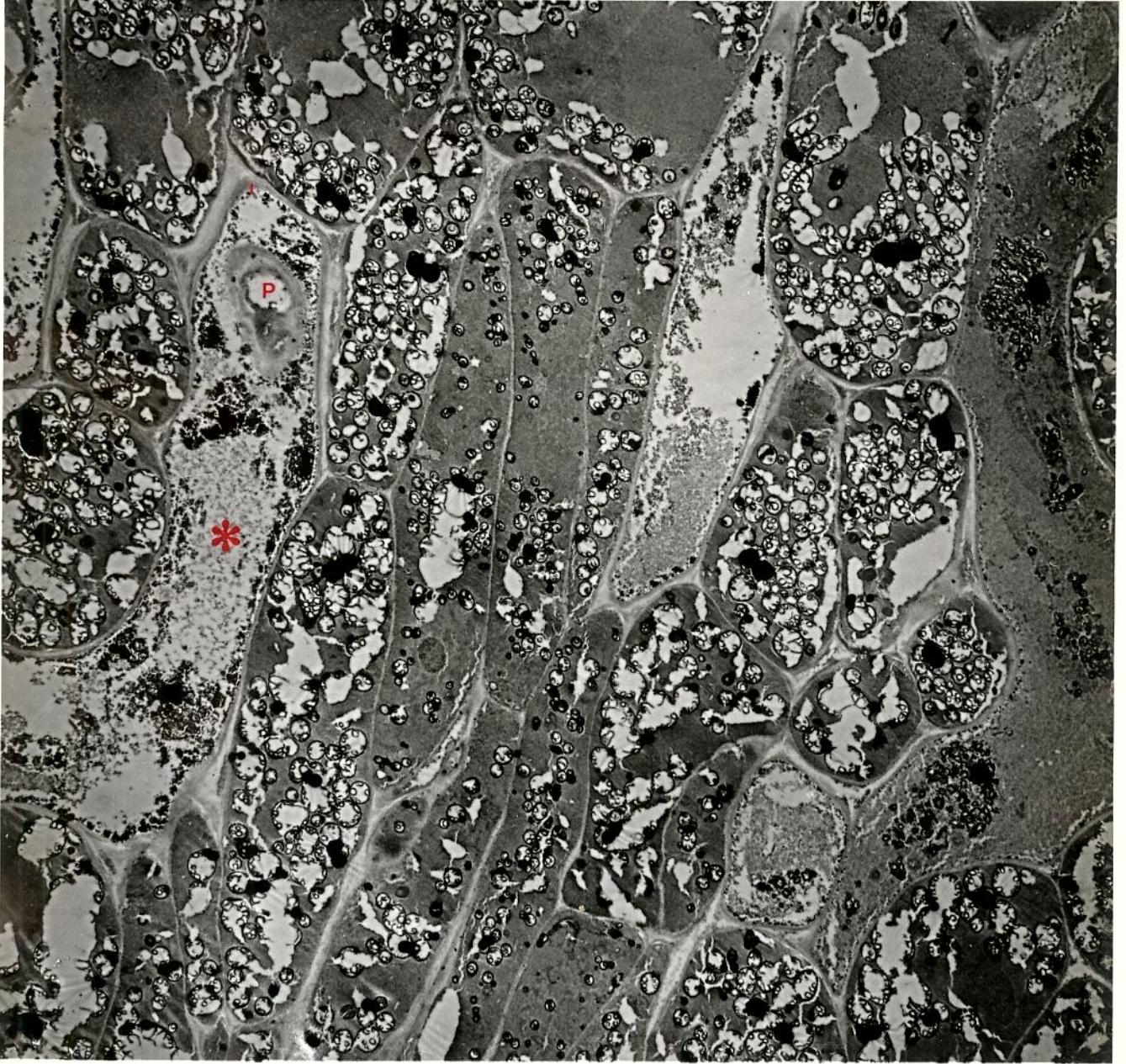


Fig. 3. Seção longitudinal do hipocôtilo de embrião já germinado de *E. pillulifera*. Fixado em solução a 2% do tetróxido de osmio. Reservas lipídicas e proteicas parcialmente digeridas; muito escassas nos laticíferos. Em um destes, assinalada uma perfuração da parede (P), vista de face, cercada por área electrodensa da mesma parede em dissolução, onde se percebem pequenas soluções de continuidade. (Micrografia eletrônica) ca. 3150 x.

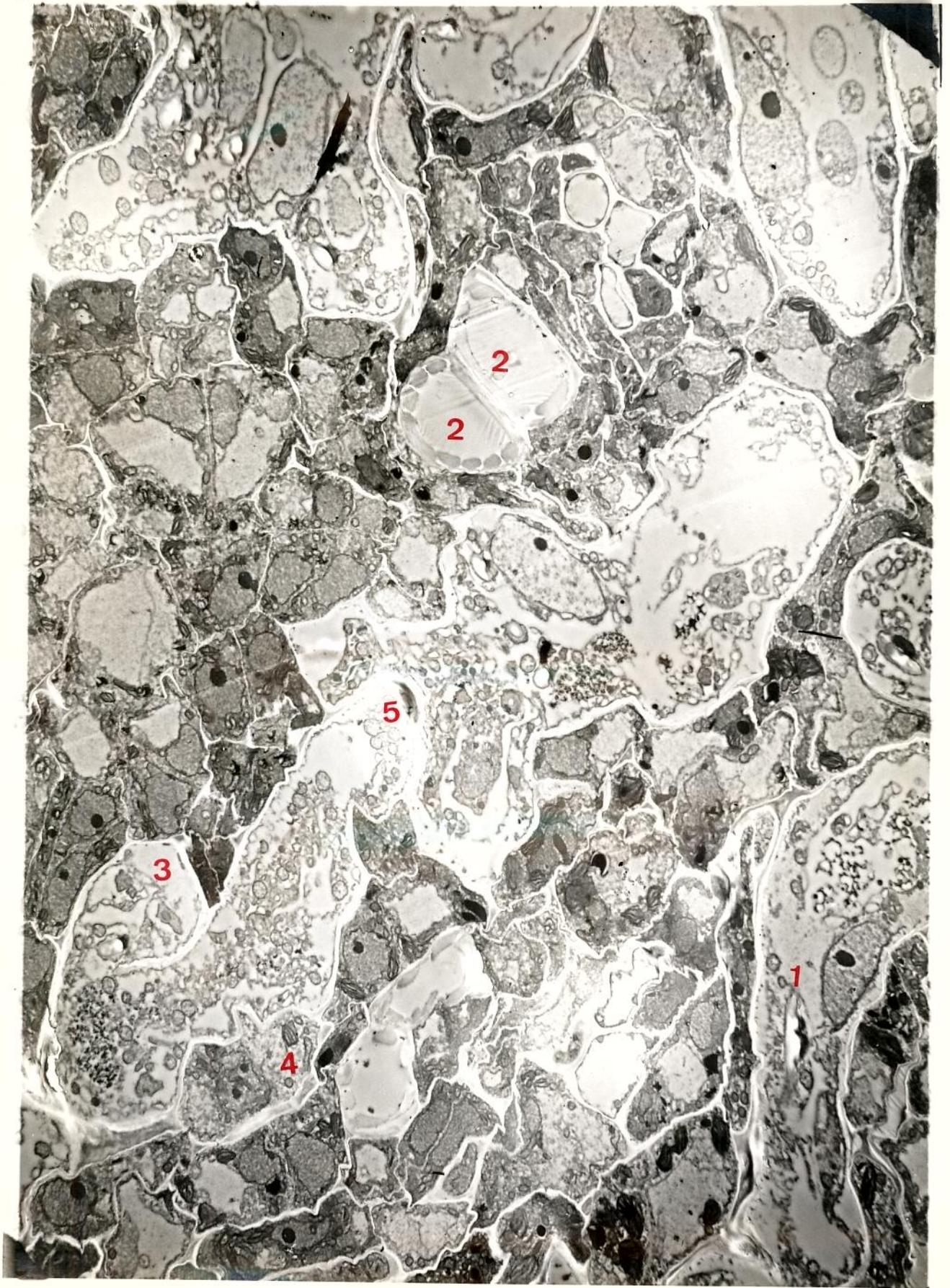


Fig. 4. Seção transversal do hipocôtilo do embrião germinado de *E. pillulifera*. Nos laticíferos abundantes, os núcleos se apresentam mais volumosos, alongados e hipocromáticos relativamente aos das outras células.

Assinalados:

1. grão de amilo típico, em formação e respectivo amiloplasto
2. vasos lenhosos
3. célula já incorporada, vendo-se parte da parede separadora
4. célula em via de incorporação, cuja parede separadora, já menos resistentes, apresenta curvatura característica.
5. início da alteração da parede separadora, cuja ulterior dissolução estabelecerá a continuidade desse laticífero (micrografia eletrônica) ca. 3.150 x.

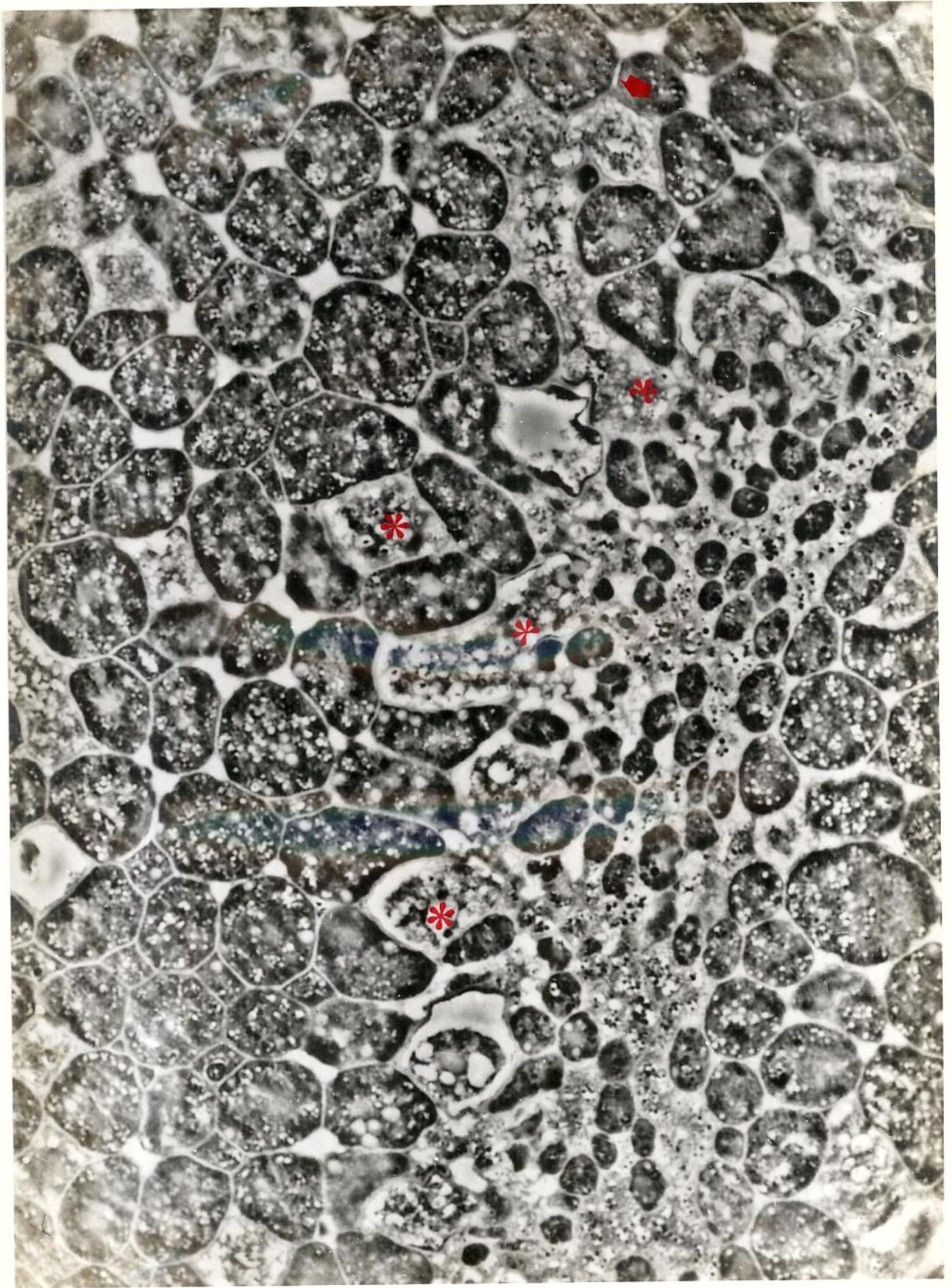


Fig. 5. Seção transversal do hipocôtilo de embrião maduro de *Cryptostegia grandiflora*, próxima do plano nodal. Visíveis dois ramos corticais horizontais, formados por incorporação de células do meristema fundamental do córtex; no mais longo (parte superior da fig.), a última célula incorporada, assinalada, ainda mantém parede separadora. (contraste de fase). ca. 1000 x.

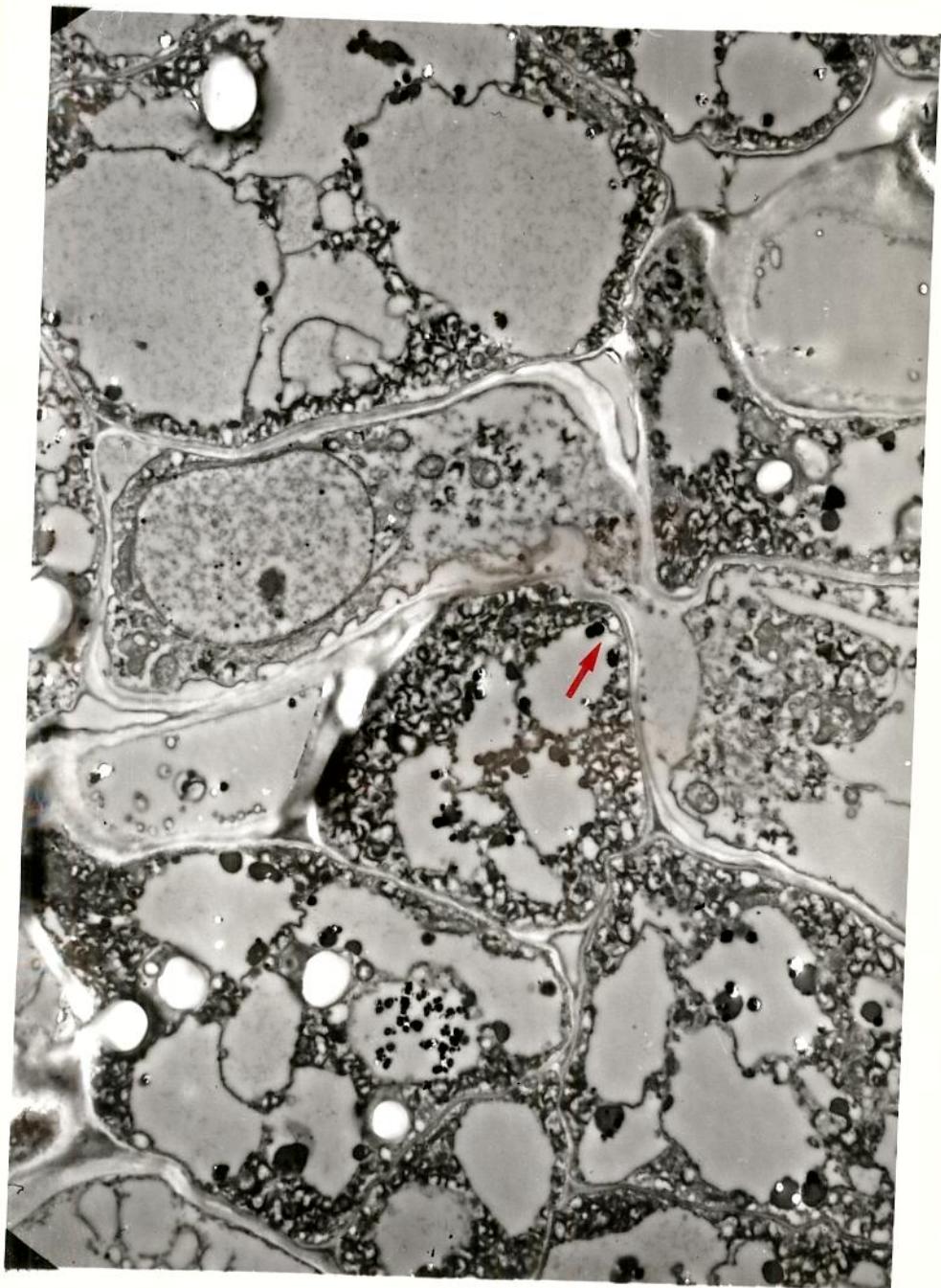
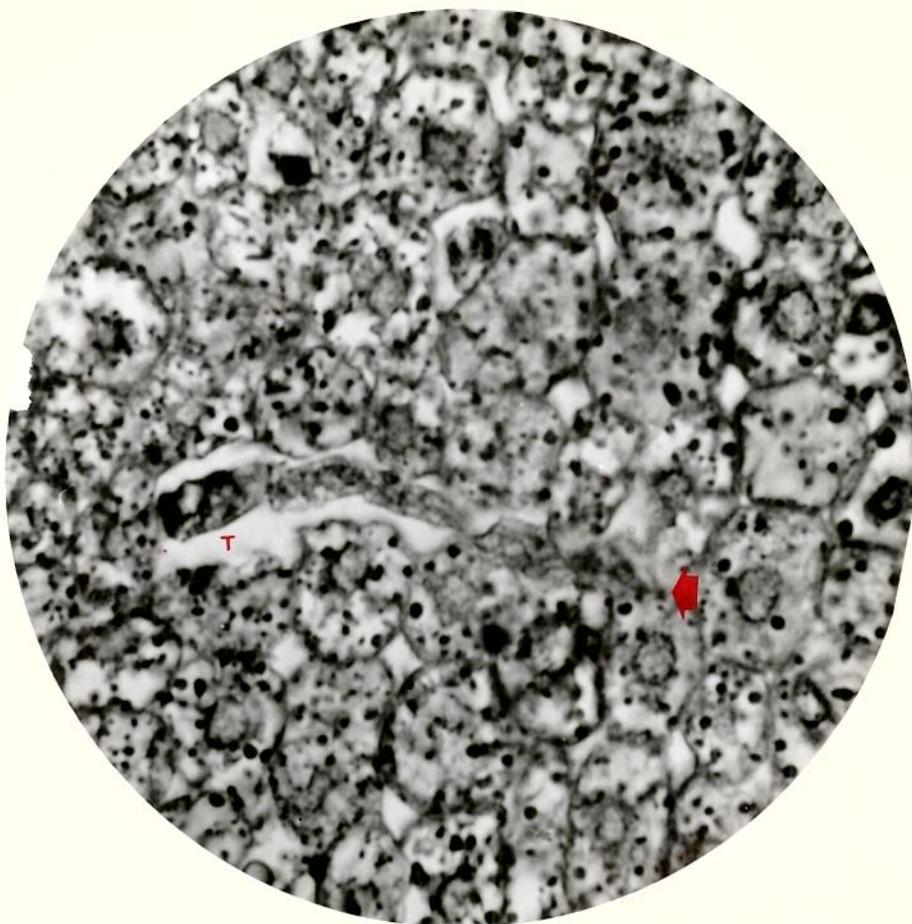
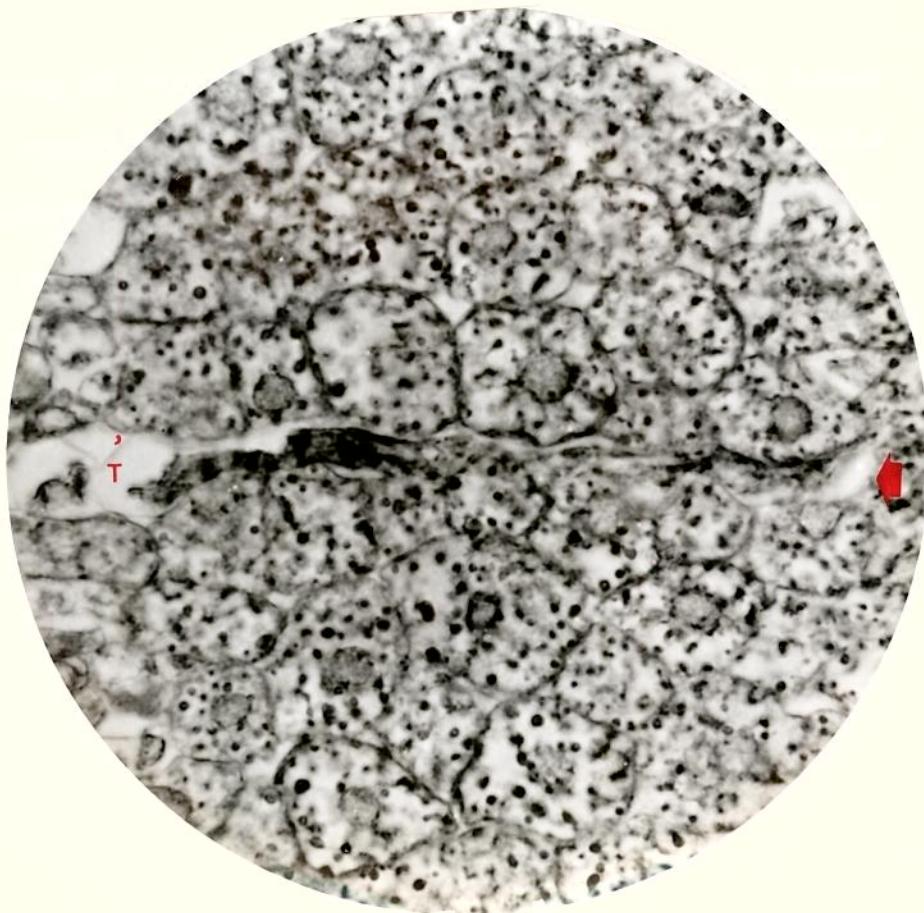


Fig. 6. Seção transversal do hipocôtilo do embrião germinado de *Cryptostegia grandiflora*. A comunicação entre o sincício e a célula incorporada estabeleceu-se através de um meato, com a dissolução de uma área mínima das paredes respectivas. (Micrografia eletrônica). ca. 5000 x.



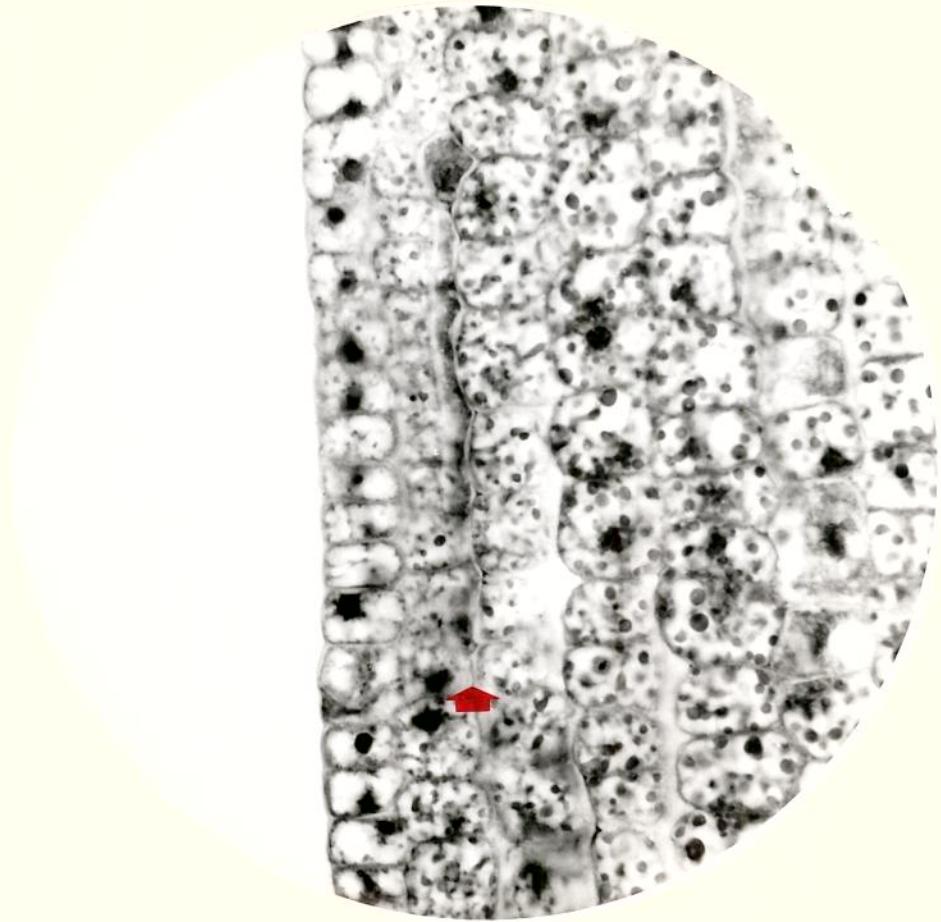
7



8

Fig. 7. Seção transversal do hipocôtilo de embrião imaturo de *Cryptostegia grandiflora*. Protoplastos resultantes das divisões das células do meristema fundamental, em processo de fusão para constituir um ramo cortical. (T. tubo básico) ca. 800 x.

Fig. 8. Idem, idem, no processo de constituição de um outro ramo horizontal. (T. tubo básico) ca. 1300 x.



9



10

Fig. 9. Seção longitudinal de hipocôtilo do embrião imaturo de *Cryptostegia grandiflora*: nas células subepidérmicas, individualizam-se porções de protoplastos que se fusionam para constituir um ramo laticífero. ca. 800 x.

Fig. 10. Seção longitudinal do hipocôtilo de uma plântula muito jovem: à custa da subepiderme e da camada vizinha, interna, forma-se um ramo laticífero pela fusão de porções de protoplastos cujos limites ainda são parcialmente visíveis. ca. 500 x.

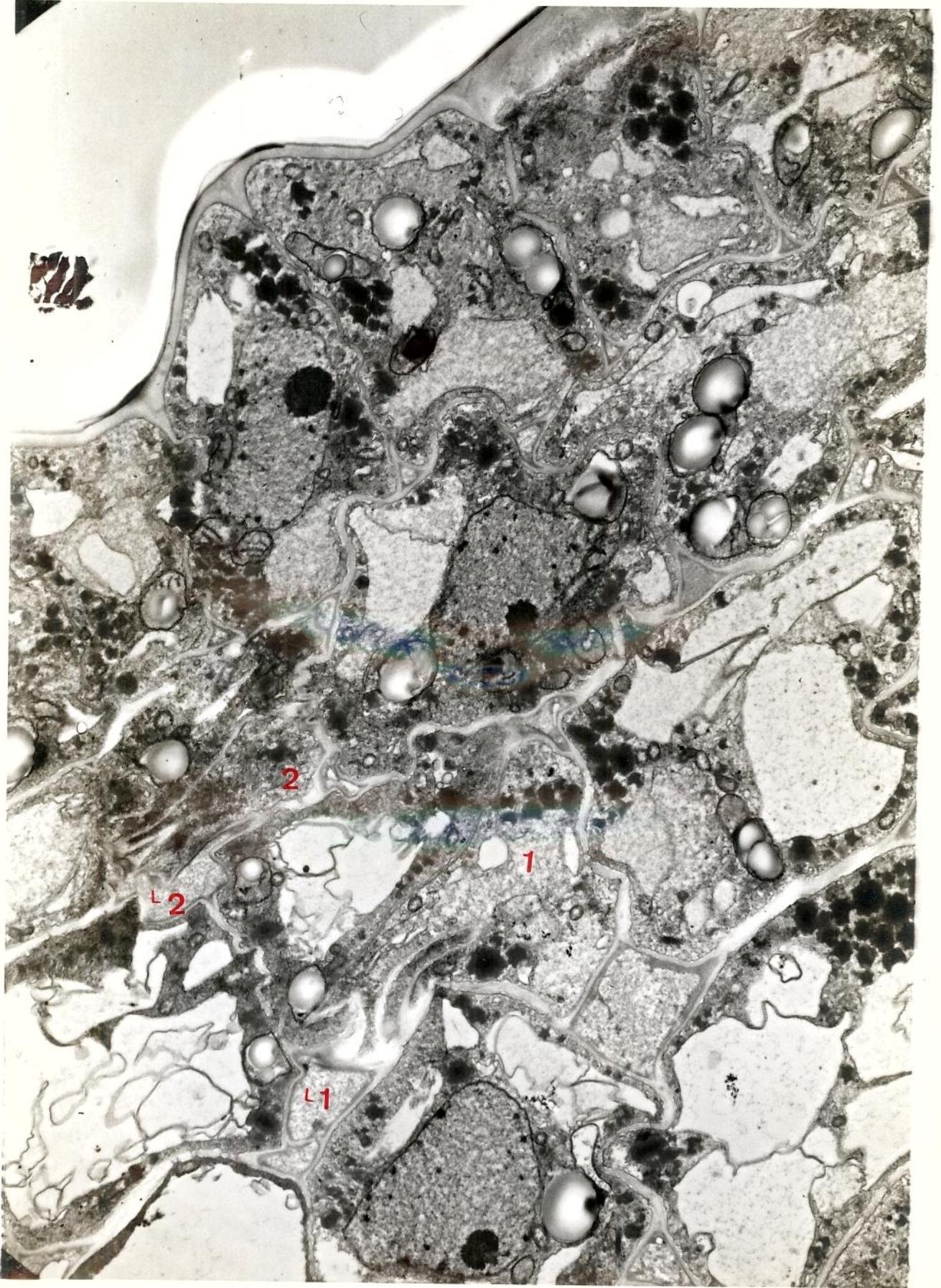
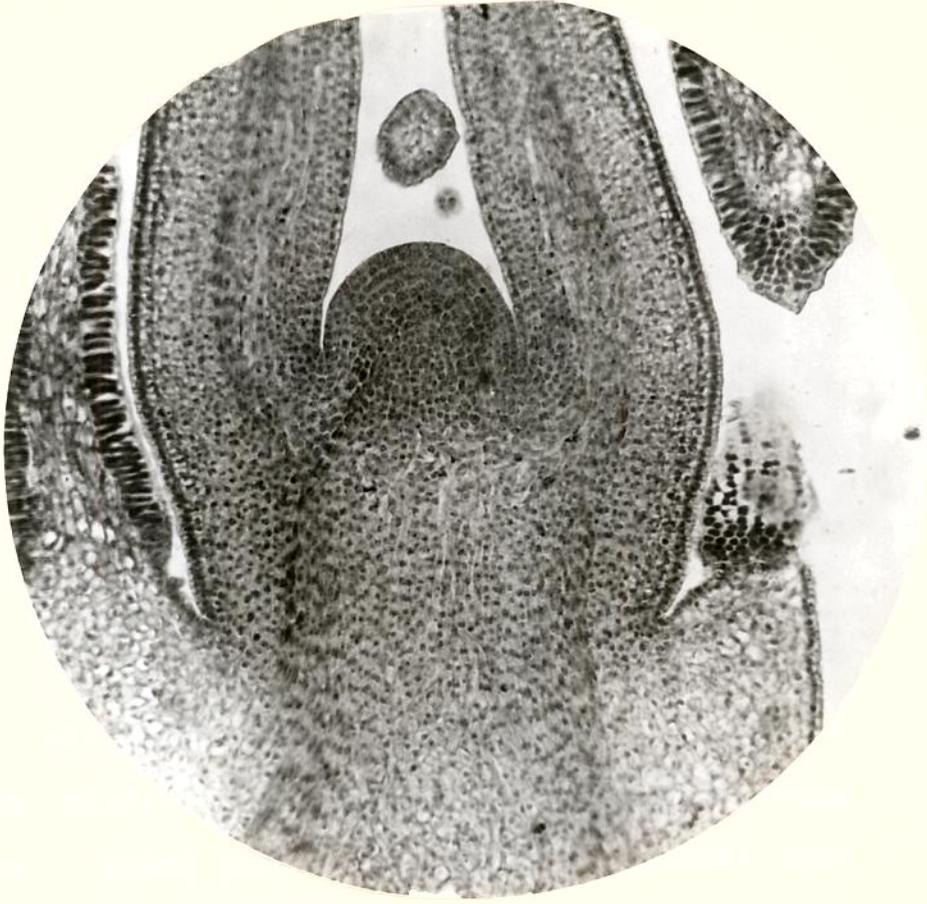
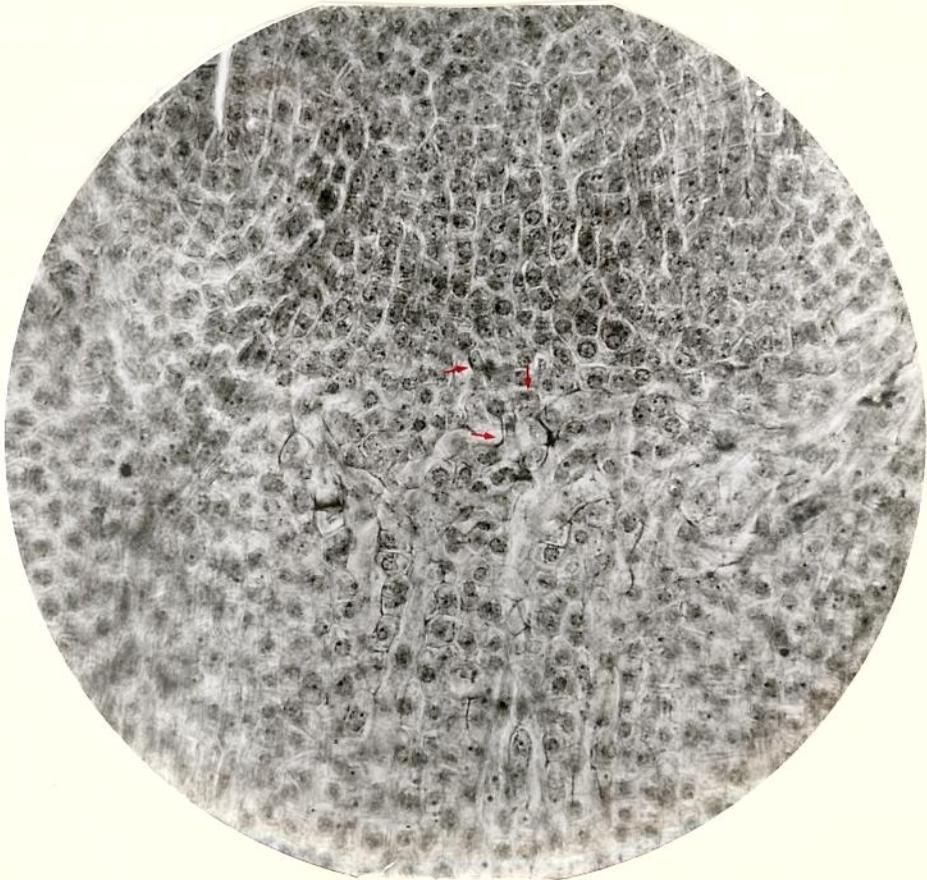


Fig. 11. Seção transversal do hipocotilo de embrião germinado. 1 e 2: Início da diferenciação de duas células laticíferas, estando ainda em elaboração as paredes, por enquanto muito finas, que as separam das células irmãs. Em ambos os casos parece ter havido indução a partir de laticíferos que aparecem cortadas transversalmente (L_1 e L_2) e cujas paredes de contacto com as células induzidas parecem parcialmente dissolvidas. No citoplasma das novas células laticíferas desapareceram as reservas figuradas (grãos de amilo formados na germinação, grãos proteicos e gotas lipídicas), notando-se ainda marcada alteração no sistema vacuolar. Electromicrografia - ca. 7.500 x.



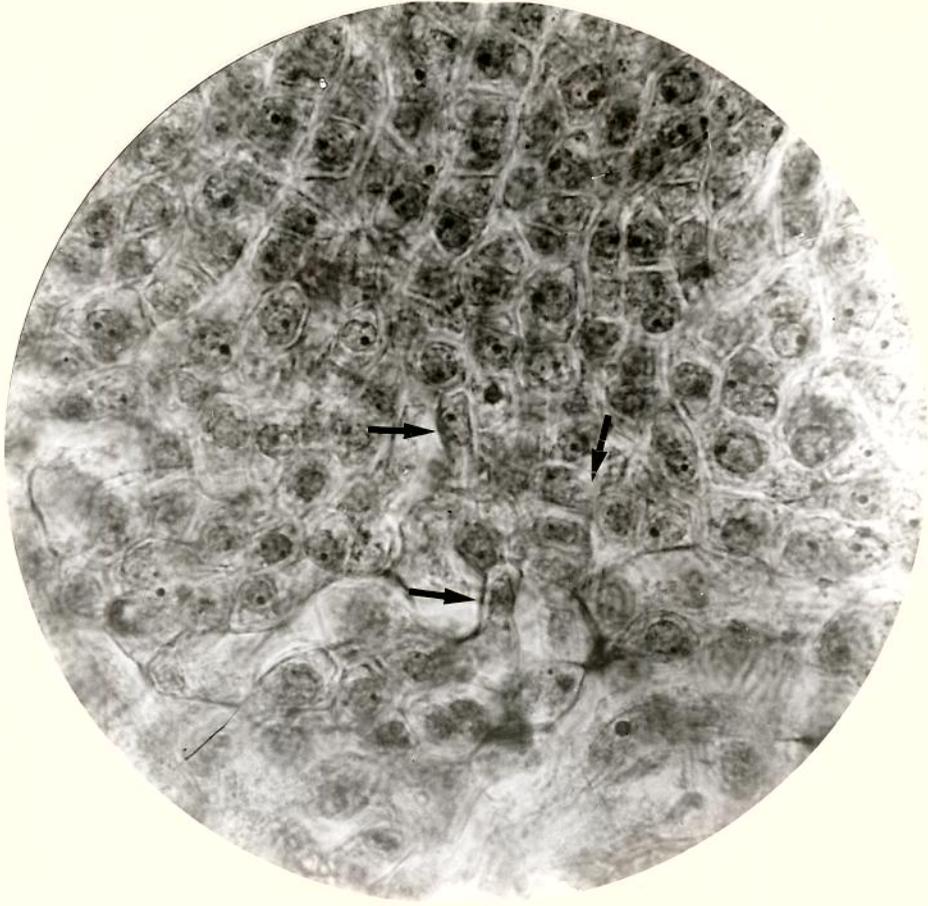
12



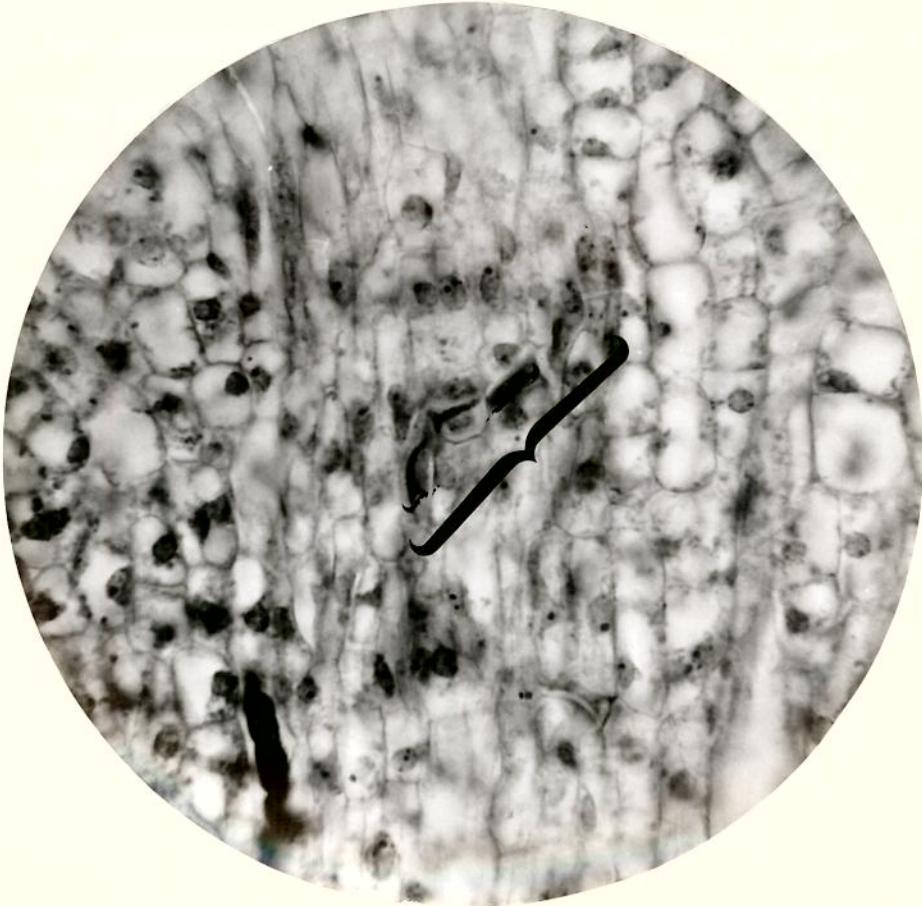
13

Fig. 12. Seção longitudinal mediana do meristema apical em fase de superfície máxima; exemplar adulto de *Cryptostegia grandiflora*. ca. 165 x.

Fig. 13. Vista parcial do mesmo campo microscópico: assinaladas as extremidades de tres laticíferas na base do promeristema. ca. 500 x.



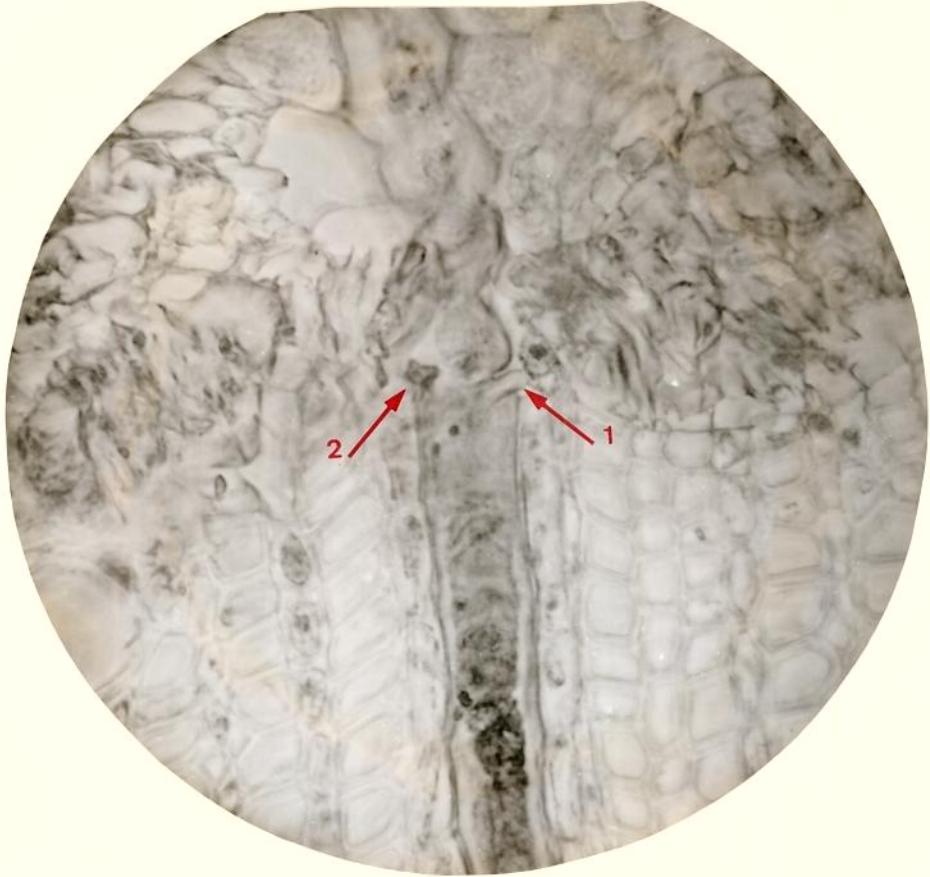
14



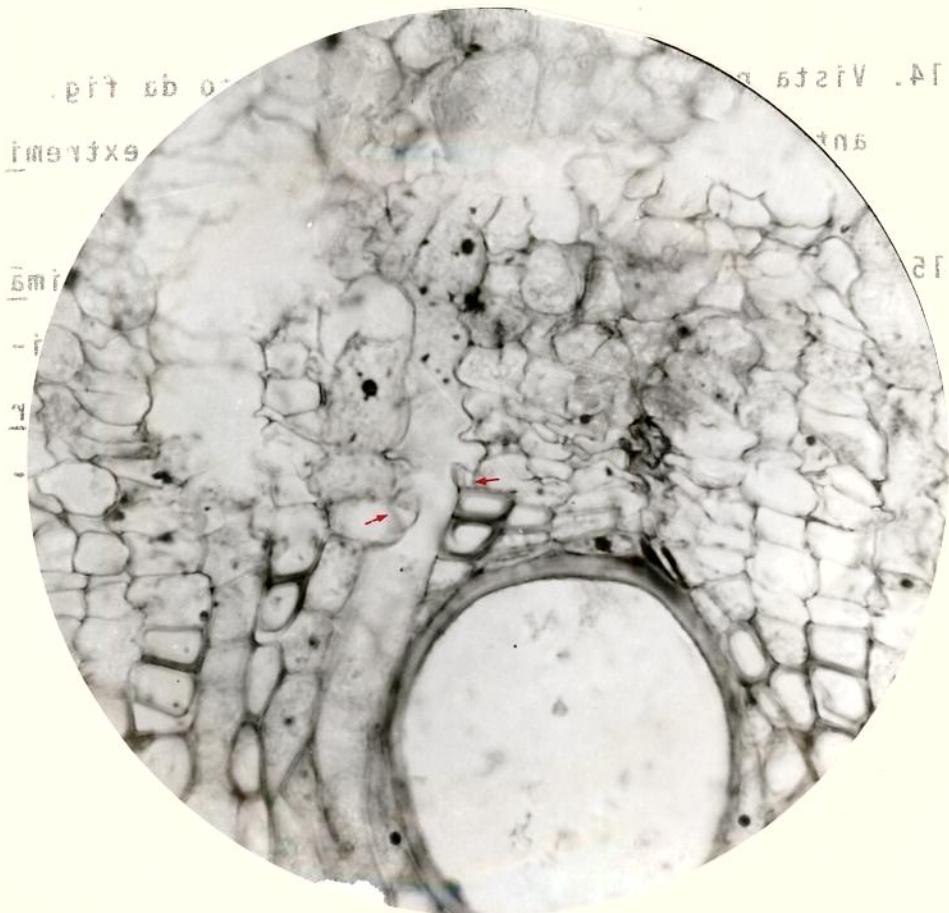
15

Fig. 14. Vista parcial do campo microscópico da fig. anterior. Assinaladas as mesmas tres extremidades de laticíferos. ca. 1180 x.

Fig. 15. Seção longitudinal, radial do meristema primário do caule de *Cryptostegia grandiflora*. Divisão de células do procâmbio para que se forme, após fusão de protoplastos, um ramo laticífero transestelar. ca. 765 x.



16



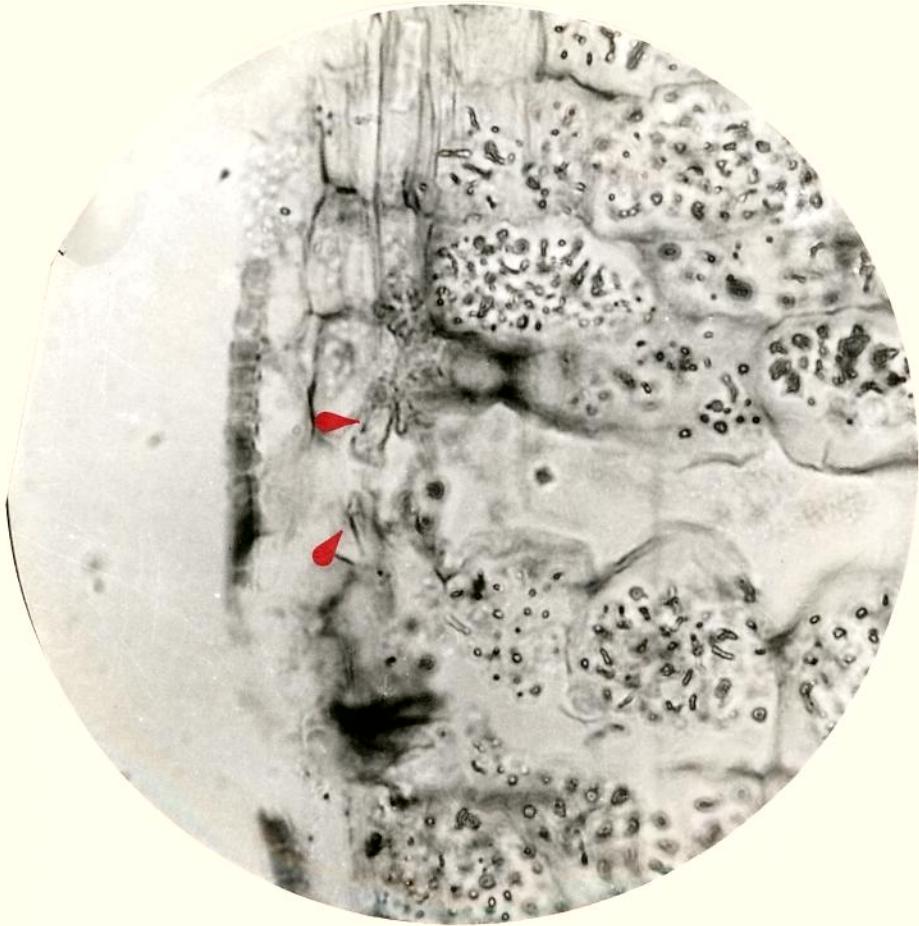
17

Fig. 14. Vista de la extremidad superior de la raíz de la planta de la Fig. 13.

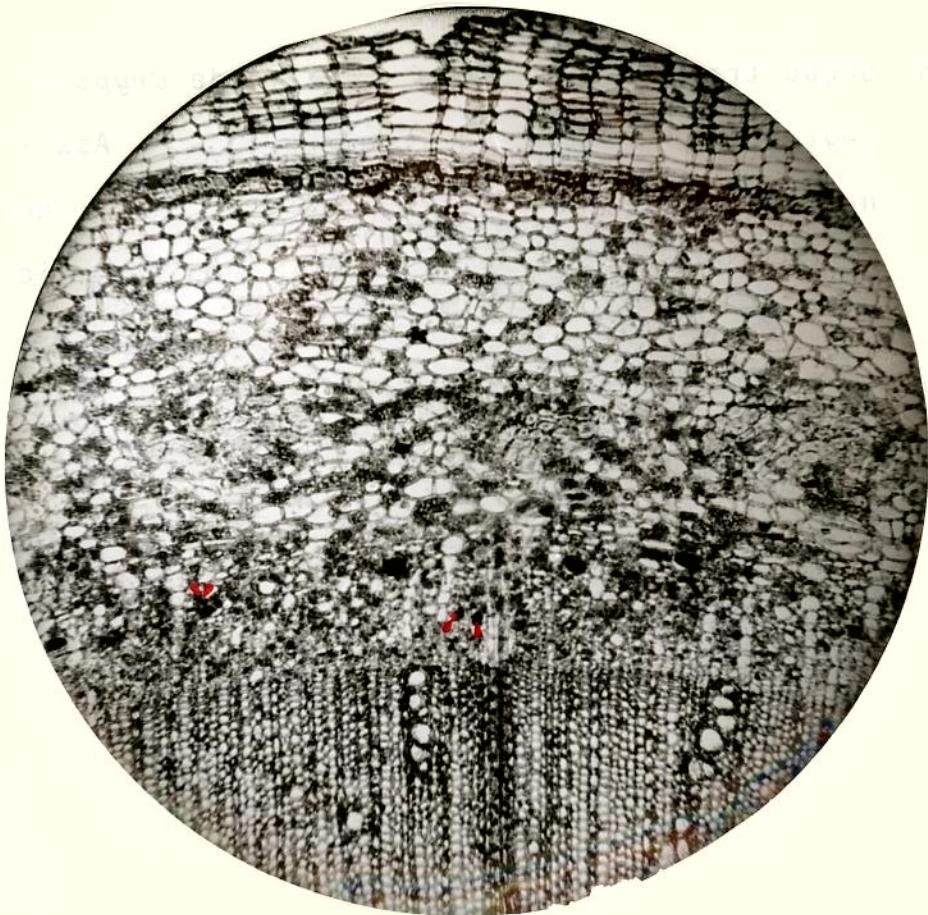
Fig. 15. Vista de la extremidad superior de la raíz de la planta de la Fig. 13.

Fig. 16. Seção transversal do caule adulto de *Cryptostegia grandiflora*, ao nível do cambio. Assinaladas duas células pequenas, derivadas do cambio, em via de incorporação pelo sincício laticífero radial. ca. 500 x.

Fig. 17. Idem, idem. Assinaladas duas células que provavelmente serão incorporadas pelo sincício laticífero radial. ca. 500 x.



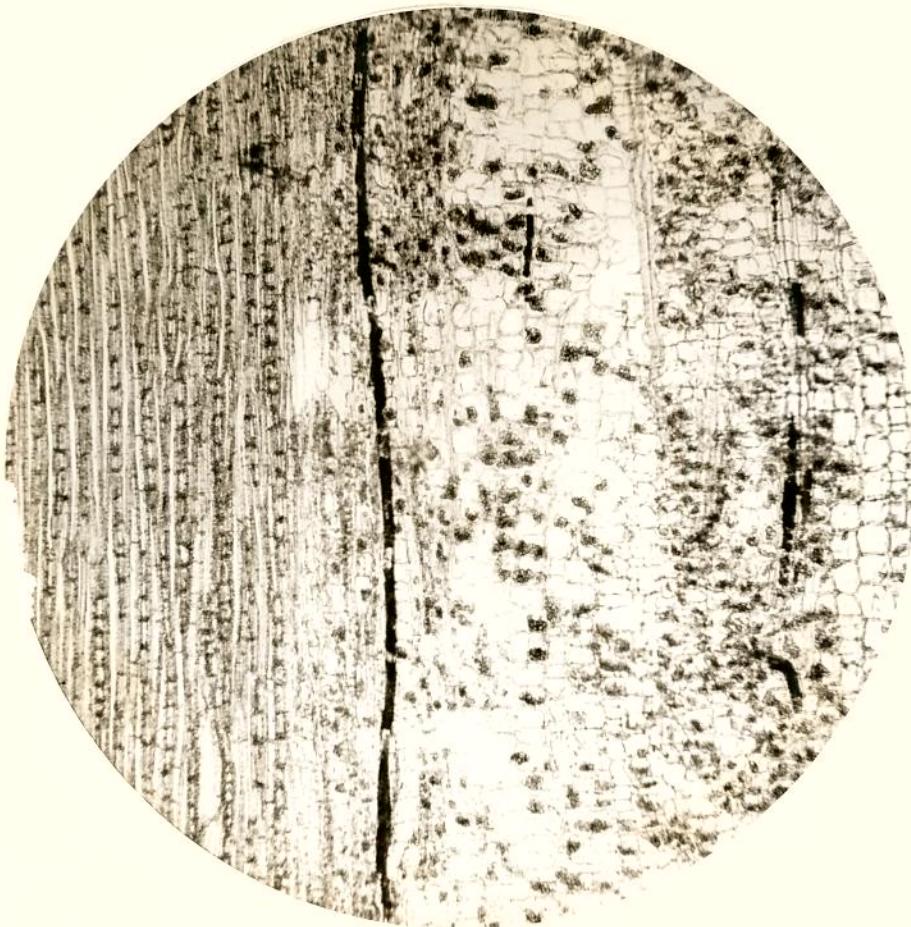
18



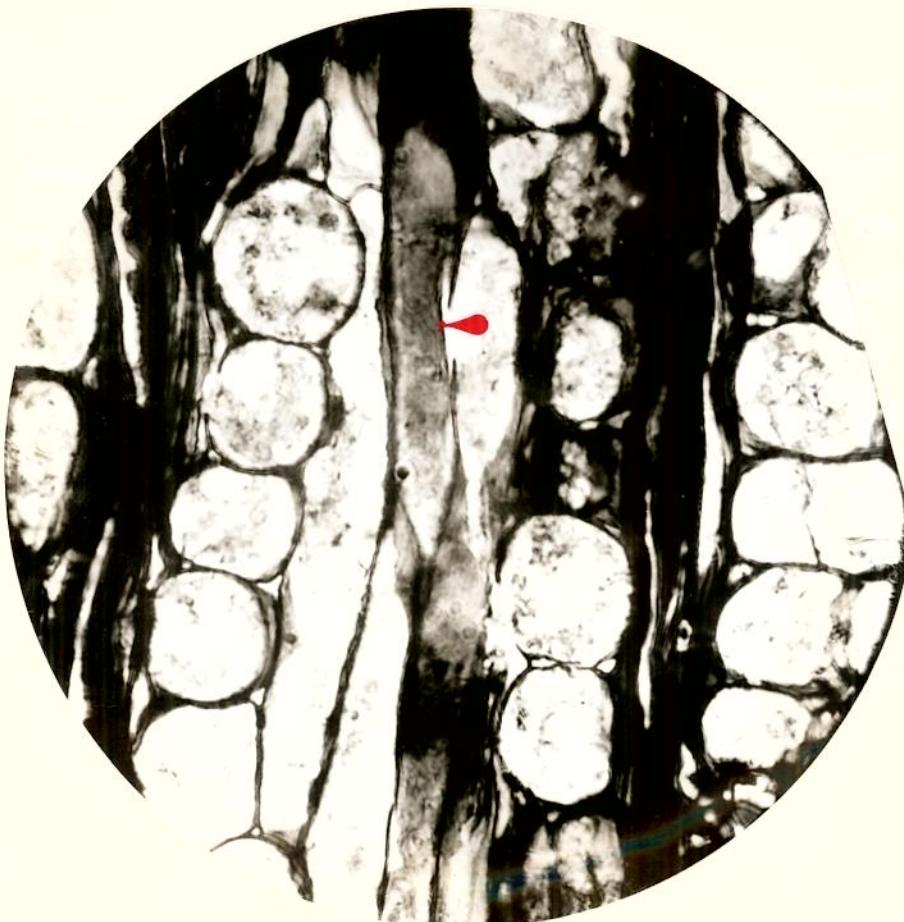
19

Fig. 18. Seção longitudinal radial de caule de *Cryptostegia grandiflora*. Assinaladas duas derivadas do câmbio, que provavelmente serão anexadas ao laticífero radial, estimulando-lhe o crescimento. ca. 790 x.

Fig. 19. Seção transversal do caule de *Cryptostegia grandiflora*, vendo-se o liber secundário, cuja porção interna contém laticíferos secundários, formados pelo câmbio. Assinalados alguns destes laticíferos estreitos. ca. 80 x.



20



21

Fig. 20. Seção longitudinal tangencial do caule de *Cryptostegia grandiflora*: próximo do câmbio, um laticífero secundário do liber. ca. 80 x.

Fig. 21. Idem, idem. Assinalada a perfuração da pare de pela qual se comunicam duas células, provenientes do câmbio, reunidas na constituição de um laticífero secundário. ca. 500 x.

CAPÍTULO III

Da nova serie de trabalhos sobre os laticíferos con
tínuos que surgiram apõs a publicação de nossos primei-
ros resultados, vamos examinar apenas os de quatro Auto-
res: P. MAHLBERG - (1959), (1959a), (1960), (1961),
(1963), (1966), (1967), (1968), os tres ultimos em cola-
boraçãõ com P. S. SABHARWAL; H. MOOR (1959); J. R.
ROSOWSKI (1968).

Logo no primeiro trabalho, demonstra MAHLBERG
(1959) aparente intençãõ de contestar sistemãticamente
nossas conclusões principais. E, assim, que afirma ã
pãgina 115: "According to Milanez, upon incorporation
of new cells into the laticiferous system, there
appeared to be a rapid destruction of the nuclear
chromatic material". Esta citaçãõ refere-se a nosso pri-
meiro trabalho (MILANEZ, 1952); entretanto, o ítem 5 do
respectivo Abstract diz o seguinte (pg. 174): "There
were not found mitotic figures in the laticiferous pro-
toplast, but prophasic and metaphasic nuclei were easily
seen in the adjacent cells. If these dividing cells be
fused to the laticiferous syncytium, there shall
probably be a rapid destruction of the nuclear threads
in the cytoplasm". Como se vê, o que haviamos admitido
como provavel, apenas com referencia aos nucleos em divi

são, e neste estado incorporados ao sincício, ele nos atribuiu em sentido muito mais amplo, para todos os núcleos incorporados. É possivelmente esse mesmo ânimo de contestação que leva MAHLBERG, poucas linhas abaixo, a este estranho silogismo: "No distinction of pioneer and adventitious nuclei can be made from the present studies upon *Nerium oleander*. Furthermore, classical studies upon the laticifer system in the genus *Euphorbia* do not support the multicellular concept of the laticifer. Hence, there would be no differentiation of pioneer and adventitious nuclei." A assertiva óbvia, à página III, "Tips of the branches penetrate between adjacent cells and not into or through the surrounding cells", também só desse modo poderá compreender-se se a relacionarmos com o ítem I do Abstract, de nosso citado trabalho, mal entendido por MAHLBERG: "The young tips of the non-articulate latex tubes in the axis shoot of *Euphorbia phosphorea* occupy cellular (not intercellular) spaces ..." significando naturalmente que por suas dimensões esses tubos eram comparáveis às células vizinhas e não aos meatos da região. Finalmente, na mesma linha de contestação situa-se a assertiva categórica do Summary (pg.118): "No fusion or degeneration of nuclei occurs within the laticifer"; na verdade, na página anterior, escrevera o Autor: "It is quite possible that changes may occur in the nuclei as they become more distant from the

meristematic region of the shoot apex during growth in the normal plant".

Para completarmos a apreciação desse primeiro trabalho, onde são descritas e mostradas varias fases de mitose no embrião e nos meristemas de *Nerium oleander*, queremos dar destaque às seguintes observações do Autor (pg. III): "In the apices of seedling and adult plants which were studied, mitoses were observed in the laticifers only within the meristematic shoot apex including young primordia of foliar organs.... Nuclear division was not observed in the maturing or matured tissues of the plant body two millimeters or more from the shoot apex".

Muito mais ambicioso foi seu segundo trabalho. Sementes de *Euphorbia marginata*, depois de embebidas em água esteril por tres horas e de superficialmente esterilizadas, foram dissecadas para a retirada dos embriões; estes foram cultivados em meio nutritivo complexo, com agar, em placas de Petri. De certo modo, era uma repetição da tentativa de SNYDER (1955), já anteriormente mencionada, inclusive quanto aos resultados, como nos informa o Autor (pg. 159) - "No laticifer branches were observed to penetrate into the agar culture medium." Crescimento e divisões celulares são observados tanto no hipocôtilo, quanto nos cotilédones. Naquele, os tecidos do córtex entram em colapso pouco a pouco, ao passo que se verifica intensa atividade mi

tônica nos tecidos provasculares, originando-se um calo. No mesofilo dos cotilédones, "Enlargement, as well sporadic cell division, results in the formation of a very lacunate cell arrangement..." Aqui, nas enormes lacunas formadas, vêm-se as extremidades dos ramos dos laticíferos, mas sempre em contacto íntimo com células parenquimáticas (Fig. 5 a 10 do trabalho em análise), como se delas tivessem provindo seus últimos segmentos.

Pelo tamanho das lacunas, ele pôde repetir nestas circunstâncias, mais que em quaisquer outras aquela sentença óbvia: "The laticifer cell occupies only intercellular spaces, never penetrating into the adjacent cells" (pg. 161); com o simples crescimento simplástico, continuam os laticíferos entre as células de parenquima, ocupando agora parte das largas lacunas surgidas entre elas na cultura. Mas terão aparecido novos ramos durante o cultivo? Claro que não, deixa entrever o Autor, quando honestamente declara (pg. 159): "Further investigation, however, is necessary to determine if such branches actually do arise during the proliferatio of the tissues."

Dos fatos acima expostos poderíamos supor que o estudo em foco tivesse sido sem valia, senão totalmente desfavoravel, em relação à teoria classica. Entretanto, o Autor inicia desse modo a Discussion (pg. 161)-: "The observations upon the non-articulated laticifer within the proliferated tissue derived from embryos of

Euphorbia marginata indicate conclusively that the laticifer is an elongate and branched intrusively growing cell." Assegura não haver qualquer evidência de organização sincial, como propuzemos, mas não explica porque nas lacunas largas, as extremidades dos tubos, quando íntegras, aparecem sempre em contacto íntimo com células de parenquima. Afirma, adiante, à página 162: "That tip growth of the cell does occur was supported by its sinuous and helical course through the proliferated tissues of the hypocotyl"; aliás, anteriormente, à página 159, afirmara MAHLBERG: "The very sinuous and irregular helical-like growth pattern of the laticifer within the proliferated tissue suggests that the non-directional growth is a response to the composition of the culture medium". É curioso notar que o Autor não se refere ao mesmo tipo de crescimento, nem nos mostra qualquer micrografia que o exhiba, com relação ao mesofilo dos cotilédones, embora aí também ocorra, segundo ele, o crescimento apical dos ramos laticíferos e estejam estes evidentemente sob a ação do mesmo meio de cultura. A diferença no desenvolvimento das duas partes do embrião, notada pelo próprio Autor, está em que "The parenchyma cells of the mesophyll do not collapse as rapidly as do the outer cortical parenchyma cells in the hypocotyl". Chegamos, assim, à conclusão de que é o colapso das células parenquimáticas que determina o trajeto irregular dos laticíferos, fato perfeitamente

explicável se atentarmos para as seguintes proposições, de fácil verificação: -a) apesar do colapso das células de parenquima, os laticíferos permanecem vivos por algum tempo, capazes de crescer; -b) esse crescimento simplástico, à custa do meio de cultura, na massa do parenquima, em degeneração, resulta no aumento de seu comprimento, sem que haja avanço das extremidades j^ovens: os tubos adotam, por isso mesmo, um trajeto sinuoso, irregular que ao invés de apoiar a teoria do crescimento apical, como declara MAHLBERG, antes a torna completamente improvável.

Sem qualquer dúvida, porém, a conclusão mais excitante de MAHLBERG está contida no seguinte período (pg. 161): "The nutritional mechanism of the laticifer cell in *Euphorbia marginata* is quite unknown. Although an abundance of stored starch is present in the cortical cells of the hypocotyl and mesophyll cells of the cotyledons, no starch grains are evident within the laticifer branches. Until more data becomes available it is suggested that the basic nutritional requirements of the laticifer cell are obtained from adjacent cells. Hence the laticifer can be broadly interpreted as a parasitic cell within the plant body". Como se viu na primeira parte da apreciação bibliográfica, páginas atrás, SCHMALHAUSEN (1877), para melhor compreensão de sua teoria sobre o desenvolvimento do sistema laticífero, comparou-o, apenas, ao de um fungo parasita, com a

diferença de que aquele sō se processava nos tecidos meristemáticos; jã para SCHULLERUS (1882), a constatação do crescimento dos tubos nas radículas e nas gemas laterais mostrava que a analogia entre as hifas parasitas e os laticíferos é maior do que imaginava aquele Autor, pois o desenvolvimento podia processar-se também fora dos meristemas. Agora MAHLBERG, baseando-se na ausência de grãos de amilo nos ramos em diferenciação, ao passo que os hã abundantes nas células adjacentes de parênquima, conclui que o sistema laticífero deve ser interpretado como uma célula parasita. Em discordância completa com este conceito, permitimo-nos lembrar dois fatos conhecidos: -a) a solubilização das substâncias de reserva das células ocorre logo no início da diferenciação laticífera, no embrião; -b) justamente nas espécies de *Euphorbia* os laticíferos produzem grãos de amilo típicos durante o desenvolvimento do embrião em plântulas. Além do mais, parece-nos sumamente estranho tenha MAHLBERG chegado a sua concepção da natureza parasítica dos laticíferos com a observação do desenvolvimento dos mesmos em meio de cultura rico e complexo.

Os trabalhos sobre a embriogenese e a histogenese de *Nerium oleander* L. (MAHLBERG, 1960, 1961 e 1963) serão apreciados na discussão de nosso estudo inédito sobre a mesma planta. Convém, entretanto destacar desde jã uma afirmativa de caráter geral, constante do terceiro trabalho citado. É a página 230: "The slender pro-

toplasmic tips penetrate along the intercellular zone of contiguous cells with no evidence of crushing of either the laticifers or of the adjacent cells. Since the tips are within the meristematic zones of the different organs where no intercellular spaces are evident, their growth must necessitate the actual separation of cells of the ground meristem or procambium. It is not known whether growth is accomplished by the physical intrusion of the cell tips between the adjacent cells or by enzymatic dissolution of the intercellular pectic substances."

Na verdade, os anatomistas que descreveram o desenvolvimento do sistema laticífero de acordo com a teoria clássica, sustentaram que o crescimento apical intrusivo dos tubos contínuos se efetuava através dos meatos intercelulares, sem a preocupação de verificar a existência e a largura desses meatos. Seus seguidores também não levaram em consideração esses dados de tão fácil observação. MAHLBERG, que a princípio adotou o mesmo ponto de vista, foi o primeiro a reconhecer a ausência de meatos com as dimensões necessárias a esse modo de crescimento, nas zonas meristemáticas, neste trabalho de 1963. Substituiu, então, essa hipótese por outra - o afastamento das células ao longo da lâmina média - dando-a, porém, como fato necessário e dizendo apenas ignorar se se realiza por via mecânica ou química. Essa hipótese nos parece de difícil aceitação so-

bretudo quanto as procambio, cujas células, sempre intimamente unidas, dão origem a vasos que não apresentam peculiaridades morfológicas na região do laticífero, não obstante essa intromissão de uma célula estranha no feixe em diferenciação.

A seguir publicou dois trabalhos sobre mitoses nos laticíferos dos embriões de *Euphorbia marginata*, o último em colaboração (MAHLBERG, 1966 e MAHLBERG e SABHARWAL, 1967). O primeiro foi simples nota previa; no segundo, mais minucioso, apresenta diversas considerações sobre a falta de sincronismo das mitoses e a não formação de paredes divisorias. Declara que empregou embriões em vários estágios da ontogênese e na "Discussion" afirma: "We noted that mitosis was evident in all samples and nearly all stages were to be found, even though divisions were more conspicuous in one zone of the axis than in another".

Esta ultima frase deixa-nos a impressão de que as mitoses foram observadas em todas as fases do desenvolvimento do embrião, mas os Autores não são explicitos a respeito. As fotomicrografias, ao contrário, levam-nos a supor, dado o grande diâmetro da maioria dos tubos, que se trata sobretudo de embriões já bem desenvolvidos, ou em pleno processo de germinação.

A proposito dessa largura é interessante ler-se o que escrevem os Autores mencionados logo no inicio das "Observations" (página 465) - "In *E. marginata* approxi-

mately 12 laticifer initials arise at the periphery of the incipient procambium in the cotyledonary node of the embryo. They appear at the time of initiation of the cotyledons, and during subsequent development of the embryo the growing extensions of these cells penetrate along the hypocotyl toward the root meristem and into the enlarging cotyledons. The tips, all of which grow between adjacent cells, appear delicate and somewhat pointed, while back from the tip the cell attains a diameter comparable to that of adjacent cells." Ora, é fácil verificar que nas doze micrografias do trabalho os laticíferos, cujos núcleos estão em mitose, são sempre nitidamente mais largos que as células adjacentes. Forçoso é concluir, portanto, que ou os embriões já estão muito desenvolvidos, ou é extremamente rápido o crescimento em largura das pontas das extensões das iniciais laticíferas, supondo-se, é claro, que o processo ontogenético tenha sido o descrito pelos Autores.

Finalmente, ainda em colaboração com SOBHWAL, publica em 1968 o que nos parece ter sido seu último trabalho sobre laticíferos "Origin and Early Development of Nonarticulated Laticifers of *Euphorbia marginata*". Descrevem a formação do sistema laticífero de acordo com a teoria clássica, negando de plano, fatos morfológicos observados por Autores menos ortodoxos, mas as fotomicrografias, em geral de boa qualidade, que apresen-

tam em apoio de suas assertivas, estão frequentemente em flagrante contradição com as mesmas.

Na "Discussion", a página 379, lê-se: "The studies of MILANEZ (1952) and MILANEZ and NETO (1956) on laticifer development in two species of *Euphorbia* are of particular interest as their interpretations are at variance with those of other investigators. They describe the laticifer as arising by wall lysis, resulting in the formation of vesicles which lack membranes and walls. They maintain that the protoplasts from the different cells fuse and the nuclei in aggregate contribute to the multinucleated condition of the cell." Está claro que não escrevemos que as vesículas não possuíam membranas ou paredes, pois sem estas não seriam vesículas; a lise das paredes é limitada aos pontos de contato, por onde se fundem os respectivos protoplastos e a vesícula tem por paredes as das células que se fundiram.

No parágrafo seguinte, os Autores parecem querer encerrar definitivamente a questão, tal a forma em que está vasado: "In contrast with their observations, it is readily demonstrated that the cell wall of the laticifer can be isolated (MAHLBERG, 1963) and that the coenocytic protoplast in *Euphorbia* is a result of the repeated mitotic activity of nuclei confined to the laticifer (MAHLBERG and SABHARWAL, 1967)". Interrompemos a citação para comentar estas duas proposições. Na

primeira, passam sutilmente das vesículas da fase embrionária para os laticíferos em geral, dando a impressão de que havíamos duvidado da presença de parede não somente naquela fase, o que mostramos ser falso, mas também nos tubos mais desenvolvidos, ponto de vista adotado por SCHLEIDEN (1839) antes do seu livro clássico de 1849 ... Quanto à afirmação sobre o isolamento da parede por MAHLBERG (1963), relemos cuidadosamente o citado trabalho e não encontramos sequer uma referência ao fato. Há somente uma fotomicrografia com a seguinte legenda: "Fig. 5- portion of laticifer isolated from cortex with several parenchyma cells attached in their original positions, $\times 175$." Trata-se, apenas, de um fragmento de tubo com algumas células vizinhas, obtido por maceração de tecido, tal como vários Autores já tinham observado muito antes. A segunda proposição não nos parece ainda suficientemente fundamentada em observações. O próprio Autor afirmava, com relação ao embrião desta mesma espécie em proliferação num meio de cultura (MAHLBERG, 1959b - pg. 161): "No mitotic figures were observed in the nuclei contained in the laticifer branches." Aliás, em trabalho publicado no mesmo ano, sobre cariocineses nos laticíferos de *Nerium oleander* (MAHLBERG, 1959a, - pg. III) já proclama, como vimos linhas atrás: "In the apices of seedling and adult plants which were studied, mitoses were observed in the laticifers only within meristematic shoot apex, including

young primordia of foliar organs." Como se explica a origem dos núcleos dos ramos que percorrem o córtex ou se dirigem para a raiz?

Retomemos a citação do mesmo paragrafo, à página 379: "Recently MOOR (1959) isolated the wall and studied the cellulose microfibril arrangement in the laticifer wall. Considerable recent evidence, therefore, indicates that the laticifer possesses a distinct cell wall and does not arise by fusion of numerous protoplasts." Mais um curioso silogismo de MAHLBERG que considera como demonstrada recentemente a presença de parede distinta nos laticíferos, verdade aceita universalmente, como vimos, desde 1849; por outro lado, a observação de mitoses nos tubos do embrião não implica em que todos os núcleos, inclusive os da planta adulta, provenham de divisões do núcleo da célula inicial e dos seus descendentes. Ainda mais, tal como está formulado, pode este silogismo sugerir certa contradição entre a presença de parede distinta e a origem pela fusão de protoplastos - o que é evidentemente falso, tendo-se em vista os tubos articulados.

O belo trabalho de MOOR (1959)-Platin-Kohle-Abdruck-Technik angewandt auf den Feinbau der Milchrohren-traz, na primeira parte, amplos esclarecimentos sobre o estudo, ao microscópio eletrônico, da textura da parede das células vegetais segundo o processo da replica, descrito com minúcias. Mas para realiza-lo "Die gebräuliche

Methode ist die Mazeration des pflanzlichen Gewebes, welche durch die Entfernung der Zellinhalte und der leicht löslichen Wandbestandteile auf chemischen Wege erfolgt." (pg. 394). Ora, este metodo não é o mais apropriado para dirimir dúvidas sobre a ontogenese dos laticíferos continuos porque implica na perda das relações topograficas dos tubos com os tecidos vizinhos onde, segundo a teoria sincicial, se formam as ramificações e se processa o crescimento por adição de novos elementos. Sem a visão de conjunto do sistema laticífero é difícil determinar a ordem de sequencia dos ramos e sua idade relativa. O criterio adotado pelo Autor, em nota ao pé da página 412, não nos parece dos mais seguros: "Als Anhaltspunkt der Auseinanderfolge der Entwicklungsstadien der Milchrohren dient uns die Zunahme des Zelldurchmessers, gemessen im elektronenmikroskopischen Präparat." Temos visto ramos que já se iniciam com a largura de uma célula, ao passo que outros, após marcado alongamento do hipocotilo, conservam diametro muito reduzido. A segunda parte do trabalho é dedicada ao estudo da textura fina das paredes dos laticíferos de *Euphorbia splendens* Bojer. Mostra em micrografias a parede dos laticíferos mais jovens, provavelmente embrionarios, onde as microfibrilas de celulose formam trama frouxa, sem apresentarem uma direção predominante bem definida; novas camadas de microfibrilas se depositam a seguir, à medida que se desenvolvem

os laticíferos, agora com características diferentes, bem definidas, quanto à direção predominante e à abundância das microfibrilas de celulose.

A conclusão mais importante da tese está à página 418: "Ferner gleicht die Textur der jungsten Röhren derjenigen von Pollenschläuchen, Samen- und Wurzelhaaren, welche ganz ohne Zweifel durch Spitzenwachstum entstehen." Ao ler-se esse período, colhe-se a impressão de que a parede, nos exemplos citados, possui textura característica e que o reconhecimento da mesma textura na parede dos laticíferos mais jovens levará fatalmente a uma conclusão sobre seu modo de crescimento. Assevera, entretanto, ROELOFSEN (1959), um dos mais reputados mestres no assunto: "As far as we know it is now generally assumed that there is no essential difference between the mechanism of cell-wall extension in the growing tip and that found in a more or less cylindrical cell-wall zone. The tip growth would merely be an example of a strongly localized surface growth. At one time it was believed that the tip was perforated, and that the wall grew by the aid of cell-wall material that was deposited by the protruding protoplast, but as we have already pointed out, this hypothesis of protoplasmic growth has now been discarded." (pg. 183). Por aí se vê que à luz dos conhecimentos atuais a simples textura da parede é insuficiente para caracterizar o crescimento apical.

O último trabalho que examinaremos, realizado por ROSOWSKI (1968), não apresenta relação direta com o assunto em pauta, mas dele desejamos citar dois períodos, ambos à página 114 que reforçam algumas das nossas proposições. O primeiro refere-se à forma de ramificação, indicadora de prováveis anastomoses: "Longitudinal sections reveal that both the wide and the narrow laticifers undergo Y- or H-shaped branching within the internode, although this type of branching is much more common in the nodal regions". O segundo período diz respeito aos núcleos dos tubos e a suas possíveis formas de degeneração: "Extremely elongate forms up to 30 μ in length were observed. In several cases the elongate nuclei appeared flat and were twisted in the center. In one section two almost spherical nuclei appeared to be held together by a thin nuclear connection. Mitotic figures were not observed in the laticifers."

II PARTE

Esta divisão da Tese contém um estudo inédito, realizado na Unicamp, sobre o embrião maduro e as primeiras fases do desenvolvimento da plântula de *Nerium oleander* L., tendo em vista os aspectos morfológicos que fundamentam nossa preferência pela teoria sincicial da formação e crescimento dos laticíferos contínuos; por esse motivo apoiamos constantemente nossa exposição nas fotomicrografias que a ilustram. Alguns outros aspectos foram também considerados quando, de algum modo, se relacionam com o processo histogenético (reservas do embrião, por exemplo). Não é, portanto, nossa intenção descrever com minúcias a estrutura e o desenvolvimento do sistema laticífero dessa planta, como fez MAHLBERG (1960, 1961, 1963) mas apenas ressaltar aqueles aspectos acima mencionados.

A escolha do material resultou de possuímos no jardim de nossa residência, aqui em Campinas, belo exemplar arbóreo da espécie, prodigo em sementes; esta feliz coincidência nos permitiu cotejar os resultados de nossas pesquisas com os daquele Autor.

O fixador usado na maior parte das preparações foi o F.P.A., com a seguinte composição (JOHANSEN, 1940, pg. 42):

Formol (1 40%).....	5 partes em volume
Ácido Propiônico	5 partes em volume
Álcool etílico a 70%.	90 partes em volume

Para os embriões com 5 a 7 dias após a germinação, empregamos com sucesso variável, a mistura de Lewitsky cuja fórmula é a seguinte (JENSEN, 1962, pg. 263).

50 ml de ácido crômico a 1% em água
50 ml de formol a 10%

Em ambos os casos foram os embriões impregnados de parafina e nela incluídos pelos processos usuais. Alguns cortes, como o da Fig. 24, foram obtidos diretamente do material fixado, por meio do criostato.

A maceração química foi conseguida com o líquido de Jeffrey (JOHANSEN, 1940, pg. 104) preparado misturando-se partes iguais, em volume, das soluções aquosas de ácido crômico e nítrico, ambas a 10%.

Todas as fotomicrografias foram obtidas pelo Autor com o Fotomicroscópio II da Zeiss.

1.

Nas sementes maduras e secas, o embrião tem comumente 5,5 mm a 6,8 mm de comprimento; o hipocótilo, que se sempre menor que os cotilédones, mede mais comumente de 2,5 mm a 3 mm de comprimento.

Em corte transversal do terço médio do hipocótilo,

observam-se, de fora para dentro os seguintes tecidos:

a) protoderme, em camada única de células muito pobres de reservas, em geral com 17 a 25 μ de altura; b) meristema fundamental do córtex, habitualmente com 8 a 10 camadas de células amplas, de seção poligonal arredondada, com minúsculos meatos nos ângulos, sobrecarregadas de reservas; c) procâmbio, sob a forma de cilindro de elementos estreitos, com 5 a 12 μ de diâmetro, mais comumente, e de seção poligonal, intimamente unidos, sem meatos conspícuos, em número aproximado de sete camadas; contêm alguns grupos de protofloema diferenciado, ao passo que varia bastante o grau de diferenciação dos elementos vasculares do protoxilema já perceptíveis (em geral 2-4); d) meristema fundamental da medula, de células amplas, semelhantes às do córtex, inclusive quanto às reservas, com 5-7 elementos no maior diâmetro.

No limite externo do procâmbio, encontra-se o círculo incompleto de laticíferos perivasculares, nos casos mais comuns em número de 27-29 que aumenta nas proximidades do plano nodal e diminui em direção à radícula. O diâmetro maior desses tubos oscila, em geral, entre 10 e 20 μ ; em certos casos, sobretudo nos que se dirigem para os cotilédones, pode ser bem maior.

Na extremidade superior do hipocótilo, entre as bases dos cotilédones, está situado o promeristema apical, de células pequenas (geralmente até 12 μ de diâmetro maior), com seção poligonal de 4 a 6 lados, frequente-

mente arredondada e núcleo único de 3 a 5 μ de diâmetro, contendo nucléolo nítido. A superfície externa do meristema é em geral mais ou menos plana, levemente convexa ou, mesmo, levemente côncava, tornando-se fortemente convexa quando inicia sua atividade, aproximadamente um mês após a sementeira. Até então o hipocótilo que aumenta de comprimento cerca de treze vezes, o faz apenas pelo alongamento e divisão das células dos meristemas primários que o constituem.

Na extremidade inferior do hipocótilo encontra-se, acima das três ou quatro camadas de células da coifa, o grupo de iniciais do promeristema sub-terminal que logo entra em atividade, promovendo o crescimento da radícula. Esta é difícil de limitar-se no embrião em vida latente: examinando-se um corte longitudinal mediano da parte inferior do hipocótilo, percebe-se uma primeira constrição superficial a cerca de 200-350 μ da ponta, que coincide com o limite superior da coifa, ou seja, de sua camada mais externa; mais para cima, aproximadamente a 600-700 μ da mesma ponta, aparece nova constrição menos nítida, causada pela diminuição de altura das células protodérmicas. É provavelmente aí que se inicia a transição estrutural da radícula para o hipocótilo. Segundo MAHLBERG (1960) pag. 127, "The several cell layers formed by periclinal divisions, both from the protoderm and from the outermost cells of the root meristem, constitute root cap tissue."

Na base dos cotilédones, seccionada transversalmente, encontra-se o feixe cotiledonar provindo do hipocótilo: sua secção é, em geral, concavo-convexa ou, mais raramente, plano-convexa e mede aproximadamente 150 a 200 μ de largura. Na face convexa, abaxial estão dispostos os laticíferos e pouco mais para dentro, os grupos de vasos do protofloema. Os primeiros, em número variável (10 a 18 mais comumente) apresentam com frequência diâmetro maior que no hipocótilo, podendo atingir 35 μ de diâmetro. O restante do feixe é formado por células provasculares e, na sua face adaxial, que limita de modo pouco contrastante com as células do meristema fundamental do mesofilo, aparecem vasos do protoxilema em diversos estádios de diferenciação. Este meristema fundamental é semelhante ao do hipocótilo: suas células são apenas um pouco menores (maior diâmetro comumente entre 20 e 35 μ). A protoderme apresenta dimensões maiores na face adaxial (15-28 μ x 7-20 μ) do que na abaxial (12-18 μ x 7-15 μ).

Em nível pouco acima do precedente, quando começam a alargar-se os cotilédones, em lugar do feixe cotiledonar único, encontram-se tres, dos quais um mediano, maior; em geral, já estão aí bem diferenciados alguns vasos lenhosos. Além desses tres feixes, muitos outros podem surgir, em nível superior, de trajeto e dimensões variáveis; pode-se, inclusive, assistir à diferenciação de alguns dos menores, oblíquos ou transversais, à cus-

ta da divisão de células do meristema fundamental do mesofilo. Os tres primeiros citados são constantes e se prolongam até a extremidade dos cotilédones.

2.

As reservas do embrião maduro e seco são constituidas por grãos proteicos e gotas lipídicas; grãos de amilo, antes da hidratação (às vezes acidental) somente são encontrados nas células da coifa da radícula (Fig. 22), o que poderia sugerir agissem eles na orientação desse órgão (estatolitos).

Os grãos protêicos são ovóides ou subesferoidais; suas dimensões, bastante variáveis, dependem da natureza das células onde se localizam. Assim, no meristema fundamental do córtex e da medula do hipocótilo, bem como do mesofilo dos cotilédones, seu diâmetro maior atinge comumente a 8-10 μ , sobretudo na medula; na protoderme e em certos elementos do procâmbio, medem com frequência apenas 1-3 μ de diâmetro. Na vizinhança deste meristema, como também do meristema apical, os grãos vão diminuindo de tamanho, até se tornarem imperceptíveis (ao microscópio fotônico) nas células meristemáticas. Não são encontrados nos laticíferos já diferenciados, tendo sido solubilizados logo no início do processo; sua presença ocasional serve, por isso mesmo, para indicar as células mais recentemente incorporadas e ainda

da em processo de diferenciação (Figs. 26, 31 e 34).

Afora este caso dos laticíferos, a solubilização dos grãos ou sua desintegração, mesmo parcial, indicam hidratação da semente, às vezes accidental, pois o embrião em vida latente os conserva íntegros; o início da germinação é marcado por essa desintegração que se inicia pela extremidade inferior do hipocótilo, das camadas externas para as internas.

Os grãos proteicos coram-se pelos corantes usuais (figs. 25-31, 34-36) e apresentam reação nitidamente positiva com o processo da Ninidrina-Schiff, segundo YASUMA e ICHIKAWA (1953).

Verificamos que esses grãos não são constituídos exclusivamente de holoproteínas, mas contêm certa proporção de glicoproteínas, isto é, proteínas conjugadas a um grupo prostético glicídico. Na verdade, a reação do ácido periódico-Schiff (PAS), segundo HOTCHKISS, 1948 e MCMANUS 1948, permitiu-nos observar grânulos de reação nitidamente positiva no interior da massa parcialmente incolor dos grãos proteicos (Fig. 23). Esta presença do grupo glicídico explica, por outro lado, fato que observamos durante a germinação; logo que se inicia a solubilização dos grãos, depois de breve período de intumescimento, em seguida à absorção de água, surgem minúsculos grãos de amilo em amilo plastos perinucleares, antes inconspícuos.

Sabe-se que geralmente os grãos proteicos de re-

serva são misturas de várias proteínas. A propósito da semente de trigo, escreve VARNER (1965): "Each protein body probably contains a mixture of all of kinds of proteins being synthesized at the time of the formation of the protein body". (pg. 768). Dentre estas, são conhecidas várias glicoproteínas extraídas de sementes, inclusive do próprio trigo. Assim, MARSHALL & NEUBERGER (1970), baseados em um trabalho de KUNDIG e NEUKOM (1963), assinalam (pg. 415): "Other glycoproteins are known in which at least some of the carbohydrate moieties are much larger. Macromolecules of the type found in wheat flour, in which it is reported that both an arabinoxylan and an arabinogalactan are linked to a polypeptide chain, are in this group, ..."

Outra glicoproteína foi isolada das sementes do *Phaseolus vulgaris* por PUSZTAI (1966). Na "Discussion" do trabalho em que relata a extração de duas proteínas das mencionadas sementes, afirma: "The two proteins showed great contrasts in their chemical composition. The first and larger protein component, in accordance with previous results (PUSZTAI, 1965a 1966), was a glycoprotein and was designated as glycoprotein I (PUSZTAI, 1966)".

As reservas lipídicas impregnam, como habitualmente, o citoplasma situado entre os grãos protéicos, sob a forma de gotículas que com frequência coalescem em gotas maiores e estas, sobretudo no meristema fundamental

do córtex e da medula do hipocôtilo, podem reunir-se em camada quase contínua na porção externa do citoplasma, sob o plasmalema (Fig. 24). É praticamente a mesma localização de que nos falam REST e VAUGHAN, 1972 (pg. 246) a proposito da semente de *Sinapis alba* L. "The oil in matured *Sinapis alba* seeds is located at the periphery of the cell and also fills the spaces between the protein grains".

Uma consequência prática dessa localização é que as células que continham lipídios, quando fixadas em misturas comuns, sem tetróxido de ósmio, aparecem nas preparações de cortes em parafina, cuja técnica prevê o emprego de solventes dos lipídios, com aspectos de acentuada plasmólise, que poderíamos chamar de "pseudoplasmólise assimétrica" porque o afastamento entre o protoplasto e a parede é maior em certas faces, onde se alojavam os lipídios (ver especialmente as figs. 26, 28 e 31). Tais reservas parecem abundantes nas células provasculares (procâmbio) onde escasseiam os grãos proteicos, em gotículas disseminadas pelo citoplasma. Nos laticíferos encontram-se comumente substâncias coráveis como os lipídios e com solubilidade analoga a destes compostos. É provável, porém, que se trate de outras substâncias ligadas a seu metabolismo especial uma vez que, como já se disse, as reservas são solubilizadas, de hábito, no início da diferenciação.

As reservas lipídicas parecem rapidamente mobiliza

das, sendo muito difícil caracterizá-las durante a germinação. É possível que haja alguma relação entre a localização periférica dos lipídios e a formação de certos ramos finos de laticíferos, igualmente periféricos, que aparecem na germinação.

3.

Os embriões maduros e secos, em estado de vida latente, se reconhecem, nos cortes, pela presença dos grãos protéicos, íntegros, facilmente coráveis e pela ausência de grãos de amilo, exceto na coifa da radícula. Um corte longitudinal mediano, levemente oblíquo (fig. 25) mostra, à direita do observador, o tubo laticífero cotiledonar, largo e um vaso lenhoso em diferenciação; à esquerda, na base do cotilédone oposto, do tubo cotiledonar parte um ramo oblíquo, em direção ao promeristema, visivelmente formado pela fusão de células; adjacente ao mesmo tubo, vê-se uma célula laticífera trapezoidal oriunda, ao que parece, de divisão de célula do meristema fundamental. Outro corte longitudinal paramediano permite observar o início da formação dos ramos corticais, aproximadamente horizontais, assinalados na fig. 27; sua origem está visivelmente ligada à divisão de células vizinhas, pertencentes ao meristema fundamental. Em certos cortes paramedianos, os aspectos morfológicos são ainda mais convincentes a favor da origem sincicial dos

laticíferos e de seus ramos: assim, por exemplo, na fig. 26, onde um dos ramos que mudou de direção ocupa a cavidade de uma célula, semelhante às vizinhas pela forma e ordem de grandeza (A); também assinalados (B) dois protoplastos que participam da constituição do mesmo ramo.

As próprias anastomoses e fusões de protoplastos laticíferos vizinhos, negadas por alguns anatomistas, podem ser visualizadas já no embrião maduro, antes da germinação. É o que nos mostra a fig. 28, de um corte longitudinal da base de um cotilédone, onde um grupo de tubos apresenta, em diversos trechos, redissolução das paredes separadoras.

Dentre os embriões examinados, um havia em cuja região tangencial do procâmbio encontramos um tubo de trajeto curioso em sua porção subapical. A fig. 29, de um corte longitudinal paramediano, oblíquo, mostra-nos parte do cilindro procambial: aí se destacam, pela forte coloração do conteúdo, laticíferos e células do liber. Entre os primeiros distinguem-se o ramo cotiledonar (1) largo, à direita e alguns ramos subapicais que terminam na base do promeristema apical, vistos com maior nitidez na fig. 30. Justamente um desses ramos, formado pela fusão de protoplastos semelhantes aos da base do promeristema, pelo que se depreende da própria figura, apresenta trajeto de tal forma caprichoso, enovelado que nos parece muito mais consentâneo interpre-

tã-lo como consequência da simples progressão de um estímulo histogenético do que como o resultado do desenvolvimento de uma determinada inicial ou de um de seus ramos.

Pelo que temos visto, já no embrião em vida latente, são perceptíveis os sinais da origem sincicial dos laticíferos; isto significa que os processos formadores dos tubos e de seus ramos, que ocorrem durante o desenvolvimento do embrião, são interrompidos ao término deste desenvolvimento, na fase em que se encontrarem. Raramente essa interrupção acontece na fase inicial, como é o caso do ramo cortical, horizontal mostrado na fig. 31: aqui ainda são visíveis alguns dos grãos proteicos, bem como quase todas as paredes separadoras do protoplastos que se vão fundir, para formar o ramo do tubo. Mais comumente, são observadas fases ulteriores.

Além dos processos usuais de preparação de lâminas permanentes, outros podem ser empregados na observação das fases de formação de laticíferos. Um dos mais simples consiste na coloração dos cortes desparafinizados pela solução 1/1000 de azul de toluidina; após lavagem, são as preparações examinadas em água. O conteúdo dos laticíferos, inclusive dos protoplastos recentemente incorporados, adquire cor verde, bem contrastada porque os grãos proteicos não se coram. A fig. 32 foi obtida de um desses cortes, com filtro laranja escuro e nela se percebem os protoplastos fundidos do ramo cortical. Re

dos H-7

sultados igualmente interessantes colhemos com o tratamento do corte pela solução alcoólica de benzidina, segundo HADLER e colaboradores (1970) para demonstrar a presença do íon PO_4 . Tornaram-se, assim, plenamente visíveis os protoplastos provenientes das células do meristema fundamental, que se fundiram longitudinalmente para constituir um ramo laticífero (fig. 33; protoplastos assinalados).

4.

O início da germinação se denuncia nos cortes pela dissolução dos grãos protéicos; ora estes se apresentam integros em certas regiões, vizinhas de outras em que faltam completamente (figs. 34 e 35), ora eles aparecem em processo de desintegração (Fig. 36). A formação dos laticíferos, que havia sido suspensa nas diversas fases em que se encontrava, retoma sua marcha e assim se repetem os mesmos aspectos que já havíamos surpreendido nos embriões em vida latente. Na fig. 34, por exemplo, vê-se um tubo cortical, vertical, oriundo da fusão de protoplastos provenientes da divisão de células da fileira vizinha, à direita do observador; note-se que ainda há vestígios dos grãos nos aludidos protoplastos. A partir da germinação, começam a surgir ramos laticíferos mais estreitos e, muitas vezes, de trajeto sinuoso

ou irregular. Este é o caso representado na Fig. 35, onde se vê um trecho de laticífero da base de um cotilédone, cuja natureza sincítica parece evidente. A divisão desigual em plano tangencial oblíquo separou de cada célula do meristema fundamental, uma calota de protoplasto: a fusão longitudinal dessas calotas, cuja filiação ainda é possível determinar, deu origem ao ramo.

Outro fato que se torna mais frequente depois da germinação é o aparecimento de ramos corticais horizontais, de que já vimos um aspecto na fig. 27: estes, quando já esboçados, retomam seu desenvolvimento. Novos ramos encetam sua formação: na fig. 36 assiste-se ao início do processo com a divisão de uma célula assinalada do meristema fundamental do córtex, em corte longitudinal do hipocótilo. O mesmo fato pode ser observado também nos cortes transversais, como o da Fig. 40. Uma célula do meristema fundamental assinalada sofre uma divisão desigual para a formação de um ramo cortical horizontal.

Essa formação de ramos horizontais parece resultar, em muitos casos, de ação indutora direta do sincício laticífero sobre uma célula do meristema fundamental. As imagens características dessa ação aparecem com frequência nos cortes transversais do hipocótilo, no início da germinação. Assim na fig. 37, está assinalado um laticífero que envia uma projeção lateral fina, pe

netrando em forma de cunha na porção periférica do citoplasma de uma célula vizinha, externa, do meristema fundamental do córtex. No citoplasma já se percebe uma modificação que provavelmente determinará a divisão desigual. Esta fase já foi atingida na Fig. 38 onde também se nota projeção do laticífero (L) que provocou a divisão desigual da célula, preparatória à formação de um ramo.

Esses ramos corticais, oblíquos ou transversais, tornam-se, pois, bastante frequentes. No corte da Fig. 39 de um curto trecho do hopocótilo, vêem-se tres tubos que enviam desses ramos para o córtex, assinalados com 3. Muito menos frequente é o caso, visível na mesma fig. 39, de um tubo (assinalado com 1) que envia um ramo interno, em direção ao procâmbio. Algumas vèzes a indução laticífera atravessa este meristema, dando origem a um ramo transestelar.

O número básico de tubos perivasculares, mais comumente de 27 a 29 no terço médio do hipocótilo, aumenta frequentemente de algumas unidades, na parte superior: já é de 30 na fig. 40, atrás citada. Nas proximidades do plano nodal, onde é máxima a indução laticífera, pode atingir 32 ou 33. A importância do plano nodal foi ressaltada por MAHLBERG (1960), pg. 128): "Ontogenetically, in *Nerium* it represents a region of considerable interest since it is in this region that differentiation of the internal primary meristems - ground

meristems and procambium tissues - are first discernible within the embryo". Ai são muito frequentes os ramos oblíquos, tipicamente celulares, como os assinalados na fig. 41 com a letra S. Esses tubos oblíquos, em circunstâncias felizes, são também visíveis nos cortes longitudinais e demonstram, à evidência, sua natureza sincicial (Fig. 42); note-se que embora os protoplastos apareçam com frequência mais estreitos, retraídos, as cavidades dos respectivos tubos apresentam a mesma largura dos elementos vizinhos, subapicais.

É também nesta primeira fase da germinação que se desenvolve rapidamente a radícula. Os ramos laticíferos do hypocótilo que se dirigem para a radícula ficam distantes do ápice deste órgão, quando ele vai iniciar seu desenvolvimento e assim permanecem durante o crescimento. Na fig. 51, de um corte longitudinal de embrião no início da germinação, a extremidade de laticífero mais próxima do ápice radicular distava cerca de 400 μ . Dita extremidade se apresentava rombuda e dificilmente se poderia admitir seu crescimento intrusivo.

5.

As fases subsequentes do crescimento da plântula germinal se reconhecem, nos cortes, pelo desaparecimento completo dos grãos protéicos das células do meristema fundamental, cujos protoplastos se apresentam fina-

mente granuloso; os grãos de amido são abundantes, mas ainda permanecem muito pequenos. Quanto aos laticíferos, repetem-se os mesmos fatos principais já referidos: formação de novos ramos e desenvolvimento de outros anteriormente iniciados, com as características que apoiam a teoria sincicial. Assim, na fig. 43, assiste-se à formação de ramo oblíquo, irregular que lembra outro já observado na fig. 35, com a diferença que aqui ele é subapical; tal como aquele, parece constituído de protoplastos oriundos da divisão desigual de células vizinhas, do parênquima fundamental, que ainda não se fusionaram completamente, pois ainda exibem vestígios das paredes separadoras.

Dada a grande frequência, nesta fase, dos ramos oblíquos ou horizontais, formados pelo processo já referido - fusão de protoplastos provenientes de divisão desigual de células do meristema - foi possível surpreender, em cortes longitudinais tangenciais, imagens inequívocas dessas divisões. Este é o caso da fig. 44, onde estão assinaladas com o algarismo 2 as células com divisão desigual. É claro que se não podem ver os sincícios indutores dessas divisões por se acharem em plano diferente. Uma dessas divisões aparece com a máxima nitidez na fig. 45, de um corte longitudinal de cotilédone.

Os ramos "transestelares" de que já tratamos na Revisão Bibliográfica, são os mais interessantes para a

tese sincicial, uma vez que sua formação implica em divisão transversal prévia das células provasculares (Ver fig. 15). Linhas atrás mostramos, em corte transversal, um ramo que chamamos de "cortical interno" (Fig. 39), sugerindo que o mesmo poderia induzir a diferenciação laticífera através do procâmbio, dando origem a um desses ramos. O aspecto colhido na Fig. 46, de um corte longitudinal do embrião germinado, reproduz a maior parte do trajeto de um desses ramos. Percebe-se que o ramo está situado entre as extremidades das células procambiais, que sofreram divisão transversal, e não entre ditas células afastadas lateralmente. A extremidade interna deste ramo, dirigida para cima, parece já ter provocado a divisão transversal de outras células do procâmbio: os elementos curtos resultantes ainda se reconhecem acima e em contato com a mencionada extremidade, infelizmente não muito nítida no plano da fig.. Aspectos como este fazem prever a existência de ramos transestelares no caule de *Nerium oleander*. Realmente MAHLBERG (1963) afirma (pg. 229): "Occasionally laticifers do traverse procambial tissues, although many of the growing tips terminate as blunt, short branches in the procambium (fig. 13)". Todavia, a fig. em causa mostra, tão somente, a secção de um tubo perivascular e um ramo cortical, horizontal, oriundo do mesmo tubo. Entretanto a Fig. 8 da página 227, exhibe realmente um trecho de ramo transestelar em plântula. Desejando es-

clarecer o assunto, realizamos vários cortes longitudinais no meristema do caule jovem, obtendo a confirmação da presença desses ramos e de seu processo formador. As figs. 47 e 48 de dois cortes em série, adjacentes, mostram um ramo transestelar em formação cujas duas porções não se encontravam em um mesmo plano exatamente paralelo ao do corte, mas levemente oblíquo a este: observam-se elementos ainda independentes, em parte, cuja fusão irá dar origem ao tubo.

É aproximadamente nesta fase do desenvolvimento da plântula, após o desaparecimento dos grãos protêicos, que os laticíferos em material fixado pela mistura de Lewitsky apresentam conteúdo muito denso, corável energeticamente por hematoxilina-safranina, em vermelho arroxeado. A mistura aludida, muito favorável à fixação de fosfolípidos por permitir, sem perdas apreciáveis, a inclusão em parafina (JENSEN, 1962, pg. 252) e a coloração mencionada que tingem em roxo escuro as paredes pecto-celulósicas, constituem um processo cuja principal vantagem, no caso dos laticíferos, é o contraste da coloração que permite facilmente caracterizá-los nesta etapa do desenvolvimento. No corte transversal da fig. 50, por exemplo, reconhecem-se prontamente treze laticíferos perivasculares, dois dos quais emitem ramos corticais curtos, horizontais além de três ramos corticais, verticais. Parte do trajeto de um ramo cortical, horizontal é visto na Fig. 49, em corte longitudinal: aqui

é particularmente evidente a natureza sincicial do ramo.

6.

Nos estádios seguintes do desenvolvimento da plântula, que se podem caracterizar, nos cortes, pelo tamanho maior dos grãos de amilo e dos respectivos plastos, ocorrem ainda os mesmos fatos principais na formação dos tubos de látex. Assiste-se, assim, ao crescimento de um ramo horizontal, à custa dos protoplastos vizinhos ou de parte dos mesmos, no corte da Fig. 52; note-se que dois desses protoplastos ainda não estão separados, por paredes, das células de origem. Repara-se que a extremidade do ramo já parece exercer ação indutora sobre a célula do meristema fundamental que lhe é oposta, tendo sido reabsorvida parte da parede de contacto. Fato curioso, por pouco frequente, é apresentado na Fig. 53: dois laticíferos perivasculares vizinhos, assinalados com F, emitem um ramo só, porque seus protoplastos se fundem. A fusão dos laticíferos contínuos, negada por alguns Autores ortodoxos por motivos meramente teóricos, já foi mostrada, neste estudo, na fig. 28.

O simples aumento da circunferência do hipocótilo, pelo crescimento da plântula, parece capaz de determinar o aumento do número dos tubos perivasculares, como se existisse determinada relação entre a área da região pe-

rivascular no corte transversal e a diferenciação dos tubos. Já são conhecidos fatos análogos na morfogênese vegetal: a diferenciação dos estomatos em certas espécies, ou de células secretoras, em outras, parece depender de relação desse tipo. É o que nos sugerem os aspectos como o da Fig. 54. Entre dois laticíferos assinalados com (5) havia espaço relativamente grande; mais ou menos ao meio desse espaço, uma célula assinalada com N está se diferenciando em novo laticífero: sua turgescência está nitidamente diminuída e em seu citoplasma já quase não há grãos de amilo. Fenômeno semelhante pode ser apreciado no corte longitudinal tangencial da Fig. 55: aqui as células que se transformam em novos laticíferos se reconhecem pelos escassos grãos de amilo que ainda não foram solubilizados (assinaladas com I); no tubo à direita do observador, assinalado com M, um tubo com numerosos núcleos provenientes de mitoses recentes.

7.

Com embriões em várias fases de sua transformação em plântulas, pode-se usar outro processo muito útil para o estudo da histogênese dos laticíferos contínuos: a maceração química. Empregando-se o líquido de Jeffrey, a coloração do material lavado e dissociado, com um corante diluído, permite, nos casos felizes, a observação

em água, de vários aspectos importantes para a interpretação do processo que dá origem aos tubos contínuos. A Fig. 56, por exemplo, mostra claramente que todos os ramos, dos maiores aos menores, são protoplastos acrescentados ou ajuntados ao sincício, e não verdadeiras ramificações no sentido dos que adotam a teoria clássica. É evidente, nos pontos de ligação dos ramos assinalados com I, a descontinuidade existente entre eles e o sincício. Além disso, alguns desses ramos (assinalados com +) ainda mantem relações íntimas com as células que lhes deram origem. Este fato de suma importância para a teoria sincicial, pode ser observado em casos diversos, com absoluta clareza. Na fig. 57, percebe-se que a extremidade do laticífero é proveniente da divisão de uma célula do meristema fundamental, não obstante pequeno deslocamento sofrido durante a dissociação; outros dois protoplastos oriundos de divisão da mesma célula estão assinalados; vestígios de dois protoplastos, (assinalados) permanecem unidos ao sincício. Ainda mais nítido é o caso da Fig. 58, onde a extremidade do ramo provem de parte de uma célula do meristema a qual permanece unida. Por fim, o dispositivo de contraste de fase, deu ensejo a que se destrinçassem as íntimas relações de origem da extremidade de um ramo com duas células vizinhas, do meristema fundamental, na Fig. 59. Se examinarmos essas tres últimas figuras em ordem inversa, verificaremos que representam tres fases sucessi

vas da formação dos ramos. Na primeira (Fig. 59), porção do protoplasto das duas células vizinhas do meristema fundamental já sofreu diferenciação laticífera, estando ambas, uma de cada protoplasto, fusionadas entre si e com o sincício laticífero, mas ainda não separadas completamente por paredes das duas células que lhes deram origem (Comparar com as Figs. 33, 40, 49 e 52 obtidas de cortes), na fase seguinte (Fig. 58) já existe parede separadora distinta, mas o protoplasto da extremidade do ramo ainda está firmemente ligado à célula de origem, dentro de cujo contorno se enquadra perfeitamente (comparar com as Figs. 25, 27, 31 e 45 obtidas de cortes); afinal, na última etapa (Fig. 57) a extremidade do ramo, após crescimento, parece independente das células de origem do meristema fundamental, embora algumas circunstâncias ainda denunciem o parentesco (Comparar com as figs. 35, 43, 50 e 55 obtidas de cortes).

8.

Vários dias após o início da germinação, os cotilédones e sobretudo o hipocótilo, sofrem marcado alongamento, sem que o meristema apical tenha entrado em atividade: são as próprias células dos meristemas primários que crescem em comprimento e se dividem ativamente. Em um caso que acompanhamos atentamente, 30 dias depois da sementeira (25 dias após os primeiros sinais de germi

nação) os cotilédones tinham atingido 22 milímetros e o hipocótilo chegara a 38 milímetros (isto é 13 vezes seu comprimento inicial). Nesse período, as preparações apresentam aspecto característico devido às sucessivas divisões que ocorrem com grande rapidez. É claro que durante esse alongamento acentuado os laticíferos também se alongam mediante crescimento simplástico. Essas preparações são muito ricas em tubos estreitos que sugerem crescimento intrusivo apical. É fácil compreender-se que os ramos curtos, já existentes antes deste período, entre umas poucas células do meristema fundamental, algumas das quais visivelmente responsáveis por sua origem, passem agora a coexistir com um número muito maior de elementos, oriundos da divisão das mesmas células, com os quais já não apresentam quaisquer relações visíveis de parentesco, muito mais longos por simples crescimento simplástico. Ao mesmo tempo, suas paredes tornam-se frequentemente mais espessas e distintas. Assim na Fig. 60, de material que sofreu dito alongamento, estão assinalados tres ramos finos deste tipo.

Entretanto, outros ramos podem crescer de modo diferente, ativo, durante o citado período ou podem formar-se de novo. A Fig. 61 mostra um ramo curto, de trajeto recorrente, assinalado; se prestarmos atenção à sua extremidade, veremos que na continuação da mesma já estão, nas tres células em sequência do meriste-

ma fundamental, demarcados os territórios que provavelmente serão incorporados ao dito ramo, promovendo seu crescimento ativo. Na Fig. 62 acharemos a explicação de como se podem formar novos ramos durante essa fase de multiplicação celular intensa e do motivo por que são, em geral, finos tais ramos. O tubo que atravessa verticalmente o campo já incorporou a célula muito estreita, resultante da divisão de uma célula do meristema, assinalada, já diferenciada como laticífero; na mesma direção dessa célula estreita e à esquerda (assinalada) outra célula estreita, de origem semelhante e ainda não diferenciada, proporcionará provavelmente o futuro crescimento deste ramo recém-formado.

9.

Com a entrada em atividade do meristema apical, começa a plântula a formar o epicótilo com as folhas primeiras. No corte longitudinal da Fig. 63 observam-se a "túnica" (de uma camada só de células) e o "corpus"; ambos constituem o promeristema apical que aí aparece no período de "área máxima" (SCHMIDT, 1924): duas novas folhas, a terceira e a quarta, ou melhor, os respectivos primórdios estão iniciando o desenvolvimento. Um laticífero é visível nitidamente no meristema da medula; sua extremidade se confronta, em outro plano, com uma célula assinalada. No corte da Fig. 64, feito em pla-

no diferente, vêm-se as extremidades de dois laticíferos: uma delas, mais grossa, assinalada com 1, fica distante do promeristema, a segunda (2) está situada no limite do promeristema com o meristema primário; ambas apresentam largura comparável à das células vizinhas.

Nas proximidades da gema axilar da fig. 65, cujo meristema ainda está em organização, há um tubo laticífero (T) que termina a certa distância do meristema: já se acha esboçado o ramo (R) que vai constituir sua continuação no meristema, quando este se desenvolver, mediante uma fileira de células mais estreitas e alongadas.

Também na base dos primórdios foliares que começam seu desenvolvimento há laticíferos em formação e crescimento ativo. No corte da Fig. 66 percebe-se um tubo que vindo da medula meristemática estende-se obliquamente para cima, através do primórdio, à direita do observador. Sua extremidade bem visível, assinalada, termina sob uma célula meristemática que provavelmente proverá seu crescimento. Note-se que seu protoplasto é estreito, parecendo retraído, mas que a largura do próprio tubo é comparável à das células meristemáticas mais jovens.

Concluimos, portanto, que aqui, como nos outros casos que já estudamos, as extremidades dos laticíferos não atingem profundamente o promeristema, mas chegam, no máximo, à zona do meristema primário, adjacen-

te ao promeristema, do qual recebem novas células para seu crescimento.

10.

Já na primeira porção formada do epicótilo surge a principal modificação estrutural relativamente ao hipocótilo: a presença do liber interno. Este é plenamente visível nos cortes transversais como o da Fig. 67; aí também está patente que os elementos condutores, na sua maioria, estão reunidos em dois grupos correspondentes aos dois primórdios foliares em crescimento. Um corte longitudinal, aproximadamente mediano, como o da Fig. 68, passando pelo n.º cotiledonar, permite-nos verificar que o liber interno aparece imediatamente abaixo deste n.º, e daí se dirigem seus elementos com os outros elementos vasculares (vasos lenhosos visíveis nos cortes executados em outro plano) para constituírem os dois cordões acima referidos, destinados aos primórdios foliares. /o

Corte longitudinal, perpendicular ao limbo de uma das primeiras folhas, ainda jovem, pode ser apreciado na Fig. 69: epidermes semelhantes, com células levemente mais altas, quase sempre na face adaxial; na face abaxial estão os estômatos, situados nas criptas incipientes que assumirão sua forma característica quando do pleno desenvolvimento da folha; sob a face adaxial

acha-se a paliçada, geralmente em camada dupla, enquanto o clorênquima esponjoso se compõe de 2 a 5 estratos; no trecho visível da nervura, cujos elementos se encontram em disposição normal, há células clorofiladas e longas, paralelas aos vasos lenhosos, entre estes e a paliçada; entre o liber e o parenquima esponjoso, observa-se um laticífero, pertencente àquele tecido.

Algum tempo após o início do desenvolvimento do epicôtilo, encontram-se, com frequência, no hipocôtilo, tubos de látex contendo numerosos núcleos e corpúsculos nucleares, cuja natureza foi comprovada pela reação de Feulgen e cujo aspecto sugere um processo degenerativo. A fig. 70 mostra dois destes acúmulos de núcleos e de corpúsculos nucleares; o tubo à direita do observador possuía a forma de Y invertido.

A radícula apresenta, na plântula, estrutura tetrarca ou pentarca; deste último tipo é a que aparece na Fig. 71, em corte transversal. O córtex espesso, amiláceo, compõe-se habitualmente de 9-11 estratos. Não está bem diferenciada a endoderme, situada imediatamente por fora dos laticíferos; somente algumas de suas células, vizinhas destes tubos, apresentam paredes anticlinais que pela coloração parecem possuir constituição heterogênea, sugerindo a faixa de Caspary. Os laticíferos, às vezes bastante largos (diâmetro $\pm 25 \mu$) dispõem-se em grupos, apenas pela face externa dos feixes de liber, faltando completamente nos lenhosos. No cor-

te aqui reproduzido em fotografia, havia 14 tubos alguns dos quais estão assinalados (6). A medula tem comumente 8 a 10 camadas de células no seu maior diâmetro; são elementos menores que os corticais e também contêm amilo.

As radículas não possuem medula e o córtex se reduz, em geral, a 4-6 camadas; sua estrutura é mais comumente triarca ou tetraarca. Em alguns trechos é mais nítida a endoderme, mas os laticíferos são muito mais difíceis de caracterizar.

11. Discussão

Embora tenhamos apenas examinado embriões maduros, podemos discutir certas questões referentes à formação e ao desenvolvimento dos laticíferos durante a embriogênese porque, como salientamos mais de uma vez, guardam os embriões sinais evidentes do processo histogenético dos laticíferos, interrompido nas diversas fases em que se encontrava, pelo estado de vida latente do embrião na semente madura, e retomado com a germinação. Por esse motivo, atendo-nos aos aspectos observados nos cortes de embriões maduros, já podemos contestar, por exemplo, a assertiva de MAHLBERG (1961) da página 97 "There was no suggestion of cell fusion, nor of anastomoses between adjacent laticifers in *Nerium oleander*". Quanto à primeira parte, das fusões celulares, parecem-nos suficien-

temente claras as Figs. 26, 31, 41 e 62; no que tange às anastomoses, as Figs. 28 e 53 são as mais expressivas.

Outro período que merece reparos é o seguinte, na mesma página e pouco abaixo do anterior: "The very attenuated tips of intrusively growing branches in normal tissues of *Nerium oleander* maintain a conspicuous wall. Their small diameter, less than that of surrounding cells precludes the possibility that their development can be explained satisfactorily as the result of cellular fusion". Vejamos, em separado, cada uma de suas proposições. Antes de mais nada cumpre ressaltar, tendo em vista as Figs. 39, 41, 42, 51, 52, 64 e 66, que na maioria dos casos é impróprio falar-se de "very attenuated tips" com respeito às extremidades dos ramos de laticíferos de *Nerium oleander*. Se considerarmos os ramos em toda a sua extensão, poderemos verificar que as figs. 49, 52 e 62 (★) contrariam a primeira asserção, pois em certa extensão dos ramos aqui apresentados falta parede conspícua. Já mostramos que várias ramificações exibem, desde o início, a mesma largura que as células circundantes; basta rever as Figs. 25, 26, 39, 41 (S), 42, 64 e 66; quando são mais finas, é porque resultam de divisão recente, quase sempre desigual, dessas células tal como aparece com particular nitidez nas Figs. 27, 44, 45, 58 e 62, ou então porque sofreram alongamento simplástico

em tecidos que cresceram rapidamente (Fig. 60).

Em trabalho publicado dois anos depois por MAHLBERG (1963), que mais de perto se relaciona com o presente estudo, há de igual modo várias afirmações passíveis de comentários. Assim, ao fim da página 226, escreve: "The intrusive tips of laticifers can be detected within the meristematic region of the shoot...". Em apoio dessa assertiva, exhibe o Autor uma fotomicrografia (nº 11) onde está assinalada uma extremidade de laticífero larga e levemente concava que ele pretende seja bifurcada. Como vimos, também em nossas Figs. 63, 64 e 65, as extremidades dos tubos no meristema apical, de modo algum sugerem crescimento intrusivo. Acreditamos que na ânsia de mostrar uma extremidade de tubo que, pela conformação, sugerisse esse tipo de crescimento, foi levado MAHLBERG (1963) a começar imperdoável engano, como já ressaltamos, ao confundir um ramo cortical, horizontal de tubo perivascular, com um laticífero de direção centrípeta, e a seção do mencionado tubo com a extremidade intrusiva do dito laticífero. Eis a legenda do fotomicrografia nº 13 do corte transversal onde se verificou o engano: "Fig. 13, tip of laticifer cell in cortex 200 μ below shoot apex; it has penetrated centripetally in to procambium, x810. Intercellular pattern of intrusive growth is clear". Na fig. 50, de corte transversal do hipocótilo, onde aparecem dois curtos ramos horizontais, é fácil verificar que a seção dos tubos perivasculares que lhes deram ori

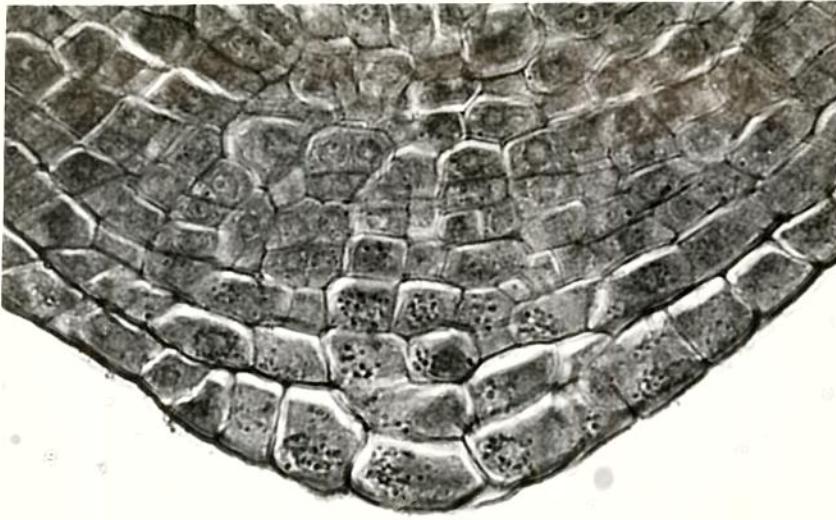
gem apresentam o contorno anguloso, sobretudo para o liber, que induziu MAHLBERG ao mencionado equívoco.

Na "Discussion" do mesmo trabalho, existem proposições que devem ser comentadas pelas incorreções que contém. À página 230, por exemplo, está escrito: "Of considerable interest is the recent work by MILANEZ (11-13) on species of *Euphorbia*. He described the tip of the laticifer as ending at the promeristem which contributed new cells to the laticifer. As interpreted by MILANEZ the laticifer in *Euphorbia* species is a multicellular structure in contrast to the structure reported here for the apocynaceous genus *Nerium*". Ora no primeiro trabalho citado (MILANEZ, 1952) que realmente trata do assunto, o Item 2 do Abstract diz o contrário do que está transcrito no princípio da citação (pag. 32): "Those tips never penetrate the mitotic zone - Hauptteilungszone of SCHAFFSTEIN: They end at the limit of the promeristem, where new cells from the latter become incorporated with them thus promoting the lengthwise growth of the tubes (Figs. 1-6; 13-15)". Aliás, poucas linhas acima, já havia reproduzido erroneamente a opinião de SCHAFFSTEIN, quando escreveu: "On the other hand, SCHAFFSTEIN (15), who studied their growth in the shoot apex stated that the tips were never found in the meristem proper but distal from it". Como se viu na I parte desta Tese, SCHAFFSTEIN (1932) expressou opinião exatamente oposta à acima citada; é su-

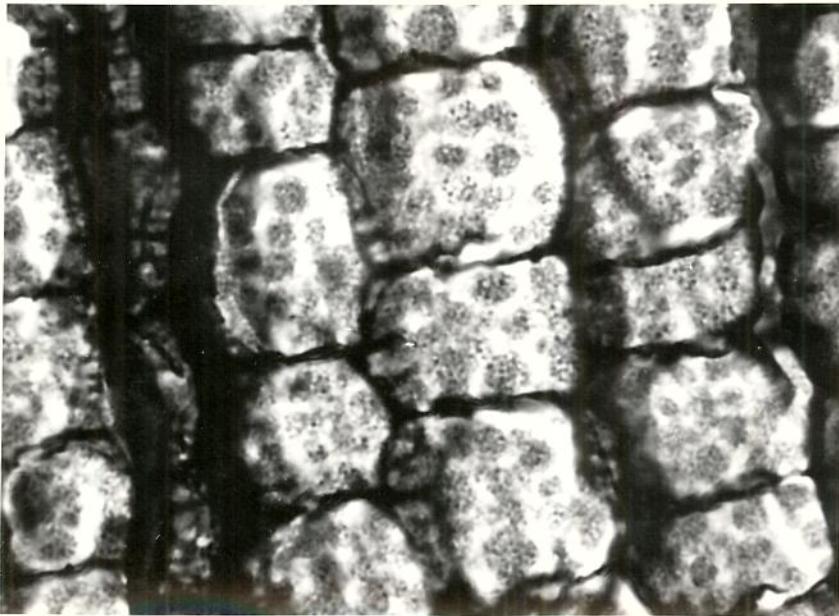
ficiente, a proposito, citar o período seguinte de seu trabalho (SCHAFFSTEIN, 1932): "Mit dem Wachstum des Vegetationskegels Schritt haltend sich ihre Spitzen stets innerhalb der Hauptteilungszone, was ein immer fortdauerndes Wachstum der Milchröhren ermögliche" (pg. 217).

16
/over

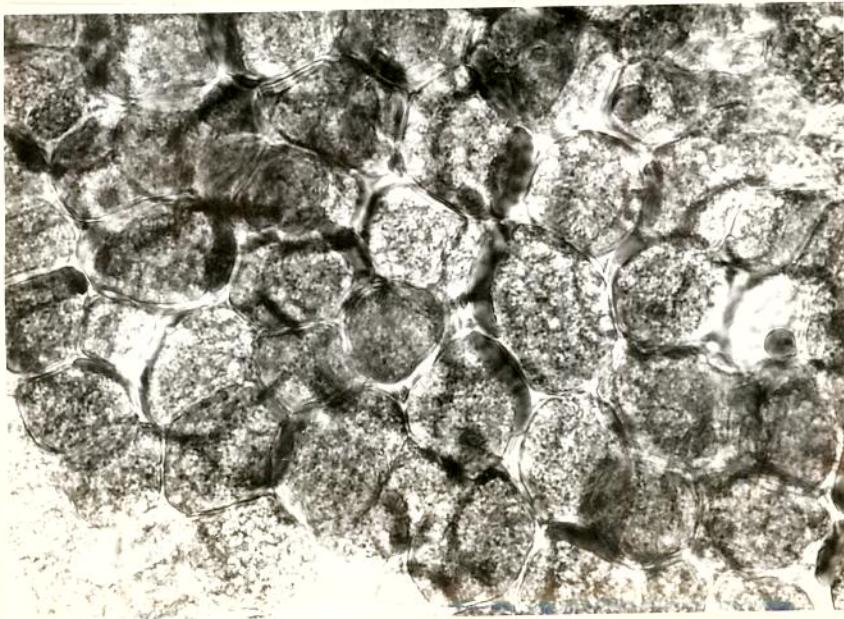
Quanto ao ponto de vista do próprio MAHLBERG sobre o assunto, afirma ele na mesma página que "there is no constancy in the position occupied by the laticifer tips", o que nos parece razoável. Mas acrescenta, logo a seguir: "Cortical branches often grow around or sometimes penetrate directly between cells of a procambial strand to subsequently occupy a position in the subjacent promeristem region..." Nas muitas observações que fizemos, nunca encontramos as extremidades dos laticíferos dentro do promeristema.



2 2

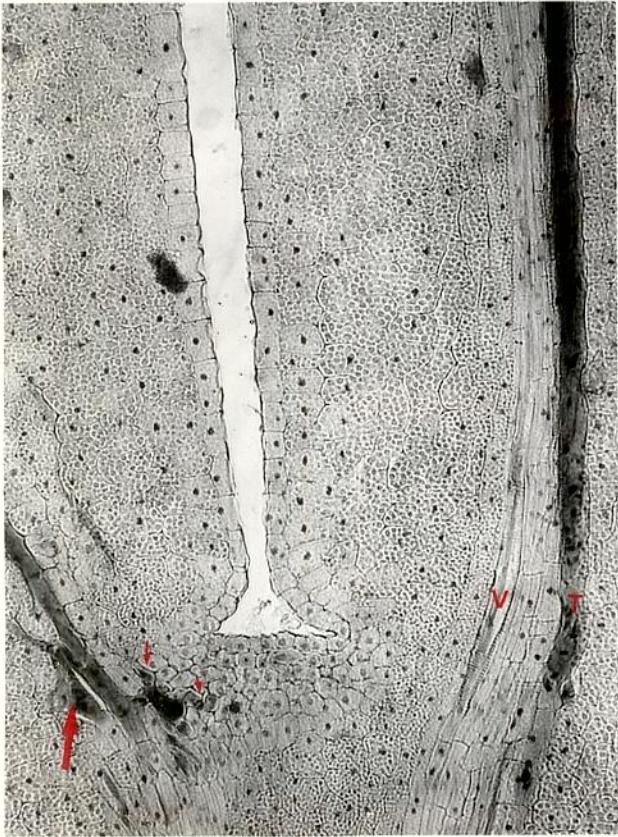


2 3

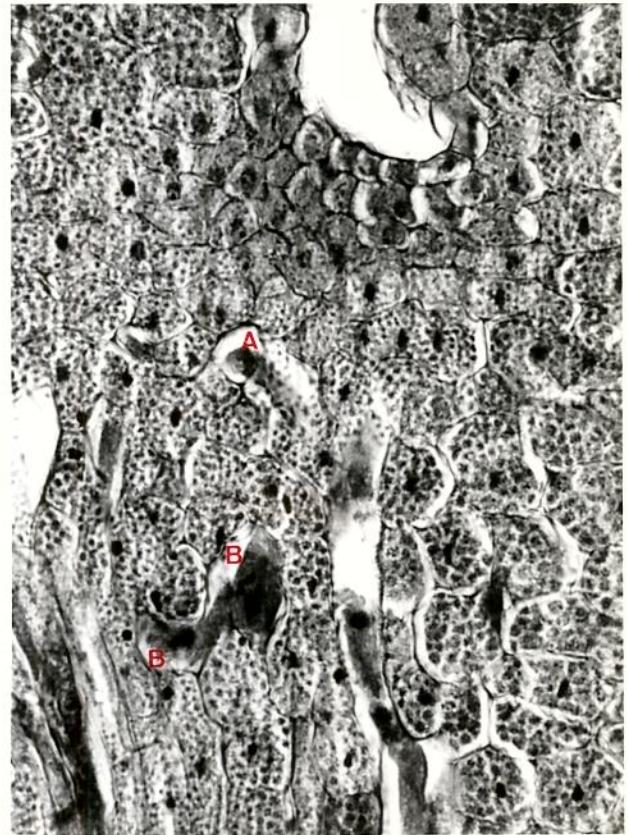


2 4

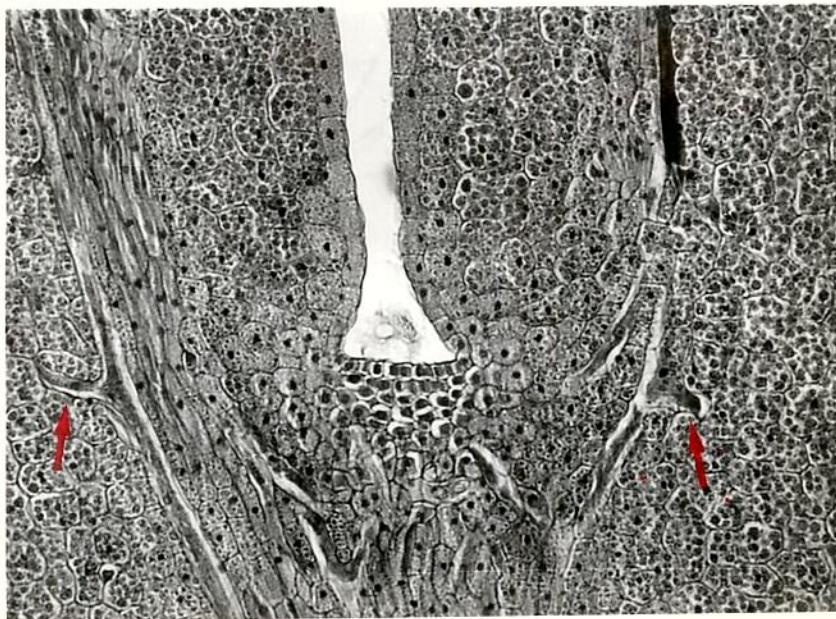
- Fig. 22. Corte longitudinal da extremidade inferior da radícula. Nas camadas de células da coifa, amiloplastos e grãos de amilo, únicos a existir no embrião seco, em vida latente. Na parte superior, algumas células do promeristema subapical. ca. 960 x.
- Fig. 23. Corte longitudinal do hipocótilo - Reação de P.A.S. para mostrar nos grãos proteicos a presença de componentes glicoproteicos. ca. 1500 x.
- Fig. 24. Corte transversal do hipocótilo, obtido com criostato, para mostrar a localização mais frequentes dos lipídios nas zonas superficiais do citoplasma, além das gotas situadas entre os grãos proteicos (Coloração pelo Sudan IV; filtro verde) ca. 750 x.



25



26



27

- Fig. 25. Corte longitudinal mediano, levemente obl \tilde{c} quo, de embri \tilde{a} o maduro, em vida latente, abrangendo plano pr \tilde{o} ximo do tangencial, no lado esquerdo. Neste lado os latic \tilde{i} feros atingem o meristema apical: algumas das c \tilde{e} lulas subapicais j \tilde{a} est \tilde{a} o incorporadas, assim como outras oriundas da divis \tilde{a} o das c \tilde{e} lulas do meristema fundamental (seta). No lado direito, onde \tilde{e} + mediano, o cotiledone mostra um vaso lenhoso em diferencia \tilde{c} o (V) e um latic \tilde{i} fero (T) tanto ou mais largo que as c \tilde{e} lulas vizinhas. ca. 200 x.
- Fig. 26. Corte para-mediano, obl \tilde{c} quo do embri \tilde{a} o, onde se veem diversas c \tilde{e} lulas como integrantes de latic \tilde{i} feros. ca. 750 x.
- Fig. 27. Corte longitudinal mediano do embri \tilde{a} o: os latic \tilde{i} feros peric \tilde{i} clicos e cotiledonares come \tilde{c} am a formar novos ramos \tilde{a} custa da divis \tilde{a} o de c \tilde{e} lulas do meristema fundamental (setas). ca. 350 x.



28



29

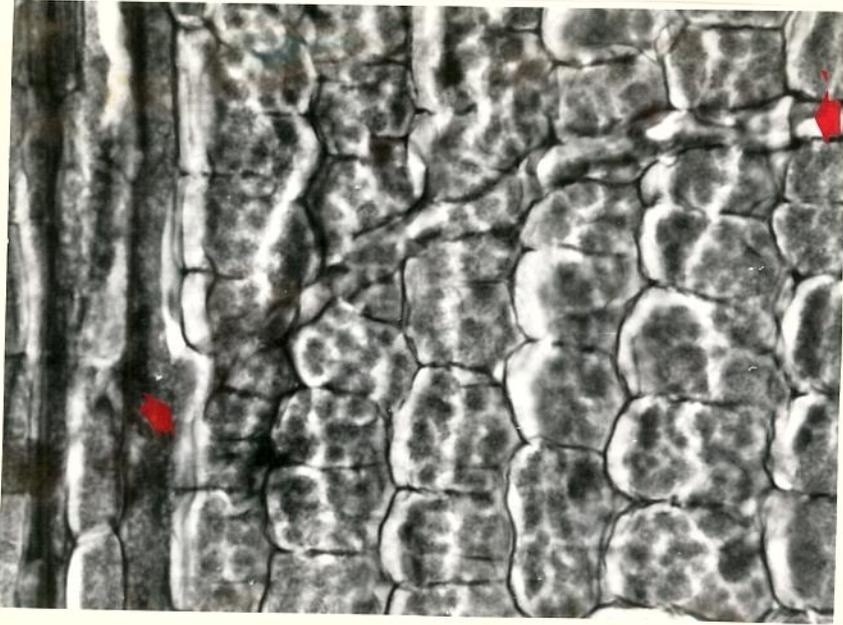


30

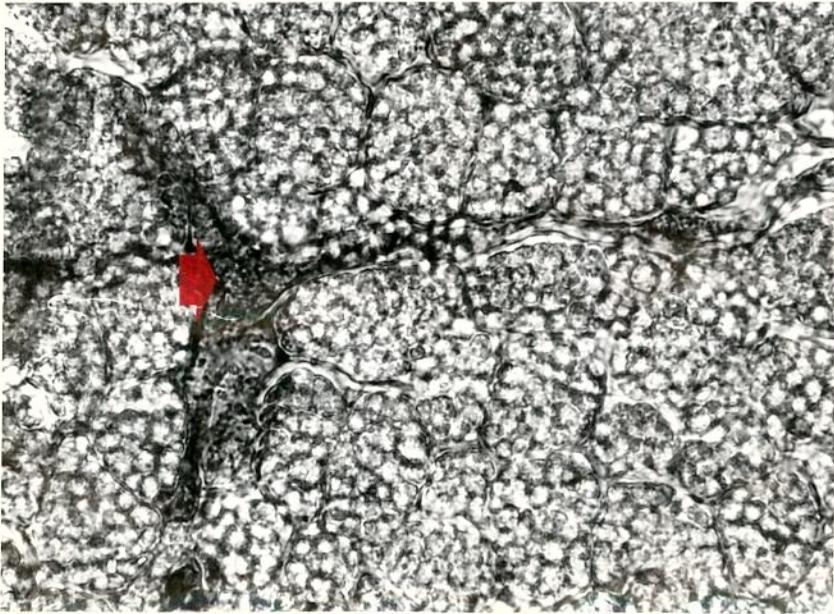
Fig. 28. Corte longitudinal de um cotilédone mostrando que já no embrião latente, laticíferos podem fundir-se em parte de seu trajeto. ca. 960 x.

Fig. 29. Corte longitudinal, paramediano, oblíquo, abrangendo parte dos tecidos provasculares do hipocótilo e do cotilédone à direita. Bem visíveis pela forte coloração do conteúdo, laticíferos e células liberianas: largo laticífero pericíclico do hipocótilo penetra no cotilédone; um dos laticíferos do hipocótilo apresenta trajeto enovelado, complexo (difícil de compreender-se em uma inicial) pela incorporação de células do meristema apical e de outras vizinhas do meristema fundamental. ca. 350 x.

Fig. 30. Ampliação da Fig. anterior, mostrando o trajeto complicado do laticífero sub-apical; no primeiro plano, segmento vazio de um laticífero. ca. 960 x.



31

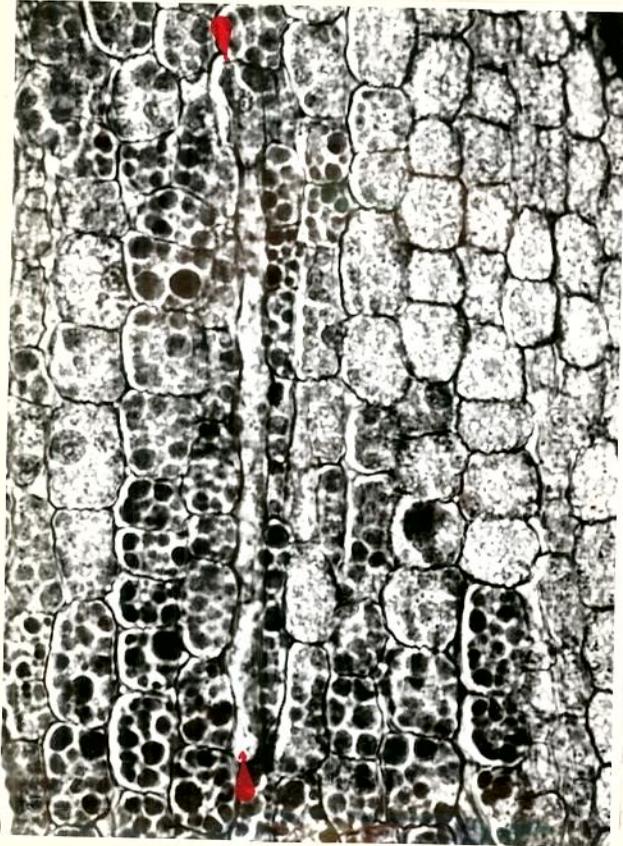


32



33

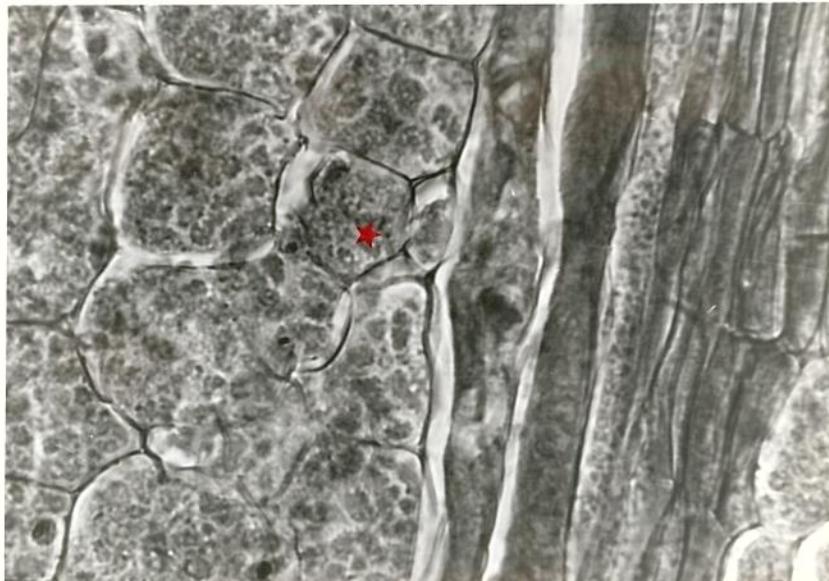
- Fig. 31. Corte longitudinal paramediano do hipocôtilo, mostrando um ramo laticífero cortical horizontal, visivelmente sincítico, cujos protoplastos fusionados, ainda com vestígios dos grãos proteicos, conservam parte das paredes separadoras primitivas. ca. 960 x.
- Fig. 32. Corte longitudinal tangencial da base de cotilédone - O conteúdo do laticífero pela coloração especial que adquire com azul de toluidina, torna visível a filiação dos elementos que o compõem. ca. 960 x.
- Fig. 33. Corte longitudinal do hipocôtilo - Tratamento para demonstração do ion PO_4 . Ramo cortical evidentemente constituído de elementos cuja filiação ainda é bem perceptível. ca. 960 x.



34

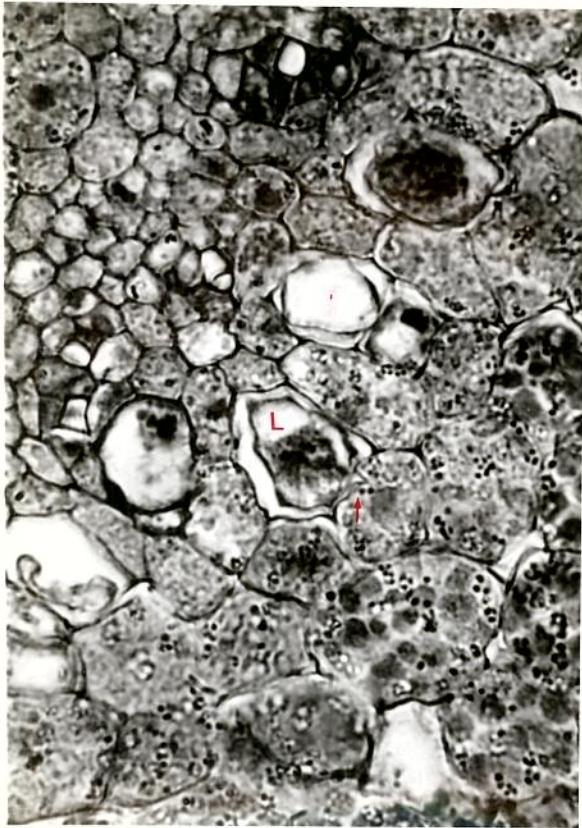


35



36

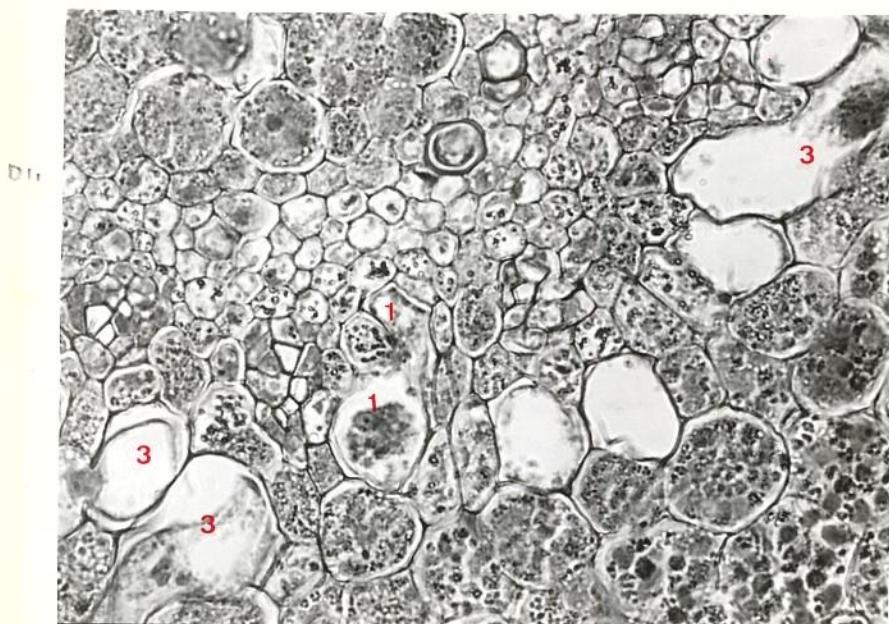
- Fig. 34. Corte longitudinal do hipocôtilo - formação de um ramo cortical longitudinal, por fusão de células oriundas da divisão das situadas na fileira que está ao lado. As reservas das citadas células estão quase inteiramente solubilizadas - ca. 750.
- Fig. 35. Corte longitudinal na base de cotilédone - Formação de ramo laticífero visivelmente "composto"; ainda perceptível, em parte, a filiação ao meristema fundamental. ca. 960 x.
- Fig. 36. Corte longitudinal na parte média do cotilédone - Início da formação de um ramo, com divisão de uma célula adjacente ao laticífero (assinalada). ca. 960 x.



37



38

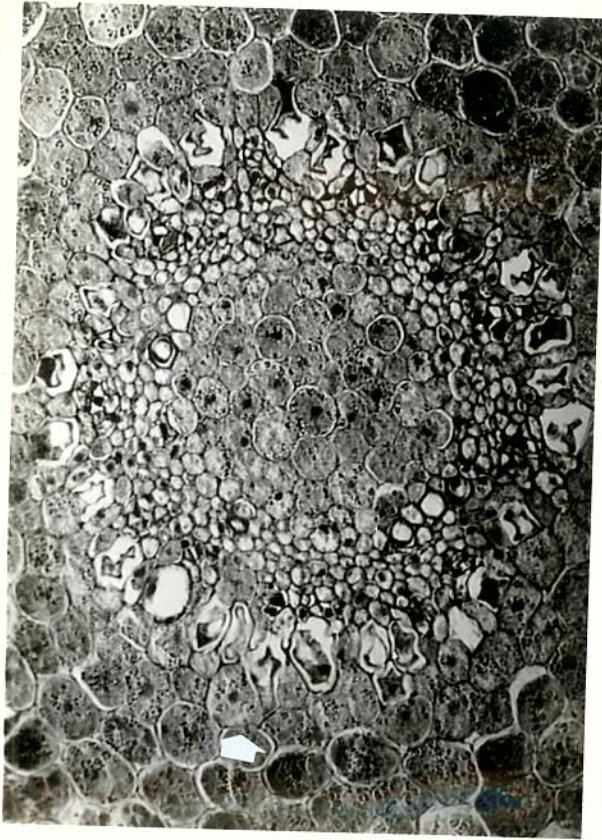


39

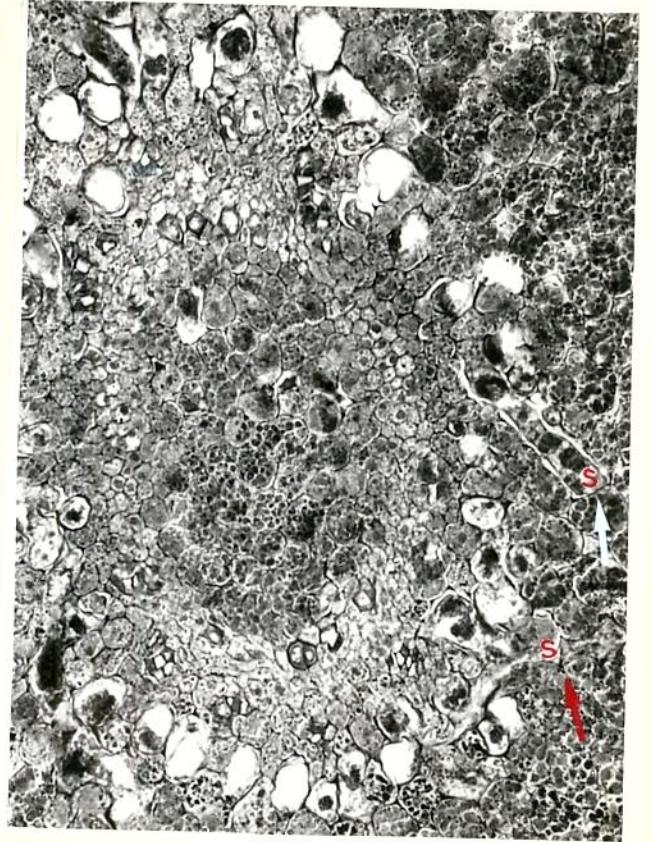
Fig. 37. Corte transversal do hipocôtilo, abrangendo cinco laticíferos perivasculares: o terceiro assinalado - L (no meio da fig.) parece exercer ação direta sobre o protoplasto cortical vizinho, previamente à diferenciação de um segmento laticífero, já delineado; o seguinte, pouco acima, deve ter induzido a mesma diferenciação à célula vizinha, externa, cujas reservas parecem ter sido solubilizadas. ca. 960 x.

Fig. 38. Corte transversal do hipocôtilo. Indução direta do laticífero assinalado L, ocasionando divisão da célula vizinha cortical. ca. 960 x.

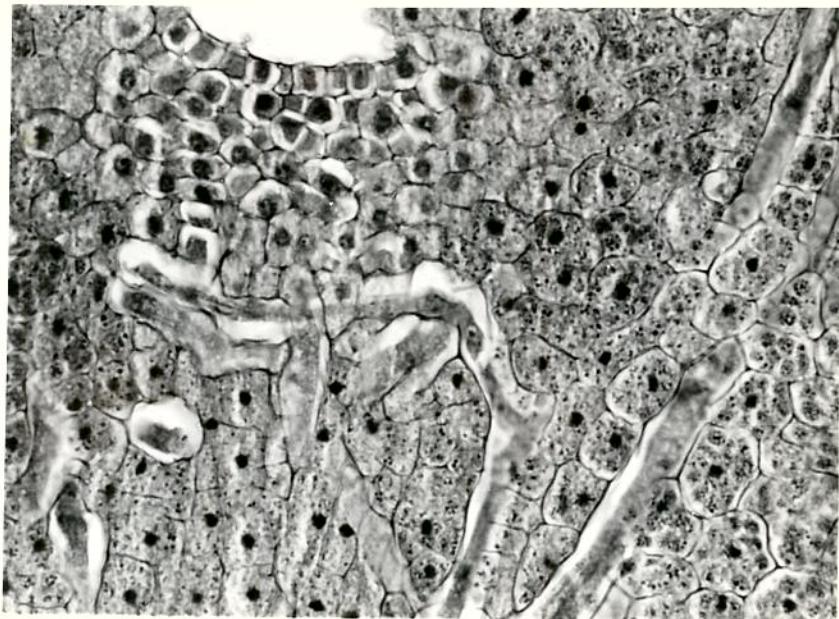
Fig. 39. Corte transversal do hipocôtilo. Além dos três ramos externos corticais (3), um ramo reconformado (1) se dirige para o procâmbio, onde possivelmente induzirá a formação de um ramo transestelar. ca. 750 x.



4 0

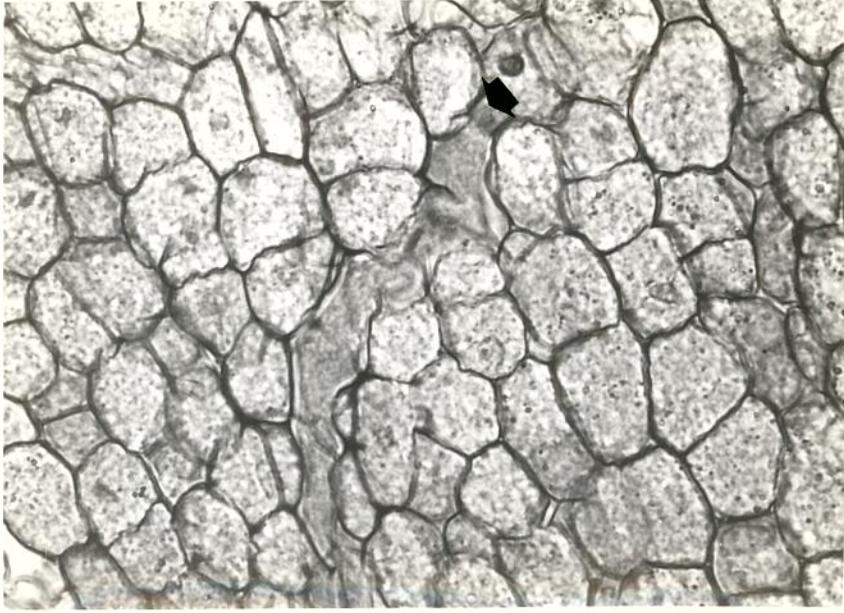


4 1

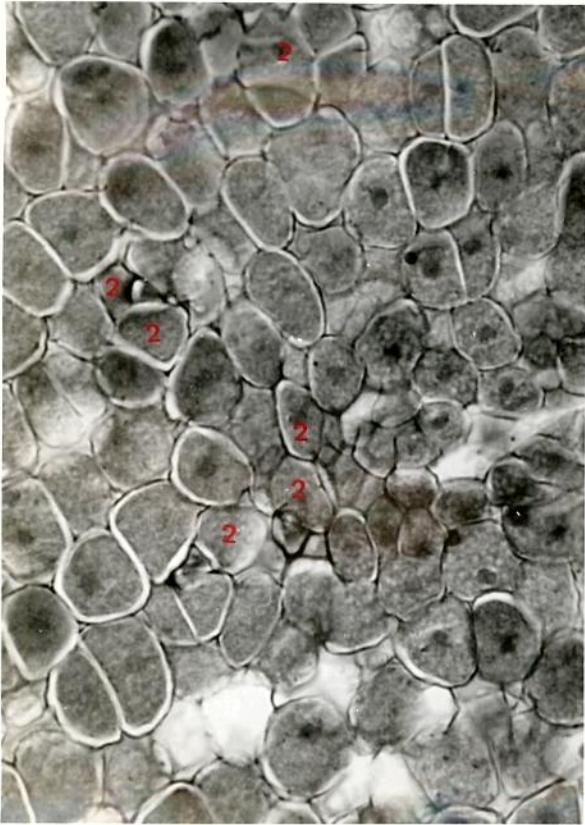


4 2

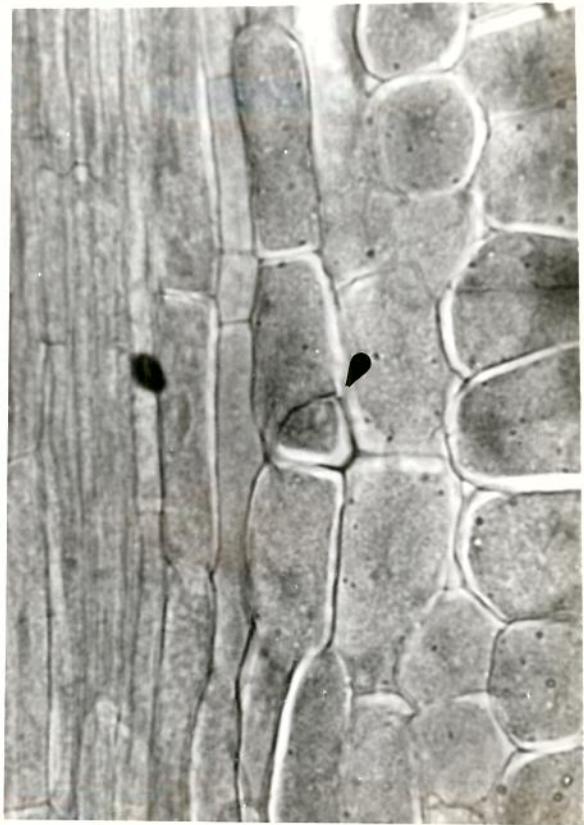
- Fig. 40. Corte transversal do terço superior do hipocôtilo, com 32 tubos perivasculares - Início da formação de um ramo, com parte de uma célula (seta) resultante de divisão desigual. ca. 350 x.
- Fig. 41. Corte transversal do hipocôtilo, logo abaixo do plexo nodal. Formação de vários ramos deste plexo, dois dos quais, plenamente visíveis (seta) formados pela fusão de células. ca. 350 x.
- Fig. 42. Corte longitudinal paramediano da parte superior do hipocôtilo, mostrando dois ramos horizontais subapicais: o superior é visivelmente formado pela fusão de protoplastos retraídos, mas cujas cavidades celulares, do tamanho das células vizinhas, ainda revelam vestígios das paredes separadoras. ca. 750 x.



4 3

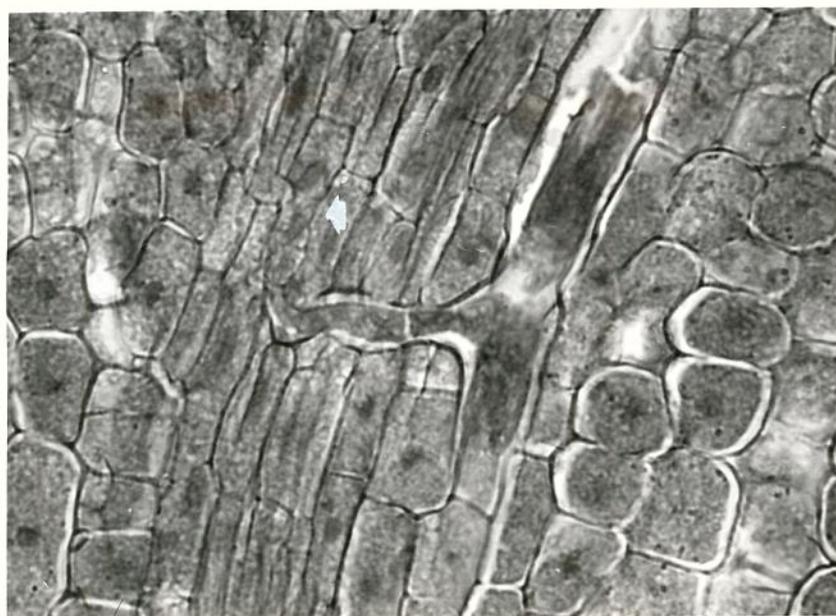


4 4



4 5

- Fig. 43. Corte longitudinal paramediano da parte superior do hipocôtilo: notar a largura e o trajeto do laticífero que parece composto de protoplastos fusionados, provenientes de divisões recentes. ca. 750 x.
- Fig. 44. Corte longitudinal, tangencial do hipocôtilo, próximo do plano nodal. Divisões desiguais de certas células do meristema fundamental explicam a formação de ramos laticíferos finos (assinaladas essas células). ca. 480 x.
- Fig. 45. Corte longitudinal de um cotilédone, mostrando divisão desigual de uma célula e origem de ramo de laticífero. ca. 1180 x.



46



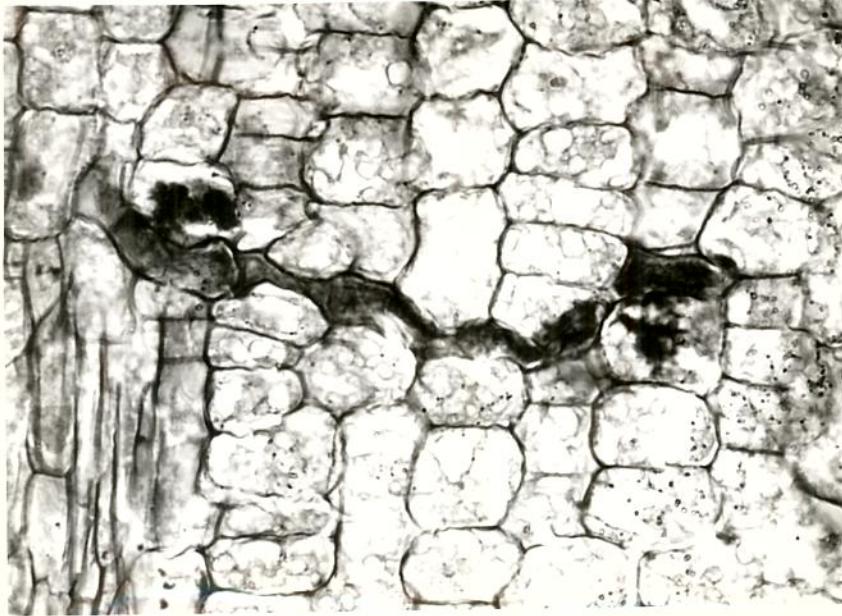
47
-



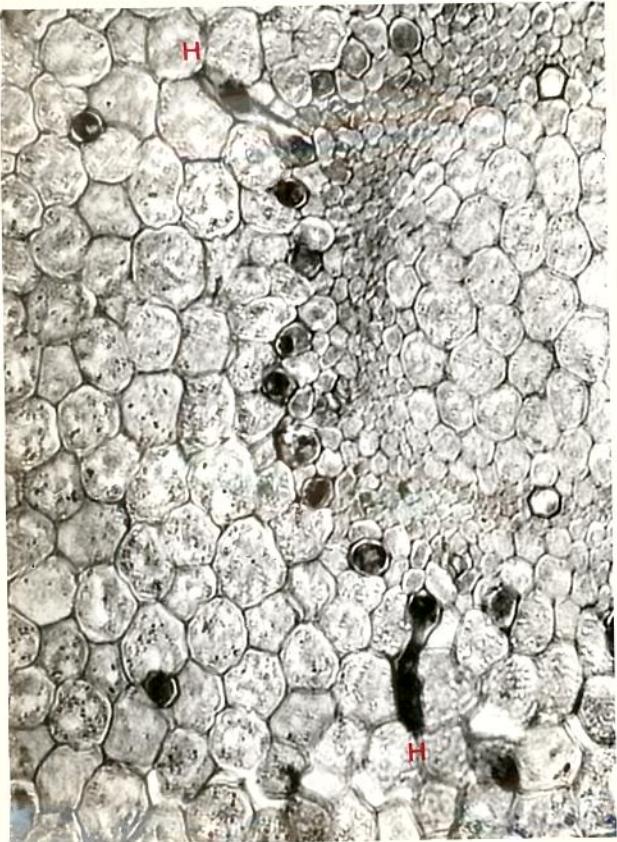
48

Fig. 46. Corte longitudinal mediano da parte superior do hipocôtilo, pouco abaixo do plano nodal. Formação de um ramo transestelar: ainda se notam divisões transversais nas células da porção interna do procâmbio ca. 960 x.

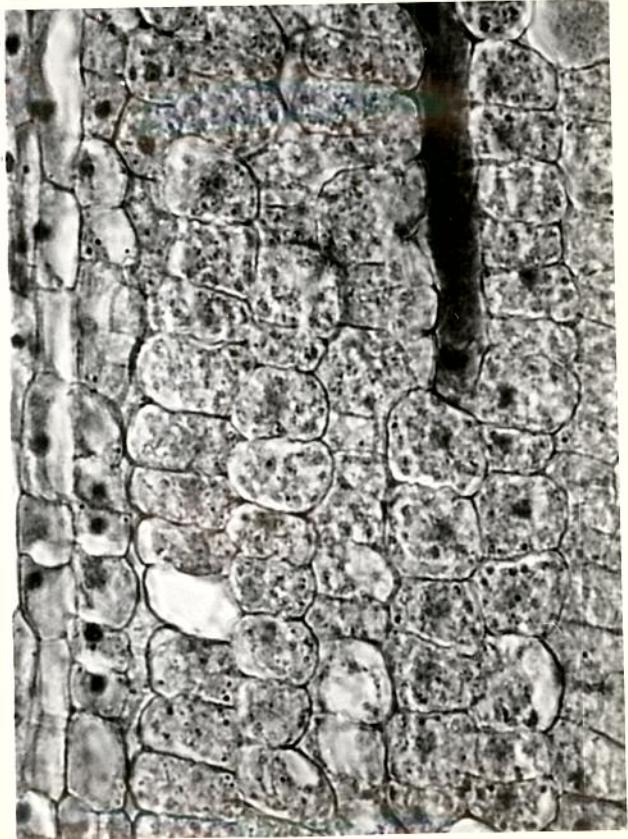
Figs. 47 e 48. Cortes longitudinais, adjacentes, do meristema primário do ápice caulinar, mostrando um laticífero transestelar em formação; por sua posição oblíqua ao plano de corte, suas porções aparecem em cortes adjacentes. ca. 750 x.



49

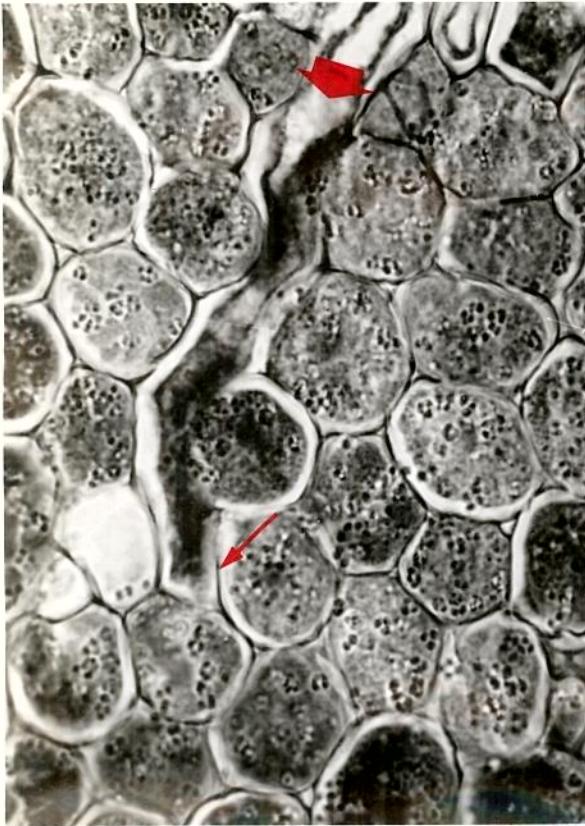


50



51

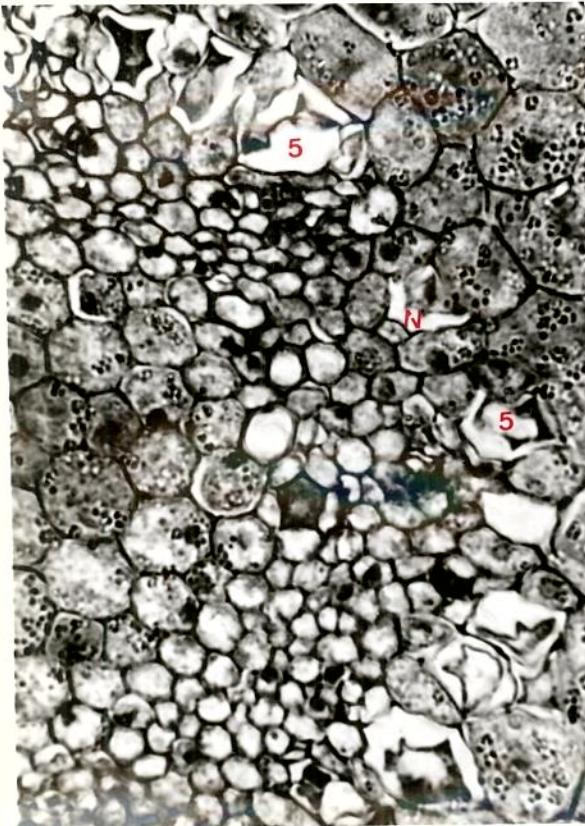
- Fig. 49. Corte longitudinal do hipocôtilo; com a técnica usada que cora intensamente o conteúdo do tubo de látex nesta fase, percebe-se, com nitidez, a natureza "composta" do mesmo. ca. 750 x.
- Fig. 50. Corte transversal do hipocôtilo: dos ~~doze~~¹³ laticíferos perivasculares visíveis, dois enviam ramos horizontais corticais (assinalados. (H)). ca. 480 x.
- Fig. 51. Corte longitudinal da porção inferior do hipocôtilo: extremidade inferior de um laticífero que termina a cerca de 400 μ do ápice da radícula. Note-se o conteúdo denso e a forma rombuda dessa extremidade. ca. 960 x.



52



53

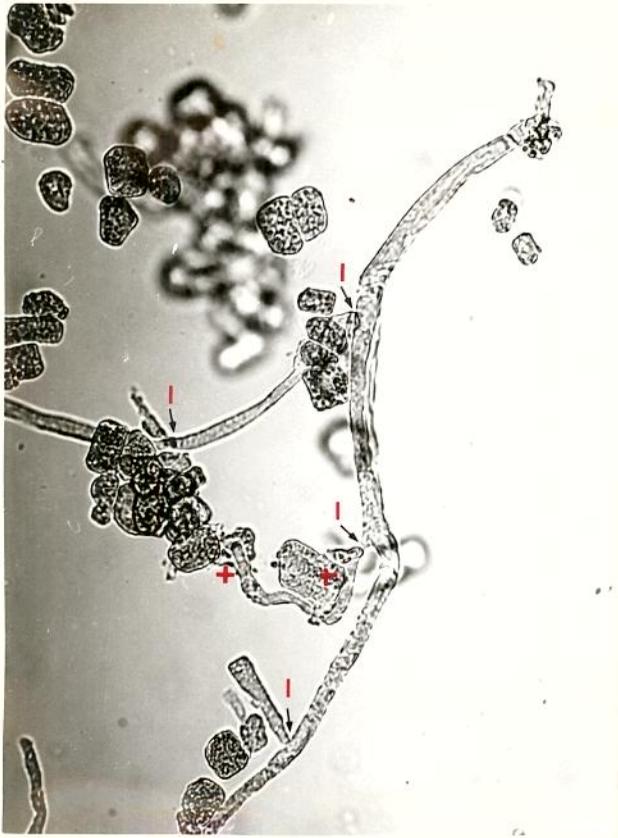


54



55

- Fig. 52. Corte transversal do hipocôtilo. Ramo horizontal, cortical incorpora protoplastos (ou porções de protoplastos) vizinhos; sua extremidade atua sobre a célula que lhe é anteposta, com a possibilidade de novo crescimento longitudinal. ca. 960 x.
- Fig. 53. Corte transversal do hipocôtilo. Dois laticíferos perivasculares (assinalados com F) fusionam-se lateralmente, nesse ponto, enviando um único ramo cortical, horizontal. ca. 960 x.
- Fig. 54. Corte transversal do terço superior do hipocôtilo. Um laticífero perivascular, assinalado (N), parece ter-se diferenciado muito recentemente entre dois outros (5). ca. 750 x.
- Fig. 55. Corte longitudinal oblíquo, próximo ao plano nodal: incorporação de diversas células do meristema fundamental, cujas reservas (grãos de amilo) ainda são parcialmente visíveis nos laticíferos (I); na parte superior do tubo, à direita do observador, diversos núcleos provenientes provavelmente de cariocineses. (M). ca. 200 x.



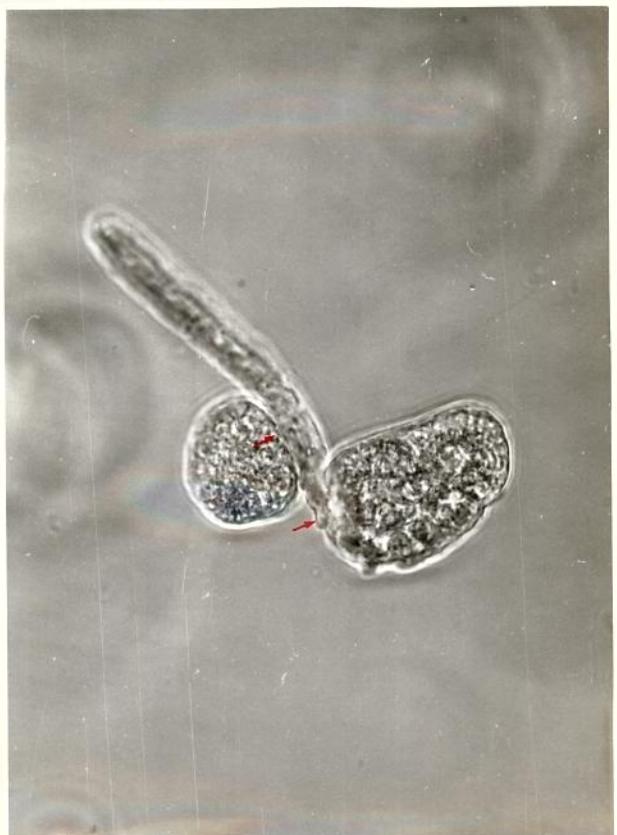
56



57



58

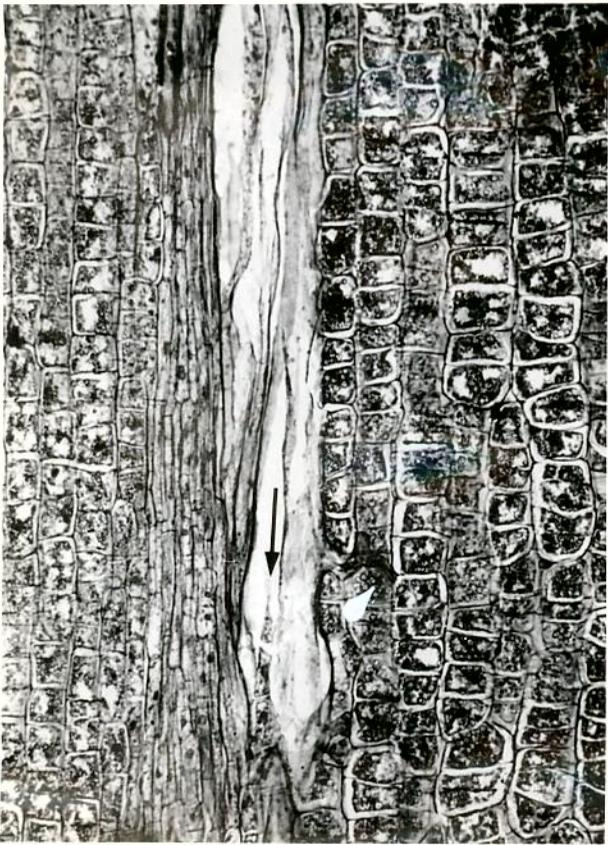


59

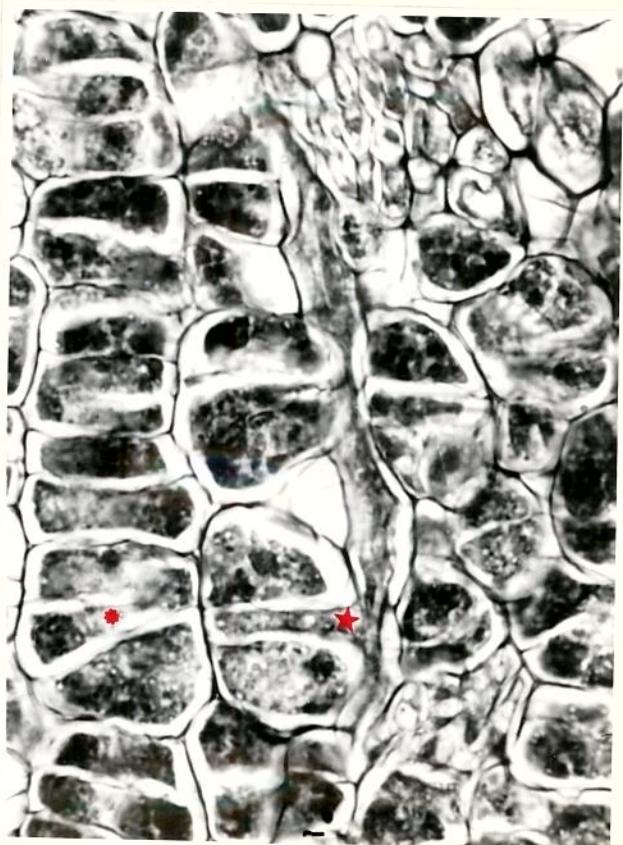
- Fig. 56. Material macerado (Jeffrey). Segmento grande de um laticífero e suas ramificações que aparecem como porções de protoplasto juntadas ou "anexadas", ao sincício e não como verdadeiras ramificações, no sentido que lhe é emprestado pela teoria clássica, em virtude da presença de soluções de continuidade, assinaladas. ca. 350 x.
- Fig. 57. Idem, extremidade de um laticífero, parecendo constituída por uma célula resultante de divisão (vide células irmãs, assinaladas) e que traz anexados vestígios ainda visíveis de outras células. ca. 750 x.
- Fig. 58. Idem, segmento de um laticífero cuja porção terminal é visivelmente porção de uma célula, à qual ainda está presa. ca. 960 x.
- Fig. 59. Idem, segmento de um ramo laticífero cuja extremidade ainda está intimamente unida a duas células do meristema fundamental (contraste de fase). ca. 960 x.



60

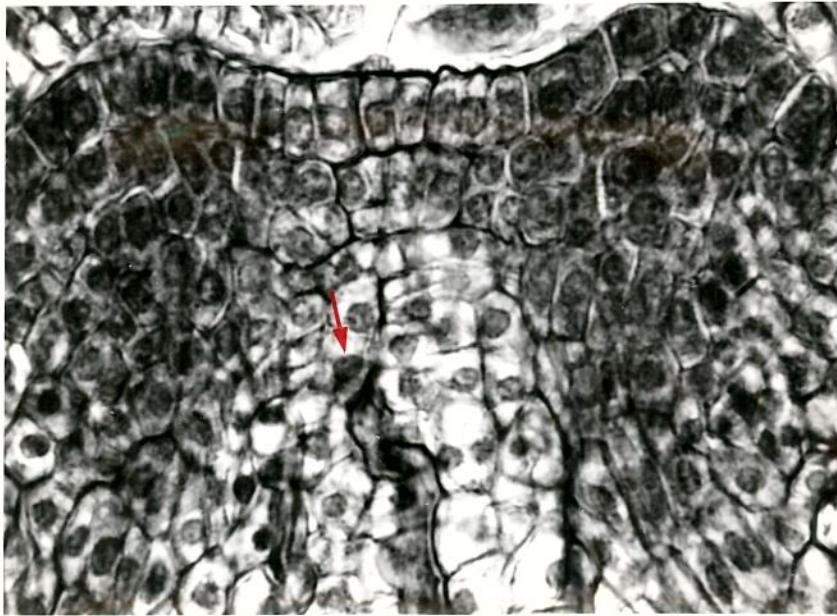


61

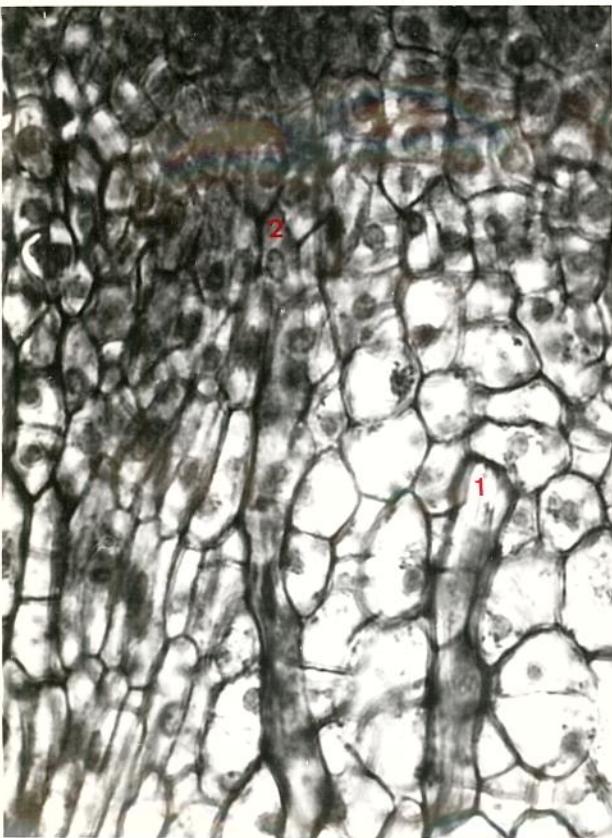


62

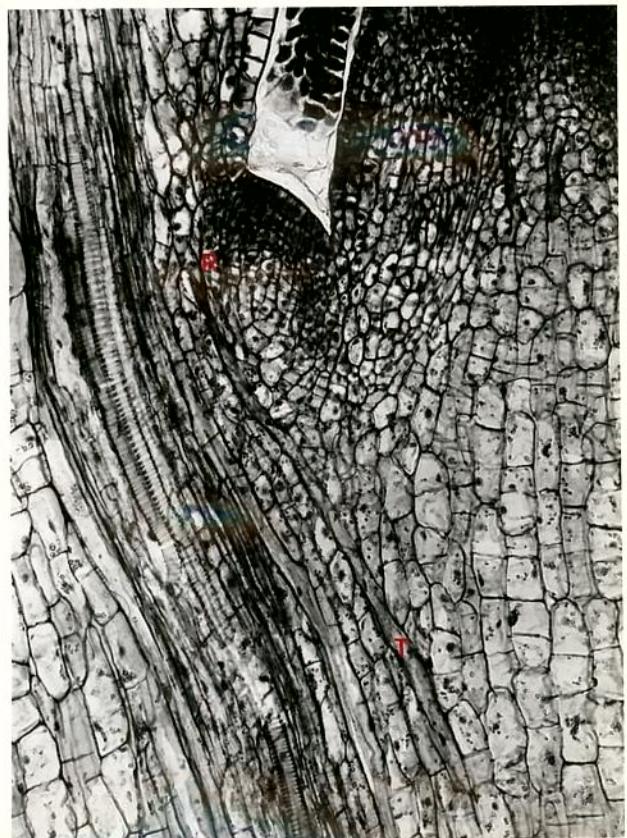
- Fig. 60. Corte longitudinal tangencial do hipocótilo em fase de rápida expansão. Entre as células do meristema fundamental que se dividem e alongam, aparecem tres ramos laticíferos finos, assinalados, cujo aspecto sugere crescimento intrusivo. ca. 200 x.
- Fig. 61. Corte longitudinal do hipocótilo, na base de um cotilédone; tecidos em rápida expansão. Ramo cortical em formação e crescimento (assinalado). Também assinaladas células estreitas que restaram entre 2 laticíferos, em via de anexação ao sincício. ca. 200 x.
- Fig. 62. Corte longitudinal tangencial do hipocótilo em rápida expansão. As células do meristema fundamental crescem e dividem-se ativamente; o sincício do ramo laticífero, por crescimento simplástico, também se alonga e incorpora uma célula estreita, oriunda da divisão de uma célula do meristema fundamental (assinalada).



63



64

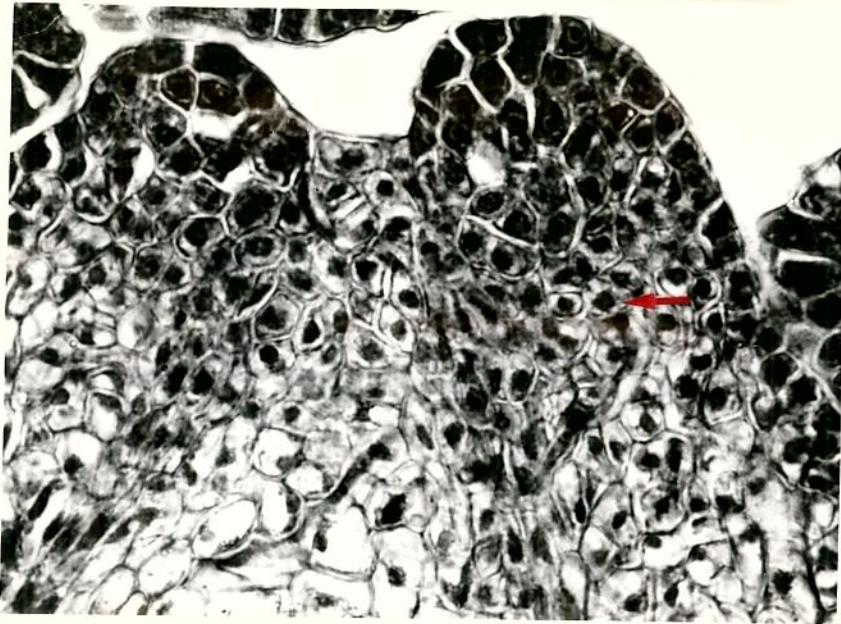


65

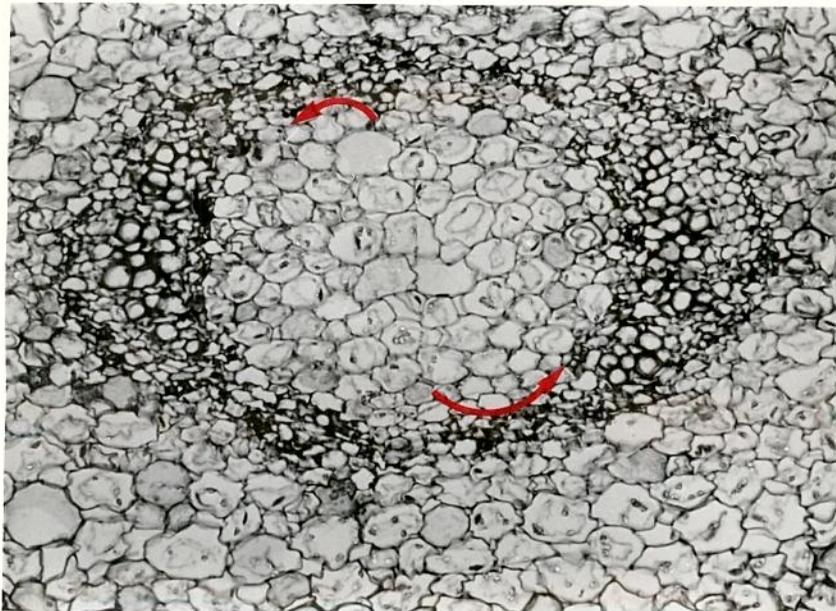
Fig. 63. Corte longitudinal mediano do meristema apical do epicôtilo, mostrando-o no início da formação dos dois primórdios foliares - Vê-se nitidamente a túnica, de uma só camada; um laticífero largo também é visível no meristema medular. ca. 1180 x.

Fig. 64. Corte longitudinal do meristema apical (vide fig. seguinte) mostrando as extremidades de dois laticíferos, uma das quais no limite inferior do promeristema (assinaladas 1 e 2) ca. 1180 x.

Fig. 65. Corte longitudinal mediano do meristema apical da plântula, abrangendo especialmente uma gêmea na axila de uma folha do primeiro par; observa-se grande parte do trajeto de um laticífero cuja extremidade está situada sob dita gêmea. ca. 200 x.



66



67

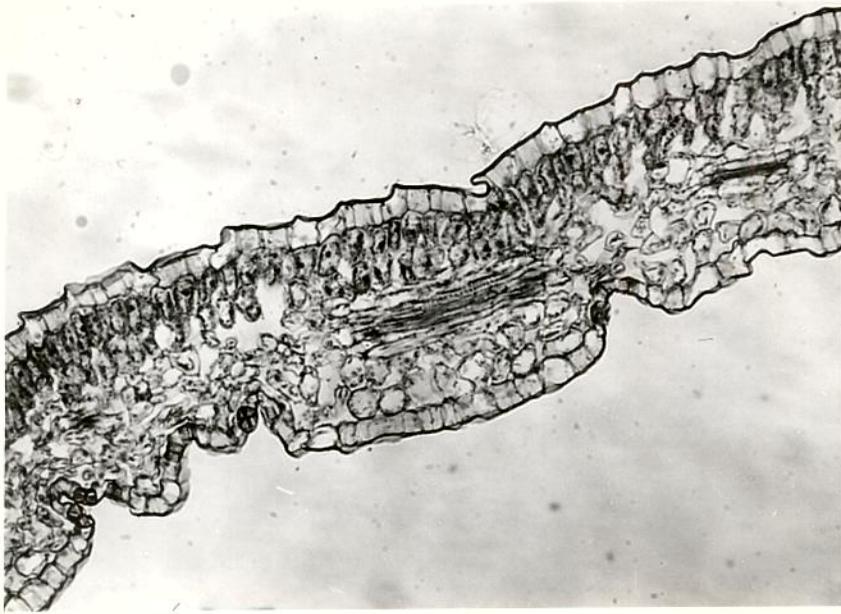


68

Fig. 66. Corte longitudinal, mediano do epicôtilo: meristema apical, vendo-se, já esboçados, os primórdios do segundo par de folhas. No primórdio a direita, do observador, vê-se a extremidade de um laticífero cujo protoplasto está retraído; a largura de cavidade do tubo é comparável à das células vizinhas, especialmente da quela com que se defronta dita extremidade (assinalada.). ca. 750 x.

Fig. 67. Corte transversal do epicôtilo, com os elementos condutores dispostos em dois fortes feixes, correspondentes às duas folhas do primeiro par. Note-se que já aparece, pela primeira vez, o liber interno. ca. 350 x.

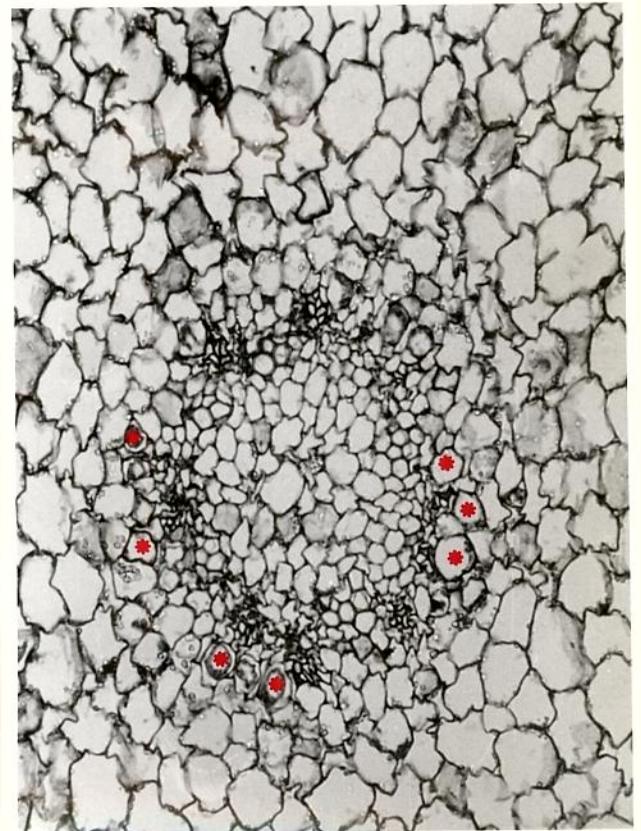
Fig. 68. Corte longitudinal do epicôtilo, abrangendo a região do nã cotiledonar. Vejam-se os elementos do liber interno que surgiram pouco abaixo, na face interna dos feixes, e que já tomam parte na constituição dos feixes do primeiro par de folhas. ca. 200 x.



69



70



71

- Fig. 69. Corte transversal do limbo, paralelo ao seu comprimento, na folha muito jovem do primeiro par. ca. 200 x.
- Fig. 70. Corte longitudinal paramediano do hipocôtilo, após o crescimento do epicôtilo. No interior dos laticíferos veem-se grupos de núcleos e de corpúsculos em processo degenerativo. ca. 1180 x.
- Fig. 71. Corte transversal da parte central da radícula, mostrando cinco feixes lenhosos, separando outras tantas áreas liberianas. Somente por fora destas se vêem os laticíferos perivasculares, bem desenvolvidos (comumente com mais de 25 μ de diâmetro radial) - Na presente seção existem dezesseis tubos, de diâmetro variável, alguns dos quais assinalados. ca. 350 x.

III PARTE

Esta última parte da tese encerra as Considerações Finais que justificam nossa decidida adesão à teoria sincicial.

Na apreciação da bibliografia (I Parte) mostramos como esta teoria, mais antiga, que atribuía a histogênese dos laticíferos contínuos à fusão de protoplastos, devida aos estudos de UNGER (1855), HANSTEIN (1864) e DIPPEL (1865) foi rapidamente suplantada pela teoria celular (hoje, cenocítica) em consequência dos trabalhos de DAVID (1872), SCHMALHAUSEN (1877), SCHULLERUS (1882), CHAUVEAUD (1891) e vários outros, graças ao prestígio de anatomistas como DE BARY (1877) que logo a adotaram, transformando-se na doutrina clássica, "oficial".

Consideremos, inicialmente, esta segunda teoria que ainda goza da preferência dos botânicos modernos, fazendo um breve retrospecto de suas vicissitudes. As "iniciais laticíferas" que DAVID (1872) supôs surgissem sucessivamente no meristema apical, foram transferidas por SCHMALHAUSEN (1877) para o embrião, mas com as mesmas características: alongamento, sem divisão, por crescimento apical intrusivo nos meatos dos tecidos do corpo da planta. Para aquele Autor, as iniciais seriam em

número indefinido e os respectivos laticíferos permaneceriam independentes, estanques; para este, as iniciais seriam em número definido e fixo para cada espécie e os respectivos tubos contrairiam anastomoses frequentes. Afirmava, ainda SCHMALHAUSEN (1877) que o crescimento dos tubos, comparável ao de hifas parasitas, apenas ocorria nas regiões meristemáticas (o que excluía das radículas os laticíferos) e que novas iniciais laticíferas jamais apareciam após o desenvolvimento do embrião. Este esquema foi aceito nos traços gerais por SCHULLERUS (1882), exceto em dois pontos importantes: as fusões e anastomoses entre os laticíferos foram negadas perentoriamente; a semelhança entre os tubos de látex e as hifas parasitas foi considerada mais profunda para explicar a possibilidade de crescimento dos ramos fora das áreas de meristema.

Tentar a conciliação entre as proposições divergentes dos dois últimos Autores citados foi a tarefa que se impôs CHAUVEAUD (1891) no que tange à histogênese dos tubos concluindo, entretanto, contra SCHMALHAUSEN (1877), pela presença de laticíferos nas radículas e pela ausência de anastomoses entre os tubos de látex. A propósito destes dois Autores transcrevemos (MILANEZ e MONTEIRO NETO, 1956, pg. 384) com referência ao gênero *Euphorbia*: "Interessante prova da precariedade do critério para distinguir as iniciais é a discordância entre os respectivos números, apontados por SCHMALHAUSEN

(1) e CHAUVEAUD (2) para as espécies que ambos estudaram. Assim, em *E. peplus*, acharam respectivamente, A e 8 iniciais; em *E. lathyris*, 8 e um círculo completo delas; em *E. myrsinites*, 6 e mais de 30".

SCHAFFSTEIN (1932) voltou a sustentar que o crescimento dos laticíferos sã se efetua nos meristemas e situou nestes, ou mais precisamente, no promeristema, as extremidades dos tubos que sempre ai permanecem porque seu crescimento iguala exatamente • dos tecidos do ápice. Isto se aplica tanto ao caule quanto a raiz e ramificações respectivas. No caso das raízes adventícias e outros semelhantes, o crescimento e a multiplicação das células vizinhas dos laticíferos condicionariam o crescimento destes tubos. Importante inovação é apresentada por este Autor e confirmada por BLASER (1945): ao lado dos tubos mais numerosos, oriundos dos iniciais embrionárias, pelo processo considerado normal, outros se formam por fusão de protoplastos em certas Asclepiadaceas. Nas espécies de *Trichocaulon* e em *Stapelia bella* descobriu SCHAFFSTEIN (1932, pg. 207), ao lado dos tubos continuos, um segundo sistema de laticíferos, em tudo semelhantes aos articulados, independentes quanto a origem, posição e época tardia de formação, do sistema de tubos contínuos. Em *Cryptostegia grandiflora* admitiu BLASER (1945, pg. 132) como provável ao lado dos tubos contínuos, normais, a presença de outros constituídos por fusão de células parenquimáticas, pouco especializadas.

Modificações de certa relevância foram introduzidas neste esquema geral, como consequência, sobretudo, das pesquisas recentes de MAHLBERG. Ao fim de seu trabalho sobre cariocinese nos tubos de *Nerium oleander*, (MAHLBERG, 1959, pg. 118), põe em relevo o caráter cenocítico do respectivo protoplasto. O laticífero que fôra apenas comparado a uma hifa de fungo parasita, agora, na opinião deste Autor (MAHLBERG, 1963, pag.230) "can be broadly interpreted as a parasitic cell within the plant body", estranho conceito que é, pelo menos, inteiramente novo.

Afinal, reconhecendo que são pouco evidentes os espaços intercelulares nas regiões meristemáticas dos órgãos vegetais, onde estão situadas as extremidades dos laticíferos em crescimento intrusivo, assegura que este se efetua necessariamente ao longo da lamela média, com a separação das células do meristema fundamental e do procâmbio (MAHLBERG, 1963, pg. 230).

A simples leitura desse retrospecto é de molde a inspirar dúvidas e incertezas, face às opiniões contraditórias de vários pesquisadores sobre questões importantes da teoria vigente, tais como: presença ou ausência de fusões e anastomoses entre os laticíferos; capacidade de crescimento intrusivo dos tubos somente nos promeristemas, ou também nos meristemas, ou ainda, nos tecidos já diferenciados, mediante reativação; crescimento intrusivo dos laticíferos através dos meatos ou ao longo da lamela média alterada, com afastamento das células.

O sentimento de insegurança mais se acentua quando são considerados alguns casos particulares, ainda não satisfatoriamente explicados pela doutrina em voga. Aos laticíferos transestelares, por exemplo, atribui-se a capacidade de atravessar o cilindro procambial cujas células, sempre intimamente unidas, não apresentam deslocamentos; os elementos que delas provêm não mostram igualmente deslocamentos ou deformações, apesar da penetração ativa dos tubos transestelares.

Após a travessia, pouco ou nada se sabe destes tubos, inclusive se persiste seu crescimento apical. Certo é que, com o desenvolvimento da estrutura secundária passam a exibir, os mencionados tubos, crescimento intercalar ao nível do câmbio, sem outra explicação (?) senão que suas paredes permanecem finas e pectocelulósicas na região cambial (ARTSCHWAGER, 1946).

Outro sério obstáculo à aceitação da doutrina atual que afirma não se formarem novas iniciais laticíferas além das embrionárias, é representado pela grande quantidade de látex encontrado nos exemplares bem desenvolvidos de certas plantas das *Apocynaceae*, *Asclepiadaceae*, *Euphorbiaceae* e *Moraceae* principalmente, o qual, em várias circunstâncias, tem sido explorado em algumas espécies. Impressionado com essa abundância, que contrasta com o número habitualmente pequeno de iniciais embrionárias, escrevera VAN TIEGHEN (1884, pg. 649) referindo-se ao laticífero contínuo: "À l'intérieur d'un grand Mûrier, par exemple, c'est par Klomètres que se mesure le développement total des branches d'une

pareille c ellule". Vale a pena recordar, em resumo, o que ressaltamos a propósito: DE BARY (1877) confessou-se incapaz de decidir se os numerosos laticíferos observados na estrutura secundária provinham da atividade do câmbio ou eram simples ramos dos tubos da estrutura primária. A grande maioria dos Autores, no entanto, passou a ignorar esses fatos. Não foi esta a atitude de ARTSCHWAGER (1946) que se esforça por explicá-los   luz da teoria vigente, mediante hipóteses que reúne sob a forma de sugestões   página 29, baseadas na capacidade, quase inexgot vel, de ramifica o dos tubos, qualquer que seja sua idade.

Há por fim, contra a teoria vigente, o resultado totalmente ~~(en)~~gativo das tentativas de comprova o experimental do crescimento aut nomo dos laticíferos. SCHAFFSTEIN (1932) não conseguiu que os tubos de látex de dois exemplares de *Euphorbia esculenta*, enxertados 5 meses antes, atravessassem o calo primário, passando de um para outro indivíduo. SNYDER (1955) em cultura assética de fragmentos de medula de *Cryptostegia grandiflora*, onde havia células de parênquima e laticíferos, não obteve qualquer crescimento destes últimos, embora proliferassem copiosamente as primeiras. Na cultura do embrião de *Euphorbia marginata* empreendida por MAHLBERG (1959a), em meio complexo, os laticíferos aumentaram sua massa por crescimento simplástico, mas em nenhum caso abandonaram os tecidos, degenerados após algum tempo, penetrando e se alongando no meio de cultura.

Consideremos agora a teoria sincicial.

Nas ilustrações desta tese, tanto da primeira quanto da segunda parte, mostramos numerosas imagens que sugerem a fusão de protoplastos, às vezes com insofismável clareza. Outros Autores devem tê-las encontrado também e talvez seja essa a origem de sérias divergências existentes na literatura a respeito da natureza dos laticíferos de várias espécies de *Euphorbiaceae*, sobretudo dos gêneros *Jatropha* e *Aleurites* (Cf. SCHAFFSTEIN, 1932, pg. 204).

Já vimos, outrossim, que dois Autores contemporâneos, adeptos da teoria clássica (SCHAFFSTEIN e BLASER) consignam a presença simultânea, na mesma planta, dos dois tipos de tubos que pela mesma teoria surgem de processos inteiramente diversos e independentes entre si, os quais quase sempre se excluem. É obvio que esses Autores já discrepam da teoria vigente por admitirem a formação de novos laticíferos, além dos que provêm do embrião; mas a simples presença dos dois tipos de tubos, tão diferentes à luz da citada teoria, não nos parece fácil de conceber-se.

Afigura-se-nos muito mais lógico o ponto de vista de HANSTEIN (1864) segundo o qual as fusões são, em certos casos, tão rápidas e completas na formação dos tubos, que em geral não deixam vestígios.

Muito mais lógico se nos afigura o ponto de vista de HANSTEIN (1864) descrevendo o processo sincicial:- as fusões são de tal modo rápidas e completas que habitualmente não deixam vestígios.

Isso explica a razão por que nos tubos formados algum tempo antes e sujeitos ao crescimento simplástico durante a rápida expansão do hipocôtilo, como vimos em *Nerium oleander* (Fig. 60) o aspecto sugere crescimento apical intrusivo. Foi necessário um exame minucioso no embrião em vida latente e nas várias fases de seu crescimento em plântula, para descobrirmos as imagens aqui reproduzidas, denunciadoras de crescimento sincicial.

Aceita esta forma de crescimento, não há mais qualquer motivo para se rejeitarem as fusões e anastomoses entre os tubos contínuos, mais ou menos numerosas conforme a espécie de planta e do tecido respectivo. Desaparecem, de igual modo, as dificuldades sobre o crescimento dos laticíferos nos tecidos jovens e a consequente necessidade de assemelha-los a hifas intercelulares, ou mesmo de considerá-los como veros parasitas do organismo vegetal para explicar esse crescimento fora dos meristemas; os meatos aeríferos ficam a salvo da invasão dos tubos de látex e a lâmina media tem assegurada sua integridade.

Mas onde a teoria sincicial leva nítida vantagem sobre sua competidora é, sem dúvida, nos casos particulares antes citados como não satisfatoriamente descritos de acordo com a teoria vigente. Assim, os tubos transtelares são explicados pela fusão de protoplastos resultantes da divisão de células do procâmbio (figs. 15, 46, 47 e 48), desaparecendo os problemas re-

lativos à íntima união das células deste meristema e à falta de deformações ou deslocamentos de suas derivadas. Seu crescimento intercalar ao nível do câmbio pode considerar-se como reativado periódicamente pela fusão ao sincício laticífero de protoplastos resultantes da multiplicação das células desse meristema (Figs. 16, 17 e 18). A abundância de látex na casca do tronco de algumas plantas se explica de maneira singela pela produção de tubos no liber secundário, em consequência da fusão longitudinal de protoplastos oriundos do câmbio, como os outros elementos da estrutura secundária (Figs. 19, 20 e 21).

Não se pense, entretanto, que a interpretação preconizada seja isenta de incertezas. A primeira delas, já expressa anteriormente, diz respeito à natureza e origem de certos protoplastos incorporados ao sincício. Mostramos que nos meristemas muito jovens são as próprias células que se fusionam (Figs. 1, 2, 4, 5, 14, 25, 26, 41, 42, 64, 66); em outros casos, é evidente que a fusão se dá com elementos provenientes de divisões recentes, quase sempre desiguais (Figs. 11, 15, 27, 38, 40, 44, 62). Mas em outras oportunidades delimitam-se os protoplastos sem que se possa afirmar se houve realmente divisão celular (Figs. 2, 7, 8, 9, 10, 31, 35, 36, 43, 49). Em alguns destes exemplos o núcleo é visível no protoplasto e é legítimo supor-se que tenha havido divisão; em outros, porém, não se percebe o nú-

cleo e persiste a dúvida.

Novas pesquisas acuradas parecem necessárias para esclarecer o início da diferenciação laticífera nos embriões. Há realmente iniciais laticíferas precocemente caracterizáveis? Quando se realizam as primeiras fusões de protoplastos? Em que épocas ocorrem as cariocines observadas por vários autores nos laticíferos e qual a sua significação no processo histogenético? Essas são algumas das questões mais importantes para serem investigadas durante o desenvolvimento embrionário.

É desejável que se escolham espécies cujos embriões, suficientemente pequenos, possam ser fixados por inteiro e estudados, inclusive ao microscópio eletrônico, sem que se modifique a infraestrutura do protoplasto dos tubos pelo corte prévio do material a ser fixado. Desse modo é provável que se adquira uma noção precisa sobre a diferenciação laticífera e uma imagem exata da subestrutura do protoplasto respectivo, o que até agora não se obteve.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARTSCHWAGER, E. (1946) Contribution to the morphology and anatomy of *Cryptostegia* (*C. grandiflora*). U.S. Dept. Agric. Techn. Bull. 915.
- BARY, A. DE (1877) Vergleichende Anatomie der Vegetationsorgane der Phanerogamen und Farne. Leipzig.
- BLASER, H. W. (1945) Anatomy of *Cryptostegia grandiflora* with special reference to the latex system. Am. J. Bot. 32: 135-141.
- BLOKHINTSEVA, I. I. (1940) Formation of Rubber in Koksaghyz as a result of the functioning of the latex vessels. Bull. Acad. Sci. URSS Ser. Biol. nº 4: 608-613.
- CHAUVEAUD, L. G. (1891) Recherches embryogeniques sur l'appareil laticifère des Euphorbiacées, Urticacées, Apocynées et Asclepiadées. Dissertation Fac. Sc. Paris.
- DAVID, G. (1872) Über die Milchzellen der Euphorbiaceen, Moreen, Apocyneen und Asclepiadeen. Diss. Breslau.
- DIPPEL, L. (1965) Entstehung der Milchsaftgefäße und deren Stellung in dem Gefäßbündelsysteme der

- milchenden Gewächse - Rotterdam.
- ENDLICHER, S - UNGER, F. (1843) Grundzüge der Botanik
Wien.
- GREW, N. (1682) The Anatomy of Plants. London.
- HABERLANDT, G. (1928) Physiological Plant Anatomy.
(Trad. de M. Drummond) London.
- HADLER, W.A., L.M. ZITI & M.A.C. HOFLUNG (1970)
Método de Benzidina para Demonstração histoquímica do
Ion SO_4 . XXII Reunião da Sociedade Brasileira para
o Progresso da Ciência.
- HANSTEIN, I. (1864) Die Milchsaftegefäße, und die
verwandeten Organe der Rinde. Berlin.
- HOTCHKISS, R.D. (1948) A microchemical reaction
resulting in the staining of polysaccharide structures
in fixed tissues preparations. Arch. Biochem. 16:
131-141.
- JENSEN, W.A. (1962) Botanical Histochemistry:
Principles and Practice. (W.H. Freeman and Company) -
San Francisco - London.
- JOHANSEN, D.A. (1940) Plant Microtechnique. McGraw-
Hill Book Co. N. York - London.
- KUNDIG, W. & N. NEUROKOM (1963) Helv. Chim. Acta,
1423 (citado por Marshall e Neuberger (1970)).
- LABOURIAU, F. G. (1952) *Regnellidium diphyllum* Lind.
a latescent fern. Rev. Bras. Biol. 12: 181-183.
- MAC-MANUS, J.F.A. (1948) Histological and
histochemical uses of periodic acid. Stain Technol.

- 23: 99-108.
- MAHABALE, T. S. (1949) The laticiferous system of *Regnellidium diphyllum* Lind. Curr. Sc. 18: 449-450.
- MAHLBERG, P. G. (1959) Karyokinesis in the Non-articulated Laticifers of *Nerium oleander* L. Phytomorphology, 9: 110-118.
- MAHLBERG, P. G. (1959a) Development of the Non-articulated Laticifer in Proliferated Embryos of *Euphorbia marginata* Pursh. Phytomorphology, 9: 156-162.
- MAHLBERG, P. G. (1960) Embryogeny and histogenesis in *Nerium oleander* L. I Organization of primary meristematic tissues. Phytomorph, 10: 118-131.
- MAHLBERG, P. G. (1961) Embryogeny and histogenesis in *Nerium oleander* L. II Origin and Development of the Non-Articulated Laticifer. Am. J. of Bot. 48: 90-99.
- MAHLBERG, P. G. (1963) Development of Non-Articulated Laticifer in Seedling Axis of *Nerium oleander*. Bot. Gazette 124: 224-231.
- MAHLBERG, P. G. & P. S. SABHARWAL (1966) Mitotic waves in Laticifers of *Euphorbia marginata*. Science 152: 518-519.
- MAHLBERG, P. G. & P. S. SABHARWAL (1967) Mitoses in the Non-Articulated Laticifer of *Euphorbia marginata*. Am. J. of Botany, 54: 465-472.
- MAHLBERG, P. G. & P. S. SABHARWAL (1968) Origin and

- Early Development of Non-Articulated Laticifers in Embryos of *Euphorbia marginata*. Am. J. of Bot. 55: 375-381.
- MALPIGHI, M. (1675) Anatomie Plantarum (citado segundo SACHS, J. VON (1906) - pg. 229 e seguintes).
- MARSHALL, R. D. & A. NEUBERGER (1970) - Aspects of the structure and metabolism of glycoproteins - in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry - 25: 407-478.
- MAYUS, O. (1905) Beiträge über den Verlauf der Milchröhren in den Blättern. B.B.C. - 1, 273.
- MILANEZ, F. R. (1952) Ontogenese dos laticíferos do Caule de *Euphorbia phosphorea* Mart. Arq. Jard. Bot. XII: 15-35.
- MILANEZ, F. R. (1952a) Sobre os núcleos dos Laticíferos de *Euphorbia phosphorea* Mart. Rodriguesia XV, 27: 163-175.
- MILANEZ, F. R. (1953-4) Origem das Ramificações dos Laticíferos do Caule de *Euphorbia phosphorea* Mart. Arq. Jard. Bot. XIII: 95-113.
- MILANEZ, F. R. (1954) Sobre os Laticíferos Foliares de *Ficus retusa*. Rodriguesia XVI-XVII: 159-180.
- MILANEZ, F. R. (1959) Contribuição ao Conhecimento Anatomico de *Cryptostegia grandiflora* - I. Embrião. Rodriguesia - XXI e XXII (33-34): 347-394.
- MILANEZ, F. R. (1960-1) Contribuição ao Conhecimento Anatomico de *Cryptostegia grandiflora* - II Sobre os

- Laticíferos da Estrutura Primária. *Rodriguesia* - XXIII-XXIV (35-6): 99-128.
- MILANEZ, F. R. (1966) Contribuição ao Conhecimento Anatomico de *Cryptostegia grandiflora* - III Nota sobre a Estrutura Secundária. *Rodriguesia* XXV (37): 335-350.
- MILANEZ, F. R. & H. MONTEIRO NETO (1956) Origem dos Laticíferos do Embrião de *Euphorbia pulcherrima* Willd. *Rodriguesia* XVIII e XIX (30-1): 351-424.
- MOLDENHAWER, J.H.D. (1779) De vasis plantarum. Diss. (apud SCHMALHAUSEN 1877).
- MOLISCH, H. (1901) Studien über den Milchsaft und Schleimsaft der Pflanzen - Jena.
- MOOR, H. (1959) Platin-Kohle- Abdruck-Technik angewandt auf Feinbau der Milchröhren. *Jour. Ultrast. Res.* 2: 293-422.
- PROKOF'EV, A. A. (1939) Rubber formation in plants. *Bull. Acad. Sc. U.R.S.S. Ser. Biol.* Nº 4: 908-923.
- PUSZTAI, A. (1966) - The Isolation of Two Proteins, Glycoprotein I and a Trypsin Inhibitor, from the Seeds of Kidney Bean (*Phaseolus vulgaris*) - *Biochem J.* 101: 379-384.
- RENNER, O. (1907) Beiträge zur Anatomie und Systematik der *Artocarpeen* und *Conocephaleen*, insbesondere der Gattung *Ficus*. *Engler's Bot.* / *Abh.* Jahrb. 39: 319-448.
- REST, J.A. & J.G. VAUGHAN (1972) The Development of

- Protein and Oil Bodies in the Seed of *Sinapis alba*
L. *Planta*, 105: 245-262.
- ROSOWSKI, J. R. (1968) Laticifer morphology in the
mature stem and leaf of *Euphorbia supina*. *Bot.*
Gaz. 129: 113-120.
- SACHS, J. von (1906) *History of Botany (1530-1860)*.
Trad. de H.E.F. Garnsey - Revista por I.B. Balfour -
Oxford.
- SCHACHT, H. (1851) Die sogenannten Milchsaft-
Gefäße der Euphorbiaceen u.s.w. sind
Milchsaftführenden, nicht selten verzweigte
Bastzellen. *Bot. Zeitung*. IX: 513-521.
- SCHACHT, H. (1852) *Die Pflanzenzelle* - Berlin.
- SCHACHT, H. (1856) Die Milchsaftgefäße der *Carica*
papaya. *Monatsber. de Koenigd. Preuss. Acad.*
- SCHAFTSTEIN, G. (1932) Untersuchungen an
ungegliederten Milchröhren. *B.B.C. I* - 49: 197-220.
- SCHLEIDEN, M. J. (1845) Ueber Cacteen - *Me. savants*
étrang. de l'Acad Pétersb. IV.
- SCHLEIDEN, M. J. (1849) *Grundzüge der*
wissenschaftlichen Botanik. Leipzig - 3a. ed.
- SCHMALHAUSEN, J. (1877) Beiträge zur Kenntniss der
Milchsaftbehälter der Pflanzen. *Mem. de l'Acad. de*
Sc. St. Petesbourg - Serie 7, T. 24.- n° 2.
- SCHMIDT, A. (1924) Histologische Studien and
phanerogamen Vegetationspunkten. *Bot. Archv.* 8:
345-404.

- SCHULLERUS, F. (1882) Über die physiologische Bedeutung des Milchsaftes von *Euphorbia lathyris*.
Abh. Bot. Ver. d. Prov. Brandenburg 24: 28-93.
- SCHULTZ, C. H. (1839) Sur la circulation et sur les vaisseaux laticifères dans les plantes. Paris, Berlin.
- SCHULTZ, C. H. (1841) Die Cyclose des Lebensaftes in den Pflanzen. Verh. d. Kais. Leopold-Carol Skh. d. Naturforscher XVIII Suppl. II: 1-355.
- SNYDER, F. W. (1955) Growth of excised tissues from the stem of *Cryptostegia grandiflora*. Bot. Gaz. 117: 147-155.
- SPERLICH, A. (1939) Das trophische Parenchym B. Excretionsgewebe. in Handbuch der Pflanzenanatomie - Vol. IV. Berlin.
- THEOPHRASTUS Enquiry into Plants and Minor Works on Odours and Weather Signs. Trad. Inglesa: Arthur Hort. Ed. W. Heineimann. 2 vol. 1914-16.
- UNGENANNT (1846) Die Milchsaftgefäße, ihr Ursprung und ihre Entwicklung. Bot. Zeitung - IV: 833-43; 845-59; 865-72.
- UNGER, F. (1839) Aphorismen - Wien.
- UNGER, F. (1840) Ueber Krystallbildungen in Pflanzen. Ann. Wiener Museum d. Natur: 10-11.
- UNGER, F. (1855) Anatomie und Physiologie der Pflanzen. Pest, Wien, Leipzig.
- VAN TIEGHEN, P. H. (1884) Traité de Botanique

(2 vol.) Paris.

VARNER, J. E. (1965) Plant Biochemistry - Edited by
James Bonner & J. E. Varner. New York & London.

WOODSWORTH, R. H. (1932) Diaxylary laticiferous
cells of *Beaumontia grandiflora*. Jour. Arnold
Arboretum 13: 35-38. /u