

TECNOLOGIAS FUTURAS: APLICAÇÃO DA POLIEMBRIOGÊNESE PARA A PROPAGAÇÃO MASSAL DE PLANTAS ELITE DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* (BERT.) O. KUNTZE

Miguel P. GUERRA¹
Edson L. KEMPER¹

RESUMO

O termo reconstituição define uma categoria de propagação vegetativa pela qual ocorre a reorganização do tecido embrionário original. Células do complexo celular embrião-suspensor, quando excisadas e inoculadas em meios de cultura adequadamente formulados originam novos embriões através de processos contínuos de clivagem e gemação. Este fenômeno tem sido induzido em algumas espécies de coníferas e o correto domínio destas técnicas permite a propagação em larga escala de genótipos superiores, o melhoramento e a conservação de germoplasma. Acículas jovens e embriões maduros de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze inoculados em meios LP (VON ARNOLD & ERIKSSON, 1981) e MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementados com 2,4-D, BAP e KIN mostraram a proliferação de células calosas que não apresentavam características embriogênicas. Embriões imaturos constituídos de complexos celulares embrião-suspensor proliferaram novas massas celulares que, em avaliações histoquímicas, revelaram características embriogênicas. Estas células foram induzidas a ciclos repetitivos de divisão celular. Ensaios estão sendo conduzidos visando o estabelecimento de linhagens celulares embriogênicas em suspensões líquidas e a maturação das estruturas pró embrionárias para a obtenção dos embriões somáticos e/ou sementes sintéticas.

Palavras-chave: Cultura de tecidos vegetais, poliembriogênese somática, *Araucaria angustifolia*, propagação massal, sementes sintéticas.

1 INTRODUÇÃO

Durante parte significativa deste século a floresta de pinhais constituiu-se na área mais importante para a exploração madeireira no sul do Brasil, dada a grande homogeneidade e densidade da população arbórea, principalmente o pinheiro-do-paraná (*Araucaria angustifolia*) e a imbuia (*Ocotea porosa*) (REITZ et alii, 1978).

Araucaria angustifolia tem sido a espécie madeireira nativa mais importante do sul do Brasil. Esta

ABSTRACT

Reconstitution in plant morphogenesis is a type of vegetative propagation in which the reorganization of embryonic tissue does occur. When embryonal-suspensor cells (young zygotic embryo) are excised and inoculated in suitable culture medium new embryonal-suspensor cells are originated by cleavage and budding processes. This phenomenon has been described in gymnosperms and its manipulation may allow the mass clonal propagation of elite plants, as well the improvement and the germ plasm conservation. Young needles and mature embryos of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze were inoculated in LP (VON ARNOLD & ERIKSSON, 1981) and MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) media supplemented with 2,4-D, BAP and KIN, and showed the proliferation of callus tissue that couldn't be subcultured and showed no embryogenic characteristics. Immature zygotic embryos containing embryonal-suspensor masses (ESM) were inoculated in the same media and the proliferation of new ESM with embryonic features were demonstrated. Condition for obtaining repetitive cycles of cell division and the scale-up of this ESM were established. Experiments are in progress with the aim of establishing embryogenic cell lines in liquid suspension and obtaining somatic embryos and/or synthetic seeds.

Key words: Plant tissue culture, somatic polyembryogenesis, *Araucaria angustifolia*, mass clonal propagation, synthetic seeds.

espécie ocorre nas partes leste e central do planalto meridional do Brasil em altitudes superiores a 500 m. Atualmente, estima-se que a floresta ombrófila mista encontra-se reduzida a aproximadamente 5% da superfície original (CARPANEZZI et alii, 1988).

Esta planta tem valor econômico e social inegáveis. Possui muitos empregos, como planta ornamental, fonte de alimento, madeira de qualidade, papel, lenha e matéria-prima de produtos químicos (REITZ et alii, 1978). Por estes aspectos, pela limitada produção de sementes e

(1) Lab. Cult. Tecidos Vegetais, Departamento Fitotecnia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, 88049, Florianópolis, SC.

tendo como objetivo a conservação e a propagação massal de genótipos superiores estão sendo utilizadas técnicas de biotecnologia vegetal aplicadas a esta espécie.

Em um já clássico livro sobre morfogênese vegetal, SINNOTT (1960) utilizou o termo reconstituição para caracterizar uma categoria de propagação vegetativa onde ocorre a reorganização do tecido embrionário pelo qual este retorna à sua estrutura original, ou seja, há a formação de um novo embrião reconstituído por clivagem a partir de um pré-existente. Um exemplo clássico de reconstituição é a poliembriogênese das gimnospermas. Células do complexo celular embrião suspensor originam em condições específicas *in vitro* novos embriões reproduzindo os mesmos estágios seqüenciais observados na embriogênese zigótica, sem a necessidade de induzir a desdiferenciação e a posterior rediferenciação celular (DURZAN & GUPTA, 1987; GUPTA & DURZAN, 1987). A poliembriogênese somática pode ser induzida a partir da excisão *in vivo* do complexo celular embrião suspensor e sua inoculação para condições *in vitro* em meios de cultura adequadamente formulados.

O sucesso da aplicação de técnicas de cultura de tecidos vegetais para plantas perenes parece ser dependente da utilização de explantes juvenis ou embrionários devido ao fato de a morfogênese se expressar mais facilmente nestes tecidos (DURZAN, 1990). Normalmente são empregadas gemas apicais, cotilédones, hipocótilos que regeneram novas plantas através de processos de restauração e regeneração (SINNOTT, 1960), que são dependentes de desdiferenciação, indução e rediferenciação, implicando no risco de ocorrência de variações genéticas (DURZAN, 1988a).

A poliembriogênese somática é, portanto, o método de multiplicação que captura o processo natural de reconstituição do embrião zigótico transplantado *in vitro* e é obtido a partir dos complexos celulares embrião suspensor (DURZAN, 1988b). A adequada manipulação *in vitro* destas massas celulares embrionárias permite o estabelecimento e a obtenção de ciclos repetitivos de formação de novos complexos celulares pró-embriônicos através de clivagem e gemação. DURZAN (1988a) postulou que as células deste complexo embrionário atuam como unidades replicadoras antes do que explantes propriamente ditos.

Para que haja a multiplicação destas células é necessária a formulação de meios enriquecidos com fontes de aminoácidos, baseados na composição dos pró-embriões zigóticos. O 2,4-D parece exercer papel preponderante no estabelecimento e manutenção de ciclos repetitivos de divisão celular. A retirada deste regulador de crescimento do meio de cultura, a adição de ABA e a modificação das condições osmóticas parecem favorecer a progressão e maturação dos embriões somáticos (HAKMAN & VON ARNOLD, 1985; HAKMAN et alii, 1985; DURZAN, 1988b; DURZAN & DURZAN, 1991; TAUTORIUS, 1991). Os níveis e proporções de 2,4-D, KIN e BAP no meio de cultura são importantes para o crescimento e a manutenção contínua e cíclica dos complexos pró-embriônicos. A redução gradual destes reguladores de crescimento favorece a diferenci-

ção celular. O ABA parece ser importante no desenvolvimento das massas celulares embrionárias pois inibe os processos de clivagem e leva à completa maturação dos embriões somáticos (DURZAN & GUPTA, 1987).

2 MATERIAL E MÉTODOS

Cones femininos de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze em diferentes estágios de desenvolvimento, foram coletados entre os meses de julho e dezembro de 1991 em diferentes regiões do estado de Santa Catarina.

Estes cones sofreram um corte superficial das escamas e foram submetidos a um pré-tratamento com hipoclorito de sódio a 2,25% durante 12 horas. Posteriormente, em câmara asséptica procedeu-se nova desinfestação com o mesmo produto durante 40 minutos, seguido de uma passagem durante 10 minutos em álcool 70°GL. Por fim, os cones foram submetidos a três rinsagens com água esterilizada. A partir disto, procedeu-se a dissecação dos cones para a retirada dos embriões maduros, imaturos e das massas zigóticas poliembriogênicas. Acículas jovens também foram utilizadas como fontes de explantes.

Foram testados três meios basais: LP modificado (VON ARNOLD & ERIKSSON, 1981), DMH (HONG, 1991) e MS modificado (MURASHIGE & SKOOG, 1962; GUPTA & DURZAN, 1987). Estes meios foram suplementados com sacarose (30g/l), Glutamina (0,45 g/l), Inositol (0,10 g/l), caseína hidrolisada (0,50 g/l), 2,4-D (5,10,25 e 50 mg/l) e BAP e KIN (24,5 e 10 mg/l) e solidificados com agá a 0,5-0,7%.

Os tipos de explantes citados anteriormente foram inoculados nestes meios indutivos e a manutenção destas culturas deu-se no escuro a 25°C. Quando a proliferação de massas celulares era visível sobre os tecidos matrizes, procedeu-se o seu cultivo para meios LP-secundários para a indução de ciclos repetitivos de divisão celular. Nestes meios procedeu-se à redução dos níveis de 2,4-D e de BAP para 1,10 e 0,45 mg/l respectivamente, a eliminação da cinetina e a repicagem semanal para meios frescos de mesma composição.

A qualidade das culturas foi monitorada principalmente por avaliações histo-químicas através do carmin acético a 2% e do azul de Evans a 0,1%. A montagem em lâminas com glicerol permitiu a visualização e avaliação dos diferentes tipos celulares verificados como resultado das proliferações dos tecidos matrizes. Aspectos mais relevantes foram fotomicrografados em microscópio Olympus CBA com o auxílio de fotocélulas Olympus EMM-7.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Acículas - A expressão morfogenética mais conspícua de acículas jovens foi a formação de calos constituídos de células parenquimatosas em todas as combinações de reguladores de crescimento testadas. A diferença mais visível foi observada para a velocidade de formação deste tipo de calo, que foi maior em meios contendo concentrações mais elevadas de 2,4-D (50,0

mg/l). Curvatura intensa dos tecidos do explante foi verificada como resposta a KIN e BAP. Notou-se que as bases das acículas responderam mais favoravelmente a formação de calos. Oxidação em variáveis graus foi observada quando da repicagem destas massas calosas para novos meios. Aspectos restritivos desta ordem já haviam sido citados para os gêneros *Aghatis* e *Araucaria* por MAENE & DEBERGH (1987). As abordagens para este tipo de explante concentram-se na possibilidade de serem induzidas rotas de embriogênese somática e/ou organogênese.

Embriões maduros - Diferentes padrões de proliferação celular foram observados nos embriões maduros. Na região do mesocótilo verificou-se a formação de massas celulares de coloração clara que, aparentemente, se formavam a partir dos feixes vasculares do embrião zigótico. Quando vistas ao microscópio, estas células exibiam um formato alongado, com presença abundante de grãos de amido junto ao núcleo central. Nos cotilédones, observou-se a proliferação de células hialinas, de tamanho menor do que aquelas que surgiam na região do mesocótilo. Apesar destas células apresentarem reação positiva para o corante carmin acético não foi possível estabelecer e estabilizar linhagens celulares morfogenéticas. O estabelecimento de linhagens celulares embriogenéticas a partir de embriões zigóticos maduros de coníferas parece restrito a poucas espécies (TAUTORIUS et alii, 1991). Uma abordagem alternativa para este tipo de explante parece ser a indução de rotas organogenéticas como a formação direta de gemas na região do mesocótilo (CHEAH & CHENG, 1978).

Poliembriogênese zigótica e somática - A avaliação contínua de cones fertilizados e não fertilizados de *Araucaria angustifolia* revelou interessantes aspectos da embriogênese desta espécie. A polinização parece ocorrer entre as escamas e a velocidade de germinação do tubo polínico parece diminuir quando este atinge a nucela. Neste estágio, contudo, o megagametófito ainda não se encontra completamente formado, o que parece acontecer por volta do mês de novembro quando ocorre a fertilização das quatro a seis células arquegoniais presentes na extremidade proximal do megagametófito.

A partir da fertilização (nov - dez) ocorre a formação e desenvolvimento dos pré-embriões que parecem não exibir o fenômeno de clivagem. Este aspecto caracteriza um processo de poliembriogênese zigótica simples, na qual cada pró-embrião é o resultado da fertilização de gametas originados de diferentes grãos de pólen (TAUTORIUS et alii, 1991). Na maioria das outras coníferas ocorre o fenômeno de poliembriogênese complexa, na qual das quatro a seis arquegônias originam-se até 24 pró-embriões através de processos de clivagem (GIFFORD & FOSTER, 1988). Portanto, em *Araucaria angustifolia*, a quantidade de pró-embriões formados será função do número de arquegônias fertilizadas. Observações posteriores indicam que apenas um pró-embrião progride enquanto que os outros degeneram e esta ocorrência também foi verificada para outras coníferas (DURZAN, 1988a e TAUTORIUS et alii, 1991)

Quando pró-embriões em estágio poliembriônico foram inoculados em meios LP contendo 10 mg/l de 2,4-D e 4,5 mg/l de BAP e KIN, verificou-se a proliferação intensa de células em 12% dos explantes, após 4 semanas em cultura. Estes complexos celulares apresentavam-se sob aparência friável, translúcida e muscilaginosa. Quando avaliadas ao microscópio estes complexos exibiam agregados de células arredondadas com forte reatividade para o corante carmin acético e células alongadas, com reatividade ao corante azul de Evans. Estas características foram empregadas por DURZAN (1988a) e por TAUTORIUS et alii (1991) para definir massas celulares embrião-suspensor de linhagens poliembriogenéticas de outras espécies de coníferas. Proliferações celulares desta natureza também foram obtidas para *Pinus banksiana* (DURZAN & CHALUPA, 1976), *Picea abies* (MO et alii, 1989) e *Pseudotsuga menziesii* (HONG et alii, 1991).

A repicagem destas massas celulares para meios de cultura com a mesma composição, porém com os valores de 2,4-D e de BAP reduzidos para 1,10 mg/l e 0,45 mg/l, respectivamente, permitiu a obtenção de culturas celulares em proliferação contínua e tipos celulares com as características citadas anteriormente foram estabelecidos e estabilizados com sucesso.

4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho indicam, pela primeira vez, a possibilidade de captura de massas celulares pró-embriônicas zigóticas e a indução da proliferação contínua de células com características de linhagens poliembriogenéticas em *Araucaria angustifolia*. Novos ensaios estão sendo conduzidos no sentido de induzir a progressão destes complexos celulares proembriogenéticos, até a obtenção de embriões maduros e sementes sintéticas. Estas técnicas serão de grande valia para a propagação massal de genótipos superiores e para a conservação e o melhoramento do germoplasma desta espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARPANEZZI, A. A.; PEREIRA, J. C. D.; CARVALHO, P. E. R.; REIS, A.; RODRIGUES, A. R. F.; ROTTA, E.; STURION, J. A.; RAUEN, M. J.; SILVEIRA, R. A., 1988. Zoneamento ecológico para plantios florestais no Estado de Santa Catarina. EMBRAPA/CNPQ. Curitiba.
- CHEAH, K-T. & CHENG, T-Y., 1978. Histological analysis of adventitious bud formation in cultures Douglas Fir cotyledon. *Amer. J. Bot.*, 65(8):845-49.
- DURZAN, D. J. & CHALUPA, V., 1976. Growth and metabolism of cells and tissue of jack pine (*Pinus banksiana*). 3. Growth of cells in liquid suspension cultures in light and darkness. *Can. J. Bot.*, 54:456-467.
- DURZAN, D. & GUPTA, P. K., 1987. Somatic

- embryogenesis and polyembryogenesis in Douglas-fir cell suspension cultures. *Plant Science*, 52:229-235.
- DURZAN, D. J., 1988a. Process control in somatic polyembryogenesis. In: Hallgreen, J.E. (ed.). *Molecular Genetics of Forest Trees*. pp. 147-186. Swedish Univ. of Agric. Sci. Sweden.
- DURZAN, D. J., 1988b. Somatic polyembryogenesis for the multiplication of tree crops. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 6:339-76.
- DURZAN, D. J. 1990. Adult vs. juvenile explants: direct totipotency. *Plant Aging: Basic and applied approaches*. pp. 19-25. New York.
- DURZAN, D. J. & DURZAN, P. E., 1991. Future technologies; model reference control systems for the scale-up of embryogenesis and polyembryogenesis in cell suspension cultures. In: *Micropropagation*. DEBERGH, P. C. & Zimmerman, R. H. (eds.). pp.389-423. Kluwer Academic Publ. Netherlands.
- GIFFORD, E. & FOSTER, A. S., 1988. *Morphology and Evolution of Vascular Plants*. Freeman and Company. New York. 626 p.
- GUPTA, P. K. & DURZAN, D. J. 1987. Somatic embryos from protoplasts of loblolly pine proembryonal cells. *Bio/Technology*, 5:710-712.
- HAKMAN, I. & VON ARNOLD, S., 1985. Plantlet regeneration through somatic embryogenesis in *Picea abies* (Norway Spruce). *J. Plant Physiol.*, 121:149-158.
- HAKMAN, I.; FOWKE, L. C.; VON ARNOLD, S.; ERIKSSON, T., 1985. The development of somatic embryos in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway Spruce). *Plant Sci.*, 38:53-59.
- HONG, L.; BOULAY, M.; GUPTA, P. K., DURZAN, D. J., 1991. *Variations in somatic polyembryogenesis: induction of adventitious embryonal-suspensor masses on developing douglas-fir embryos*. Data not published.
- MAENE, L. & DEBERGH, P., 1987. *Araucaria*. In: *Cell and Tissue Culture in Forestry*. Bonga, J. M. & DURZAN, D. J. (eds.). pp. 176-84. Martinus Nijhoff Pub. Dordrecht. V.3.
- MO, L. H.; VON ARNOLD, S.; LAGERCRANTZ, V., 1989. Morphogenic and genetic stability in longterm embryogenic cultures and somatic embryos of norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst). *Plant Cell Rep.*, 8:375-378.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Pl.*, 15:473-497.
- REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A., 1978. *Projeto Madeira de Santa Catarina*. Separata nº 28 de Sellowia-Herbário Barbosa Rodrigues. Itajaí. 320 p.
- SINNOTT, E. W., 1960. *Plant Morphogenesis*. McGraw Hill, New York.
- TAUTORIUS, T. E.; FOWLE, L. C.; DUNSTAN, D. I., 1991. Somatic embryogenesis in conifers. *Can. J. Bot.*, 69:1873-1899.
- VON ARNOLD, S. & ERIKSSON, T., 1981. *In vitro* studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. *Can. J. Bot.*, 59:870-74.