

# Histogênese de calo de explante caulinar de *Datura insignis* Barb. Rodr.

Solange Faria Lua Figueiredo

Prof. Assistente — UERJ — IB — DBAV — Fisiologia Vegetal

Ricardo Cardoso Vieira

Prof. Auxiliar de Ensino — UFRJ — IB — DB — Fisiologia Vegetal

Maria Aparecida Esquibel

Prof. Adjunto — UFRJ — IBCCF<sup>o</sup> — Fisiologia Vegetal — Programa de Biotecnologia Vegetal

\* Auxílio Financeiro: CNPq, CEPEG, FINEP, BIOMATRIX

Cecília Gonçalves Costa

Pesquisadora do Jardim Botânico do Rio de Janeiro — Seção de Anatomia Vegetal

## Resumo

Calos não-homogêneos e compactos foram induzidos a partir de explantes internodais de *Datura insignis* Barb. Rodr. cultivados em meio B5 (Gamborg, 1968) suplementado com 1mg/l BAP + 0,25 e 1mg/l NAA. A análise histológica do calo revelou que, embora tenham ocorrido divisões periclinais na epiderme, no colênquima e no parênquima cortical, interfascicular e medular, apenas os tecidos situados entre a epiderme e o cilindro central transformaram-se em tecido calogênico. Constatou-se a diferenciação de elementos xilemáticos e centros meristemáticos dispersos pelo calo. Em meio com 1mg/l BAP + 0,25mg de NAA observou-se a presença de estruturas globulares constituídas de células em divisão periclinal com arranjo radial e inúmeros centros meristemáticos. Não foi possível identificar a presença de embriões somáticos, considerando-se os calos como não-embriogênicos.

## Abstract

Compact and non-homogeneous callus were induced to start from internodal explant of *Datura insignis* Barb. Rodr. Cultured on B5 medium (Gamborg *et al.*, 1968) supplemented with 1mg/l BAP + 0,25 and 1mg/l NAA. The callus histological analysis showed that although periclinal division may have occurred in the epidermis, colenchyma and cortical, interfascicular and medullary parenchyma, only the tissues situated between the epidermis and central cylinder were transformed into callogenic tissue. It was observed the differentiation of xilematic elements and meristematic centers dispersed by callus. On a medium with 1 mg/l BAP + 0,25mg NAA was observed the presence of globular structures made up of cells in periclinal division with radial array and many meristematic centers. We could not identify the presence of somatic embryos if one considers the callus as not embryogenic.

## Introdução

A organogênese ou a embriogênese induzida em calos provavelmente ocorre muito cedo, durante a iniciação destes, resultando num agregado organizado de células (Thomas & Street, 1970) que guarda uma capacidade de proliferação, ainda reprimida pela aplicação exógena dos reguladores. Esses calos podem, também, crescer rapidamente, mas com uma linhagem de células não-morfogênicas (Thomas & Wernick, 1978). A importância desses conhecimentos reflete o interesse científico pelos grupos vegetais de indiscutível valor econômico e com alta capacidade regenerativa, que são de extremo significado para pesquisas em embriogênese somática (Vasil & Vasil, 1982).

Através da histogênese do calo é possível acompanhar o desenvolvimento de estruturas morfológicas desde suas fases iniciais de formação. Visto que não foi en-

contrado registro sobre o assunto para *Datura insignis*, tornou-se objeto do presente trabalho a análise histológica da iniciação e desenvolvimento do tecido de calo proveniente de explante caulinar da espécie acima citada, uma vez que Guha & Maheshwari (1964) conseguiram observar o desenvolvimento de embriões *in vitro* a partir da antera de *Datura innoxia* Mill.

## Material e métodos

Secções internodais de caule de *Datura insignis* Barb. Rodr. foram obtidas a partir de plântulas cultivadas *in vitro* em meio de Murashige & Skoog-MS (1962). Os segmentos, com 3 a 5mm de comprimento e aproximadamente 2mm de diâmetro, foram cultivados em tubos de ensaio (25 x 150mm) contendo 15ml de meio nutritivo B5 (Gamborg *et al.*, 1968), selecionado face aos resultados positivos já obtidos com a cultura da espécie (Figueiredo & Esquibel, 1988). As combinações hormonais utilizadas como

promotoras de calogênese foram 1mg/l de benzil-amino-purina (BAP) com 0,25 e 1mg/l de ácido naftaleno-acético (NAA) (Figueiredo & Esquibel, 1987). Os meios foram ajustados para pH 5,5, solidificados com 7g/l de agar e autoclavados a 120°C por 15 minutos. Para cada tratamento a amostragem foi de 20 tubos. As culturas foram incubadas a 25°C sob regime de 16 horas de luz/dia, com intensidade de 2500 lux.

Os calos permaneceram 25 dias em cultura, sendo que em 1mg/l BAP + 0,25mg/l NAA o período de incubação estendeu-se até 60 dias, sem subcultura. Após 0, 3, 5, 10, 15, 20, 25 e 60 dias em cultura foram fixados em FAA (etanol 50° GL) e submetidos aos processos usuais de histologia vegetal (Johansen, 1940). Cortes seriados transversais, com espessura de 12 µm, obtidos com o auxílio de micrótomo rotativo de Spencer, foram corados pela combinação Astrablau x Fucsina básica (Braga, 1977). A documentação foi feita por meio de desenho obtido com o auxílio da câmara clara, acoplada ao Microscópio Ótico, e as fotomicrografias foram realizadas com Microscópio Micro-nal Olympus BH2.

## Resultados

Secções transversais de caules cultivados *in vitro* revelam epiderme uniestratificada com cutícula delgada e a presença de tricomas glandulares e tectores bicelulares. O tecido de sustentação, representado pelo colênquima do tipo angular, constitui-se de 3-4 camadas de células. O parênquima cortical é formado por células aproximadamente isodiamétricas e mostra em sua camada mais interna elevado conteúdo amilífero. O sistema vascular acha-se constituído por feixes do tipo bicolateral e a região medular é ocupada por células parenquimáticas heterodimensionais (Fig. 1).

Após três dias de incubação observa-se uma alteração diferencial e irregular na superfície periférica do explante, sobretudo na região que não está em contato com o meio de cultura. A análise histológica mostra células em divisão periclinal na epiderme, no colênquima e nas células parenquimáticas, com maior freqüência no parênquima perivascular (Figs. 2 e 3). Paralelamente ocorre aumento de volume celular, sobretudo nas células do colênquima e dos parênquimas cortical e vascular.

As células resultantes das divisões iniciais contribuem para a formação de um tecido de *calo claro*, com aspecto homogêneo, já visível cinco dias após o cultivo. Observa-se intensa divisão das células epidérmicas e das camadas corticais, que se agrupam em fileiras radiais (Fig. 4). Na região vascular há formação de novos elementos xilemáticos (Fig. 5).

Entre o 10º e o 15º dias de cultura ocorre um acentuado desenvolvimento do tecido do calo, decorrente de

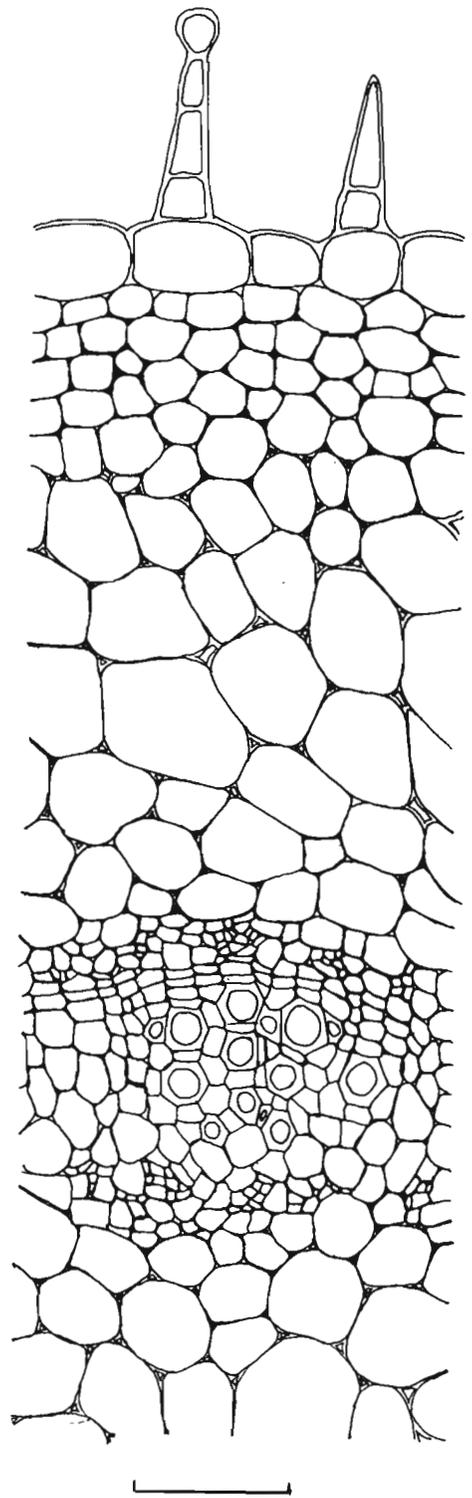


Fig. 1 Esquema do caule de *Datura insignis* Barb. Rodr. cultivado *in vitro*; secção transversal.

uma proliferação desordenada das células parenquimáticas, que empurram a epiderme para o exterior, culminando com sua ruptura. Distribuídos pela região periférica do calo, observa-se a presença de centros meristemáticos, com diferenciação de grupos vasculares independentes do cilindro vascular do explante caulinar (Figs. 6 e 7). Além

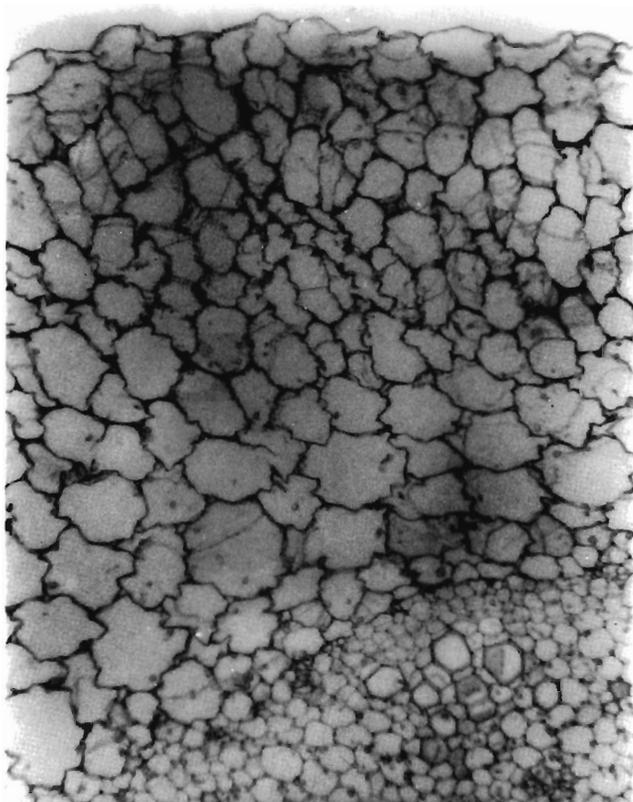


Fig. 2. Secção transversal de explante caulinar, após três dias em cultura, mostrando divisão periclinal em células da epiderme e das camadas corticais. MO. 197x.

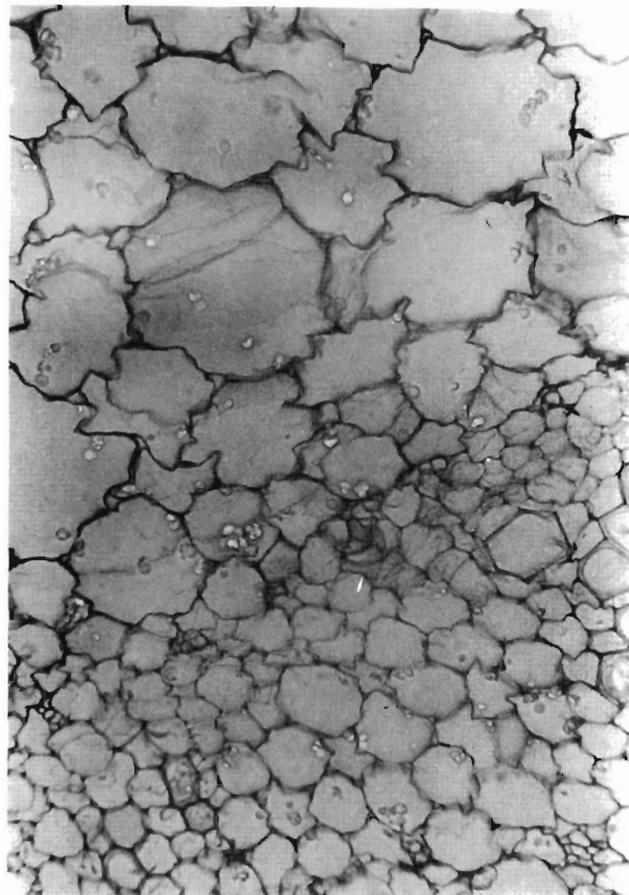


Fig. 3. Detalhe do parênquima perivascular em divisão observado em explante caulinar, após três dias em cultura. MO. 294x.

desses centros, diferenciam-se, com menor freqüência, elementos xilêmáticos, dispersos pelo tecido do calo (Fig. 8). Constata-se, ainda, um aumento localizado do número de camadas do sistema vascular do caule (Fig. 9), bem como uma divisão intensa nas células da região medular (Fig. 10).

Até o 25º dia de cultura não se verifica alteração em relação à coloração bege-clara e à consistência compacta dos calos (Fig. 11), e o padrão anatômico conserva-se inalterado em relação à descrição anterior.

Após 60 dias em cultura primária os calos desenvolvidos em meio com 1mg/l BAP + 0,25mg/l NAA assumem coloração verde, desenvolvendo estruturas globulares (Fig. 12). A análise histológica revela que a camada mais externa do calo é constituída por células cujas paredes apresentam-se coradas de vermelho após tratamento pela fucsina básica.

Em determinadas regiões periféricas do calo as células parenquimáticas sofrem divisões periclinais, assumindo um arranjo radial (Fig. 13) e orientando a formação de glóbulos (Fig. 14). Essa condição permanece no interior dos mesmos, onde se observa, também, a presença de inúmeros centros meristemáticos constituídos por células de formato tabular envolvendo parcialmente os elementos

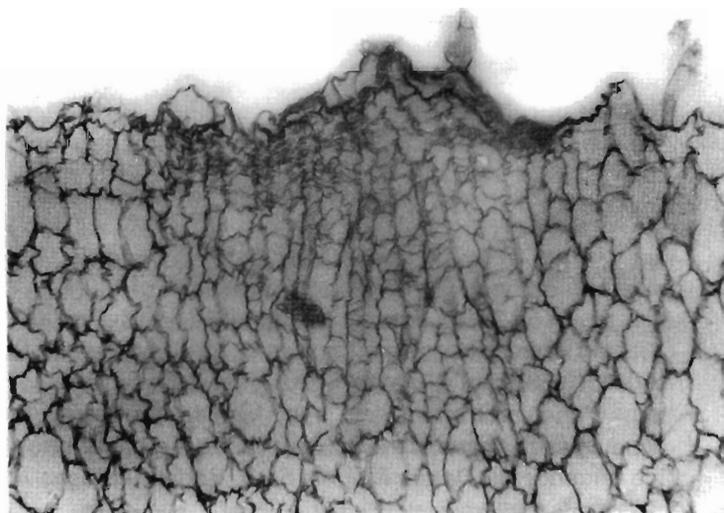


Fig. 4. Secção transversal do explante caulinar, com cinco dias em cultura, evidenciando a disposição radial das células em divisão. MO. 150x.

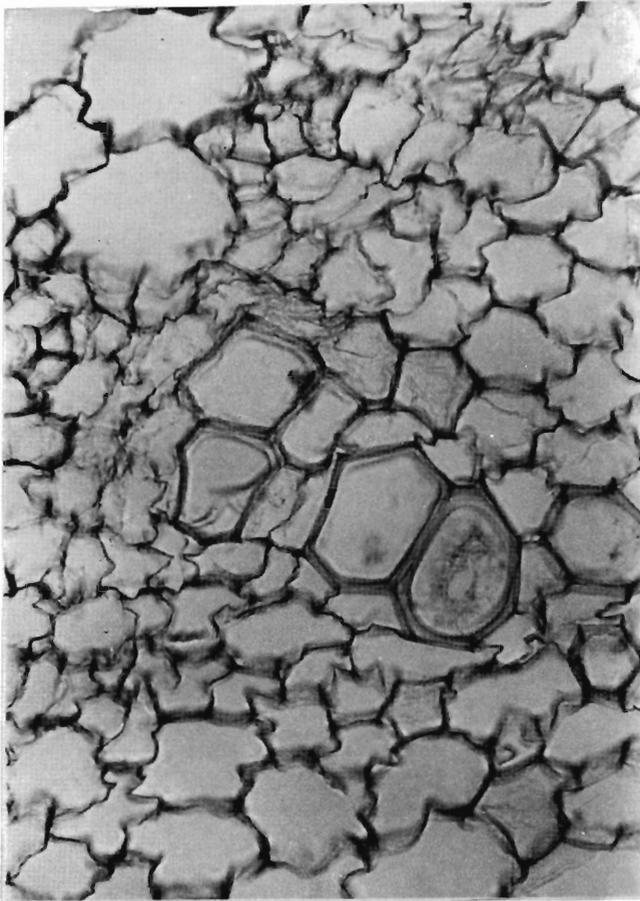


Fig. 5. Detalhe de elementos xilêmáticos neoformados em calos com cinco dias em cultura. MO. 500x.

condutores. Não se identifica polaridade de tecidos nem a presença de embriões somáticos em quaisquer dos seus estágios de diferenciação.

Embora não se evidenciem diferenças relevantes quanto à constituição e disposição dos tecidos componentes dos calos desenvolvidos em ambos os meios, deve-se ressaltar o crescimento mais acentuado e acelerado dos calos desenvolvidos em meio com 1mg/l BAP + 0,25mg/l NAA. Com 25 dias em cultura apresentam  $1,64 \pm 0,21$ cm de diâmetro, enquanto os calos mantidos no outro meio têm  $1,35 \pm 0,19$ cm de diâmetro.

## Discussão

As características anatômicas citadas por Metcalf & Chalk (1965) para a família Solanaceae, tais como tricomas glandulares e tectores, feixes bicolaterais e anel colenquimático, foram identificadas nas secções transversais de entrenós de *Datura innoxia* Barb. Rodr. cultivadas *in vitro*.

Alterações irregulares observadas na superfície do explante são dependentes da distribuição e atividade mitó-

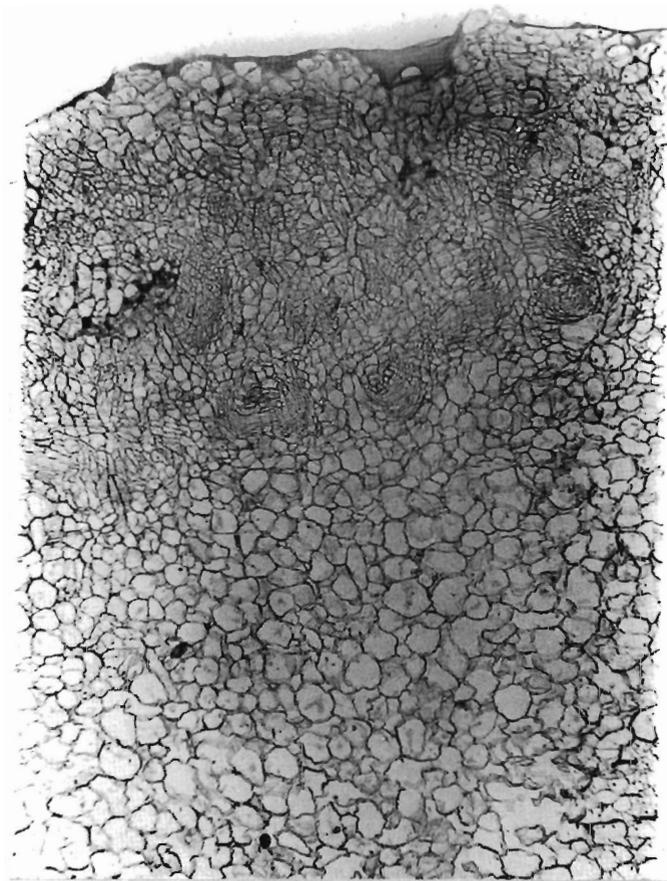


Fig. 6. Aspecto geral dos centros meristemáticos dispersos periféricamente nos calos com 15 dias em cultura. MO. 60x.

tica dos tecidos (Aitchison *et al.*, 1977). Dyer & Robertson (1965) e Smithers & Sutcliffe (1967) *apud* Aitchison *et al.* (1977) mencionaram que apenas as células da região externa do tecido parenquimático são induzidas a se dividir, resultando numa intensa atividade periférica, não observada no cilindro central. Na espécie em estudo observou-se que esse processo não estava restrito a nenhuma região particular, mas que ocorreu nos tecidos externos ao cilindro central e nos parênquimas interfascicular e medular.

As células que sofreram as primeiras divisões, em função de sua dediferenciação, contribuíram para a formação de um calo com aspecto homogêneo. A análise anatômica desses calos de *Datura* revelou, no entanto, uma considerável variabilidade em relação ao tipo e diferenciação celular. Um calo homogêneo, constituído inteiramente de células parenquimáticas, é raro de ser encontrado, embora tenha sido reportado por Moore (1984) em culturas de *Agave* e *Rosa*. As citodiferenciações observadas em calos, tais como elementos traqueais, tubos crivados, células suberificadas e tricomas (Moore, l.c.), tornam-nos distintos da classificação anterior. Após a análise histológica de calos de *Datura*,

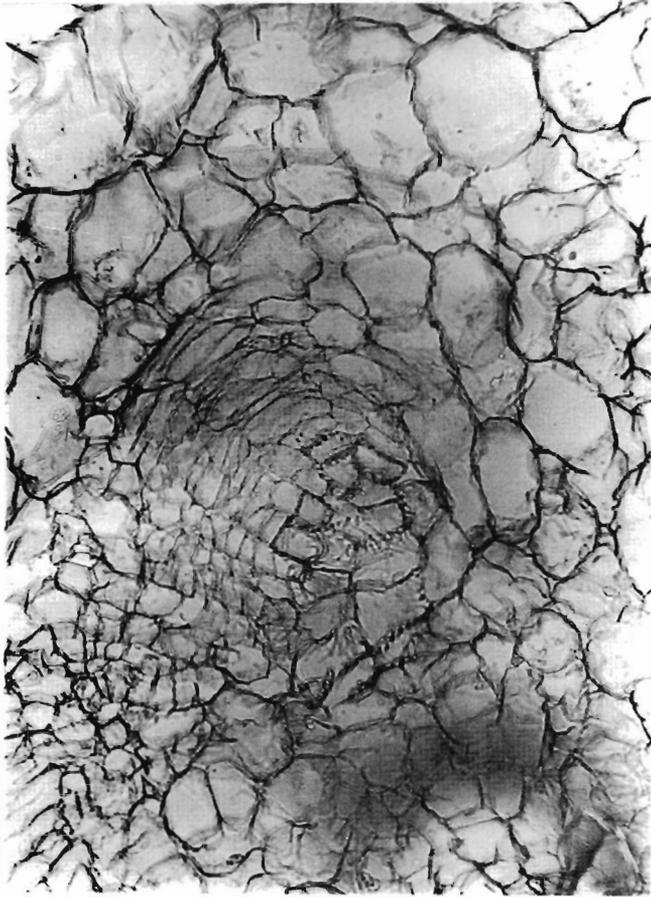


Fig. 7. Detalhe de um centro meristemático, em secção transversal, integrado por células tabulares que envolvem parcialmente os elementos xilemáticos, observados em calos com 15 dias em cultura. MO. 235x.

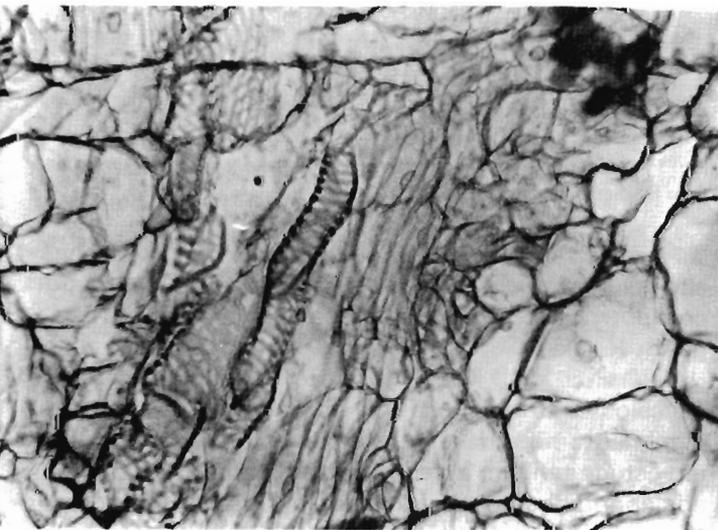


Fig. 8. Detalhe de elemento xilemático em plano longitudinal, em calos com 15 dias em cultura. MO. 397x.

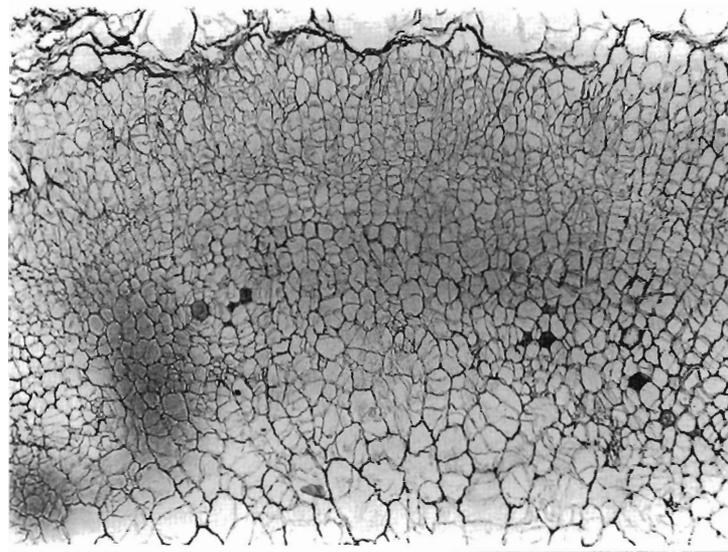


Fig. 9. Secção transversal do explante caulinar evidenciando o aumento do número de camadas do sistema vascular em calos com 15 dias em cultura. MO. 178x.

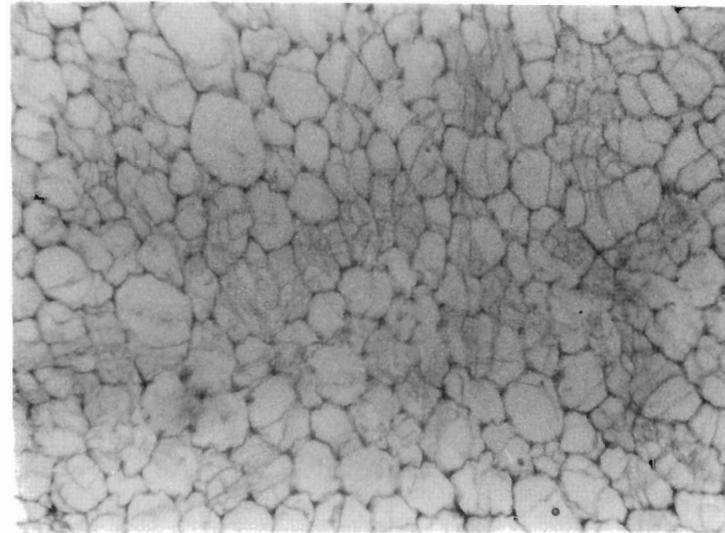


Fig. 10. Secção transversal de calo com 15 dias em cultura, mostrando parênquima medular em intensa divisão. MO. 147x.

estes foram considerados não-homogêneos, uma vez que se constatou a presença de elementos condutores dispersos individualmente ou em centros meristemáticos, diferenciados no interior do calo. A histogênese de calos de *Aesculus hippocastanum* (Profumo *et al.*, 1986) e de *Digitalis lanata* (Diettrich *et al.*, 1986) também revelou a presença de centros meristemáticos em calos não-homogêneos.

Durante o desenvolvimento do calo de *D. insignis* foi possível observar que, embora todos os tecidos do caule tenham apresentado divisão, somente aqueles situados

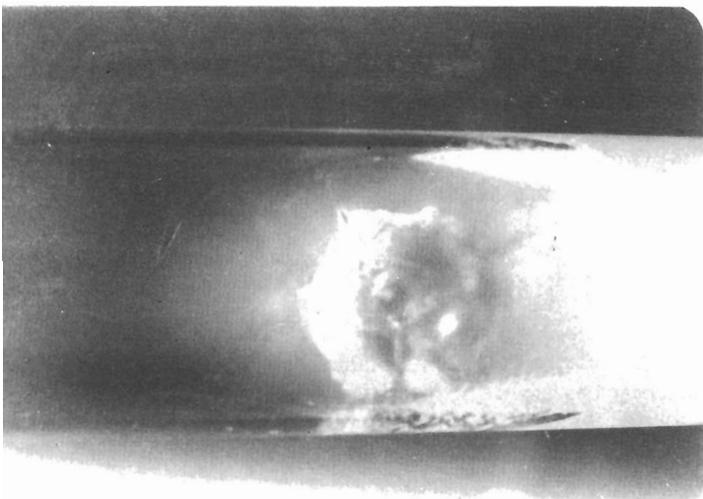


Fig. 11. Calo claro, compacto e não-embriogênico desenvolvido em meio com 1mg/l BAP + 0,25mg/l NAA, após 25 dias em cultura.

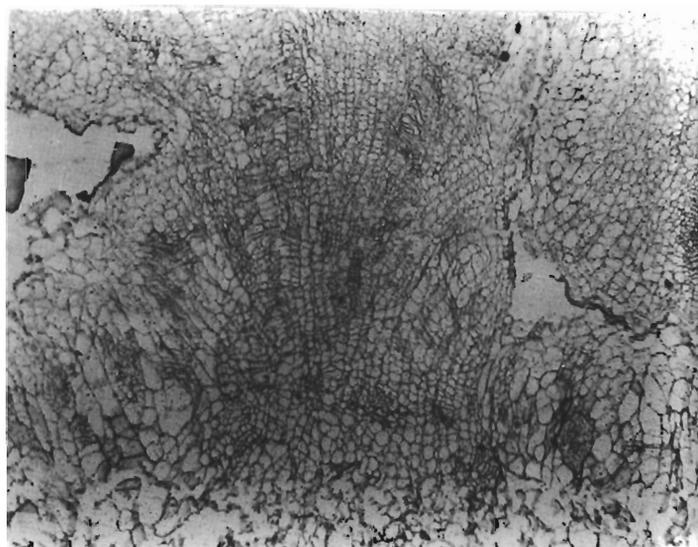


Fig. 13. Detalhe do arranjo radial das células periféricas do calo em divisão, orientando a formação de estruturas globulares, com 60 dias em cultura. MO. 55x.

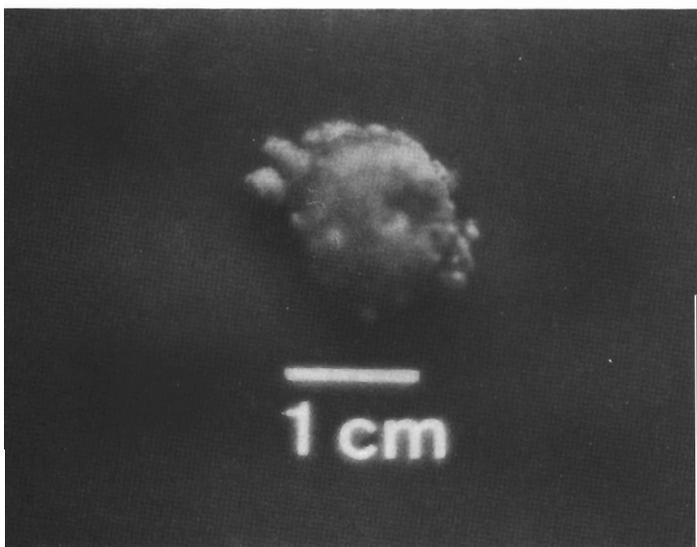


Fig. 12. Calo compacto e não-embriogênico desenvolvido em meio com 1mg/l BAP + 0,25mg/l NAA, após 60 dias em cultura. Presença de estruturas globulares na periferia do calo.

entre a epiderme e o cilindro vascular eram em tecido calogênico. Tal resultado se assemelha ao encontrado em *Coffea canephora* por Nassuth *et al.* (1980).

A razão exata pela qual o tipo de tratamento e trocas no estado físico do meio induzem à diferenciação do calo, tornando-o embriogênico, é difícil de ser explicado. No entanto, considerando-se o quanto são específicos os balanços hormonais e nutricionais necessários para induzir a embriogênese somática no calo, podem ser produzidas diferentes situações para que esse equilíbrio dentro das célu-

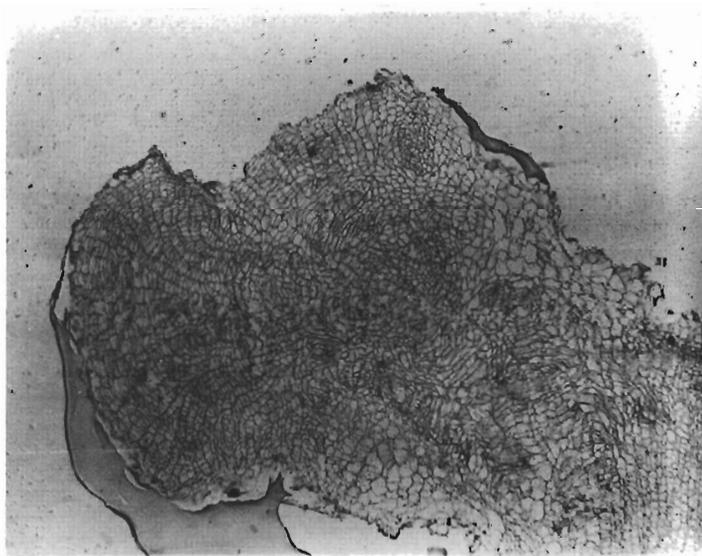


Fig. 14. Secção transversal da estrutura globular desenvolvida em calos com 60 dias em cultura. MO. 60x.

las favoreça a diferenciação de um grupo de células com alto grau de crescimento e alongamento e de outro grupo com potencial para assumir atividade embriogênica (Rengel & Jelaska, 1986).

Vasil & Vasil (1986) descreveram que as culturas de calos embriogênicos são compactas, nodulares e geralmente não-friáveis. Embora os calos da espécie em estudo tenham apresentado aspectos semelhantes aos apontados pelos autores acima, foram considerados como não-embriogênicos, uma vez que os estudos anatômicos não apontaram a presença de embriões somáticos.

Dietrich *et al.* (1986) detectaram colônias de glóbulos não-embriogênicos em calo de folha de *Digitalis lanata*, o mesmo tendo sido observado por Rucker *et al.* (1976) *apud* Dietrich *et al.* (l.c.) em *Digitalis purpurea* e por Nuti Ronchi (1981) em culturas de *Nicotiana*. Estruturas similares foram encontradas, no presente trabalho, em calos desenvolvidos no meio com 1mg/l BAP + 0,25mg/l NAA.

A indução de embriões somáticos depende dos valores absolutos e dos tipos de auxina e citocininas empregadas. Ammirato (1983) considerou que para a indução de células com capacidade embriogênica torna-se necessária a utilização de altas concentrações de auxina, e Rengel & Jelaska (1986) mencionaram que inúmeras culturas apresentam formação de embriões somáticos em presença de BAP, que acelera a fase de expressão da diferenciação. Diante de tais proposições procurou-se estabelecer uma combinação BAP/NAA, mantendo-se constante a

concentração de BAP. No entanto, não foi possível obter a indução e diferenciação de tais estruturas embriogênicas. Tal fato leva a concluir que as interações auxina/citocinina empregadas não se mostraram adequadas ao desenvolvimento de calo embriogênico.

Esse resultado não inviabiliza a possibilidade de novos estudos com outros tipos e/ou concentrações dos reguladores de crescimento.

#### Agradecimentos

Os autores agradecem ao Sr. Raul Zacarias de Lima, Técnico de Laboratório do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, pela confecção das lâminas permanentes; aos Técnicos H. de Oliveira e Paulo Roberto T. Ventura, do Laboratório de Fisiologia Vegetal da UFRJ, onde foram realizadas as culturas de tecido; e à Datilógrafa Janaina Lima Paiva, que datilografou este trabalho.

#### Referências bibliográficas

- AITCHISON, P.A., MACLEOD, A.J. & YEOMAN, M.M. 1977. Growth patterns in tissue (callus) cultures. In: STREET, H.E. *Plant Tissue and Cell Culture*, vol. II:267-306.
- AMMIRATO, P.V. 1983. Embryogenesis. In: EVANS, D.A. *et al.* *Handbook of Plant Cell Culture*, vol. I:83-123.
- BRAGA, M.M.N. 1977. Anatomia foliar de Bromeliaceae da Campina. *Acta Amazonica*. 7(3):5-74.
- DIETRICH, B. *et al.* 1986. Morphogenetic Capacity of Cell Strains Derived from Filament, Leaf and Root Explants of *Digitalis lanata*. *J. Plant Physiol.* 124:441-53.
- FIGUEIREDO, S.F.L. & ESQUIBEL, M.A. 1987. Micropropagação de *Datura innoxiosa* Barb. *Rodr.* IX Encontro Regional de Botânicos. Vitória, ES. p. 41.
- FIGUEIREDO, S.F.L. & ESQUIBEL, M.A. 1988. Organogenesis and calli development of *Datura innoxiosa* Barb. *Rodr.* I Congresso e Feira Nacional de Biotecnologia FENABIO — 88. p. 4-2.
- GAMBORG, O.L., MILLER, R.A. & OJIMA, K. 1968. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell. Res.* 50:151-8.
- GUHA, S. & MAHESHWARI, S.C. 1964. In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature* 204:497.
- JOHANSEN, D. 1940. *Plant Microtechnique*. New York-London, McGraw-Hill Book Co., XI + 523 p. ilustr.
- METCALFE, C.R. & CHALK, L. 1965. *Anatomy of the Dicotyledons*. V. II. Oxford, Clarendon Press, XI + 1500p.
- MOORE, T.C. 1984. *Biochemistry and Physiology of Plant Hormones*. Cap. 5:54-59.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum* 15:473-97.
- NASSUTH, A. *et al.* 1980. The histogenesis of callus in *Coffea canephora* stem explants and the discovery of early embryoid initiation. *Acta Bot. Neerl.* 29(1):49-54.
- NUTI RONCHI, V. 1981. Histological study of organogenesis in vitro from callus cultures of two *Nicotiana* species. *Can. J. Bot.* 59:1969-77.
- PROFUMO, P. *et al.* 1986. Histological Study of Calli and Embryoids from Leaf Explants of *Aesculus hippocastanum* L. *J. Plant Physiol.* 126:97-103.
- RENDEL, Z. & JELASKA, S.J. 1986. Somatic embryogenesis and plant regeneration from seedling tissue of *Hordeum vulgare* L. *J. Plant Physiol.* 124:385-92.
- THOMAS, E. & STREET, H.E. 1970. Organogenesis in cell suspension cultures of *Atropa belladonna* L. and *A. belladonna* cultivar lutea Döll. *Ann. Bot.* 34:657-669.
- THOMAS, E. & WERNICK, W. 1978. *Frontiers of Plant Tissue Culture*. Calgany: 403-410.
- VASIL, V. & VASIL, L.K. 1982. The ontogeny of somatic embryos of *Pennisetum americanum* (L.) K. Schum I in cultured immature embryos: *Bot. Gaz.* 143:454-465.