

L. RIGGIO BEVILACQUA (*), G. ROTI MICHELOZZI (*), P. MODENESI (*)

IMPLICAZIONE DEL CALLOSO NELL'IMPERMEABILITÀ DEL SEME DI *LATHYRUS LATIFOLIUS* L. (LEGUMINOSAE)

Riassunto — La «durezza» del seme di *Lathyrus latifolius* L., che ne causa la dormienza, è dovuta allo strato a palizzata del tegumento seminale. Nelle pareti delle cellule malpighiane viene evidenziato il calloso, che viene proposto come uno dei fattori della impermeabilità, insieme alle sostanze pectiche e alla «suberina» del «cono».

Abstract — *Callose implication in the impermeability of Lathyrus latifolius* L. (Leguminosae) seed. «Hardness» in *Lathyrus latifolius* L. seeds is the cause of their dormancy and is due to the palisade layer of the testa. Callose is demonstrated in the malpighian cell walls. It is suggested that callose is one of the substances involved (together with pectins and suberin) in *Lathyrus latifolius* seed impermeability.

Key words — *Lathyrus*, Seed hardness, Histochemistry, Callose.

La «durezza» dei semi è argomento già ampiamente studiato, che continua però a interessare, in quanto molti aspetti di essa non sono stati ancora chiariti.

L'impermeabilità dei semi, cioè la loro «durezza», poggia su due fattori, uno strutturale e l'altro chimico. Nelle leguminose il primo interessa generalmente lo strato a palizzata del testa, formato da cellule (a palizzata = malpighiane = macrosclereidi) a pareti fortemente ispessite, situate una accanto all'altra senza spazi tra di loro. Il fattore chimico è dovuto invece a sostanze che rendono il tessuto malpighiano impermeabile, quali cere, fenoli, lignina, tannini, suberina, pectina e derivati chinonici (ROLSTON, 1978).

Recentemente RIGGIO BEVILACQUA e coll. hanno proposto che anche il calloso — sostanza ben nota come occludente nel floema (CURRIER and STRUGGER, 1956), nello stigma in caso di impollinazione incompatibile (KERHOAS *et alii*, 1983) e nella resistenza all'invasione di patogeni (HINCH

(*) Istituto ed Orto Botanico Hanbury dell'Università di Genova.

and CLARKE, 1982; BLACKMAN *et alii*, 1982) — eserciti un ruolo nella impermeabilizzazione del tegumento seminale.

La presenza di questa sostanza è stata infatti evidenziata istochimicamente nelle pareti delle cellule a palizzata di *Gleditsia triacanthos* (RIGGIO BEVILACQUA *et alii*, 1986), *Sesbania punicea* (BEVILACQUA *et alii*, 1987), *Melilotus alba* (BEVILACQUA *et alii*, in stampa) e *Vicia loiseleurii* (RIGGIO BEVILACQUA e ROTI-MICHELOZZI, 1989).

Il seme di *Lathyrus latifolius*, le cui caratteristiche sono ampiamente descritte da GUNN (1970), mostra al SEM una superficie papillosa, in cui ogni papilla corrisponde alla protrusione cupuliforme di ciascuna cellula malpighiana (LERSTEN, 1979). La superficie appare perciò simile a quella del *Melilotus alba* (LERSTEN and GUNN, 1982; RIGGIO BEVILACQUA *et alii*, 1986), seme la cui impermeabilità sembra dovuta sia alla suberina del «cono» delle cellule a palizzata (HAMLY, 1932), sia al calloso presente nella maggior parte della loro parete (BEVILACQUA *et alii*, in stampa).

Lo scopo della presente indagine è verificare se alla somiglianza della superficie seminale tra *Lathyrus* e *Melilotus* corrisponde una somiglianza più generale, non solo nella forma delle cellule malpighiane, ma anche nella natura delle sostanze chimiche che ne determinano l'impermeabilità.

MATERIALE E METODI

Materiale

Sono stati usati semi prelevati da piante di *Lathyrus latifolius* L., crescenti spontaneamente in comune di Cartosio (AL). La raccolta è stata compiuta quando il legume era secco, ma non ancora aperto. Per la ricerca sono stati utilizzati solo i semi che apparivano perfettamente integri. La forma dei semi è variabile ed anche il loro colore (dal camoscio al nero, con presenza anche di esemplari chiazzati).

Autofluorescenza

I semi secchi sono stati esaminati in epifluorescenza (vedi oltre).

Preparazioni microscopiche

1) *Sezioni al criostato*. Sono state eseguite su semi imbibiti (previa

incisione del tegumento) tagliando sezioni dello spessore di 8-10 μm .

- 2) *Inclusioni in resina*. I semi, fatti rigonfiare per incisione del tegumento, sono stati fissati in FAA (JENSEN, 1962), disidratati nella serie degli alcoli ed inclusi in resina Jb-4 in capsule BEEM (BRINN and PICKETT, 1979). I blocchetti sono stati sezionati a 2-4 μm usando un ultramicrotomo Reichert Om U2 munito di lama di vetro. Le sezioni sono state montate in DPX dopo colorazione.
- 3) *Separazione di cellule*. È stato usato il metodo dei fitoglifi: dai semi imbibiti è stato separato il tegumento che è stato fatto bollire 15 minuti o più in una miscela costituita da una parte di acido acetico glaciale e 6 parti di acqua ossigenata a 100 volumi (O'BRIEN and McCULLY, 1981).

Per la caratterizzazione citochimica delle cellule malpighiane sono state usate le colorazioni indicate nella tabella n. 1. L'autofluorescenza e la fluorescenza indotta sono state osservate in epifluorescenza con un microscopio Leitz Dialux 22 EB. È stato usato di solito il blocchetto di filtri H2 (luce incidente: 390-490 nm); il blocchetto A (340-380 nm) è stato usato per la fluorescenza indotta dal calcofluor white.

RISULTATI

L'autofluorescenza dei semi di *Lathyrus latifolius* dipende dal loro colore: nulla nei semi neri, è presente, sia pure non molto accentuata, in quelli color camoscio.

Come risulta dalla tabella 1 e dalle fotografie, nel tegumento seminale di *Lathyrus latifolius* lo strato delle cellule a palizzata è intensamente colorato dal rosso di rutenio. Questo, come è ben visibile nella fig. n. 1, colora, in sezioni al criostato (ed anche in quelle in resina), il cono delle cellule malpighiane e le sottostanti pareti, con esclusione della linea lucida. La colorazione è assunta da sostanze, probabilmente pectine, che vengono solubilizzate durante la fitoglifatura (purché sufficientemente duratura), sicché le cellule separate in questa maniera non si colorano più con questo reagente (risultato non mostrato).

In quanto al TBO, questo colora, in sezioni in resina (Fig. 2) e al criostato, la parte superiore del cono, la zona al di sotto della linea lucida dove si vedono nettamente delle scanalature, ed il citoplasma, relativamente abbondante, nella parte inferiore della cellula. In parte questa colorazione viene assunta anche nelle cellule se-

TAB. 1 - *Semi maturi di Lathyrus latifolius L. Reazioni citochimiche nelle pareti delle cellule malpighiane.*

Colorante	Sostanze colorate o rese fluorescenti * e riferimento bibliografico	Si colora o diventa fluorescente	
		in sezioni in resina in sezioni al criostato in fitoglifi	
Rosso di rutenio	Polisaccaridi acidi (Luft, 1971)	Tutte le pareti, cono compreso	Niente
Blu di toluidina O	Componenti della parete (O'Brien et alii, 1964)	Parte superiore del cono, scanalature	Scanalature
Sudan black B	Lipidi (Bronner, 1975)	Parte inferiore del cono, esterna alla linea lucida	
Auramina O	Lipidi (Considine and Knox, 1979)	—	*Parte inferiore del cono
Blu Nilo	Lipidi (Considine and Knox, 1979)	—	Cono
Calcofluor white M 2 R new	Pareti pectocellulosiche e callosiche (Hughes and McCully, 1975)	—	*Cono e scanalature
Blu di anilina	Soprattutto calloso (Tiwari, 1982)	—	*Pareti, cono compreso
Reazione acido periodico-Schiff (PAS)	Polisaccaridi (O'Brien and McCully, 1981); Fenoli (Geier, 1980)	Parete, cono compreso	Niente

parate mediante fitoglifatura (Fig. 3), dove compare pure, colorato in azzurro, il nucleo.

I coloranti dei lipidi (sudan black B, auramina e blu Nilo) colorano fortemente e tipicamente le cellule malpighiane ottenute col procedimento dei fitoglifi: si noti in particolare la striscia nera alla base del cono ottenuta col sudan (Fig. 4), la fluorescenza determinata dall'auramina, pressoché nella stessa zona (Fig. 5), ed il cono tutto blu prodotto dal blu Nilo (Fig. 6).

Sempre nei fitoglifi il calcofluor white M2R new rende fluorescenti cono e scanalature (Fig. 7), mentre il blu di anilina induce fluorescenza nel cono e nelle pareti, escludendo, a volte, la parete tangenziale interna (foto 8).

La PAS colora pareti (cono compreso), oltre al nucleo, nelle sezioni in resina ed al criostato; solo il nucleo e non le pareti e il cono nei fitoglifi.

DISCUSSIONE DEI RISULTATI

I risultati ottenuti con l'indagine citochimica mostrano per le cellule a palizzata del tegumento seminale di *Lathyrus latifolius* una composizione complessa, in cui, a nostro avviso, sembrano avere rilevanza ai fini dell'impermeabilità: 1) i polisaccaridi acidi, 2) le sostanze lipidiche del cono, 3) il calloso.

I polisaccaridi acidi, colorabili col rosso di rutenio ed allontanabili mediante ebollizione nella miscela acido acetico-acqua ossigenata, costituiscono la parte più esterna della parete della cellula malpighiana, cono compreso. Un ruolo impermeabilizzante delle pectine era già stato suggerito da ROLSTON (1978) ed è stato successivamente confermato da BARON-EPEL *et alii* (1988). Alla presenza di sostanze lipidiche (simili a quelle chiamate «suberina» nel cono delle cellule malpighiane del seme di *Melilotus alba*) è da ascrivere l'autofluorescenza dei semi di *Lathyrus* a pigmentazione più chiara, mentre i pigmenti neri presenti negli altri la impediscono in quanto assorbono la luce. Questo fatto avviene, ad esempio, anche nei semi di *Vicia loiseleurii*, neri, che non sono fluorescenti, mentre quelli di *Vicia hirsuta*, chiazzati, sono fluorescenti nelle zone chiare e non in quelle nere (ROTI-MICHELOZZI *et alii*, 1989). Del resto è noto che quando la suberina è impregnata di sudan black perde la sua fluorescenza (BIGGS, 1985).

Nel caso del tegumento seminale di *Lathyrus latifolius* il sudan

black indica chiaramente la presenza di «suberina» nel cono della cellula malpighiana, mostrando, nei fitoglifi, una striscia nera alla base del cono (Fig. 4). Un risultato sostanzialmente concorde è dato dalla fluorescenza indotta da auramina (Fig. 5) e dalla colorazione dell'intero cono con blu Nilo (Fig. 6). Le differenze rilevabili nello spessore della zona fluorescente (Fig. 5) o colorata (Fig. 6) possono essere attribuite al fatto che l'auramina rende fluorescenti ed il blu Nilo colora anche altri componenti lipidici (CONSIDINE and KNOX, 1979).

Nelle pareti delle cellule malpighiane separate col procedimento della fitoglifatura, la fluorescenza indotta dal blu di anilina evidenzia il calloso ed il risultato è suffragato dalla negatività alla PAS, reazione non data dal calloso (PACINI, 1987). Infatti nei fitoglifi del palizzata la PAS colora solo il nucleo, forse per presenza di sostanze fenoliche (GEIER, 1980), mentre nelle sezioni colora intensamente pareti e nucleo.

Il risultato ottenuto invece col calcofluor non è facilmente spiegabile. Si potrebbe suggerire che la causa sia da ricercare nella presenza di sostanze che non impediscono la formazione del complesso fluorescente calloso-blu di anilina, ma non consentono l'assorbimento del calcofluor.

È da notare, inoltre, che in alcune delle cellule malpighiane della Fig. 8 è molto chiara una particolare distribuzione del calloso, che mancherebbe unicamente nella parte tangenziale interna della loro parete: una distribuzione simile di questa sostanza è già stata evidenziata per *Vicia loiseleurii* (RIGGIO BEVILACQUA e ROTI-MICHELOZZI, 1989) e *Melilotus alba* (BEVILACQUA *et alii*, in stampa).

A parer nostro, il calloso nelle pareti delle cellule malpighiane rafforza l'impermeabilità del loro strato. A causa della sua presenza l'acqua non può imbibire il seme se non quando lesioni nella porzione pectica della parete abbiano raggiunto e superato la superficie tangenziale interna del palizzata. Quando questo accade in una zona del tegumento l'acqua può diffondere, attraverso lo strato delle cellule a clessidra, all'interno del seme, che, rigonfiandosi, causa la lacerazione del tegumento stesso.

Cellule malpighiane dei semi di *Lathyrus latifolius* L.

Fig. 1 - Sezione al criostato, Rosso di rutenio, × 320.

Fig. 2 - Sezione in resina JB4, TBO, × 300.

Figg. 3-8 - Fitoglifi. Fig. 3 - TBO, × 320.

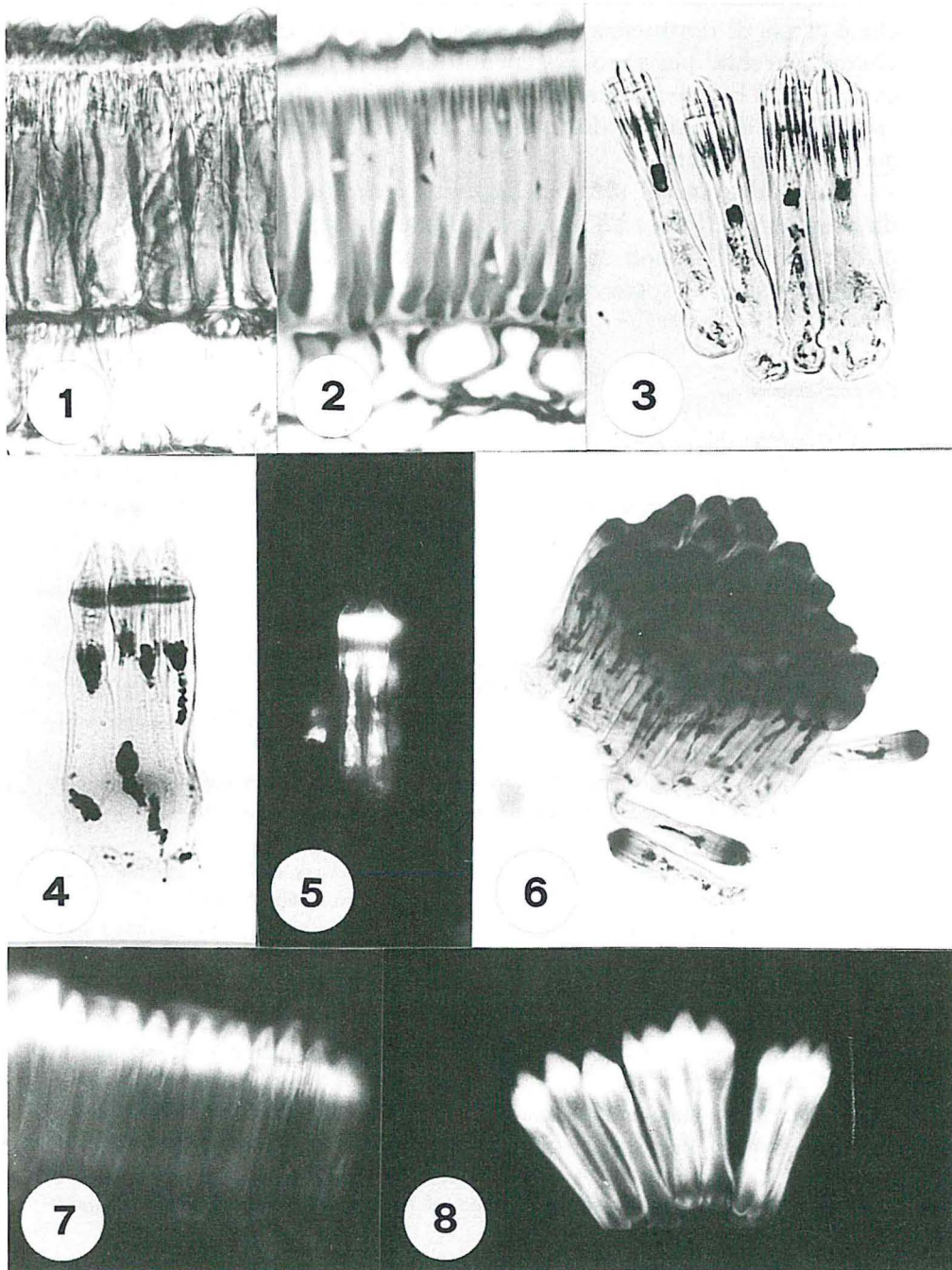
Fig. 4 - Sudan black B, × 320.

Fig. 5 - Auramina, × 250.

Fig. 6 - Blu Nilo, × 250.

Fig. 7 - Calcofluor white N2R new, × 250.

Fig. 8 - Blu di anilina, × 250.



L'impermeabilità del tegumento del seme di *Lathyrus latifolius*, che è causa di dormienza ed ha sede nello strato delle cellule malpighiane, sarebbe pertanto assicurata sia dalle sostanze pectiche che ostruiscono la via apoplastica di penetrazione dell'acqua, sia dalla «suberina» del cono e dal calloso, che ne impediscono il trasferimento simplastico.

Concludendo, nel seme di *Lathyrus latifolius* la barriera straordinariamente efficace all'ingresso dell'acqua sarebbe simile a quella di *Melilotus alba*, non solo per la forma delle cellule malpighiane, ma anche per le sostanze coinvolte.

Ringraziamenti

Le spese di questa ricerca sono state sostenute con un contributo del Ministero della Pubblica Istruzione (Ricerca: Aspetti strutturali, fisiologici e biochimici della germinazione). Si ringrazia il Sig. A. Corallo per lo sviluppo e la stampa delle fotografie.

BIBLIOGRAFIA

- BARON-EPEL O., GHARYAL P.K., SCHINDLER M. (1988) - Pectins as mediators of wall porosity in soybean cells. *Planta*, **175**, 389-395.
- BEVILACQUA L.R., FOSSATI F., DONDERO G. (1987) - «Callose» in the impermeable seed coat of *Sesbania punicea*. *Ann. Bot.*, **59**, 335-341.
- BEVILACQUA L.R., ROTI MICHELOZZI G., MODENESI P. (1989) - The watertight dormancy of *Melilotus alba* seeds. Further observations on the palisade cell wall. *Can. J. Bot.*, **67**, in press.
- BIGGS A.R. (1985) - Detection of impervious tissue in tree bark with selective histochemistry and fluorescence microscopy. *Stain. Technol.*, **60**, 229-304.
- BLACKMAN C.H., MUELLER W.C., TESSIER B.G., HARRISON N.A. (1982) - Recognition and callose deposition in response to vascular infection in fusarium-wilt resistant and susceptible tomato plants. *Phys. Plant. Path.*, **20**, 1-10.
- BRINN N.T., PICKETT J.P. (1979) - Glycol metacrylate for routine, special stains, histochemistry, enzyme histochemistry and immunohistochemistry. *J. Histochem.*, **2**, 125-130.
- BRONNER R. (1975) - Simultaneous demonstration of lipids and starch in plant tissues. *Stain technol.*, **50**, 1-4.
- CONSIDINE J.A., KNOX R.B. (1979) - Development and histochemistry of the cells, cell walls, and cuticle of the dermal system of the fruit of the grape, *Vitis vinifera* L. *Protoplasma*, **99**, 347-365.
- CURRIER H.B., STRUGGER S. (1956) - Aniline blue and fluorescence microscopy of callose in bulb scales of *Allium cepa* L. *Protoplasma*, **45**, 552-559.

- FEDER M., O'BRIEN T.P. (1968) - Plant microtechnique: some principles and new methods. *Am. J. Bot.*, **55**, 123-142.
- GEIER T. (1980) - PAS-positive reaction of phenolic inclusions in plant cell vacuoles. *Histochemistry*, **65**, 167-171.
- GUNN C.R. (1970) - Seeds of the tribe *Vicieae* (*Leguminosae*) in North America agriculture. *Proc. Assoc. Official Seed Analysts.*, **60**, 48-70.
- HAMLY D.H. (1932) - Softening of the seeds of *Melilotus alba*. *Bot. Gaz.*, **93**, 345-375.
- HINCH J.M., CLARKE A.E. (1982) - Callose formation in *Zea mays* as a response to infection with *Phytophthora cinnamomii*. *Phys. Plant. Path.*, **21**, 113-124.
- HUGHES J.E., McCULLY M.E. (1975) - The use of an optical brightener in the study of plant structure. *Stain Technol.*, **50**, 319-329.
- JENSEN W.A. (1962) - *Botanical Histochemistry*. Freeman, San Francisco.
- KERHOAS C., KNOX R.R., DUMAS C. (1983) - Specificity of the callose response in stigma of *Brassica*. *Ann. Bot.*, **52**, 597-602.
- LERSTEN N.R. (1979) - A distinctive seed coat pattern in the *Vicieae* (*Papilionoideae*, *Leguminosae*). *Proc. Iowa Acad. Sci.*, **86**, 102-104.
- LERSTEN N.R., GUNN C.R. (1982) - Testa characters in Tribe *Vicieae*, with notes about tribes *Abreae*, *Cicerae* and *Trifolieae*. *USDA Techn. Bull.*, n. 1667.
- LUFT J.H. (1975) - Ruthenium red and violet. I. Chemistry, purification, methods of use for electron microscopy and mechanism of action. *Anat. Rec.*, **171**, 347-368.
- O'BRIEN T.P., FEDER N., McCULLY M.E. (1964) - Polychromatic staining of plant cell walls by Toluidine Blue O. *Protoplasma*, **59**, 368-373.
- O'BRIEN T.P., McCULLY M.E. (1981) - *The Study of Plant Structure. Principles and Selected Methods*. Termacarphii, Pty, Melbourne.
- PACINI E. (1987) - New techniques and recent findings in embryological researches. *Atti Soc. Tosc. Sci. Nat., Mem., Serie B*, **94**, 189-201.
- RIGGIO BEVILACQUA L., MARTINUCCI R., BOTTO W. (1985) - Presenza di «calloso» nel seme impermeabile di *Gleditsia triachanthos*. *Atti Accad. Ligure Sci. Lett.*, **42**, 73-78.
- RIGGIO BEVILACQUA L., ROTI MICHELOZZI G., MARTINUCCI R., PERO S. (1986) - The continuous autofluorescent hydrophobic barrier in dormant *Melilotus alba* seeds. *Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, **62**, 837-843.
- RIGGIO BEVILACQUA L., ROTI-MICHELOZZI G. (1989) - Dormienza in *Vicia loiseleurii*. Osservazioni sul tegumento seminale. *Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, **65**, 861-868.
- ROLSTON P. (1978) - Water impermeable seed dormancy. *Botanical Review*, **44**, 365-389.
- ROTI-MICHELOZZI G., CAFFARO L., BEVILACQUA L. (1989) - New data about *Vicia loiseleurii* (M. Bieb) Litw., correct binomial for *Vicia meyeri* Boiss. *Candollea*, **44**, 103-117.
- TIWARY S.C. (1982) - Callose in the walls of the mature embryo sac of *Torenia fournieri*. *Protoplasma*, **110**, 1-4.

(ms. pres. l'11 marzo 1990; ult. bozze il 10 settembre 1990)