

## Cultura de tecidos vegetais

### Sua importância no estudo biológico de algumas hiperplasias (\*)

pelo

**Prof. ANDRÉ FRANCISCO NAVARRO**  
da Cadeira de Horticultura e Arboricultura

A cultura de tecidos segundo os métodos referidos por GAUTHERET e outros tem como ponto de partida formações tecidulares meristemáticas, com frequência obtidas a partir do meristema cambial. E no fim de um certo número de repicagens, digo melhor transferências para novos meios, vai-se reduzindo, progressivamente, por selecção histológica, a tendência para a diferenciação celular, aumentando, porém, o poder de proliferação de tecidos. Seguindo a técnica preconizada pelo autor citado, deixam, contudo, de poder ser interpretados, por razões que é óbvio enunciar, por evidentes, inúmeros aspectos metabólicos condicionados por indefiníveis interacções de correlação. Quer dizer, por outras palavras, este modo de proceder afasta muito a análise biológica experimental do quadro natural em que se desenrolam os fenómenos da vida celular. Isto não significa que a cultura de tecidos segundo os métodos referidos não tenha já permitido o esclarecimento de muitos problemas da fisiologia e da patologia, e isto especialmente desde os tempos em que o aperfeiçoamento de vários métodos de análise físico-química e biológica tem facultado a realização de estudos a partir de amostras de diminuta massa. Contudo, como ficou dito, não podemos generalizar o emprego dos métodos clássicos de cultura de

---

(\*) Este trabalho foi extraído da conferência de encerramento do Curso Complementar de Fisiologia Vegetal promovido pela Associação dos Estudantes de Agronomia no decurso do ano lectivo de 1956-57.

tecidos ao estudo de problemas da biologia que só possam ser devidamente equacionados desde que se mantenha, sensivelmente, o quadro natural em que se desenrolam estes fenómenos. Esta a razão que nos levou a procurar estabelecer, experimentalmente, a partir do método de cultura de tecidos de GAUTHERET, aquele que hoje é usado nos nossos laboratórios e que se aproxima mais do seguido na cultura dos órgãos radiculares segundo a técnica de WHITE, mantendo em condições de conveniente crescimento, e durante tempo suficientemente lato, formações histológicas relativamente complexas, permitindo-lhes uma evolução que se aproxime mais do processo natural <sup>(1)</sup>.

Tivemos, contudo, para colher o devido êxito, de evitar os inconvenientes que se verificam nos blocos histológicos em cultura demasiado prolongada e que determinam a sua morte prematura, atribuída não só a uma acumulação de produtos tóxicos do catabolismo, como também à inactivação das camadas inferiores absorventes por manifesta deficiência de oxigénio.

O método usado compreende a ablação periódica de regiões inferiores do bloco histológico em estudo, quando se verifique o início da formação de necroses, procedendo-se então, e só então, à sua transferência para novo meio de cultura por forma a eliminar os inconvenientes que resultam da acumulação de produtos excretados. Embora variável quanto à periodicidade, conforme a natureza e origem dos tecidos em estudo, as repicagens que preconizamos são muito menos numerosas que as indicadas no método de GAUTHERET e dizem respeito não apenas a tecidos em plena actividade de proliferação celular, mas sim, também, a complexos histológicos onde se manifestam, em vários graus, fenómenos de diferenciação — normais ou patológicos, conforme os casos estudados. Quando, porém, os tecidos em cultura, derem origem a formações rizogénicas e haja conveniência, no estudo experimental, de seguir o seu processo evolutivo, convirá, então, suprimir as transferências para novos meios, e apenas se introduzirão, quando for necessário, no recipiente de cultura e com os indispensáveis cuidados de assepsia, novas quantidades de líquido nutritivo, parte do qual será adsorvido pela geleia e o restante cobrirá apenas a parte inferior do bloco em estudo.

---

<sup>(1)</sup> Este método de cultura de tecidos começou a ser ensaiado, com êxito nos nossos laboratórios a partir de 1955, com a preciosa colaboração das preparadoras D. Eugénia Maurício e D. Maria Alice Pinto.

Foi por via do uso do método que resumidamente acabo de descrever que nos foi possível levar a efeito vários trabalhos de investigação, entre os quais aquele que é objecto da presente nota e cuja finalidade era fixar analogias e diferenças anatómicas e de alguns aspectos de comportamento fisiológico entre formações hiperplásicas obtidas a partir da cultura de tecidos de elementos histológicos normais e hiperplasias produzidas artificialmente, seguindo os métodos de estase descritos por ERWIN SMITH, MARQUES DE ALMEIDA e outros. E procedendo assim procuramos acrescentar modesta contribuição para uma mais profícua análise dos resultados de exaustivos trabalhos de investigação sobre o condicionalismo fisiológico de tumores de diversa origem, especialmente formações históides ocasionadas por virus, bactérias, fungos e parasitas animais e muito especialmente o *crown-gall*, este último tumor estudado com maior minúcia, pelo interesse derivado da semelhança que apresenta «quanto à forma, estrutura e evolução» com determinados cancroes animais, analogia ainda muito discutida, é certo, mas salientada por notáveis cientistas, entre os quais destaco ERWIN SMITH e MACROU. São deste último investigador as palavras que se seguem, referindo-se às hiperplasias provocadas pelo *Agrobacterium tumefaciens* em diversas espécies das famílias das Compostas, Solanáceas, Crucíferas, Umbelíferas, Gramíneas, Urticáceas, etc.:

«O estudo da estrutura e do desenvolvimento destas formações mostra que não há somente uma semelhança superficial, mas sim uma homologia profunda. Como o cancro, o *crown-gall* resulta duma proliferação exagerada de células novas, pouco diferenciadas, semelhantes àquelas cuja divisão assegura, no estado normal, a regeneração e o crescimento dos tecidos. As células formadas que o constituem permanecem como as dos cancroes, de pequeno tamanho, de citoplasma denso e núcleo volumoso; a relação núcleo-citoplasma é por consequência elevada, como nos tecidos cancerosos. A insuficiência de vascularização é ainda um carácter que aproxima o *crown-gall* do cancro; ela determina num caso como no outro a necrose do tecido tumoral, mas esta necrose é parcial e não provoca a destruição total do tumor. Ao lado dos lóbulos que faz desaparecer, outros surgem e crescem sem cessar constituindo verdadeiras recidivas locais». «O *crown-gall*, com efeito, diferencia-se da maior parte das galhas, que são tumores benignos, por não ficarem isolados dos tecidos circundantes por uma barreira de tecidos de protecção. São da mesma forma os cancroes, tumores invasores, que penetram e destroem os tecidos envolventes. A zona de invasão oferece,

nos dois casos, um aspecto microscópico idêntico: no *crown-gall* como no cancro, podem ver-se pequenas células de tumor, formando cordões que se insinuam afastando as grandes células diferenciadas dos parênquimas normais. A circunstância de surgirem *metástases*, e estas muitas vezes reproduzirem a estrutura do tumor primitivo, é outro indício salientado por vários autores para estabelecer a analogia entre as formas tumorais malignas observadas nos dois reinos».

É interessante lembrar agora, e fundamental para deduções que me proponho fazer, que na cultura de tecidos vegetais de tumor, se verifica em relação a quase todos eles, embora em hiperplasias da mais variada origem, uma perfeita identidade fisiológica perante as hormonas, isto é, um autotrofismo auxínico só comparável ao que se verifica em relação aos tecidos normais anérgicos ao ácido  $\beta$ -indolacético, por *habituação*. E estes mesmos, como é sabido, adquirem algumas características típicas dos tecidos tumorais. É esta identidade fisiológica que BUTLER e JONES completam com a afirmação da analogia anatómica, evidenciada até, segundo estes autores, entre o próprio *crown-gall* e determinadas hiperplasias que se desenvolvem nas zonas cicatriciais de certos enxertos, referindo é claro a enxertos de fragmentos somáticos pouco afins.

Pondo de parte, por não estar incluído no tema desta palestra, o estabelecimento de qualquer paralelo entre malignos afectando plantas e animais, precisemos, sim, com mais pormenor, o que se poderá dizer sobre analogias anatómicas e fisiológicas mais salientes entre as formações hiperplásicas malignas e benignas vegetais, e muito especialmente entre as que provêm da acção de vários agentes biológicos e as obtidas por estase resultante do estímulo de agentes físicos ou químicos sobre vários órgãos das plantas. E sigamos nesta análise sumária os textos de MAGROU e de SMITH na parte que se refere especialmente às várias formas cecidogéneas do tipo históide. A formação das galhas ou cecídeos de diferente origem é atribuída, como se admite desde longa data, a substâncias segregadas pelos agentes parasitários causadores das referidas hiperplasias. E supôs-se até que, além dos princípios estimuladores dos fenómenos de hipertrofia e hiperplasia, os referidos parasitas, em determinadas fases da sua evolução, segregariam substâncias de uma outra índole capazes de provocar o aparecimento de necroses — toxinas e enzimas, originando a morte e digestão dos teci-

dos neoformados. No *crown-gall*, porém, o necrosamento resultaria, em grande parte, de deficiências de irrigação.

A natureza dos princípios responsáveis pela cecidogênese mantém-se, porém, no domínio da pura hipótese até aos trabalhos de MOLLIARD referentes às nodosidades radiculares das Leguminosas provocadas pelo *Rhizobium leguminosarum*. Este autor fazendo germinar com os devidos cuidados de assepsia, sementes de ervilha em filtrados de cultura desta bactéria, obteve não propriamente tumores localizados do tipo característico das raízes das Leguminosas, mas hipertrofias e hiperplasias generalizadas, conseqüentes da didiferenciação de células pericíclicas e da hipertrofia da zona cortical.

Estas modificações anatómicas, que se traduzem por uma tendência à tuberização semelhante à que se verifica nas raízes transformadas em micorrizas endotróficas, puderam, também, ser por nós observadas, igualmente, e com análoga morfologia e características anatómicas, em hiperplasias radiculares de *Daucus carota* provenientes de blocos histológicos mantidos em cultura de tecidos segundo a técnica já descrita, mas onde se constituíram, por acidental fraccionamento do bloco de geleia, espaços saturados de humidade. Os tumores observados nos órgãos radiculares que penetraram nesses espaços eram de resto semelhantes aos descritos por ERWIN SMITH como tumores de estase de órgãos caulinares e folheares. Fig. 1. Notou-se também, nalguns casos, um acréscimo sensível da densidade de pelos radiculares e extensificação até à parte terminal da raiz, da zona pilosa. (Fot. 2 e 3). Contudo, a formação de hiperplasias radiculares, por estase hídrica foi de facto menos fácil de obter, mercê, julgo, do grau de habituação destes órgãos a um elevado gradiente auxínico. As fotografias 4 e 5 mostram bem a identidade destas formações com as descritas por SMITH, MARQUES DE ALMEIDA e outros.

A descoberta pela senhora BROWN e GARDNER em 1936, e a de WILCOX e LINK em 1937 e ainda a de BERTHELOT e senhora AMOREUX em 1938, permitiram desvendar, em parte, a natureza íntima das acções hiperplásicas e hipertróficas de certos agentes biológicos, estabelecendo as possíveis relações entre os mesmos e a presença de um gradiente elevado de ácido  $\beta$ -indolacético, possivelmente derivado de tritofana.

BERTHELOT e a senhora AMOREUX afirmam mesmo que o facto verificado do teor excepcionalmente baixo em tritofana de certas espécies poderia ser causa da imunidade delas perante os ataques de *Agrobacterium tumefaciens*. LOCKE, RICHER e DUGGAR em 1938, verificando

também o maior teor em ácido  $\beta$ -indolacético das plantas inoculadas com *Agrobacterium tumefaciens* em relação a testemunhas, admitem, porém, que a causa não será propriamente a auxina produzida pelo parasita mas sim a fitohormona elaborada pelas próprias células dos tecidos parasitados. E assim é que, quando decapitaram as plantas privando-as dos órgãos produtores de fitohormona, observaram, com estirpes atenuadas de *Agrobacterium tumefaciens*, que as formações hiperplásicas eram nitidamente menos evidentes. E finalmente nesta sequência de trabalhos experimentais foram particularmente esclarecedoras as investigações de BRAUN e LASKARIS, trabalhando com *Solanum Lycopersicum* inoculado com estirpes atenuadas de *Agrobacterium tumefaciens* e aplicando como estimulante nas extremidades decapitadas de plantas desta espécie determinadas auxinas — a heterauxina e duas auximonas — os ácidos naftilacético e o  $\beta$ -indolbutírico. Verificaram estes investigadores que as plantas actuadas pelas auxinas e inoculadas com *Agrobacterium tumefaciens* especialmente na série do ácido naftilacético formavam tumores de grande desenvolvimento, os quais enxertados em plantas sãs dariam hiperplasias de crescimento excepcionalmente rápido. Pelo contrário, quando se verificava apenas a actuação da fitohormona ou das auximonas constituíam-se hiperplasias de desenvolvimento muito mais limitado. Isto é, a acção impulsionadora inicial exercida pela bactéria em referência continuava desconhecida, e era indispensável que se verificasse para que se mantivessem as características malignas de hiperplasia. Da mesma forma, os tumores obtidos por estase por ERWIN SMITH e outros investigadores referidos na notável obra *Bacterial Diseases of Plants* e por MARQUES DE ALMEIDA, na publicação «*Acerca do Transporte Polar das Auxinas, II — Da estase do transporte e das formações neoplásicas*», embora alguns deles de aspecto evolutivo excepcionalmente rápido e de carácter eminentemente invasor e destruidor dos tecidos, não eram susceptíveis com o crown-gall de revelar a formação de verdadeiras metástases em zonas onde a estase não tivesse exercido acção paralisadora da circulação auxínica, continuando assim, conforme a expressão de MACROU, desconhecida a natureza da impulsão inicial determinada pela bactéria responsável por esta hiperplasia maligna.

De resto, podemos admitir que a estase, alterando a permeabilidade das membranas citoplásmicas, ocasiona em apreciáveis extensões orgânicas um condicionalismo hormonal determinante de profundas alterações anatómicas e fisiológicas. E, conforme verifiquei em tra-

balho conjunto que realizei com MARQUES DE ALMEIDA, este estado hormonal reflecte-se mesmo na manutenção da forma juvenil de certos órgãos, como as folhas. *Montanoa bipinatifida* quando se submetem caules de plantas desta espécie a uma estase hídrica prolongada. E facto interessante a relembrar é que essa morfologia se alterava quando, surgindo órgãos radiculares no fragmento somático, se modificava o gradiente hormonal dos tecidos caulinares.

São ainda de citar, para melhor esclarecimento deste aspecto do problema, os trabalhos realizados em East Malling promovendo o aparecimento de hiperplasias pela acção do ácido  $\beta$ -indolbutírico e as investigações realizadas na América, citadas por BUTLER e JONES, em que foram obtidos, pela acção do ácido  $\beta$ -indolacético, tumores primários e secundários, aparecendo estes a uma certa distância do ponto actuado pela auxina. Investigações realizadas nos nossos laboratórios em 1956 permitiram verificar, também, a distância apreciável da região injectada, hiperplasias com numerosas formações rizogénicas, usando ácido naftilacético em concentração de  $2 \times 10^{-6}$ , injectado continuamente, durante um período de trinta dias, em caules de *Solanum Lycopersicum* (Fot. 6 e 7), bem como pela inoculação com extracto obtido por cocção de *Gelidium pulchellum*, em incisões praticadas na base do caule, e usando como induto a lanolina.

Neste último trabalho experimental, concluído em Junho de 1957, verificou-se a formação de tumores secundários muito afastados da zona de incisão, surgindo mesmo algumas hiperplasias no pecíolo das folhas, afastadas 5 nós do meritalo onde se praticou a inoculação.

O facto de não ser possível manter durante tempo suficiente as hiperplasias obtidas por estase hídrica tem tornado, porém, de difícil realização os estudos de fisiologia e de anatomia comparadas com outras formas hiperplásicas. As tentativas para prolongar a sua evolução, em cultura de tecidos, não têm sido, até hoje, coroadas de êxito, em parte por dificuldades de desinfectão contra fungos normalmente invasores da cultura de tecidos e possivelmente, também, pela diminuta massa dos fragmentos hiperplásicos ensaiados.

Dentro de alguns meses, será possível, todavia, que os blocos histológicos em cultura e que já ultrapassaram um ano de existência, nos venham a fornecer preciosos elementos para esta análise.

Contudo, numa série de espécies experimentadas quanto à formação de hiperplasias por estase hídrica, numa delas, o lilazeiro — *Syringa vulgaris*, — foi possível obter, a partir duma formação suficientemente

evoluída, figuras anatómicas já notavelmente esclarecedoras quanto a semelhanças, denunciadas nas estruturas de hiperplasias mais novas obtidas por estase e em cultura de tecidos vegetais, com o *crown-gall*, confirmando assim a opinião emitida por BUTLER e JONES quanto à analogia estrutural de certas hiperplasias com o tumor provocado pelo *Agrobacterium tumefaciens*. As microfotografias 8 e 9 relativas ao tumor de estase da espécie referida, a *Syringa vulgaris*, denunciam especialmente apreciável semelhança em referência aos nódulos vasculares dispersos, envolvidos por formações pericíclicas, situadas em várias regiões da estrutura, constituindo pseudo-estelas de morfologia variada, e ainda o aparecimento de tecidos meristemáticos, didiferenciados a partir de células parenquimatosas localizadas para o exterior das camadas pericíclicas. A actividade proliferante toma nesta estrutura frequentemente o aspecto lobular, formando, como diz MAGROU, *recidivas* locais ampliando, progressivamente, o tumor primitivo. E foi ainda fácil observar, em várias regiões anatómicas, a presença de tecidos dispersos com características meristemáticas, formados por células com relações núcleo-protoplasma muito elevadas. Noutras regiões notaram-se tecidos didiferenciados constituindo faixas alongadas semelhantes àquelas que puderam ser observadas na cultura de tecidos de *Daucus carota* que se introduzem entre os tecidos definitivos parenquimatosos tomando o aspecto infiltrante, semelhante a algumas estruturas de *crown-gall*.

O que fica dito vem, segundo julgo, algo esclarecer sobre a natureza íntima das hiperplasias nos domínios do reino vegetal. Isto é, a semelhança anatómica do processo evolutivo dos vários tumores não provocados artificialmente com os obtidos pelo artifício da estase — e podemos incluir, nestes últimos, as formações hiperplásicas originadas em cultura de tecidos — seria expressão de uma causa formativa comum e que, conforme tudo leva a crer, representará um desvio metabólico consequente do elevado gradiente fitohormónico quando este atinge horizontes *parafisiológicos*. Simples acréscimo de fitohormona livre ou outra causa, a ciência o desvendará um dia. E quanto ao caso inexplicável da acção inicial até hoje insubstituível provocada pelo *Agrobacterium tumefaciens* responsável pelo cancro vegetal, e que se verifica mesmo no caso em que a referida bactéria já não actuar directamente, não será difícil admitir que ele seja consequente dum desvio metabólico perene semelhante àquele que se observa nos tecidos anérgicos à fitohormona obtido por habituação progressiva.

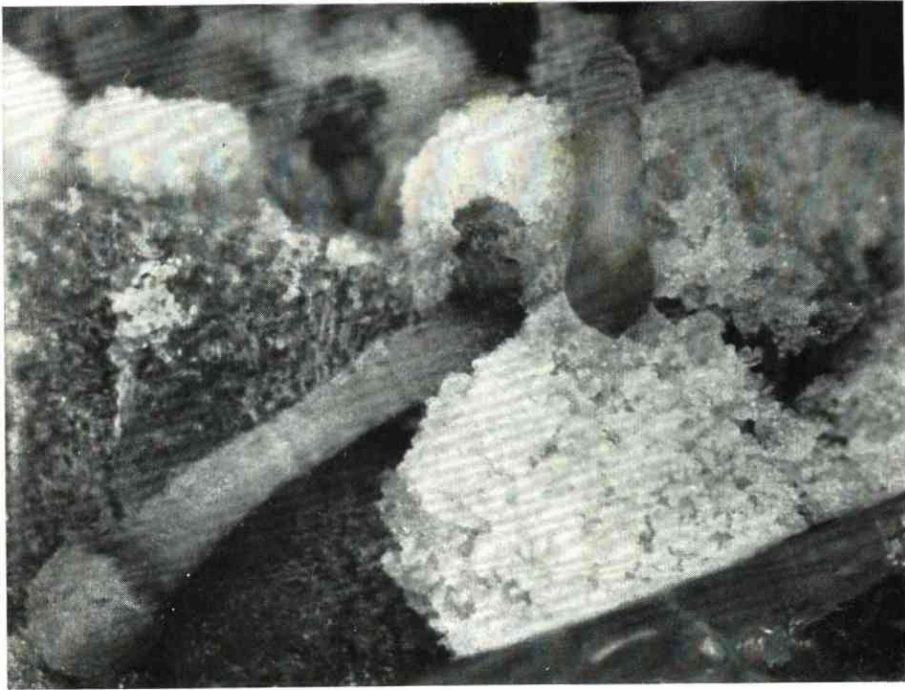
Esta ou outra explicação, o que parece poder admitir-se é que, na origem dos fenómenos que conduzem à hipertrofia e à hiperplasia dos tecidos e que revestem carácter benigno ou maligno conforme a intensidade e a perenidade das causas determinantes do fenómeno — isto, é claro, nos domínios do reino vegetal —, está sempre a existência de um meio humoral desequilibrado, especialmente no que se refere ao facies hormonal e a que não é alheio também um ambiente respiratório deficiente em oxigénio. Será esta causa semelhante à que, nos organismos animais, muito mais complexos pela diferenciação glandular, determina as formações malignas — os cancros animais? A ciência o dirá decerto um dia, e Deus permita que esse dia esteja já próximo.

#### S U M M A R Y

- 1— The A. has developed a modification of Gautheret's tissue culture method which allows maintenance of hystological blocks for longer periods. This offers a greater ease of interpretation of hystological processes relative to tumour development.
- 2— The modification consists of slicing off the lower portion of the hystological blocks at the first signs of necrosis; subcultures are made at this stage. When subculturing is not involved, fresh liquid nutrient may be introduced in the culture vessels, the active portion of the blocks remaining quite free from contact with the liquid medium.
- 3— Data were obtained on the comparative anatomy of the following formation and progressive development of *crown gall*, of tumours induced by hydric stasis and also those brought about by different hormones.
- 4— A remarkable likeness of structure and physiological behaviour was noted between neoplastic formations obtained by hydric stasis, *auximonas* and *crown gall*. This supports the observations of Butler and Jones on the anatomical analogy between *Agrobacterium tumefaciens* tumours and certain hyperplasias of scar zone in some grafts.

## BIBLIOGRAFIA

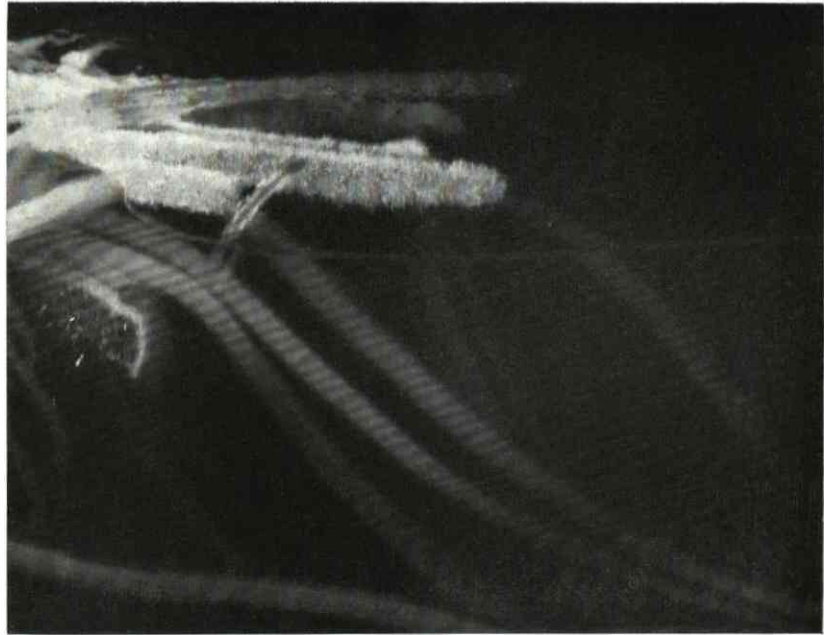
- ALMEIDA, C. R. Marques de  
 1950 Acerca do transporte polar das auxinas. *Anais Inst. Sup. Agron.* **17**:261.  
 1952 Acerca do transporte polar das auxinas. II — Da estase do transporte e das formações neoplásicas. *Anais Inst. Sup. Agron.* **19**:25.
- BLACK, L. M.  
 1955 A virus tumor disease of plants. *American Journal of Botany* **32**:408.
- BUTTER, Erwin J. and S. C. JONES  
 1955 Plant botany. *Enc. of Chemical Technology*.
- ESSAU, Katherine  
 1940 Developmental anatomy of the fleshy storage organ of «*Daucus Carota*». *Hilgardia* **13** (5):1.
- GAUTHERET, R. J.  
 1937 *La culture des tissus végétaux son état actuel, comparaison avec la culture des tissus animaux.*  
 1942 *Manuel technique de culture des tissus végétaux.*  
 1948 *La culture des tissus végétaux. Endeavour* VII (26).  
 1955 The nutrition of plant tissue cultures. *Annual Review of Plant Physiology*.
- GREULACH, Victor A. and John G. HAESLOOP  
 1954 Some effects of maleic hydrazide on internode elongation cell enlargement and stem anatomy: *American Journal of Botany* **41**:44.
- IOUMANS, W. B.  
 1952 *Basic medical physiology.*
- LIMASSET, P. et H. Augier de MONTGRENIER  
 1946 Sur une maladie à virus provoquant des déformations foliaires remarquables chez le tabac et le tomate. *Annales des Épiphyties* XII.
- MACROU, J.  
 1946 *Les maladies des végétaux.*
- MARSDEN, Marjery P. F. and R. WETMORE  
 1954 In vitro culture of the shoot tips of «*Psilotum nudum*». *American Journal of Botany* **41**:640.
- NAVARRO, André e C. R. Marques de ALMEIDA  
 1952 Acerca do transporte polar das auxinas. II — Da ocorrência e da persistência do carácter juvenil. *Anais Inst. Sup. Agron.* **19**:35.
- SMITH, Erwin F.  
 1920 *Bacterial diseases of plants.*
- VALLEAU, W. D.  
 1947 Clubroot of tobacco: A wound tumor like graft-transmitted disease. *Phytopathology* **37** (7).
- WIGGANS, Samuel C.  
 1954 Growth and organ formation in callus tissues derived from «*Daucus Carota*». *American Journal of Botany* **41**:321.



*Figura 1*



*Figura 2*



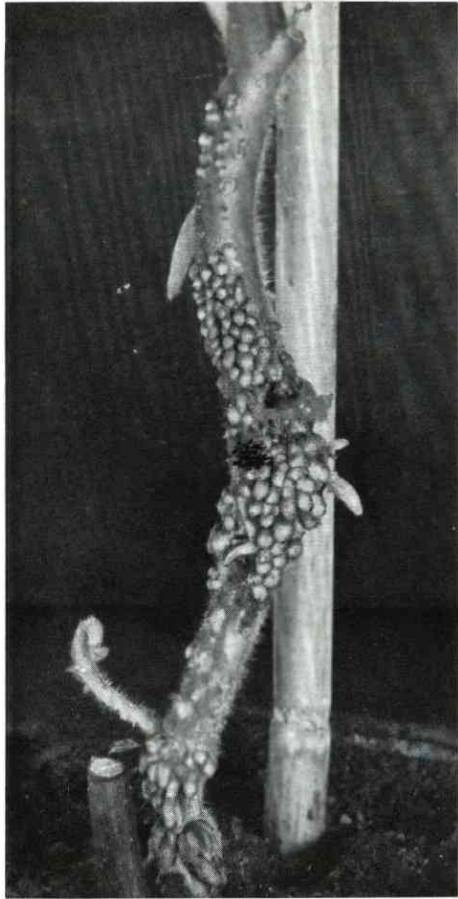
*Figura 3*



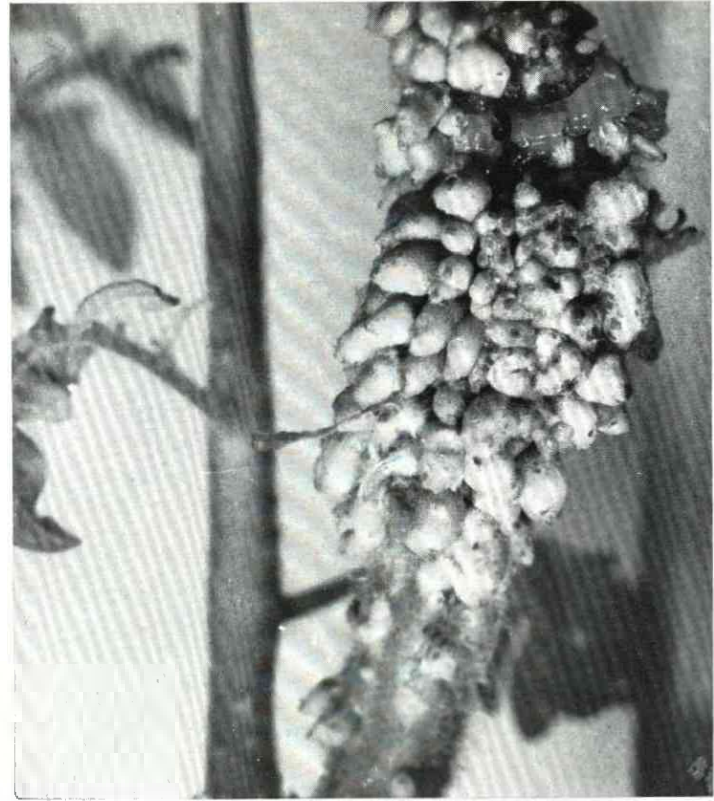
*Figura 4*



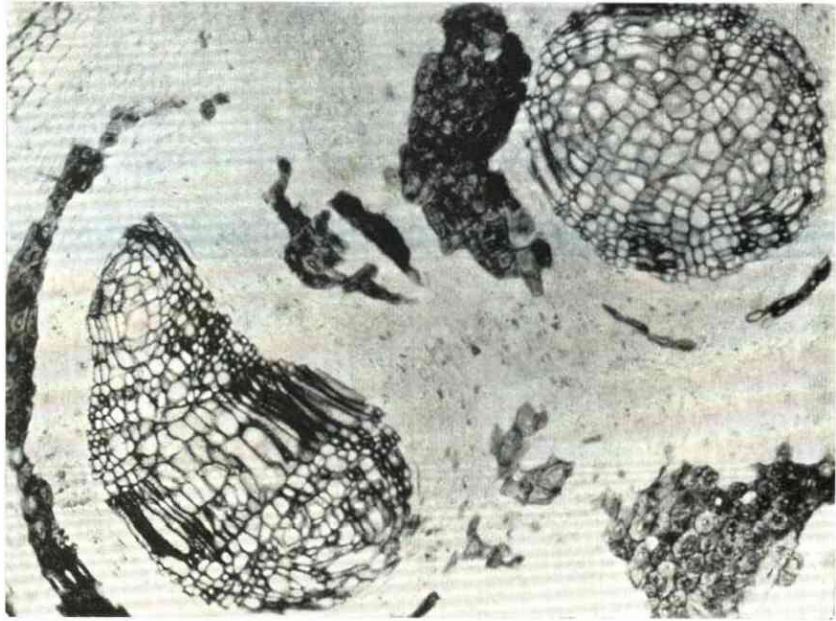
*Figura 5*



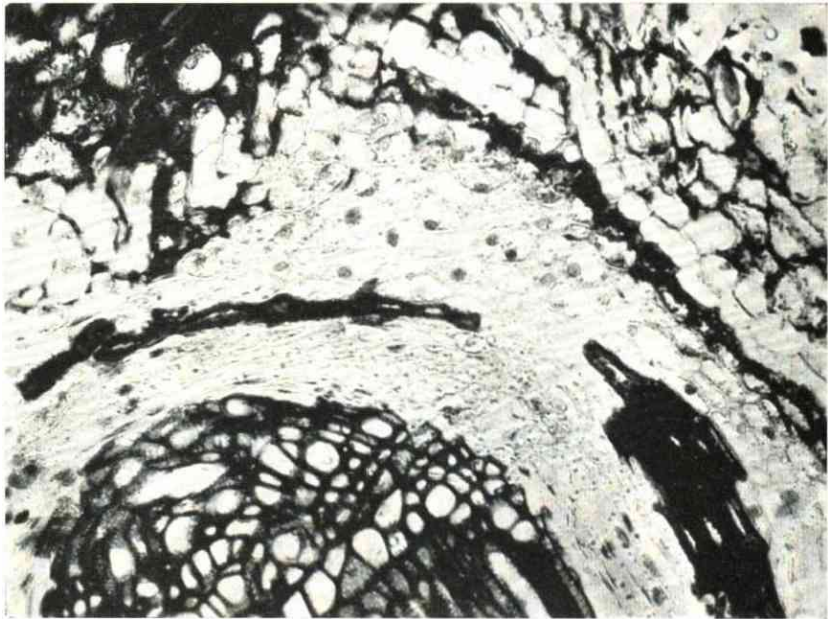
*Figura 6*



*Figura 7*



*Figura 8*



*Figura 9*