

## SEGUNDA NOTA SOBRE OS LATICÍFEROS

Por F. R. MILANEZ

### ABSTRACT

**Second note on the Laticifers:** The author presents new statements which complete the conclusions of a previous paper. These statements are:

- 1) A nuclear extrusion was observed in the laticifers of the secondary structure of *Hevea brasiliensis* and *Manihot Glaziovii*.
- 2) This extrusion was also observed in the sieve tube elements of the same species.
- 3) Considerations based on microscopical observations were made upon the origin of the hypodermic laticiferous system.
- 4) The formation of corpuscles of rubber in *H. brasiliensis* by the plastidome of the laticiferous cell was verified by new observation.
- 5) The occurrence of elongated plastids which are the cause of the presence of rods in the latex of *M. Glaziovii* was verified, and the behaviour of the laticiferous cells during the histogenesis is described.
- 6) The method of vital staining with neutral red made it possible to study the laticiferous cells in living condition. The contents of the laticiferous cells, always animated by Brownian movement are not stained; the staining only appears when the movements stop. The latex is similar to the protoplasm in this regard.
- 7) The same method was used with a *Podostemonacea*, viz.

*Apinagia Accorsii*, and the results were the same with material that was observed with a minimum of manipulation and therefore a minimum of possible alterations.

Destina-se o presente trabalho a reforçar e completar as principais conclusões contidas em *Nota Previa sobre os Laticíferos* de *Hevea brasiliensis* (12), concernentes especialmente aos fatos seguintes, observados na histogênese daqueles tubos de latex:

- I) Extrusão da substancia nucleolar.
- II) Intervenção decisiva do plastidoma na produção dos globulos de borracha.

### III) Natureza protoplasmática do latex.

O material utilizado nas pesquisas aqui relatadas provem de tres especies distintas:

- a) *Hevea brasiliensis* Müll. Arg. - exemplares novos, obtidos por sementeira de sementes colhidas em arvores ha muito existentes no Jardim Botânico;
- b) *Manihot Glaziovii* Müll. Arg. - arvore bem desenvolvida, adulta, tambem do parque do Jardim;
- c) *Apinagia Accorsii* Toledo - podostemonacea enviada, sob forma de numerosos exemplares vivos, pelo Prof. W. R. Accorsi, de Piracicaba.

Em cada caso usaram-se tecnicas que serão expostas oportunamente.

As fotomicrografias que ilustram estas paginas foram obtidas pelo Autor com auxilio de grande microscopio Zeiss, camara de fole e espelho lateral; ocular fotografica Zeiss 9 x e objetivas apocromaticas Bausch & Lomb.

São de Thonndorf, tecnico da Luik & Kleiner, as fotomicrografias coloridas; ele se serviu da maquina Leica, com dispositivo para focalização, e dos filmes Ansco Color; as ampliações coloridas foram feitas por aquela firma.

## I

Haviamos insistido no trabalho anterior (12), relativamente à extrusão, sobre os seguintes pontos:

- a) Johow (9), em sus tese inaugural publicada ha quase 70 anos, anunciara que os núcleos dos laticíferos de varios Monocótilos perdem seus nucléolos durante a histogênese;
- b) Em todas as preparações que examináramos no estudo da histogênese dos laticíferos da estrutura primária de *Hevea brasiliensis*, tanto nos pontos de crescimento do caule, como no hipocótilo de embrião, observamos sempre a eliminação de um ou mais globulos pelos núcleos da célula, previamente à elaboração do hidrocarboneto;
- c) A substância expulsa era realmente nucleolar, como pudéramos verificar pelo metodo de coloração de Feulgen e sobretudo, pelos variantes de Semmes e Bhaduri (14), (15).

Querendo tornar mais completas nossas pesquisas sobre o assunto, investigamos o mesmo fenomeno na estrutura secundaria de *Hevea brasiliensis* e *Manihot Glaziovii*. Para este fim cortamos fragmentos de casca, em tamanho apropriado, colocando-os imediatamente na mistura fixadora. Para a primeira usamos o liquido de Flemming e para a segunda, o de Zirkle osmiado (vide cap. II). Desidratados e incluídos em parafina, pelos métodos comuns, foram, em seguida cortados, os fragmentos, em micrótomo rotatorio de Spencer na espessura de 8 micra. As laminas foram coloridas pela hematoxilina ferrica, ás vezes com o verde rapido como contraste, depois de clareadas energicamente pela mistura de agua oxigenada e alcool.

Nas preparações obtidas foi menos facil observar a extrusão porque, ao contrário do que sucede com a estrutura primária, não se podem ver as diversas etapas da histogênese ao longo de um tubo em diferenciação; aqui essas etapas se sucedem à medida que a serie de tubos se afasta do cambio por força do aparecimento de outros elementos mais recentes do liber secundário e cada corte geralmente permite apenas observar poucas fases da diferenciação que, alem disso, se processa rapidamente.

Nos laticíferos secundários de *Hevea* pudemos notar que os globulos nucleolares, tal como sucedia nos da anatomia primária, permanecem durante algum tempo, inalterados no citoplasma, ás vezes já a certa distancia do núcleo; este é sempre pequeno, arredondado e picnotico. Mais tarde, porem, os globulos nucleolares apresentam vesiculas e acabam por se desintegrar.

Tambem nos laticíferos secundários de *M. Glaziovii* (manicoba) ocorrem os mesmos fatos relacionados com a extrusão. A fotomicrografia (1) mostra dois núcleos de vaso laticífero joven. Processa-se, no situado abaixo, a expulsão de um nucléolo, nitidamente visível já quase fora da membrana nuclear; o outro, muito alongado, inicia agora a eliminação de um nucléolo pela extremidade aguda. O tratamento muito prolongado pela agua oxigenada, da preparação fotografada, tornou quase impossível a coloração do condrioma, permitindo melhor exame das transformações nucleares.

Enquanto esperamos investigações que venham confirmar a universalidade da extrusão nucleolar na diferenciação das células laticíferas, podemos afirmar que, pelo menos em *Araceae* e *Musaceae* (Johow) assim como nas duas euforbiáceas, principais fornecedoras de borracha, esse fenômeno é característico da histogênese dos citados elementos. Desde já, entretanto, podemos aproxima-lo do que se verifica na diferenciação de outro elemento — o crivado<sup>(1)</sup>. Na verdade, de acordo com o trabalho recente de Engard (5), os núcleos das células crivadas durante a histogênese, expulsam para o citoplasma nucléolos, que aí vão constituir os “corpos mucosos”.

Esau (6), posteriormente, estudou a formação do liber de *Gossypium hirsutum*, *Eucalyptus rostrata*, *Rubus* sp. e *Vitis conifera* com o duplo fim de verificar a realidade da extrusão nucleolar e comparar as estruturas descritas por Engard com os “corpos mucosos” das outras plantas. Suas conclusões, quanto ao primeiro ponto, confirmam a descoberta daquele autor e consignam fato idêntico para as duas primeiras espécies citadas. Em *Vitis* não há vestígios do núcleo no tubo crivado maduro, ao passo que em *Rubus*, *Eucalyptus* e *Gossypium* a desintegração nuclear é precedida de extrusão nucleolar.

À vista dos resultados desses trabalhos, procuramos investigar de que modo se comportava o núcleo dos vasos crivados das duas euforbiáceas em estudo. Examinando as preparações que havíamos utilizado nas pesquisas sobre os laticíferos, pudemos averiguar que em ambas o núcleo expulsa nucléolos antes de se desintegrar.

A fotomicrografia (2), de um corte da estrutura primária de *Hevea brasiliensis*, deixa ver um núcleo de tubo crivado do metafloema, prestes a se desorganizar. Verifica-se, entretanto, que um nucléolo (bem focalizado na fotografia) já se encontra liberto da membrana nuclear, enquanto o outro, no polo oposto, faz saliência nítida na dita membrana, pois está sendo expulso. O núcleo de tubo crivado, na fotomicrografia (3), de uma preparação de liber secundário de *Manihot Glaziovii* já expeliu diversos nucléolos, um dos quais, maior e muito visível, já se

(1) Devemos ao Prof. Pophân, da Universidade de Estado de Ohio, a gentileza de nos ter alertado sobre esses trabalhos.

acha a certa distância da membrana, em pleno citoplasma, permanecendo perfeitamente íntegro.

Dos fatos expostos podemos concluir que existe um caráter comum, bastante estranho, aliás, na evolução dos dois tipos de elementos: *crivado* e *laticífero*. Actualmente seria precipitado concluir por uma relação filogenética entre ambos, embora sejamos levados a supor certa afinidade real.

É oportuno lembrar que conclusão análoga já havia sido alcançada mediante considerações anátomo-fisiológicas. Haberlandt (8) adotando os pontos de vista de de Bary, Faivre e Schullerus, classifica o sistema laticífero de tecido condutor adicional de substâncias plásticas, ou seja, uma espécie de liber suplementar. São conhecidos e acham-se minuciosamente explanados no tratado clássico de Anatomia Fisiológica (8) os dados, de interpretação às vezes discutível, em que se apoiaram esses Autores. Há, porém, fatos puramente anatômicos que apontam no mesmo sentido.

Desses, o mais expressivo, refere-se à proximidade dos dois tecidos, salientada pela maioria dos Autores; ainda num dos últimos trabalhos de revisão sobre laticíferos, assim se manifesta Sperlich (16): “Die Verteilung des Milchgefäßsystems innerhalb der Gewebe und Organe ist sehr mannigfaltig, doch ist eine allgemeine Bevorzugung des Phloems und seiner Umgebung unverkennbar”...

Dos estudos realizados principalmente em euforbiáceas resulta que há geralmente 3 sistemas laticíferos: o principal, situado no floema ou sua imediata vizinhança, o cortical externo ou hipodermico, em pleno cortex, e o medular.

No embrião de *Hevea brasiliensis* há somente iniciais para os laticíferos do sistema principal, na região que Calvert (2) denominou de *inner cortex*. Pudemos averiguar, nas pesquisas que realizamos (12) que essas pseudo células iniciais acham-se no proprio cilindro do procambio.

Não existe, pois, o sistema hipodermico no embrião e nem, sequer, nos primeiros estádios do desenvolvimento das plantas, afirma Calvert (2) que assim se expressa a esse respeito: “In the hypoderm or outer cortex of the upper part of the stems of the older seedlings laticiferous tubes also occur. They seem to arise as branches from the main system of tubes in

the inner cortex. Branches from tubes are frequently found running obliquely upwards through the cortex, passing between the elements of the sclerenchymatous sheath, and continuing their course in the hypodermal tissue".

Aludimos, na nota anterior (12) ao desenvolvimento dos laticíferos do sistema principal. Traçamos sua origem a partir da parte externa do procâmbio e distinguimos, nos meristemas primários, tres tipos de células situadas no trajeto dos futuros tubos (pg. 49) "elementos já tipicamente laticíferos, separados por células pouco diferenciadas no mesmo sentido (2 núcleos) e por outras que ainda não apresentem qualquer sinal de sua evolução particular".

Ha, pois, de inicio, células prococemente diferenciadas, separadas por elementos do meristema primário, aos quais parecem impôr, por influencia directa, o processo histogenético típico dos laticíferos. Essas células surgem no procâmbio, bem proximas do promeristema terminal. Na referida nota não tratamos do sistema cortical.

Novas observações foram agora por nós efetuadas em lâminas de caule primário e, em particular, no de uma plantula com cerca de 6 cm de epicótilo, o qual foi dividido transversalmente em tres partes, fixadas em Benda e incluídas na parafina em um só bloco. Usamos a coloração pela hematoxilina ferrica — verde rápido, ás vezes, com interposição da safranina.

Nas preparações examinadas pudemos constatar que não se formam, no meristema primário do caulículo, células laticíferas extra-cambiais, na proximidade do promeristema terminal. As que primeiro vimos surgir no meristema fundamental do cortex eram obviamente ramificações provenientes do sistema principal (fotomicrografia 4); o que, porem, de mais notorio pudemos fixar nessas observações foi a influencia dessas ramificações de laticíferos na evolução das células corticais com que entram em contacto. Como se pode ver na citada fotomicrografia, à direita, reage logo o plastidoma das células vizinhas a essas ramificações, aumentando rapidamente o tamanho das suas unidades que, nessa ocasião, tornam-se bem maiores que os plastas das outras células, precursores dos cloroplastas.

Igualmente, nas observações efetuadas nos brotos, somente notamos a diferenciação laticífera, na vizinhança do meristema

terminal, em elementos procambiais. Em varios pontos são visíveis as ligações dos sistemas principal e hipodermico. Estas se estabelecem antes da maturação da bainha esclerenquimatosa, graças às células laticíferas formadas ao contacto mesmo do periciclo. A fotomicrografia 6 mostra-nos um tubo de latex, no limite do cortex com o cilindro central; são notórios dois ramos que emite o referido tubo, um para o cilindro central e outro que se insinúa entre as células corticais.

Provisoriamente, à luz dos dados escassos que possuímos, podemos interpretar do modo seguinte os fatos expostos: o procâmbio é capaz, como no embrião, de produzir células laticíferas; estas não constituem, inicialmente, fileiras contínuas, mas induzem outras células meristemáticas, situadas nos claros da fileira e nas proximidades, a sofrer a mesma diferenciação. No meristema cortical, ramos provenientes daquele sistema principal, exercem a mesma influencia indutora, provocando a diferenciação dos laticíferos extra-cambiais.

Quanto ao sistema medular, de poucas observações temos noticia. As mais interessantes, devidas a Calvert & Boodle (3) em *Manihot Glaziovii*, descrevem esse sistema e suas ligações com o principal, relacionando seu aparecimento com o "parênquima cambiforme" que Pax (3) considerou como líber rudimentar.

Ha, portanto, em todos esses dados, notoria relação entre a origem dos laticíferos e o líber ou a porção externa do procâmbio (destinada a formar o líber).

No que se refere ao sistema secundário, a interpretação é mais segura. O câmbio, continuação do procâmbio, é capaz de produzir células laticíferas, e o faz justamente pela face externa, formadora de líber. Aqui, tais células devem ser consideradas como integrantes do tecido complexo (Eames & Mac Daniels) — que é o líber secundário.

O estudo da maturação dos laticíferos de *Manihot Glaziovii*, de que cuidaremos mais detidamente no cap. II, permitiu-nos algumas observações interessantes quanto às transformações externas das iniciais. Em cortes tangenciais proximos do câmbio, pudemos colher aspectos semelhantes ao da fotomicrografia 5. Por eles se verifica que os laticíferos provêm de iniciais fusiformes. Sua evolução especial se caracteriza, quanto à for-

ma externa, por numerosas divisões, não sómente em direção transversal, como sucede com as iniciais do parênquima, mas também longitudinal e oblíqua. Essas diversas células acabam por fundar seus protoplastas. Às vezes, como na fotomicrografia em apreço, essa fusão é primária, por isso que se não formam paredes divisórias completas.

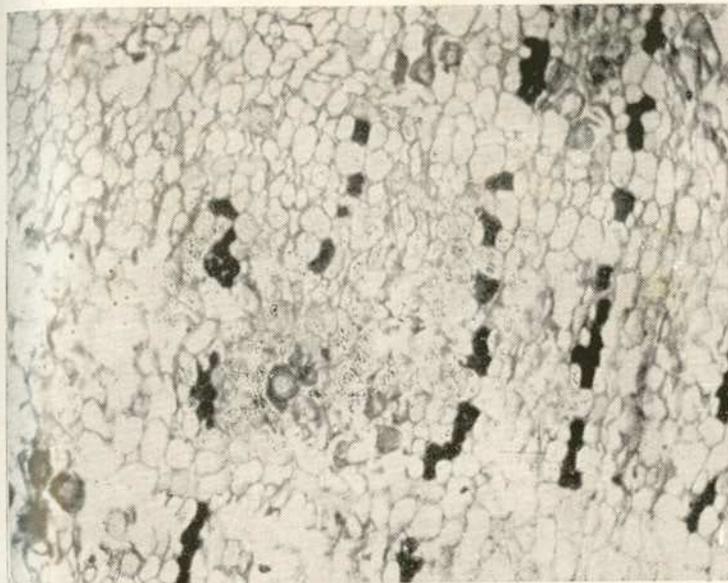
É oportuno lembrar que também na diferenciação dos laticíferos da estrutura primária ocorrem divisões longitudinais previamente à fusão dos protoplastas.

## II

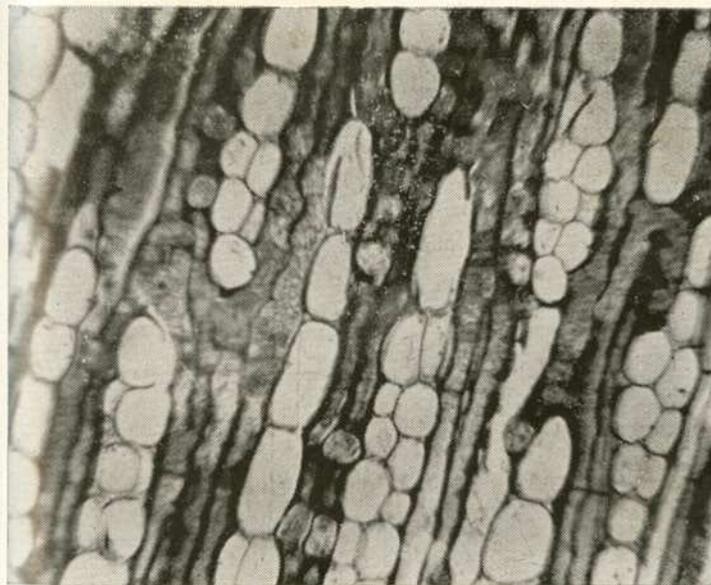
Ao escrevermos a *Nota Previa* (12), assim redigimos o período que rematava as pesquisas sobre a formação dos corpusculos do latex: "Em face das observações acima, somos obrigados a concluir que as gotas de hidrocarbonetos da borracha se originam de modo semelhante ao amilo. Ha, portanto, plastas que os elaboram". A feição particular impressa a esses dois períodos refletiam reconhecimento da dificuldade que representariam para a aceitação do nosso ponto de vista, as conclusões, em sentido oposto, da escola de Guilliermond. Pelo mesmo motivo nos decidimos a realizar novas investigações comprobatorias do acerto da nossa conclusão. Estas constituirão o assunto do presente Capítulo.

Antes de expô-las, convem ressaltar que durante a elaboração deste trabalho tivemos notícia, através do *Biological Abstracts*, vol. 21, nº 7, de 1947, dos resultados paralelos, publicados no mesmo ano que os nossos, na Rússia. Transcrevemos, aqui, o referido Abstract: 18.261 — *Synthesis of rubber by plastids*, by Prokofiev, A. A. — *Botanicheskii Zhurnal SSSR (Jour. Bot. URSS)* 31 (2) : 5-9. 1946.

"Changes in the size and in the shape of latex globules during the ontogeny of tau-saghyz, krym-saghyz and kok-saghyz were detd. The chemical nature of the peripheral layer in such globules was revealey by microchemical tests. That synthesis of rubber in a plant takes place in plastids was concluded from the following observations: changes in the latex globules during ontogeny are similar to those during the development of starch grains; peripheral layer of a latex globule consists of proteins".

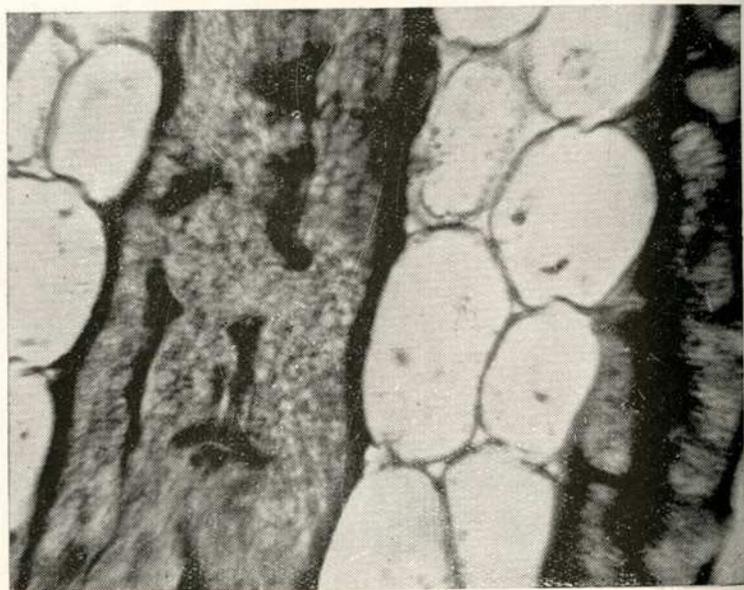


A



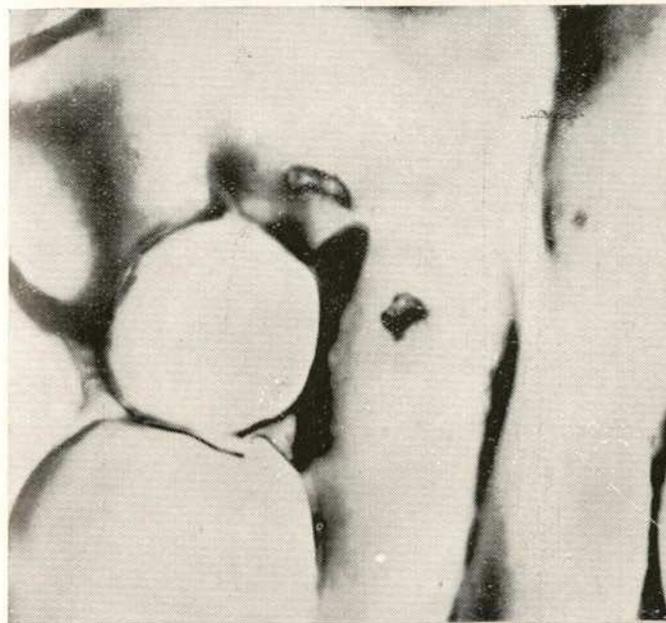
B

Fotomicros: A.  $\pm 200 \times$  ; B.  $\pm 200 \times$

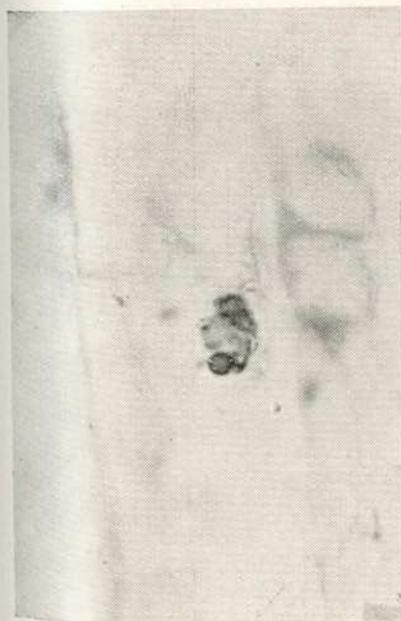


C

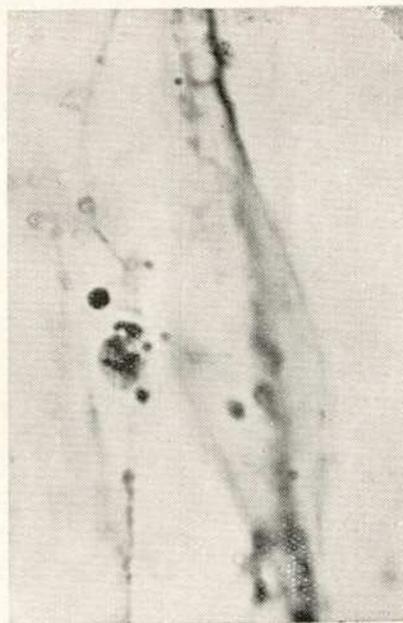
Fotomicro: C.  $\pm$  650  $\times$



1



2

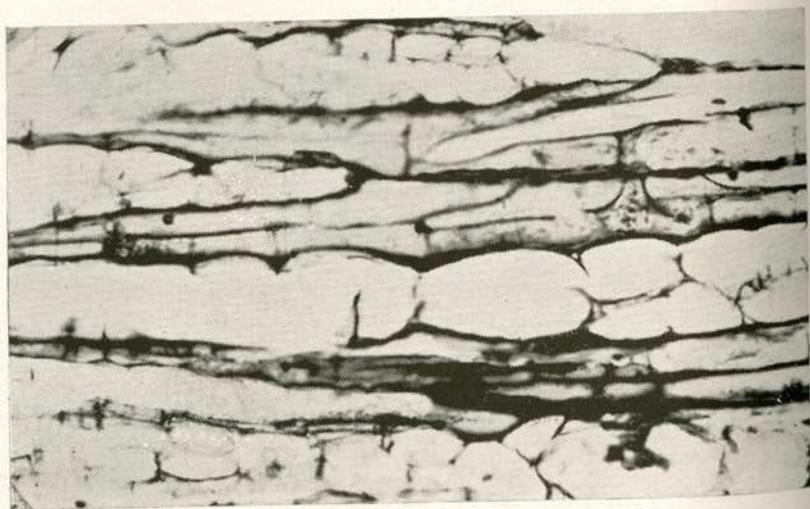


3

Fotomicrografias: 1. 1250  $\times$   
2. 1250  $\times$   
3. 1250  $\times$

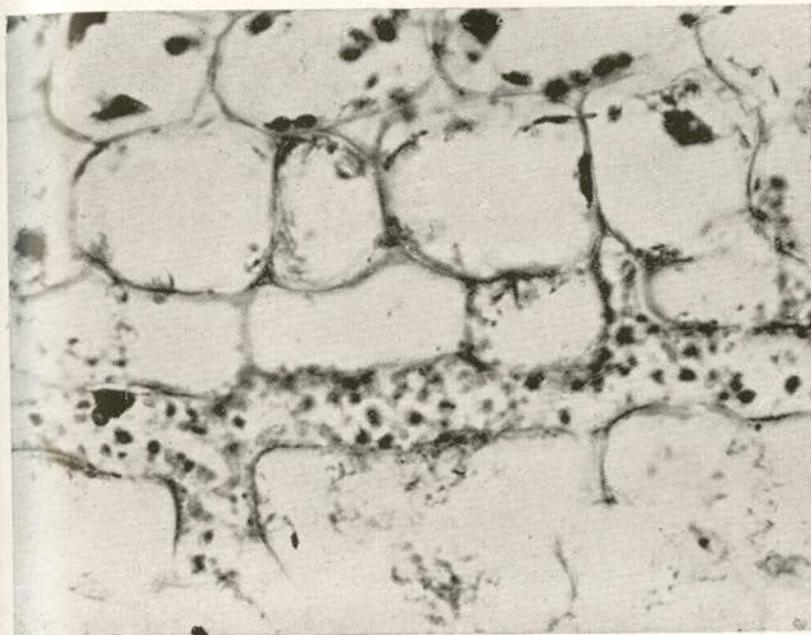


4

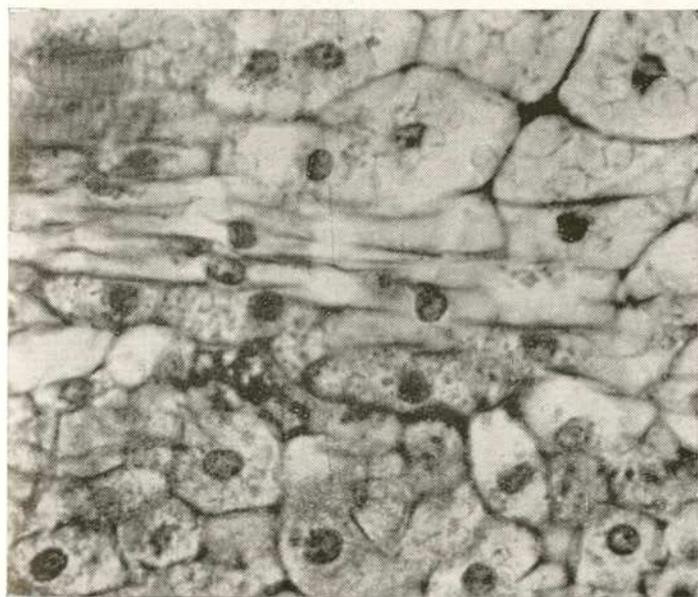


5

Fotomicrografias: 4. — 665 X  
5. — 280 X

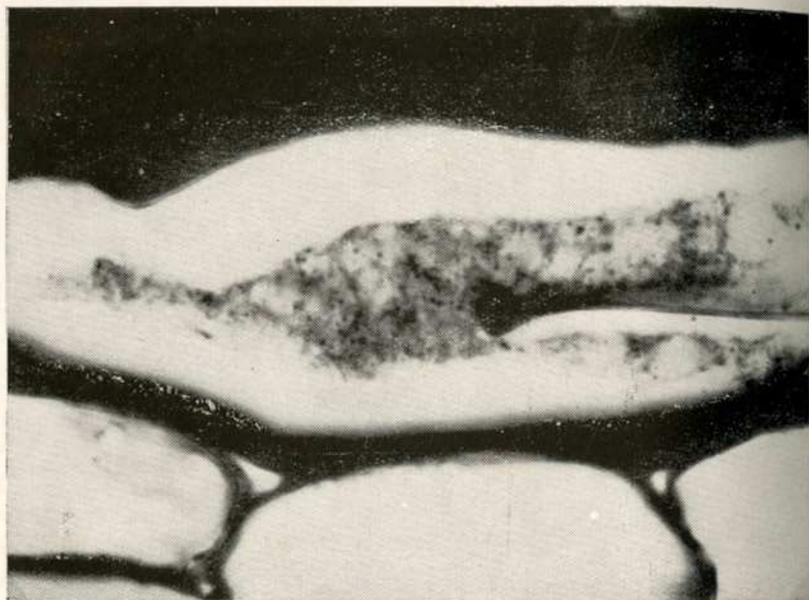


6

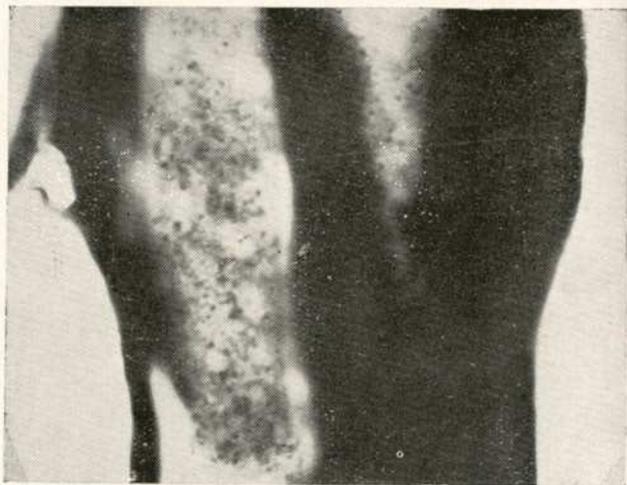


7

Fotomicrografias: 6. — 840 X  
7. — 665 X

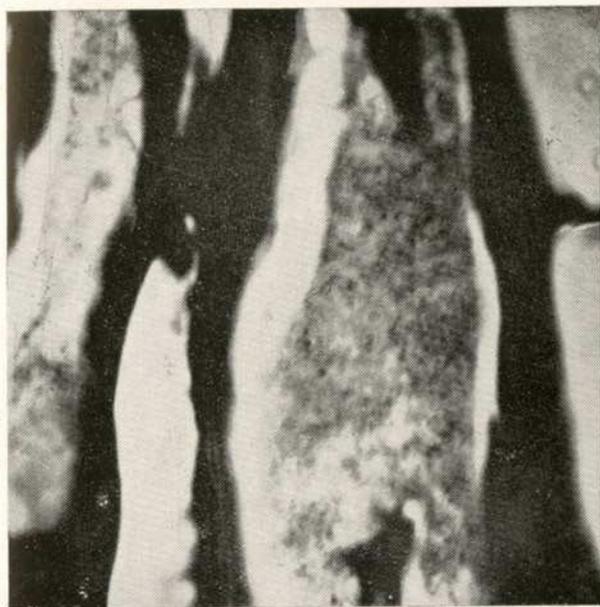


8

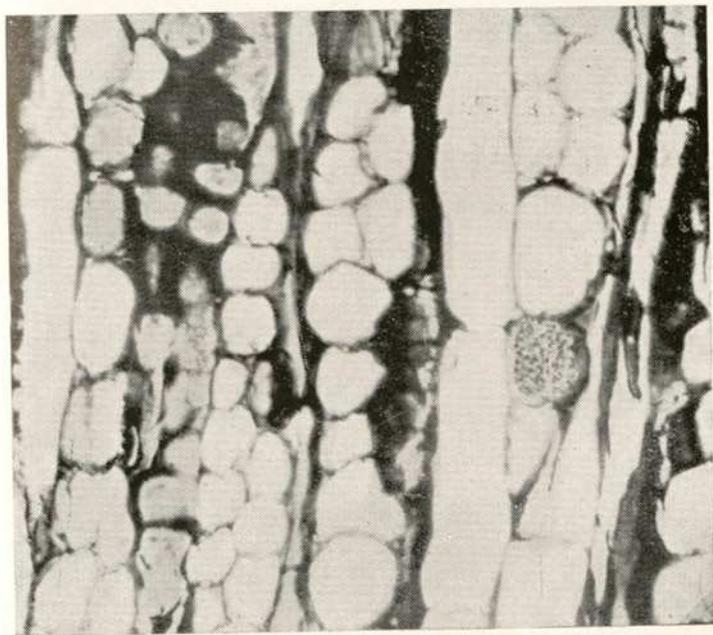


9

Fotomicrografias: 8. — 1250 X  
9. — 1250 X

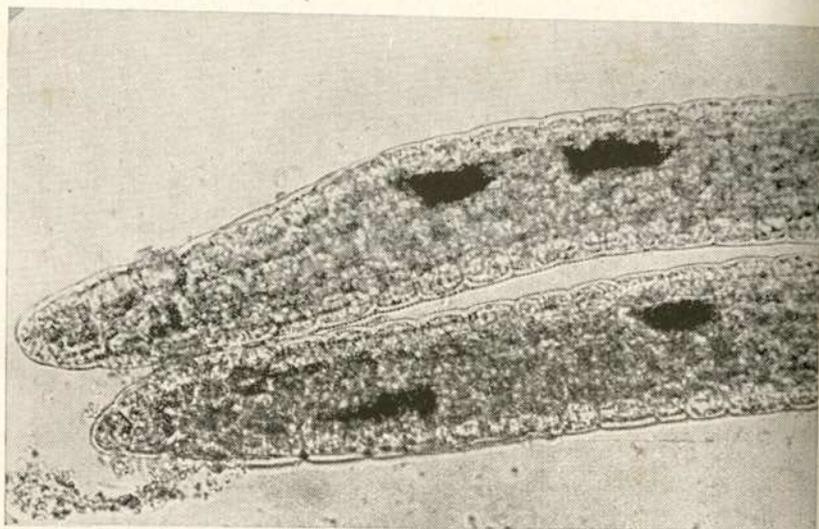


10



11

Fotomicrografias: 10. — 1250 X  
11. — 250 X



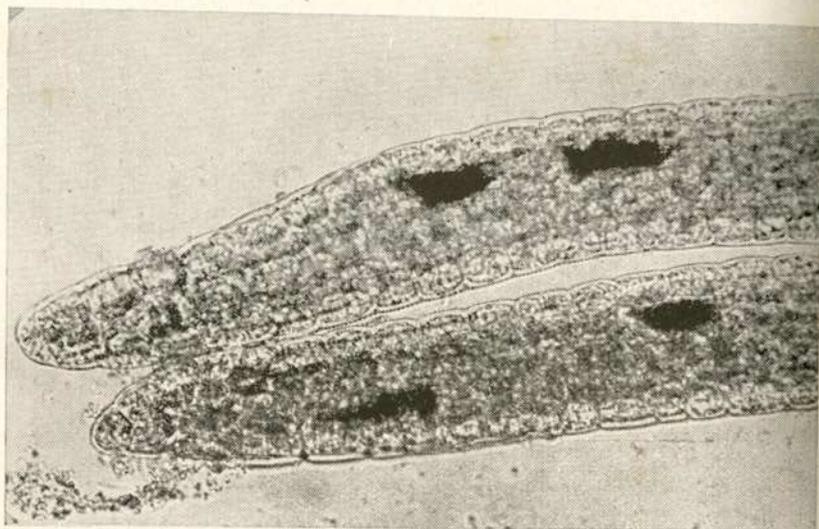
12

Fotomicrografias: 12. — 280 X

Parece-nos desnecessario encarecer o que representam tais resultados, obtidos em plantas diferentes das que examinamos, para a nossa tese.

As pesquisas foram efetuadas em *Hevea brasiliensis* e *Manihot Glaziovii*. Brotos da primeira espécie, colhidos em plantas jovens (6 meses e 1 ano de idade) foram fixados em Benda, mistura que havia proporcionado os melhores resultados nos primeiros estudos. As lâminas, obtidas pelos processos usuais, foram submetidas a diversas colorações, depois de branqueadas pela agua oxigenada-alcool. Belas preparações foram conseguidas colorindo pela hematoxilina ferrica e, após diferenciação adequada, pela safranina hidroalcoolica durante 15 minutos; após desidratação e diferenciação na serie alcoolica, cora-se pelo verde rápido em oleo de cravo. Examinando detidamente tais lâminas, vimos que em certos laticíferos, situados no limite do cilindro central e no cortex, os plastídeos productores de borracha podem atingir dimensões maiores que as comunmente observadas nos tubos que constituem a maior parte do sistema principal. Porque, alem disso, tais plastas costumam ser muito menos numerosos que naqueles tubos, constituem as citadas células, objeto favoravel á observação das transformações dos plastídeos. Na fotomicrografia 6 aparecem algumas dessas células fusionadas. O núcleo visível está expulsando um globulo nucleolar. Bastante variáveis quanto ao tamanho e à cromaticidade, sobressaem os plastídeos. A porção fortemente colorida (pela hematoxilina e safranina) é o estroma; a película proteica que envolve o hidrocarboneto está corada pelo verde rápido. Podemos, aí, observar varias fases da secreção da borracha e notar que a gota de hidrocarboneto não surge regularmente no centro do plasta, mas, ao contrario, é geralmente excentrica.

Outra coloração que proporcionou preparações de valor para o ponto de vista em exame, resultou do emprêgo da fuchsin de Altmann. Por essa maneira quizemos comprovar que tais corpúsculos, cuja evolução particular nos laticíferos descrevêramos, são realmente plastídeos. O aspecto fixado pela fotomicrografia 7 apresenta algumas células laticíferas jovens, situadas na face externa do líber, cujos limites respectivos ainda são distintos. É bem conspicuo seu plastidoma, abundante; os



12

Fotomicrografias: 12. — 280 X

Parece-nos desnecessario encarecer o que representam tais resultados, obtidos em plantas diferentes das que examinamos, para a nossa tese.

As pesquisas foram efetuadas em *Hevea brasiliensis* e *Manihot Glaziovii*. Brotos da primeira espécie, colhidos em plantas jovens (6 meses e 1 ano de idade) foram fixados em Benda, mistura que havia proporcionado os melhores resultados nos primeiros estudos. As lâminas, obtidas pelos processos usuais, foram submetidas a diversas colorações, depois de branqueadas pela agua oxigenada-alcool. Belas preparações foram conseguidas colorindo pela hematoxilina ferrica e, após diferenciação adequada, pela safranina hidroalcoolica durante 15 minutos; após desidratação e diferenciação na serie alcoolica, cora-se pelo verde rápido em oleo de cravo. Examinando detidamente tais lâminas, vimos que em certos laticíferos, situados no limite do cilindro central e no cortex, os plastídeos productores de borracha podem atingir dimensões maiores que as comunmente observadas nos tubos que constituem a maior parte do sistema principal. Porque, alem disso, tais plastas costumam ser muito menos numerosos que naqueles tubos, constituem as citadas células, objeto favoravel á observação das transformações dos plastídeos. Na fotomicrografia 6 aparecem algumas dessas células fusionadas. O núcleo visível está expulsando um globulo nucleolar. Bastante variáveis quanto ao tamanho e à cromaticidade, sobressaem os plastídeos. A porção fortemente colorida (pela hematoxilina e safranina) é o estroma; a película proteica que envolve o hidrocarboneto está corada pelo verde rápido. Podemos, aí, observar varias fases da secreção da borracha e notar que a gota de hidrocarboneto não surge regularmente no centro do plasta, mas, ao contrario, é geralmente excentrica.

Outra coloração que proporcionou preparações de valor para o ponto de vista em exame, resultou do emprêgo da fuchsin de Altmann. Por essa maneira quizemos comprovar que tais corpúsculos, cuja evolução particular nos laticíferos descrevêramos, são realmente plastídeos. O aspecto fixado pela fotomicrografia 7 apresenta algumas células laticíferas jovens, situadas na face externa do líber, cujos limites respectivos ainda são distintos. É bem conspicuo seu plastidoma, abundante; os

plastídeos, em fase de crescimento, estão coloridos intensamente de vermelho e aparecem escuros por havermos operado com filtro verde. Nos parênquimas situados para dentro e para fóra dos laticíferos, os plastídeos já fabricaram amilo, perdendo, assim, sua cromaticidade.

A resolução de estudarmos a histogênese dos laticíferos secundários de *Manihot Glaziovii*, prende-se ao fato, observado por varios autores e reproduzido por Memmler (10) em seu livro, de possuir o latex de tais vasos partículas alongadas sob a forma de bastões. Se, realmente, os corpúsculos arredondados do latex de *Hevea* são produzidos por plastídeos, mais ou menos esféricos, os que caracterizam a borracha de *Manihot Glaziovii* deverão se-lo por plastas alongados. Assim raciocinamos, e encetamos as pesquisas com o fito de fornecermos mais uma prova indireta, mas decisiva, de que o hidrocarboneto era secretado pelo plastidoma.

O material, casca de exemplar arbóreo, vigoroso, foi fixado numa mistura, em partes iguais, de liquido de Zirkle e ácido osmico a 1 %; o emprego desse fixador foi-nos sugerido pela leitura do trabalho recente de Newcomer (13) que aconselhava-aquele líquido como dos mais convenientes ao estudo do plastidoma. Juntamos ácido osmico para conservar o hidrocarboneto.

No micrótopo rotatorio de Spencer executamos cortes transversais e tangenciais.

Já é bem conhecida a distribuição e disposição anatomica dos laticíferos secundários da maniçoba. Ha, especialmente, dois desenhos do livro de Wiesner (18) reproduzidos em varios trabalhos posteriores e que retraçam com fidelidade, a anatomia do líber secundário e a disposição dos vasos de latex. O corte transversal revela-nos aneis tangenciais de latíferos, separados por outros, muito mais espessos, de vasos crivados, células companheiras e parênquima liberiano. Os aneis laticíferos não são completos, mas interrompidos pelos raios do líber. Isto se deve a que sómente as iniciais fusiformes dão origem áqueles tubos.

Á medida que nos afastamos do câmbio, torna-se menos evidente a regularidade da disposição descrita, e isso porque certos elementos dos raios aumentam de volume ou se dividem, principalmente em direção tangencial, ao passo que surgem

elementos esclerosados. Estes, como afirmamos em outra oportunidade (11) se originam de séries de parênquima cristalífero, e começam a se diferenciar quando aparecem sinais de evidente redissolução dos cristais respectivos. A fotomicrografia (A), a cores, reproduz um aspecto desses cortes. Distinguem-se aí os laticíferos pelo conteúdo negro, fixado e colorido pelo ácido osmico (sem branqueamento). Os esclerócitos estão coloridos de vermelho pela safranina e as paredes celulosicas dos demais elementos, de verde pelo "fast green".

A fotomicrografia B, também a cores, do corte tangencial, confirma o que foi dito linhas atrás: todas as iniciais fusiformes dão origem a tubos laticíferos, ao passo que isso não sucede com as isodiamétricas.

No corte, sujeito a branqueamento leve e coloração pela hematoxilina ferrica, observa-se, em certos tubos, o conteúdo formado principalmente pelos bastões ou filamentos de borracha, com a côr parda ou "bistre" conferida pelo ácido osmico, e uns poucos núcleos. As aberturas (parede tangencial) representam pontos de anastomose. Vale notar a forma irregular e caprichosa que assumem certos elementos dos laticíferos, constituindo alças que podem permanecer relativamente isoladas, inalteradas quanto ao conteúdo, permitindo observação vital.

Para a tarefa principal que nos propuzemos, preparamos lâminas tangenciais e as colorimos, após tratamento mais ou menos prolongado pela mistura de agua oxigenada e alcool, com hematoxilina ferrica. O branqueamento é a fase crítica do processo.

Nas fases iniciais da diferenciação pudemos observar um vacuoma bem definido, com vacúolos de tamanho variavel, sempre relativamente pequeno (Fotomicrografia 8). O condrioma e o plastidoma são abundantes e representados por corpúsculos arredondados (mitocondrios) e por pequenos bastões (condriocotes). Nem sempre é facil caracterizar estes últimos que se orientam de maneira muito variavel, ás vezes oblíqua, ou transversalmente. Outra razão frequente dessa dificuldade é apresentarem eles dilatações mais coraveis, semelhando fileiras de condriossomas (condriomitos).

Na fase seguinte (Fotomicrografia 9) os vacúolos tornam-se muito menores, regulares e escassos. Os condriocotes pare-

cem mais numerosos e desenvolvem-se, conservando, com frequência, o aspecto granuloso já assinalado. De modo geral, o condrioma-plastidoma apresenta-se mais denso.

A fase que coincide com o princípio da secreção do hidrocarboneto caracteriza-se pela ausência quase completa de vacúolos. (Fotomicrografia 10). Os plastas, plenamente desenvolvidos, tornam-se bem visíveis. São alongados em bastão ou menores e esféricos. Esta visibilidade diminui, porém, logo a seguir, quando surgem os hidrocarbonetos em seu estroma, o qual deixa de corar-se pela hematoxilina férrica.

A fotomicrografia colorida, (C) estampa uma fase adiantada da secreção: dentre os numerosos bastões, encontramos alguns corados total ou parcialmente pela hematoxilina; a maioria, porém, exibe coloração pardacenta, devida aos hidrocarbonetos que reduziram o ácido osmíco do fixador.

Do exame das preparações mais favoráveis, colhemos a impressão de que o aparecimento dos hidrocarbonetos nos plastas em bastão se efetua sob a forma de gotas dispostas ao longo do estroma. Nas colorações pela hematoxilina férrica, tais gotas se apresentam como regiões pálidas que alternam com granulações bem coloridas. Estas vão desaparecendo progressivamente à medida que crescem as gotas. Em geral as duas extremidades do plasta permanecem bem coradas por bastante tempo, constituindo as granulações que por último desaparecem.

À guisa de conclusão podemos dizer que a comprovação da existência, nas células laticíferas jovens do sistema secundário da maníoba, dos plastas alongados, previstos pela tese do plastidoma, assim como a observação de sua atividade secretora, reforçam de modo decisivo a tese mencionada anteriormente.

### III

Foram as seguintes, as duas primeiras conclusões da *Nota Previa* (12):

1) "O latex nos laticíferos do embrião de *H. brasiliensis* e em certas fases do desenvolvimento dos condutos da estrutura primária do caule (como também nas células jovens dos pétalos de *Chelidonium*, segundo Popovici) é indiscutivelmente

protoplasmico, correspondendo ao plasmasol; estreita camada de protoplasma existe certamente, em contacto com a parede e constitui o plasmagel.

2) Nos condutos maduros da estrutura secundária de *H. brasiliensis*, o latex deve ser também protoplasmico porque não se cora pelo vermelho neutro e porque encerra, às vezes, alguns vacúolos pequenos. O exame do processo histogênico revela que o vacuoma, depois de subdividir-se em numerosíssimos pequenos vacúolos, reduz-se progressivamente pelo desaparecimento dos mesmos".

Nas pesquisas ora realizadas tivemos por escopo confirmar e ampliar os resultados acima.

Preliminarmente convém ressaltar que as observações efetuadas em preparações fixadas e coloridas de *M. Glaziovii*, relatadas em II, permitem traçar para o vacuoma a mesma evolução antes descrita para *H. brasiliensis*. As fotomicrografias (8), (9), e (10) retratam as principais fases do processo, no qual os vacúolos se subdividem, diminuindo de volume e progressivamente desaparecem, mediante hidratação do citoplasma. O método usado nas novas pesquisas foi o da coloração vital pelo vermelho neutro, considerado, principalmente por Guilliermond (7) como o menos tóxico dos corantes empregados para este fim.

Fragmentos de casca, incluindo o câmbio, foram retirados do exemplar arbóreo de *M. Glaziovii*, já referido, e transportados imediatamente para o laboratório. Obtidos os cortes pelo micrótomo de Jung e colocados em solução a 1/20.000 de vermelho neutro em água filtrada, submetem-se ao exame microscópico durante um prazo que, somado ao tempo gasto com as diversas operações preparatorias, não excede se a duas horas e meia.

Durante a coleta I do material, e mesmo ao micrótomo, são naturalmente lesados os tubos laticíferos; mas, a disposição destes, e especialmente as alças e anastomoses que eles formam, permitem, como acentuamos páginas atrás, a propósito da fotomicrografia colorida (B), permaneçam certos segmentos relativamente isolados e inalterados. Tal como em *Hevea*, essas porções ainda vivas mostram as partículas de latex animadas de movimento browniano. Em consequência das diver-

sas observações que temos feito, e especialmente em células íntegras, como será descrito adiante, temos o direito de tomar tal movimento como condição *sine qua non* de vitalidade. É provável que sua simples ocorrência não seja capaz de assegurar-nos a integridade do protoplasma; é certo, porém, que sua simples ausência será suficiente para comprovar profunda alteração celular.

O fato mais constante de todas as nossas observações foi a não colorabilidade do latex pelo vermelho neutro. Tal coloração só aparecia, e mesmo assim, algumas vezes, após a cessação dos movimentos e a formação evidente de coágulos. Em geral essa coloração surgia nas extremidades do corte onde os laticíferos estavam mais lesados e seus conteúdos em contacto directo com o líquido de montagem. Frequentemente a pequena distancia desses pontos, onde havia latex imóvel, colorido, mostravam os tubos, conteúdo incolor animado de movimentos brownianos. A propósito dessa coloração *post-mortem* do latex devemos lembrar que, nas mesmas condições, os verdadeiros vacúolos se descoram, como acentuam Guilliermond (7), Dan-gard (4) e varios outros Autores.

Enquanto assim se comportavam os laticíferos, todos os elementos parenquimatosos proximos exibiam nítida coloração vacuolar. Entre estes elementos ha um tipo que merece particular menção.

Na rede de laticíferos secundários da maniçoba, como vimos ha pouco, os raios representam falhas. Mas, na vizinhança dessa rede, certas células radiais apresentam, ás vezes, conteúdo latescente. A fotomicrografia (11) deixa ver uma dessas células. Nesta pode-se notar que o latex, além dos filamentos habituais, apresenta pequeninas esferas fortemente coradas. O exame do material vivo em solução de vermelho neutro demonstrou que tais esferas se coram de vermelho intenso, ao passo que o resto do conteúdo, vivamente agitado pelo movimento das partículas, se mantem incolôr. Pode-se ver, facilmente, que os filamentos com frequência se chocam contra tais esferas e as deslocam. A tonalidade da cor dessas esferas indica um conteúdo ácido; sua fixação e coloração nas lâminas explica-se, então, claramente: trata-se de vacúolos ricos em substâncias de natureza fenólica, provavelmente tanoides.

A observação dessas células demonstra claramente dois fatos importantes:

1º) O latex de células vivas, inteiras, tem suas partículas animadas de movimento browniano;

2º) O mesmo latex, em tais células, apresenta vacúolos tanoides típicos e, portanto, não pode ser ele proprio, vacuolar.

#### IV

As investigações que realizamos em *Apinagia Accorsii* resultaram da leitura do trabalho de Went (17) em pról da teoria vacuolar.

Suas pesquisas nas *Podostemonaceae* atraíram-nos particularmente porque com tais plantas era possível examinar células laticíferas de uma planta, no seu meio habitual, aquoso. Além disso, segundo as proprias palavras do Autor, — “the small cells of the gills or warts were investigated, because parts could easily be brought under the microscope without much dissection”.

Os resultados dessas pesquisas, na verdade já antigas, não nos parecem ponderosos para a tese em discussão. Pelo menos, no que se refere a observações *in vivo*, somente dois fatos são apresentados:

1º) “After treatment with glycerine plasmolysis did occur. . . The protoplasm has now contracted but the peripheral part is still to be seen, partly as thin threads. . . Generally, the conclusion could be drawn from these and other similar plasmolytic experiments that the secretory masses are lying in the cellsaps. . .”

Parece-nos obvio que exatamente a mesma coisa sucederia se, em lugar de vacúolo cercado por citoplasma parietal, houvesse uma massa protoplasmática fortemente hidratada.

2º) “The first indication that one has to do with a secretory cell is the appearance of a few very small particles or little drops in the cellsap, which show a lively Brownian movement. Gradually the number of these particles increases and at the same time their movements decrease till at last they stop.

entirely; it looks as if these small masses gradually flow together”.

Julgamos de pouco proveito para a tese vacuolar o trecho acima. O processo secretor é aí descrito de maneira muito vaga, sem que se faça menção da técnica usada pelo Autor (supomos que tenha observado a fresco) e está ilustrado, no original, por desenhos nada sugestivos. Termina, além disso, por uma asserção que consideramos fruto de observação incorréta — a ausência de movimentos brownianos nas células laticíferas maduras.

Por outro lado, quem tenha examinado tais células *in vivo*, nos lacinios de *Podostemonaceae*, julgará precárias quaisquer conclusões sobre a secreção, baseadas neste tipo de exame, por isso que os próprios elementos plenamente diferenciados são às vezes difíceis de reconhecer; assim, pretender caracterizá-los no início da diferenciação, por esse modo, parece-nos imprudente.

Nossas pesquisas nesse terreno tiveram por finalidade única, indagar qual o comportamento, em coloração vital, das células laticíferas íntegras, situadas em lacinios que haviam apenas sido separados da planta e eram observados em meio aquoso a que estavam habituados.

Como aqui pelos arredores não ha *Podostemonaceae*, pedimo-las ao Prof. Accorsi que está estudando tais plantas no Salto de Piracicaba. Dos exemplares vivos (envoltos em musgo úmido), remetidos, elegemos como mais próprios ao estudo que nos propuzemos os pertencentes à espécie *Apinagia Accorsii*, Toledo. Para mante-los vivos por 24 horas foi necessário colocá-los em água corrente; os que mantivemos em água parada, ao fim do mesmo prazo já estavam mortos e cercados por grande quantidade de bactérias e fungos, aos quais parecem oferecer resistencia mínima.

Sob microscópio binocular de dissecação, cortávamos da planta, disposta num vidro de relógio com água filtrada, um certo número de lacinios que eram logo transportados com um pincel para a solução de vermelho neutro e montados na mesma solução para exame ao microscópio. Preliminarmente efetuamos a mesma operação e examinamos os lacinios a fresco, em água filtrada. Pudemos, assim, verificar que as células laticíferas

apresentavam conteúdo levemente colorido de amarelo, animado de movimentos brownianos vivos. Ainda mais, esses movimentos constituíam o melhor critério para seu reconhecimento com aumentos pequenos. Acham-se elas em número razoável nos lacinios, onde se situam sob a epiderme. Procuramos, sem sucesso, identificar, junto à extremidade do lacinio, tais células no início da diferenciação; em muitos elementos, podem-se observar algumas partículas, de natureza vária, movendo-se no suco vacuolar.

Para a coloração vital obtivemos resultados melhores com soluções de vermelho neutro a 1 : 10.000 e 1 : 5.000.

Nessas soluções, relativamente concentradas, observamos constantemente o seguinte: a grande maioria das células apresentava, quase instantaneamente, seus vacúolos palidamente corados; no interior dos mesmos, porém, surgiam granulações ou precipitados de um vermelho escuro que em pouco se reuniam em uma massa geralmente central ou, às vezes, deslocada para uma das parêdes; enquanto isso, os laticíferos permaneciam com a côr anterior, e não formavam qualquer precipitado colorido.

O fenômeno aqui apontado da precipitação do conteúdo vacuolar já tem sido estudado e descrito por varios autores e especialmente a Bailey & Zirkle (1), Dangeard (4) e Guilliermond (7), sendo considerado como resultante da intereção do corante e dos coloides vacuolares.

Prolongando-se a observação suficientemente, notava-se que os vacúolos tomavam uma côr mais acentuada ao passo que as células de latex não apresentavam alteração, desde que as partículas continuassem a se mover. Mal, porém, cessava o movimento, começava o conteúdo a colorir-se progressivamente. A mesma coloração do latex imóvel conseguimos, aliás, em plantas cuja vitalidade estava comprometida.

Todos esses fatos são nitidamente favoráveis á teoria protoplasmica do latex. A esse proposito parece-nos muito significativo o seguinte trecho do livro de Guilliermond (7): “Another point very clear from our investigations is that staining of vacuoles by neutral red is essentially a vital phenomenon. As a matter of fact, although neutral red is only slightly toxic, if used in too strong concentration, it may cause

the death of the cell. This is preceded by an increase in the refractivity of the cytoplasm. Then suddenly the vacuoles become colorless, whereas the entire cytoplasm takes on a dark color".

Para terminar, devemos dizer que o latex de *Apinagia Accorsii* reduz com pouca intensidade o ácido osmico, tomando coloração "bistre" pálida.

Lacínios fixados na mistura de Benda não permitiram a identificação rápida dos elementos laticíferos. Entretanto, por acaso, encontramos o meio de caracteriza-los facilmente. Um grupo de lacínios que haviam sido observados em coloração vital com o vermelho neutro, foram por nós colocados, ainda impregnados dessa coloração, no fixador de Benda. Ao dia seguinte, 20 horas depois, pudemos apreciar o aspecto reproduzido na fotomicrografia (12). O conteúdo das células laticíferas apresentava-se fixado e fortemente colorido de vermelho-negro.

#### CONCLUSÕES

As conclusões das presentes pesquisas podem resumir-se do seguinte modo:

- 1) A extrusão nucleolar foi observada nos laticíferos da estrutura secundária de *Hevea brasiliensis* e *Manihot Glaziovii*.
- 2) Foi verificada, igualmente, a ocorrência da referida extrusão nos elementos crivados das duas mencionadas espécies.
- 3) Fizeram-se considerações sobre a origem do sistema laticífero hipodérmico de *H. brasiliensis*, com base em observações microscópicas.
- 4) Verificou-se, com novas observações, a formação dos corpúsculos da borracha da *H. brasiliensis* pelo plastidoma das respectivas células.
- 5) Comprovou-se a existência de plastas alongados, responsáveis pelo aparecimento dos "bastões" no latex de *M. Glaziovii*, e descreveu-se o comportamento das células laticíferas durante a histogênese.
- 6) O método de coloração vital pelo vermelho neutro permitiu estudar as células laticíferas vivas, cujo conteúdo, sempre animado de movimentos brownianos, não se cõra. A coloração

sõmente aparece quando cessam os movimentos. O latex comporta-se, portanto, como o protoplasma.

7) O mesmo método, aplicado à podostemonacea *Apinagia Accorsii*, proporcionou idênticos resultados em material que pôde ser observado com um mínimo de manipulação e possíveis alterações.

#### BIBLIOGRAFIA

- (1) BAILEY, J. W., *The Cambium and its Derivative Tissues. VI. The Effects of Hydrogen Ion Concentration in Vital Staining.* - *The Journ. Gen. Physiol.* 14 (1931).
- (2) CALVERT, A., *The laticiferous tissue in the Stem of Hevea brasiliensis* - *Ann. of Bot.*, 1 (1887).
- (3) CALVERT, A. & BOODLE, L. A., *On laticiferous tissue in the pith of Manihot Glaziovii and on the presence of nuclei in this tissue* - *Ann. of Bot.*, 1 (1887).
- (4) DANGEARD, P., *Cytologie Végétale et Cytologie Générale* - Paris (1947).
- (5) ENGARD, C. J., *Organogenesis in Rubus* - *Univ. of Hawaii Res. Publ.*, 21 (1944).
- (6) ESAU, K., *A Study of Some Sieve - Tube Inclusions* - *Am. Jour. Bot.*, 34 (1947).
- (7) GUILLIERMOND, A., *The Cytoplasm of the Plant Cell* - Waltham - (1941).
- (8) HABERLANDT, G., *Physiological Plant Anatomy* - London (1928).
- (9) JOHOW, F., *Untersuchungen über die Zellkerne in den Secretbehältern und Parenchymzellen der höheren Monokotylen* - *Inaug. Diss. Bonn* (1880).
- (10) MEMMLER, K., *The Science of Rubber* - New York (1934).
- (11) MILANEZ, F. R., *Anatomia do Lenho de Aspidosperma aquaticum Ducke.* - *Arch. Inst. Biol. Veg.*, 4 (1937).
- (12) MILANEZ, F. R., *Nota Previa sobre os Laticíferos de Hevea brasiliensis.* - *Arq. Serv. Florestal*, 2 (Nº 2) (1946).
- (13) NEWCOMER, E. H., *Concerning the Quality of the Mitochondria and the validity of the Osmiophilic Platelets in Palms.* - *Am. Journ. of Bot.* 33 (1946).
- (14) SEMMENS, S. C. & BHADURI, P. N., *A Technic for Differential Staining of Nucleoli and Chromosomes.* - *Stain Tech.*, 14 (1939).
- (15) SEMMENS, S. C., *Staining the Nucleolus.* - *Stain Tech.*, 16 (1941).
- (16) SPERLICH, A., *Das trophische Parenchym. B. Exkretionsgewebe.* - *Handbuch der Pflanzenanatomie.* 4 - Berlin (1939).
- (17) WENT, F. A. F. C., *Latex as a constituent of the Cell-Sap.* - *Proc. Kon. Akad. von Wetenschappen* - 29 (1926).
- (18) WIESNER, J. V., *Die Rohstoffe des Pflanzenreichs.* 2 - Leipzig (1928).

(Presentado al II Congreso Sudamericano de Botánica, Sección Anatomía y Morfología Vegetal, en la sesión del 14 de octubre de 1948).