

TUMORES EM CERTOS HÍBRIDOS DO GÊNERO NICOTIANA

F. G. Brieger (*)

e
R. Forster

INTRODUÇÃO

Kostoff (9) foi o primeiro a descrever a formação de tumores ou outras malformações em híbridos interespecíficos do gênero *Nicotiana*. Depois alguns outros autores se ocuparam com este fenômeno, e podemos tirar dos seus trabalhos duas conclusões:

a) Todos observaram estas anormalidades nos mesmos híbridos, especialmente em *N. glauca* x *N. Langsdorffii*. Pelo fato, pois, de que aparecem sempre nestes, e nunca nas espécies puras nem na maioria dos outros híbridos interespecíficos do gênero, e, ainda mais, independente até do continente no qual os estudos foram realizados, parece definitivamente excluída a possibilidade de uma origem patogênica, provocada por fungos ou bactérias.

b) Nenhum autor até agora foi capaz de propor uma explicação satisfatória para a origem dos tumores, sendo que nenhuma das várias especulações até hoje publicadas pode ser comprovada. Assim Kostoff atribuiu inicialmente (9, 10) a origem dos tumores a uma incompatibilidade entre as espécies cruzadas e às reações imunológicas por ela provocadas. Depois, sem explicar as suas razões, Kostoff (11) mudou de opinião e considerou como causa as mutações somáticas. Finalmente (12, 13), fala de uma falta do balanço gênico depois de uma troca somática de partes de cromossômios não homólogos. Whitaker (16) atribuiu principal importância ao citoplasma, mas visto que nestas combinações cruzamentos recíprocos não podem ser feitos e estudados, a hipótese não pode ser comprovada nem desprovada.

Praticamente só se observaram tumores em híbridos nos quais representantes do grupo $n = 9$ cromossômios foram usados. A reação foi bastante forte nos experimentos de Kostoff (9), quando *N. Langsdorffii*

(*) Da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

♂ foi cruzado com *N. glauca*, *N. rustica* e *N. paniculata* e, por outro lado, *N. Sanderæ* (*) (ou *alata*) ♂ com *N. tabacum* e *N. rustica*. É bem interessante que, de acordo com este autor, *N. glauca* x *N. Sanderæ* não exibiu anormalidades. Uma reação fraca e, a nosso ver duvidosa, foi descrita para o híbrido: *N. rustica* x *N. tabacum* (9).

Observamos tumores nos híbridos *N. rustica* x *N. Langsdorffii*, mas o principal material são os híbridos *N. glauca* ♀ cruzados com *N. Langsdorffii*, *N. Sanderæ* e com híbridos (*Langsdorffii* x *Sanderæ* F₁). Quando, de modo geral, apenas verificamos as observações já publicadas dos autores, dois pontos nos pareceram novos. Vamos, pois, aqui descrevê-los.

DIFERENÇA MONOFATORIAL ENTRE *N. LANGSDORFFII* E *N. SANDERÆ*

A reação dos híbridos de *N. glauca* com *N. Langsdorffii*, de um lado, e *N. Sanderæ*, de outro, é bastante diferente.

a) *N. glauca* x *N. Langsdorffii*. O comportamento dos nossos híbridos está em todos os detalhes, de acordo com o descrito por outros autores. Exceto o aparecimento de tumores, muitas vezes bem grandes, no colo da raiz, e de pequenos crescimentos nas próprias raízes, as plantas ficaram bem normais durante os primeiros meses. Formava-se uma roseta e depois uma haste principal, que terminava com a inflorescência (fig. 1 e 2).

Nas partes já completamente formadas aparecem tumores. Estes não são limitados aos nós, mas em escala menor aparecem também nos internódios (fig. 10), onde são externamente cobertos com suber, que lhes dá cor marrom. Os tumores dos nós, mesmo em inflorescências bastante velhas (fig. 9), podem tornar-se grandes, e deles podem sair uma ou mais hastes, que são perfeitamente normais (fig. 8). Tentamos provocar um enraizamento de tais brotos, mas sem sucesso. Os tumores no colo da raiz são verdes e produzem geralmente brotos curtos e irregulares, com folhas anormais (fig. 7).

Nas raízes são brancos ou amarelo-marrons quando escondidos na terra; tornam-se, porém, verdes, quando expostos à luz.

Em alguns indivíduos velhos, apareceram tumores também nas folhas.

As flores sempre foram absolutamente normais.

(*) Usamos aqui a denominação *N. Sanderæ*, que inclui todas as formas usadas, muitas vezes denominadas *N. affinis*, *N. alata* e *N. forgetiana*.

b) *N. glauca* x *N. Sanderæ*. O comportamento é bastante diferente do dos híbridos descritos acima. Os tumores no colo da raiz aparecem até mais cedo e desenvolvem-se mais.

De modo geral, temos que distinguir duas formas de reação. No primeiro caso os tumores no colo cresceram enormemente e as plantas ficaram pequenas e raquíticas (fig. 5). Estes podem finalmente produzir brotos numerosos e normais (fig. 11 e 12).

No segundo caso, o crescimento da haste foi muito vigoroso, mostrando, porem, uma ramificação perfeitamente anormal. Os galhos laterais não cresceram apenas quando a planta iniciou a florada, mas desde o início. Além disso, em vez de um galho por axila, desenvolveu-se grande número de gemas seriadas ("seriale Beiknospen"), como bem ilustram as figuras 3 e 4.

As folhas, igualmente numerosas nos diferentes galhos, foram sempre mais ou menos deformadas, sem produzir tumores.

As flores também foram anormais, com protuberâncias e outras irregularidades de forma, e de cor sempre manchada.

c) *N. glauca* x (*N. Langsdorffii* x *N. Sanderæ* F₁). Os mesmos tipos profundamente diferentes dos cruzamentos entre duas espécies reaparecem no cruzamento das três espécies. Mas o fator mais importante era que praticamente todos os indivíduos podiam ser classificados e atribuídos a um ou outro dos dois tipos: o dos híbridos *N. glauca* x *N. Langsdorffii* ou *N. glauca* x *N. Sanderæ*. O número de plantas não foi muito grande, mas podia-se verificar que a frequência dos dois tipos foi aproximadamente a mesma. Daí podemos concluir que eles são causados por dois gens aleles. As espécies puras são homozigotas, de modo que os híbridos simples são uniformes no seu comportamento. Mas cruzando *N. glauca* com o polen do híbrido *N. Langsdorffii* x *N. Sanderæ*, obtemos uma segregação típica de um "backcross" mono-

fatorial, isto é, $\frac{1}{2} : \frac{1}{2}$.

As duas espécies *N. Langsdorffii* e *N. Sanderæ* são bastante relacionadas. Têm o mesmo número de cromossomos ($n=9$), o pareamento nos híbridos é completo, com 9 bivalentes na meiose e a segregação é perfeitamente normal. Um número de diferenças interespecíficas tem base genética bem simples, como a coloração das flores e do polen, a auto-esterilidade, etc. Anderson e de Winton (1), Brieger (4, 5), East (6, 7) e Skalinska (15).

O efeito dos aleles que alteram o porte dos híbridos quando cruzados com *N. glauca* não é visível nem nas espécies *N. Langsdorffii* e *N. Sanderæ* nem nos seus híbridos. O seu efeito é assim completamente recessivo-hipostático. Somente quando combinado com os gens de *N. glauca* é que se manifesta. Isto não é novidade. A segregação de um fator semelhante foi observada por Brieger (3) nos cruzamentos entre *N. longiflora* x *N. Sanderæ*. Na maioria dos cruzamentos, as plantas F₁ foram fortes e normalmente desenvolvidas. Mas sempre quando um certo indivíduo de *N. longiflora* foi usado, a geração F₁ foi ditípica: metade das plantas foi forte e normal e metade foi muito fraca. Um caso semelhante foi também encontrado por Hollingshead (8) em *Crepis tectorum*.

A diferença entre o caso relatado neste trabalho e os diversos casos justamente citados é a seguinte: nestes últimos manifesta-se um gen que apenas está presente em alguns indivíduos, quando no caso mencionado na presente publicação se trata de dois aleles que se encontram em forma homozigota, cada um em uma das duas espécies.

É interessante notar que as duas espécies parentes também se comportam diferentemente em cruzamentos com *N. paniculata*. Brieger (3) observou que os híbridos *N. paniculata* x *N. Langsdorffii* são sempre muito fracos e morrem quando ainda pequenos e jovens, enquanto que os híbridos *N. paniculata* x *N. Sanderæ* chegam até ao florescimento. Seu desenvolvimento, entretanto, é sempre bem anormal, como demonstram as fotografias na citada publicação. Kostoff (9) encontrou muitos tumores nas raízes e hastes de *N. paniculata* x *N. Langsdorffii*, poucos nas raízes e nenhum nas hastes de *N. paniculata* x *N. Sanderæ*. Não podemos decidir se estas diferenças são provocadas pelos mesmos gens, como no caso dos híbridos com *N. glauca*, já relatado.

Demonstramos que existem dois gens aleles, um para cada espécie *N. Langsdorffii* e *N. Sanderæ*, que alteram o curso do desenvolvimento nos híbridos com *N. glauca*. Disso não podemos concluir que sejam responsáveis pelas anormalidades, formação de tumores, etc. Trata-se, naturalmente, de uma possibilidade. **Estes gens podem ser, de-fato, os determinadores da formação dos tumores e outras malformações, ou podem ser apenas modificadores de um desenvolvimento anormal, provocado por outros agentes.**

ONTOGENIA E HISTOLOGIA DOS TUMORES

Kostoff (9) deu alguns pormenores sobre a histologia dos tumores e Levine (14) publicou uma descrição mais ampla. Este último autor

demonstrou que os tumores espontâneos dos híbridos são estruturalmente diferentes dos tumores ou "crown galls" causados pelo *Bacterium tumefaciens*. Mas parece que falta uma descrição da ontogenia dos tumores nas hastes.

De acordo com as nossas observações, o primeiro sinal da formação de um tumor é o aparecimento de células necróticas na região do cortex primário, entre a epiderme e o colênquima. As células sãs, adjacentes, reagem do modo típico à reação contra uma irritação traumática, como, por exemplo, a descrita por Brieger (2). Casos idênticos aos apresentados nas figuras 2 e 4 (Abb 1) desse trabalho, podem ser vistos com frequência nas fases iniciais da formação dos tumores. Das duas reações traumáticas descritas por Brieger (2), a fase do crescimento é inicialmente mais forte no primeiro estágio da formação dos tumores. Posteriormente, também ocorrem muitas divisões de células.

Com o tempo, a região afetada se estende. A epiderme e todas as camadas do lado de fora das células ativadas degeneram e morrem, e os tecidos internos do cortex são finalmente atingidos pela ativação. Assim, já se formam tumores grandes, mas sem ligação com o tecido do cilindro central. Aparecem nos tumores também certas diferenciações celulares. A sua superfície é formada por células pequenas, de um verde forte e aparecem também séries de traqueides traumáticas (fig. 13).

Mais tarde o câmbio e o xilema são atingidos. A fase inicial é ilustrada nas figuras 13 e 15. As divisões no câmbio não seguem mais a orientação tangencial e os raios medulares secundários começam a crescer e alongar-se. As figuras 13 e 14 demonstram que a atividade do câmbio não foi regular anteriormente. O xilema não forma um cilindro de grossura uniforme. Em partes das secções mostradas, umas regiões apresentam o dobro do diâmetro do xilema de outras.

Finalmente também a medula é atingida, o cilindro do xilema abre-se (fig. 14) e se estabelece uma perfeita ligação com os tumores.

Assim a origem dos tumores nas hastes é perfeitamente endógena. Forma-se, porém, um meristema superficial e bastante irregular (fig. 13 e 16). A observação microscópica demonstrou que em alguns lugares este meristema pode finalmente voltar à normalidade e formar pontos vegetativos e hastes normais. O lugar indicado por flecha, na figura 14, talvez corresponda a um tal ponto vegetativo normalizado.

O ponto mais importante da ontogenia dos tumores parece-nos ser a sua origem endógena de tecidos maduros e não meristemáticos. Não podemos estar absolutamente certos de que a necrose de algumas células seja de-fato o início, ou se algumas células começam a crescer, prejudicando as vizinhas e causando a sua degeneração. É certo que mais tarde, quando o cresci-

mento já atinge um maior número de células e mais camadas, esta ativação das células não é mais dependente do contacto com focos necróticos.

INCLUSÕES NAS CÉLULAS

Desejamos descrever aqui uma observação, embora sem podermos ainda interpretá-la. Nas primeiras fases da formação dos tumores, quando são ativadas células do cortex primário, encontramos sempre inclusões em células vizinhas, que não foram ativadas. Como demonstra a figura 17, trata-se de corpos redondos com uma membrana grossa e um conteúdo incolor, de alto poder de refração e que enche irregularmente o interior do corpo, deixando vacúolos ainda pequenos, que são com mais frequência encontrados nas células do cortex. Não tendo estas participado ativamente da formação dos tumores, são mais tarde eliminadas em consequência da origem endógena do tumor.

As inclusões semelham células de certos fungos, por exemplo, de *Chytridiales*. Não podemos afirmar, entretanto, que se trate efetivamente de tais células.

Queremos apenas registrar a ocorrência destas inclusões, que não encontramos nos tecidos das espécies puras, mas somente nos híbridos que formam os tumores. A relação entre elas e o tecido anormal é ainda obscura.

CONCLUSÕES

Não temos a intenção de discutir as especulações já formuladas por vários autores, e que mencionamos rapidamente na introdução.

É evidente que a constituição genética é um ponto essencial. Nenhuma espécie pura nem a maioria dos híbridos de espécies no gênero *Nicotiana* demonstra as anormalidades descritas. São encontradas apenas em alguns híbridos de espécies do grupo com $n=9$, isto é, *N. Langsdorffii* e *N. Sanderæ*, com suas muitas formas, com outras espécies, especialmente *N. glauca*.

É provável que as anormalidades sejam provocadas por qualquer desarranjo fisiológico e não por uma infecção específica.

O efeito de gens específicos que foram identificados também não ajuda na solução do problema, porque não podemos dizer se eles são determinadores das anormalidades ou apenas modificadores de processos fisiológicos causados por outros agentes.

A origem endógena em tecidos maduros exclue a possibilidade de que anormalidades nas divisões mitóticas possam ser a causa direta da formação de tumores.

Chegamos então à conclusão de que a etiologia dos tumores espontâneos e das outras anormalidades descritas continua a ser desconhecida.

SUMMARY

The present paper gives some observations on the tumour formation and other abnormalities observed in the interspecific hybrids, *Nicotiana glauca* x *N. Langsdorffii* and *N. glauca* x *N. Sanderae*. Without entering into a detailed discussion of the literature and the various speculations proposed by Kostoff and Whitaker about the causes of tumour formations or on the relations between "spontaneous" and pathogenic tumours (Kostoff, Levine and others), two new observations are described.

1) The abnormalities in the two above mentioned hybrids are quite different.

As already reported by other authors, the hybrids *N. glauca* x *N. Langsdorffii* are initially quite normal and vigorous, while tumours and other proliferations, on the stem, the stem base and the root appear more or less frequently in older plants. Tumours on leaf are rare and flowers are normal (fig. 1,2,7 and 10).

The hybrids *N. glauca* x *N. Sanderae* are very different from the former. These remain either weak and rachitic, forming early large tumours at the stem base and on the root (fig. 5 and 6 right half). Numerous shoots with more or less normal leaves may arise from these tumours (fig. 11 and 12). Or the plants show an extremely vigorous and abnormal ramification with a number of serial axial shoots developing in each leaf axis (fig. 3 and 4). The leaves are frequently deformed and the flowers exhibit abnormally coloured patches.

When crossing *N. glauca* with F1 (*N. Langsdorffii* x *N. Sanderae*) the offspring could clearly be divided into two groups: plants exactly as described for *N. glauca* x *N. Langsdorffii* and others which correspond to the types of *N. glauca* x *N. Sanderae*. Thus it seems that we are dealing with a monogenic differences, each species, *N. Langsdorffii* and *N. Sanderae*, being homozygous for one allele each. These alleles have no phenotypic effect in either pure species, but only in hybrids when combined with the genom of *N. glauca*.

The situation is somewhat similar to the sublethal genes reported in interspecific crosses involving *N. longiflora* (Brieger, 3) and *Crepis tectorum* (Hollingshead, 8).

Since the hybrids with *N. glauca* are completely sterile, it cannot be decided whether the genes reported are only modifiers or are actually causing the tumour formation and the other abnormalities.

2) A histological study was made about the origin of stem tumours. The first sign is the activation of cells of the tissues between epidermies and collenchyma. Some cells adjoining other which are dead or dying start to grow and later on to divide, in the manner typical for cells under the action of traumatic hormones (cf. Brieger, 2). Later on the whole region is activated and the cortex layers degenerate. At this stage large tumours may be formed, but as yet without connection with the xylem (fig. 15). Later on the cambium and the secondary medulary rays participate in the irregular development (fig. 13) which finally reaches the medulla. Finally the central cylindre is forced open and the tumours connected with it (fig. 14).

Thus tumours formation on the stem is endogeneous and starts from mature cells, not from meristematic cells.

3) Finally an observation is reported, without an attempt to explain it. In the earliest phases of tumours formation in the stem and in cells not participating it, intracellular bodies are observed (fig. 17) with a colourless membrane and on alveolar and highly refractive content. These bodies resemble somewhat cells of fungus such as *Chytridiales*, but, as already said, their nature is obscure.

LITERATURA CITADA

1. **Anderson, E.** and **D. de Winton.** The genetic analysis of an unusual relation between self-sterility and self-fertility in *Nicotiana*. *Ann. Miss. Bot. Gard.* 18:97-116. 1931.
2. **Brieger, F. G.** Untersuchungen ueber den Wundreiz. *Ber. Deuts. Botan. Gesel.* 52:79-90, Abb. 1-2. 1925.
3. **Brieger, F. G.** Vererbung bei Artbastarden unter besonderer Beruecksichtigung der Gattung *Nicotiana*. *Der Zuechter* 1:140-152, Abb. 1-11. 1929.
4. **Brieger, F. G.** Untersuchungen an den Bastarden der Arten *Nicotiana Sanderae*, *N. Langsdorffii* und *N. longiflora*. *Zeits. Indukt. Abst. und Vererb.* 54:235-239. Tab. 1. 1930.
5. **Brieger, F. G.** Genetic analysis of the cross between the self-fertile *Nicotiana Langsdorffii* and the self-sterile *N. Sanderae*. *Jour. Genetics* 30:79-100, fig. 1-2, Tab. 1-10, 1935.
6. **East, E. M.** Inheritance in crosses between *Nicotiana Langsdorffii* and *N. alata*. *Genetics* 13:311-333. 1916.
7. **East, E. M.** Studies on self-sterility. IX. The behaviour of crosses between self-sterile and self-fertile plants. *Genetics* 17:175-202. 1932.
8. **Hollingshead, L.** A lethal factor in *Crepis* effective only in an interspecific hybrid. *Genetics* 15:114-140. 1930.
9. **Kostoff, D.** Tumors and other malformations on certain *Nicotiana* hybrids. *Zentral. Bakt. Parasit. Infekt.* 2:244-260, fig. 1-18, tab. 1-3. 1930.
10. **Kostoff, D.** Tumor in the light of researches on plant tumors and galls and its relation to the problem of mutation. (A critical review from biophysical, biochemical and cytogenetical point of view.) *Protoplasma* 20:440-456. 1933.
11. **Kostoff, D.** Heritable tumors in plants experimentally produced. *Genetics* 17:367-376, fig. 1-3. 1935.
12. **Kostoff, D.** Abnormal mitosis in tobacco plants forming hereditary tumours. *Nature* 144:599. 1939.
13. **Kostoff, D.** Studies on atypical growth in plants from a cytogenetic point of view. *Jour. Genetics* 39:469-484, pl. VIII, fig. 1-8. 1940.
14. **Levine, M.** Tumors of tobacco hybrids. *Amer. Jour. Bot.* 24:250-256, fig. 1-17. 1937.
15. **Sachs-Skalinska, M.** Contribution à l'analyse génétique de la forme de la corolle du genre *Nicotiana* (Polish, French summary). *Kosmosu* 47:255-273. 1921.
16. **Whitaker, Thomas W.** The occurrence of tumors on certain *Nicotiana* hybrids. *Journ. Arnold Arboretum* 15:144-153, pl. 90, fig. 1. 1934.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1. *N. glauca* x *N. Langsdorffii* (N1025). Planta em início de florescimento, sem tumores ainda.

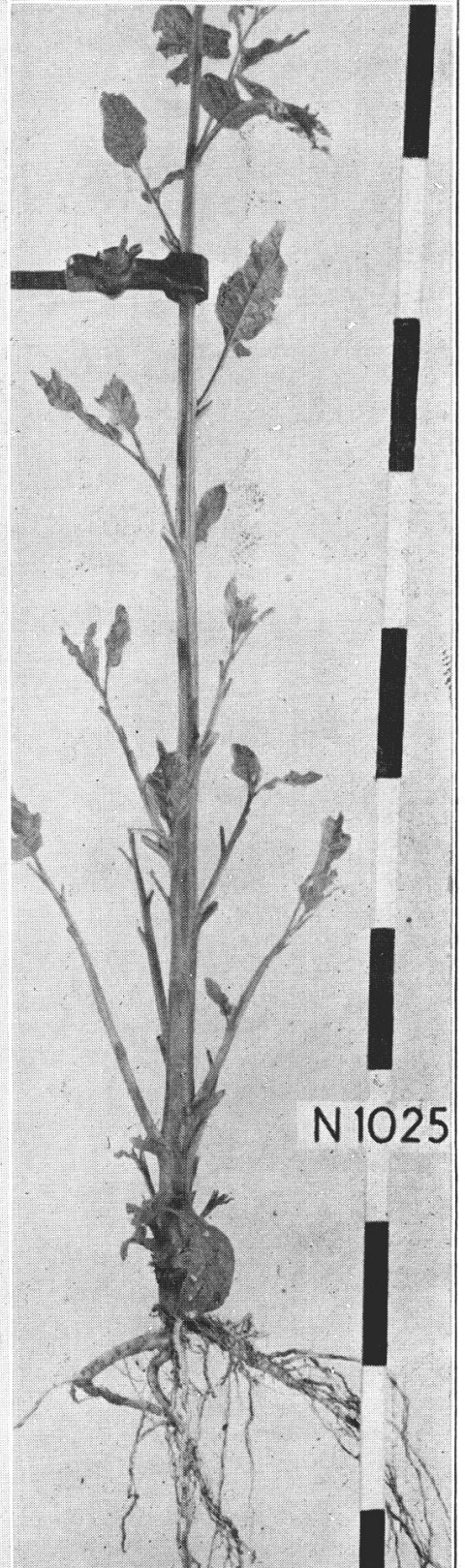
Figura 2. A mesma planta da figura 1, mostrando disposição das ramificações.

Figuras 3 e 4. Planta do tipo *N. glauca* x *N. Sanderae* no cruzamento *N. glauca* x (*N. affinis* x *N. Langsdorffii* F₁), (N. 1029) mostrando numerosas ramificações, desde o colo da planta.

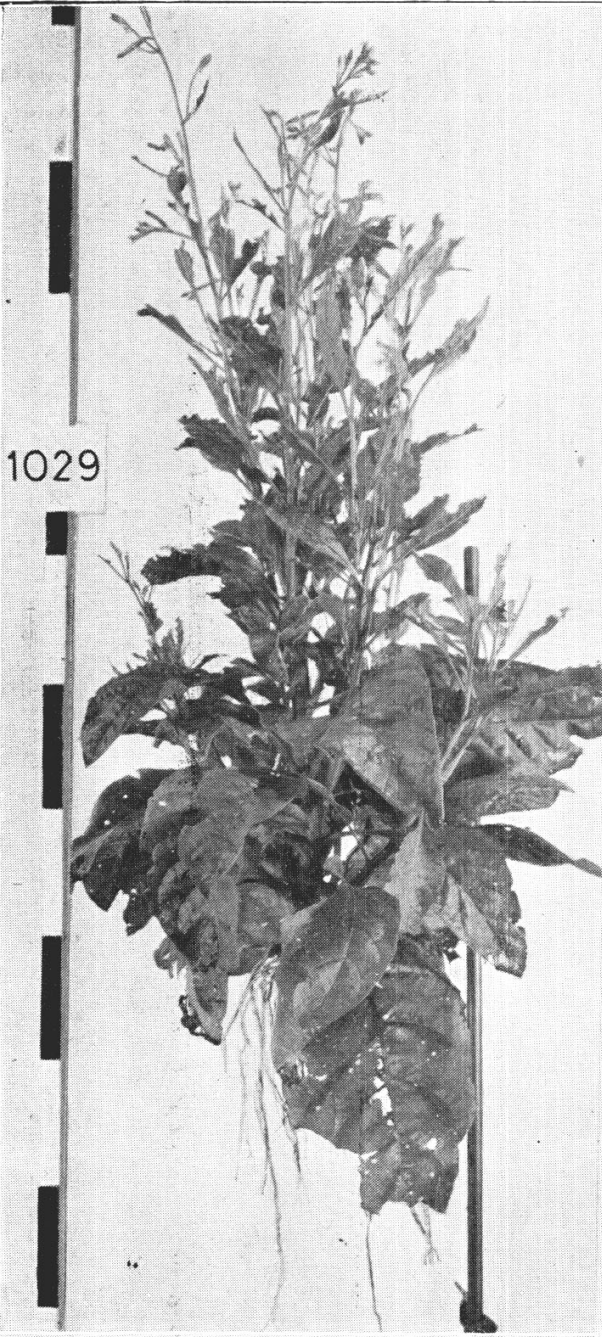
- Figura 5. Duas plantas da mesma família (N1029) mostrando a segregação no porte : no lado esquerdo (2N) planta do tipo *N. glauca* x *N. Langsdorffii* e, no direito (1N), planta do tipo *N. glauca* x *N. Sanderæ*.
- Figura 6. Colos das duas plantas da figura 5. A planta (1N) mostra o tumor precoce.
- Figura 7. Tumores no colo e nas raízes de uma planta no cruzamento *N. glauca* x *N. Langsdorffii*.
- Figura 8. *N. glauca* x *N. Langsdorffii*. Tumor na inflorescência, apresentando forte brotação.
- Figura 9. *N. glauca* x *N. Langsdorffii*. Inflorescência mostrando numerosos tumores em os nós.
- Figura 10. *N. glauca* x *N. Langsdorffii*. Tumores dos nós e internódios.
- Figura 11. Planta jovem do tipo *N. glauca* x *N. Sanderæ* no cruzamento *N. glauca* x (*N. affinis* x *N. Langsdorffii* F₁) mostrando tumores com grande número de brotos.
- Figura 12. A mesma planta da figura 11 com detalhe do colo e raiz.
- Figuras 13 a 16. Cortes transversais em hastes de híbridos *N. glauca* x *N. Langsdorffii* mostrando tumores em diferentes idades. Na figura 14 a flecha indica a formação de um ponto vegetativo. Na figura 16 a flecha indica a parte da haste principal só parcialmente visível.
- Figura 17. Parte do cortex primário da parte externa do colênquima num corte transversal, no híbrido *N. glauca* x *N. Langsdorffii*. A célula indicada pela flecha contém uma inclusão indeterminada.



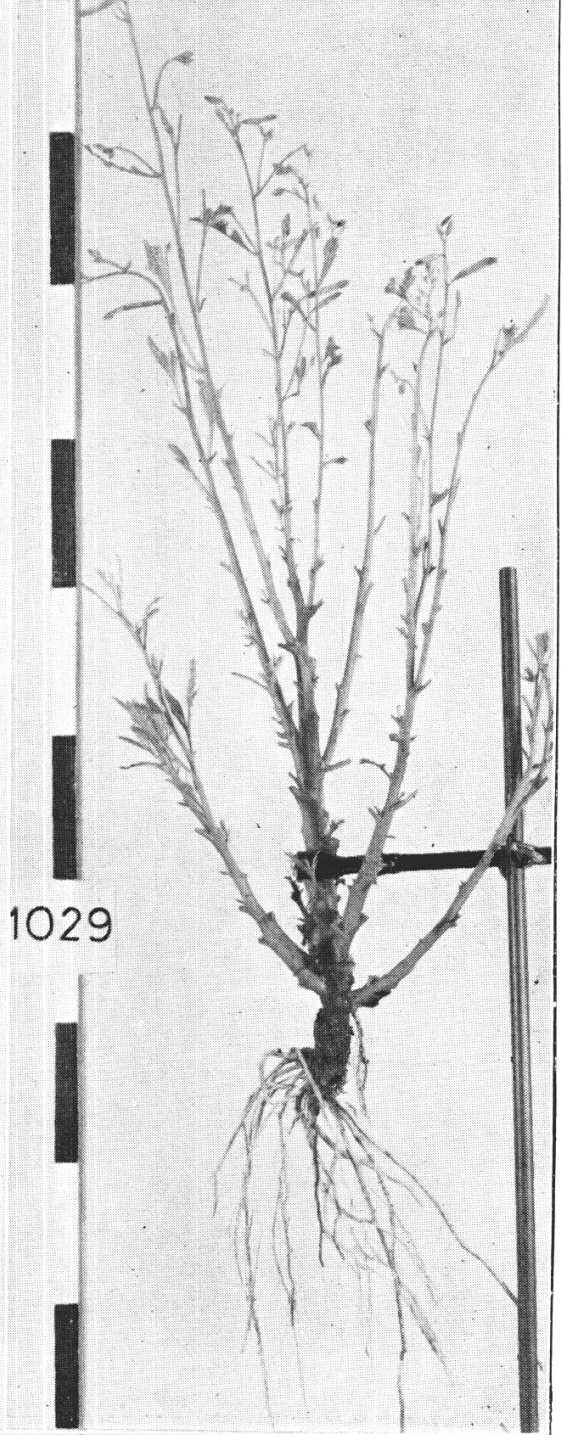
1



2

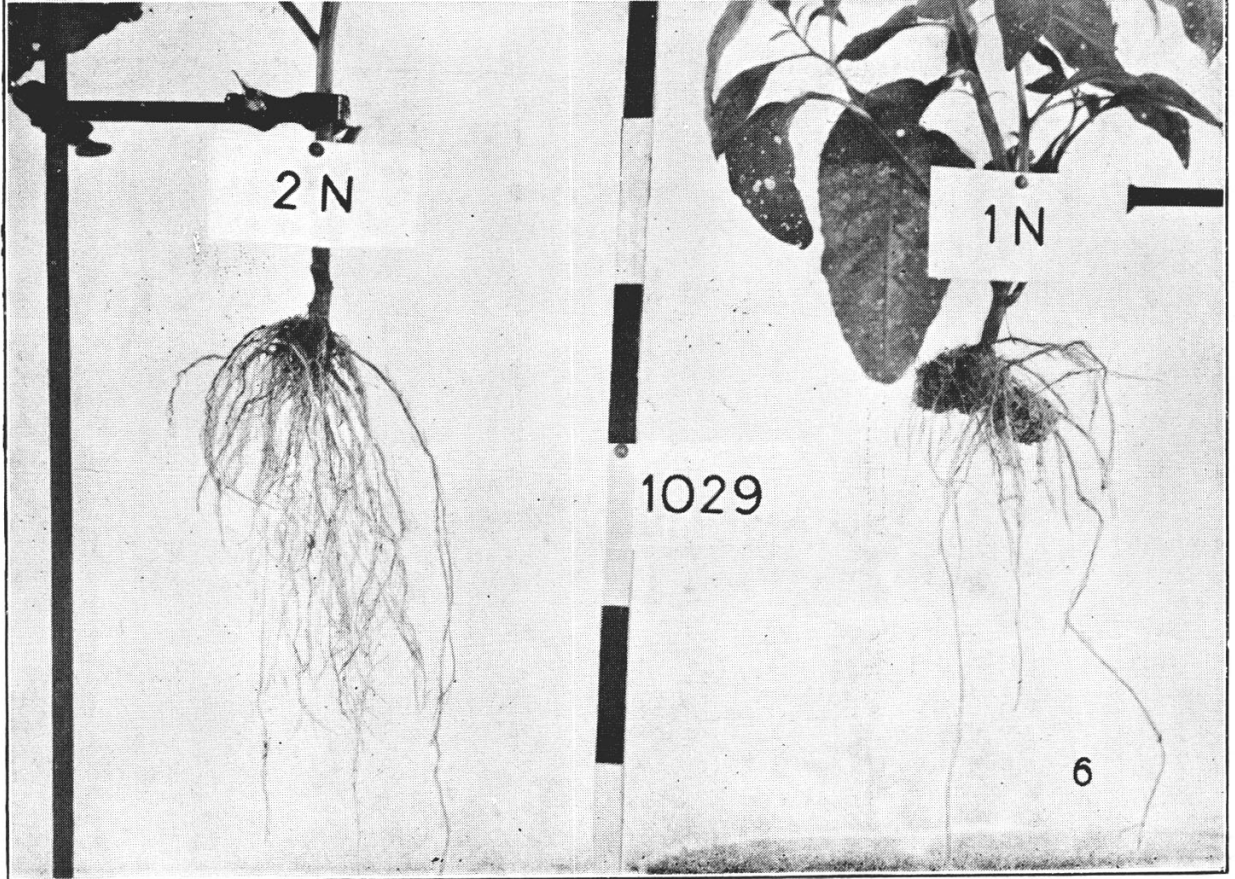
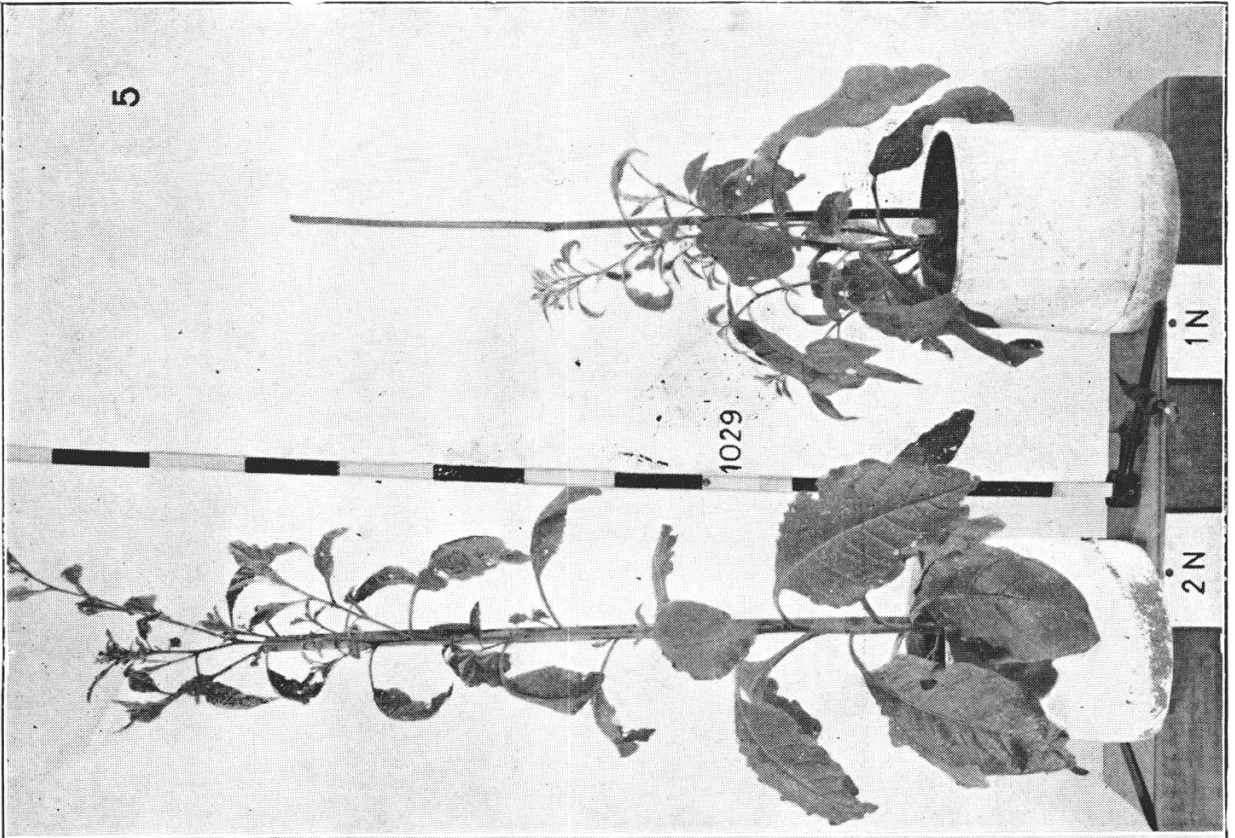


3



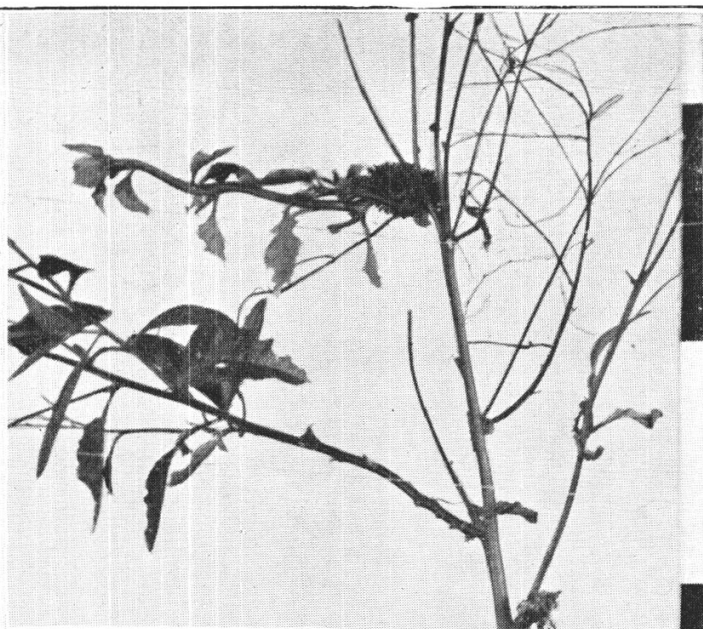
1029

4

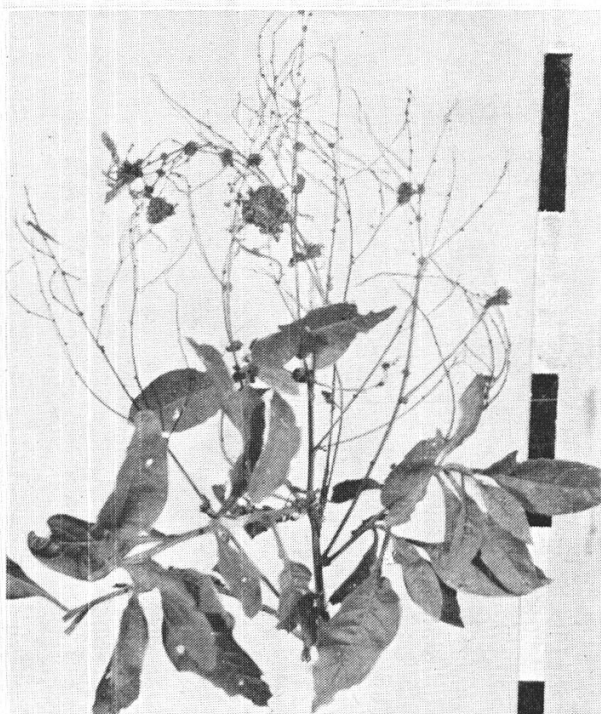




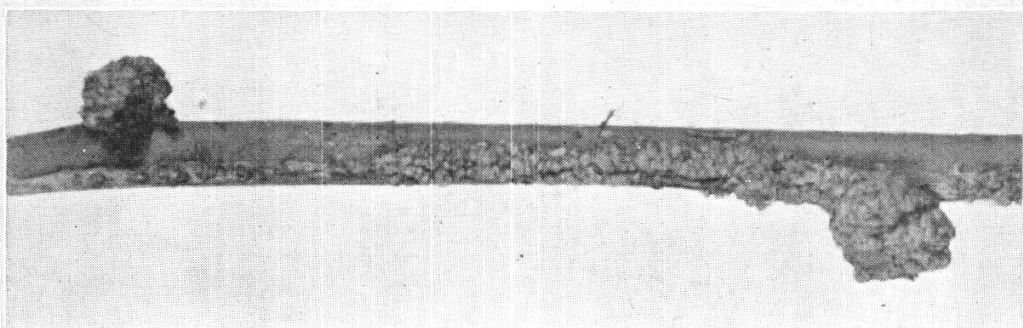
7



8

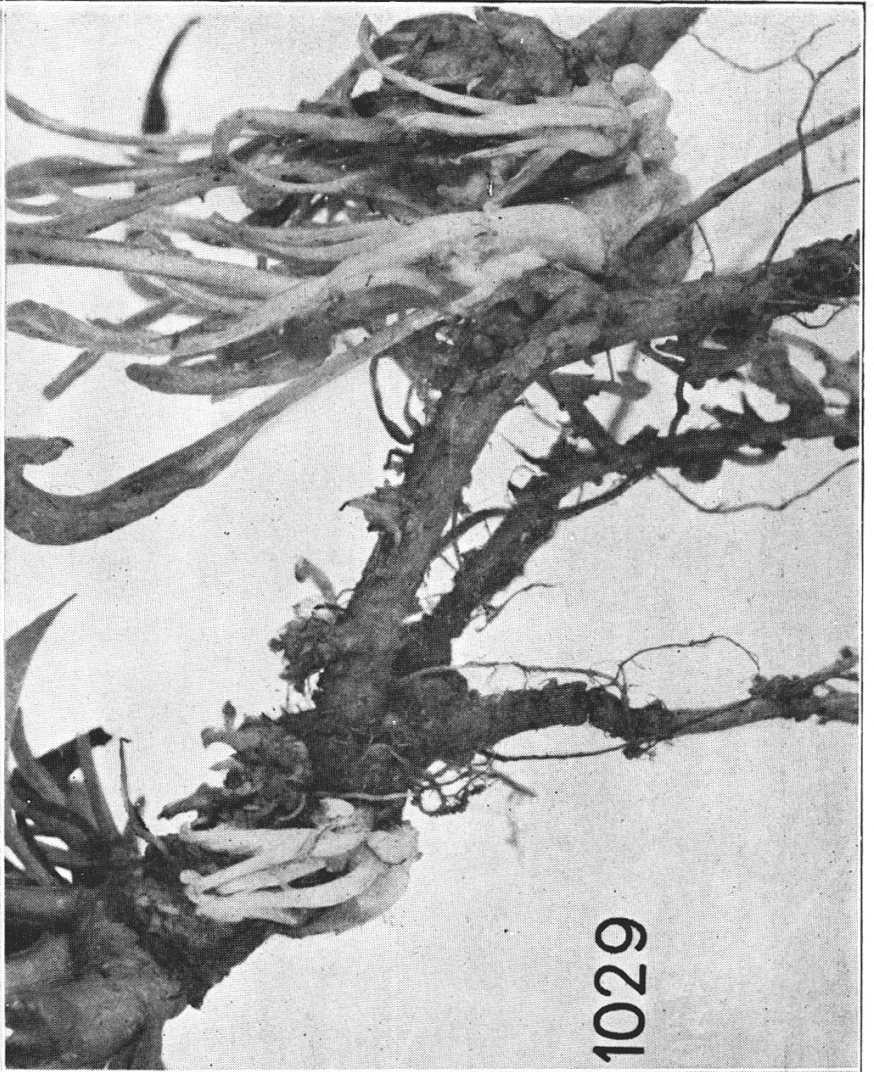


9



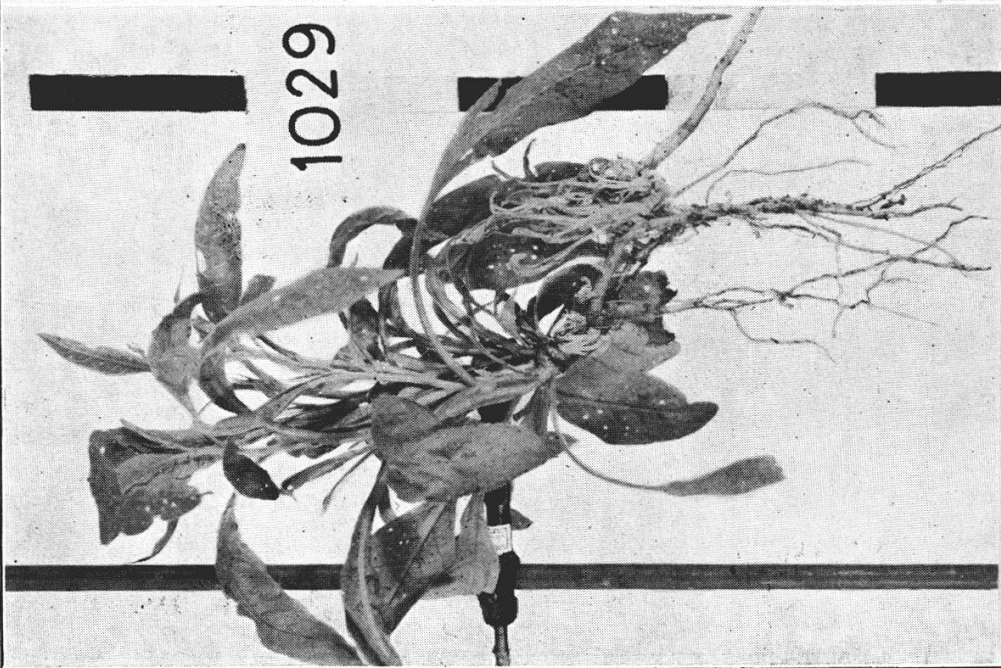
10

12

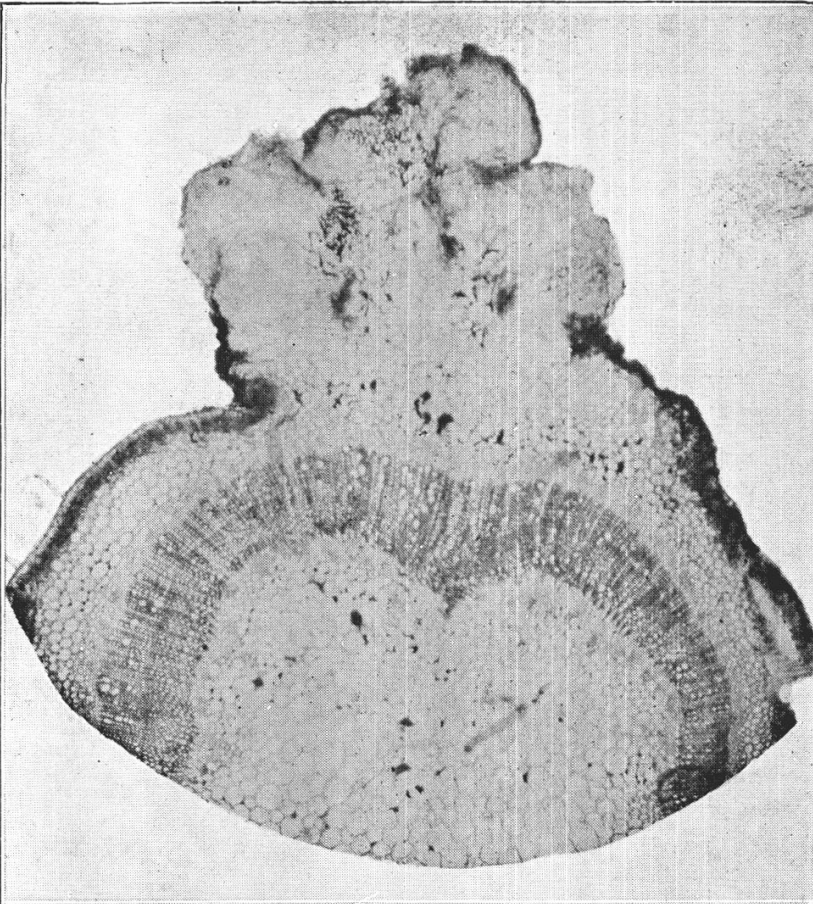


1029

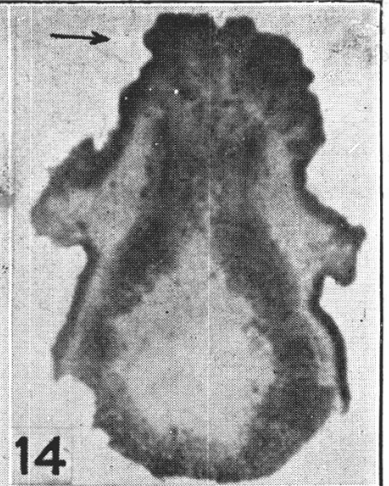
1029



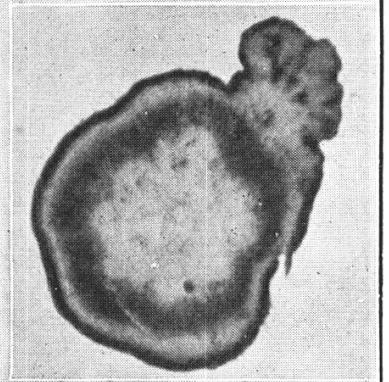
11



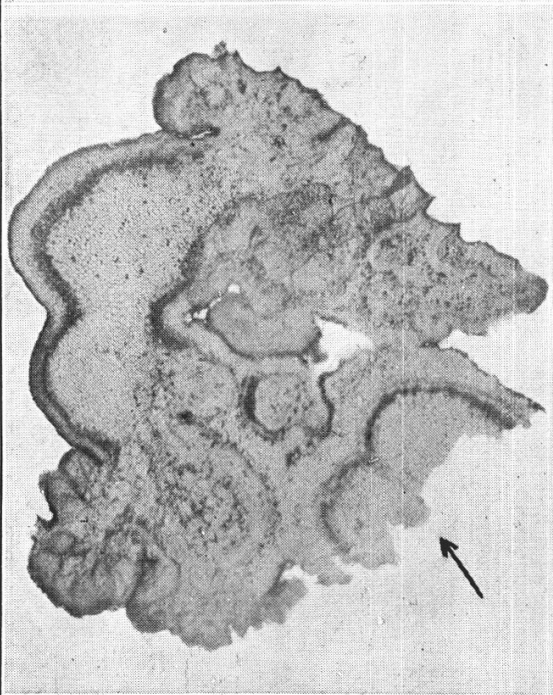
13



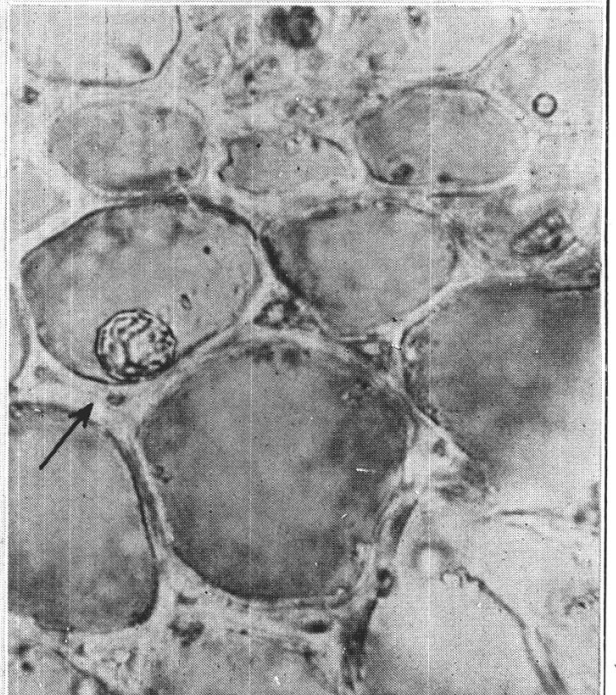
14



15



16



17