

André Luis Wendt dos Santos

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM Araucaria angustifolia (Bert.) O.
Kuntze: PONTOS DE CONTROLE E ASPECTOS DO
METABOLISMO.**

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de
Santa Catarina, para
obtenção do título de Mestre
em Recursos Genéticos
Vegetais.**

**Orientador:
Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra**

**FLORIANÓPOLIS
Estado de Santa Catarina - Brasil
Junho - 2000.**

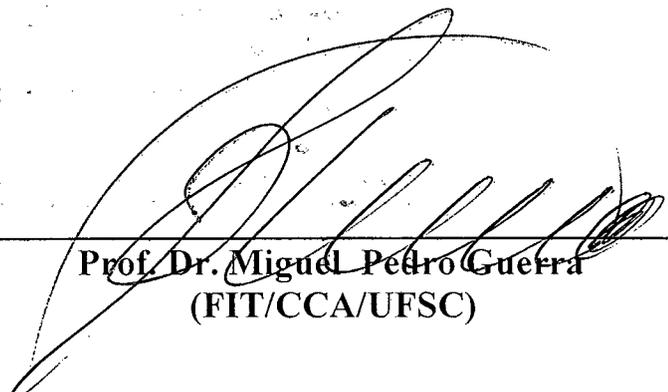
"EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Araucaria angustifolia*: PONTOS DE CONTROLE E ASPECTOS DO METABOLISMO".

POR

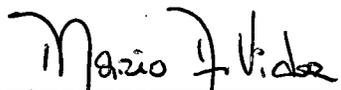
ANDRÉ LUIS WENDT DOS SANTOS

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e membros da Comissão Examinadora.

Comissão Examinadora:



Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra
(FIT/CCA/UFSC)



Pesq. Dr. Mário Vidor
(EPAGRI/SC)



Prof. Dr. Marcelo Maraschin
(FIT/CCA/UFSC)

Florianópolis, junho de 2000

Dedico este trabalho aos meus pais, Nery e Ana Lúcia e aos meus irmãos Ana Cláudia e Paulo, por todo incentivo e apoio em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra e ao Prof. Dr. Marcelo Maraschin pela orientação durante o mestrado e sobretudo pela amizade e pela confiança em mim depositada durante as atividades.

Ao Dr. Mario Vidor, pelas valiosas sugestões dadas ao projeto de mestrado, ajuda na obtenção das pinhas e por sua amizade.

Ao Eng. Agrônomo e amigo Vanildo Silveira, por todo o treinamento concedido no laboratório e por toda ajuda prestada nas atividades do laboratório e elaboração da dissertação.

A aluna do curso de Agronomia (UFSC) e amiga Neusa Steiner, por toda a ajuda e dedicação na realização e avaliação dos experimentos.

Ao Eng. Agrônomo Sadi Nazareno e ao Eng. Agrônomo Zanata e a toda equipe da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Difusão de Tecnologia de Santa Catarina S.A. (EPAGRI), por todo o trabalho de coleta das pinhas.

A Laboratorista Maria Luísa Peixoto, pelo treinamento concedido no laboratório e pela sua paciência com os meus erros.

Aos professores do curso de Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais pelos ensinamentos, amizade e respeito demonstrados durante a realização do curso.

A Bióloga Suzana Stefanello e Eng. Agrônomo Clayton De Biasi, pelas discussões sobre a vida acadêmica e sobretudo pela sua amizade.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal pela amizade e estímulo durante a realização das atividades.

Aos professores da Universidade do Contestado, Prof. Luis Cláudio Fossati, Prof. Ana Marise Auer, Prof. Rui Branco, Prof. Fonseca, Prof. Argos e Prof. Gaston (Toti) por toda ajuda e incentivo dados para que eu fizesse o Curso de Pós-Graduação.

Ao "diretor" Belo do Soweto e "diretor" Gaudério pela amizade e por todas as atividades extra-laboratório realizadas.

A Estela Mares Karolesky e sua família por todo carinho e paciência demonstrados a mim durante a nossa convivência.

Ao CNPq e Capes pelo apoio financeiro.

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D: ácido 2,4-diclorofenixiacético

BAP: benzilaminopurina

Kin: cinetina

ABA: ácido abscísico

PEG 3350: Polietilenoglicol com peso molecular 3.350 daltons

PEG 8.000: Polietilenoglicol com peso molecular 8.000 daltons

BSA: soro albumina bovina

TCA: ácido tricloroacético

SDS: dodecil sulfato de sódio

kDa: Kilo Daltons

PMSF: fenil metil sulfonil fluoredo

ÍNDICE

Agradecimentos.....	i
Lista de Abreviaturas.....	ii
Resumo.....	1
Abstract.....	3
Situação do problema.....	5
Capítulo 1 - Indução e manutenção de culturas embriogênicas em <i>Araucaria angustifolia</i> (Bert.) O. Kuntze.	20
Introdução.....	21
Materiais e Métodos.....	21
Resultados.....	24
Discussão.....	30
Conclusões.....	33
Referências.....	35
Capítulo 2 - Maturação de linhagens celulares embriogênicas em <i>Araucaria angustifolia</i> (Bert.) O. Kuntze.	38
Introdução.....	39
Materiais e Métodos.....	40
Resultados.....	42
Discussão.....	50
Conclusões.....	54
Referências.....	55
Capítulo 3 - Aspectos bioquímicos e parâmetros de crescimento celular em linhagens celulares embriogênicas de <i>Araucaria angustifolia</i> (Bert.) O. Kuntze.	58
Introdução.....	59
Materiais e Métodos.....	60
Resultados.....	64
Discussão.....	70
Conclusões.....	76
Referências.....	78

Considerações Finais e Perspectivas Futuras.....	81
Anexos.....	83

RESUMO

Durante grande parte do século XX a *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, *Araucariaceae*), foi a espécie madeireira nativa mais importante do sul do Brasil. Atualmente, restam pequenos fragmentos desta espécie. Neste sentido, se faz necessário o desenvolvimento de técnicas que viabilizem a conservação e o melhoramento genético. Em coníferas, a embriogênese somática destaca-se como uma alternativa viável para a obtenção de genótipos elite, permitindo a captura e a fixação do ganho genético e a propagação massal de genótipos superiores. No presente trabalho, estudaram-se alguns pontos de controle do desenvolvimento embrionário em *A. angustifolia*, visando o estabelecimento de um protocolo para a obtenção de embriões somáticos. Culturas embriogênicas foram induzidas a partir de embriões zigóticos pré-cotiledonares excisados de sementes provenientes de três diferentes genótipos, em cinco datas de coleta. Os embriões zigóticos foram inoculados em meio de cultura indutivo LP (von Arnold & Eriksson, 1981) e BM (Gupta & Pullman, 1991) suplementados ou não com 2,4-D (5 μM), BAP (2 μM) e Kin (2 μM). A maior frequência de indução de culturas embriogênicas foi obtida na primeira coleta (23,33 %) e o genótipo B apresentou a melhor performance (19,99 %). O genótipo da planta doadora e o estágio de desenvolvimento do explante influenciaram significativamente a frequência de indução. A formulação salina empregada e a presença ou não de fitorreguladores (2,4-D, BAP e Kin) não influenciaram significativamente a frequência de indução. Na fase de manutenção, as culturas embriogênicas foram mantidas em ciclos contínuos de subcultivo (20 dias) em meio semi-sólido ou líquido. Nas culturas embriogênicas induzidas na presença de fitorreguladores utilizou-se o meio de cultura LP e BM suplementados com 2,4-D (2 μM), BAP (1 μM) e Kin (1 μM). Culturas embriogênicas induzidas sem a suplementação de fitorreguladores foram subcultivadas no mesmo meio de cultura utilizado na fase de indução. Análises histoquímicas das culturas embriogênicas evidenciaram tipos celulares distintos e pré-embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento. Na fase de maturação, foram testados fontes e níveis de fitorreguladores: ABA (0-60 μM), BAP (0-2,5 μM) e Kin (0-2,5 μM); agentes osmóticos PEG 3350 (0-9 %), PEG 8000 (0-6 %), BSA (0-3 g.L^{-1}) e inositol (0-1 %); maltose (0-9 %). Dos tratamentos testados, apenas a combinação de PEG 3350 (6-9 %) e maltose (6-9 %) foi efetiva no desenvolvimento de embriões somáticos nos estádios 1 e 2 de desenvolvimento. Durante a fase de manutenção, foram realizados estudos sobre alguns parâmetros de crescimento de suspensões celulares de linhagens celulares embriogênicas induzidas e mantidas ou não na presença de fitorreguladores (2,4-D, BAP e Kin). Analisou-se o crescimento das linhagens celulares embriogênicas através da técnica de sedimentação, determinação dos valores de pH e concentração de glicose no meio de cultura e quantificação de proteínas extracelulares. Além disso, foi determinado o perfil protéico das linhagens celulares embriogênicas induzidas e mantidas ou não com fitorreguladores (2,4-D, BAP e Kin), e de embriões zigóticos cotiledonares e seus respectivos megagametófitos através de eletroforese em gel de poliacrilamida. Após 42 dias de cultivo, as suspensões celulares BM₀202 e BM₂212 apresentaram um crescimento médio semelhante (0,92 e 0,95 mL/dia respectivamente), contudo o padrão de desenvolvimento nas fases da curva de crescimento foi diferenciado. O valor do pH do meio de cultura nas suspensões celulares BM₀202 e BM₂212 sofreu uma queda progressiva ao longo do período de cultivo, mantendo-se em níveis mais altos na suspensão isenta de fitorreguladores (BM₀202). O perfil de concentração de glicose no meio de cultura também foi diferenciado nas suspensões BM₀202 e BM₂212, entretanto ficou evidente para as duas suspensões celulares o consumo preferencial de frutose nos estádios iniciais de crescimento. O perfil de excreção de proteínas extracelulares foi similar

Para as suspensões celulares BM₀202 e BM₂212 contudo, nos períodos de cultivo analisados, a concentração de proteínas extracelulares foi maior na suspensão celular isenta de fitorreguladores (BM₀202). A eletroforese de proteínas totais revelou não haver grandes diferenças no perfil protéico apresentado entre as linhagens celulares embriogênicas mantidas na presença ou ausência de fitorreguladores, tanto para os megagametófitos quanto para os embriões zigóticos cotiledonares. Entretanto, quando se compararam os perfis apresentados pelo material *in vivo* e *in vitro* foram encontradas claras diferenças nos perfis protéicos, sendo estas diferenças provavelmente relacionadas a estádios específicos do desenvolvimento embrionário.

ABSTRACT

During great part of the XXth century, *A. angustifolia* (Bert.) O. Kuntze (*Araucariaceae*) was the most important woody species from South Brazil. Nowadays, only relicts of the natural vegetation with this species are found. Therefore, it is necessary the development of techniques to provide it's conservation and genetic improvement. In conifers somatic embryogenesis is a reliable option for obtains elite genotypes, allowing the capture and fixation of the genetic gain and the massal propagation of selected genotypes. In the present work, controls points of the embryogenic development in *A. angustifolia* were studied, seeking the establishment of a somatic embryogenesis protocol. Embryogenic cultures were initiated from pre-cotyledonary zygotic embryos excised from seeds proceeding from three different genotypes and five harvest dates. Zygotic embryos were inoculated in inductive culture medium LP (von Arnold and Eriksson, 1981) and BM (Gupta and Pullman, 1991) supplemented or not with growth regulators 2,4-D (5 μ M), BAP (2 μ M) and Kin (2 μ M). The highest induction frequency of embryogenic cultures was obtained in the first harvest date (23,33 %) and the B genotype shows the best performance (19,99 %). The genotype of the mother tree and the developmental explant stage affected the induction frequency. The basal medium composition and the presence or absence of growth regulators did not influence the induction frequency. In the maintenance phase, embryogenic cultures were maintained at continuous repetitive cell cycles (20 days) in semi-solid or liquid medium. Embryogenic cultures initiated in the culture medium with growth regulators were maintained on LP and BM culture medium supplemented with 2,4-D (2 μ M), BAP (1 μ M) and Kin (1 μ M). Embryogenic cultures initiated in culture medium without growth regulators were maintained in the same culture medium composition used in the induction phase. Histochemical staining of embryogenic cultures demonstrated different cell types and somatic pro-embryos with different stages of development. In the maturation phase, it was tested different types and levels of growth regulators ABA (0-60 μ M), BAP (0-2,5 μ M), and Kin (0-2,5 μ M); osmotic agents PEG 3350 (0-9 %), PEG 8.000 (0-6 %), BSA (0-3 g.L⁻¹) and inositol (0-1 %); maltose (0-9 %). Only the treatment containing PEG 3350 (6-9 %) and maltose (6-9 %) was effective for the progression of somatic embryos to developmental stages 1 and 2. During the maintenance phase, it was studied some growth parameters in embryogenic cell lines maintained in the presence or absence of growth regulators. It was evaluated the growth of embryogenic cell lines through sedimentation technique, determination of pH values and glucose levels in the cell suspension medium, as well the quantification of extracellular proteins. Furthermore it was assayed the protein profile of embriogenic cultures initiated and maintained in culture medium with or without growth regulators, as well cotyledonary zygotic embryos and megagametophytes through polyacrilamide gel electrophoresis. After 42 days of culture, embryogenic cell suspension lines BM₀202 and BM₂212 showed similar growth pattern (0,92 and 0,95 mL/day respectively), however the growth profile in the phases of the growth curve was different. The pH value in the cell suspension medium of both, the BM₀202 and BM₂212 undergo progressive reduction during culture period, showing high levels in the cell suspension medium free of growth regulators (BM₀202). Also, the glucose concentration profile in cell suspension medium was different in both cell suspension lines, BM₀202 and BM₂212. It was evident for the two suspension lines the preferential consumption of fructose in the initial stage of the growth curve. Extracellular protein profile was similar to embryogenic cell suspension lines BM₀202 and BM₂212. However, in the evaluated culture period the concentration of extracellular proteins was superior in the cell suspension medium free of growth regulators (BM₀202). Protein electrophoresis did not reveal differences in the protein profile in embryogenic cell lines maintained in culture medium with or without grow

regulators, as well as for megagametophytes and zygotic embryos. However, when comparing protein profile *in vivo* and *in vitro* material it was possible to detect differences in the protein profiles.

SITUAÇÃO DO PROBLEMA

Considerações sobre a espécie

A *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, é uma espécie arbórea da família Araucariaceae. É conhecida pelos nomes comuns de pinheiro-do-paraná, pinheiro brasileiro, araucária ou pinheiro, sendo a única espécie de seu gênero com ocorrência natural no Brasil (Shimizu & Oliveira, 1981). Árvore de tronco reto, com 10 a 35 metros de altura e diâmetros de 50 a 120 centímetros, excepcionalmente mais, com uma copa corimbiforme que emerge do dossel, imprimindo à formação uma aparência característica (Jarenkow, 1999). Sua madeira, cuja tonalidade vai do amarelado ao pardacento, tem superfície brilhante sendo leve e macia (Longhi, 1993).

Esta espécie fornece madeira de alta qualidade para construções em geral, trabalhos de caixotaria, fabricação de móveis, laminados, polpa e outros usos. Sua madeira contém 58,3% de celulose e 28,5% de lignina, produzindo papel de alta qualidade. A resina exsudada principalmente da casca, serve para a fabricação de vernizes, terebentina, acetona, ácido pirolenhoso e outros produtos químicos. As sementes apresentam alto valor nutricional e são consumidos por humanos, animais domésticos e pela fauna silvestre (Carvalho, 1994; Shimizu & Oliveira, 1981).

A araucaria foi, durante parte significativa deste século, a espécie madeireira nativa mais importante do sul do Brasil (Guerra, 1993). A exploração das reservas naturais da *A. angustifolia* obrigou o governo brasileiro a encorajar programas de reflorestamento com espécies exóticas de coníferas, principalmente *Pinus elliottii* e *Pinus taeda*. Para *A. angustifolia*, a prioridade agora é a conservação das populações naturais remanescentes e o estabelecimento de programas de melhoramento visando implantar projetos de reflorestamento competitivos (Guerra *et al.*, 1999b).

Características botânicas

A araucaria é uma planta dióica, às vezes monóica, provavelmente por trauma ou doença, com flores unissexuadas (Reitz *et al.*, 1978). Os cones masculinos podem ter de 10 a 13 centímetros de comprimento (Seward & Ford, 1905). Os cones femininos são de formato globoso-ovóide, com consistência lenhosa e podem alcançar um diâmetro entre 20-25 centímetros (Rizzini, 1976). Ocorrem normalmente de 400-500 esporófilos em um cone,

entretanto não mais do que um em vinte esporófilo é fértil. Dos que chegam a formar óvulos, muitos não maturam (Burlingame, 1914).

O ciclo reprodutivo da *A. angustifolia* desde o carpelo primordial à semente compreende um período de aproximadamente quatro anos. Os estróbilos femininos iniciam seu desenvolvimento entre agosto e outubro do primeiro ano. O amadurecimento do pólen e a realização da polinização se efetua no mês de setembro do segundo ano. A fecundação ocorre entre os meses de outubro e dezembro do terceiro ano de desenvolvimento. Por fim, no período compreendido entre os meses de fevereiro e maio do quarto ano de desenvolvimento, ocorre o amadurecimento dos cones com posterior queda das sementes (Mattos, 1994).

Ecologia

A araucária é uma planta perenifólia, heliófita, pioneira, característica de regiões de altitude onde forma as chamadas "matas de pinhais" (Lorenzi, 1992). Em condições naturais, nas formações florestais primárias, o pinheiro pode apresentar o comportamento de secundária inicial, com regeneração natural ocorrendo apenas nas margens das florestas ou em clareiras grandes (Klein, 1960; Carvalho, 1994).

Segundo Reitz *et al.*, (1978), a falha nos métodos empregados e a falta de melhores informes ecológicos desta espécie sobretudo no que diz respeito ao "habitat", à qualidade e profundidade dos solos e clima são os principais responsáveis pelo insucesso de alguns dos reflorestamentos realizados no Brasil.

Distribuição geográfica

A ocorrência natural da *A. angustifolia* no Brasil está limitada às latitudes 19° 15' S e 31° 30' N e às longitudes 41° 30' W e 54° 30' L (Seitz, 1986). A espécie é restrita a altitudes acima de 500 metros ocorrendo originalmente nos Estados do Paraná (40%), Santa Catarina (31%) e Rio Grande do Sul (25%) e como manchas esparsas no sul de São Paulo (3%), internando-se até o sul de Minas Gerais e Rio de Janeiro, em áreas de altitudes elevadas (1%) (Carvalho, 1994).

Atualmente as Matas de Araucária apresentam um caráter relictual, pois acerca de 4.000 anos, quando havia maior domínio de massas de ar polares em baixas latitudes na América do Sul, essas florestas estendiam-se até latitudes próximas a 19° S (Filho & Kraus,

1999). Segundo Jarenkow (1999), evidências paleoambientais sugerem que durante a última glaciação pleistocênica, o clima no planalto era mais frio e seco, sendo a forma relictual deste período. Nas condições climáticas atuais, o campo estaria cedendo espaço aos pinhais, e estes às florestas de caráter mais tropical.

Histórico

A floresta de araucária foi praticamente eliminada no início deste século devido o corte de toras para exportação (Ondro *et al.*, 1995). De Hoogh (1981) levantou que em 1971, de 75 a 80 % do consumo de madeira para serraria era suprido pela floresta de araucária. Em 1975, a exportação chegou a 165 mil toneladas de madeira beneficiada e, em 1978, gerava aproximadamente US\$ 25 milhões, somente para o estado do Paraná. Já no período de 1970 a 1978 a produção de madeira industrializada de pinheiro brasileiro alcançava 2,5 milhões de m³. Para suportar esta produção, 6.500 hectares de florestas primárias e 22.700 hectares de florestas secundárias foram exploradas anualmente entre 1974 e 1978 (De Hoogh, 1981).

As florestas de araucária ocupavam originalmente uma área de 182.295 km². Hoje encontram-se apenas fragmentos de vegetação, 0,7 % (Longhi, 1993); 1 % (Lima & Capobianco, 1997) e 1 a 2 % (Guerra *et al.*, 1999b) de sua área original. Esta espécie está incluída na lista oficial do IBAMA de espécies brasileiras ameaçadas na categoria de vulnerável.

Família *Araucariaceae*

Araucariaceae é uma família primitiva das gimnospermas nativa do hemisfério sul (Francis, 1988). A família consiste de três gêneros bem definidos: *Araucaria*, *Agathis* e *Wollemia* (Setoguchi *et al.*, 1998).

Apesar de sua distribuição atual ser restrita ao hemisfério sul, a família *Araucariaceae* foi muito bem diversificada e amplamente distribuída em ambos os hemisférios durante a era mesozóica (Setoguchi *et al.*, 1998). Este fato, aliado a maior dimensão do cone microsporangiado em comparação ao megasporangiado e a evidente transição do esporófilo são considerados indicadores de um interessante e provável grupo primitivo (Thomson, 1907).

Embriogênica em *Araucariaceae*

A família *Araucariaceae* apresenta em relação às outras coníferas, características distintas de embriogênica (Kaur & Bhatnagar, 1983) e com alto grau de especialização (Buchholz, 1920). O estágio de núcleo livre é relativamente retraído, com a presença de 32 até 64 núcleos antes da divisão interna do pró-embrião (Gifford & Foster, 1988). O núcleo livre não migra para base da arquegônia a exemplo do que acontece nas demais coníferas, e como em *Ginkgo biloba*. O pró-embrião ocupa posição central na arquegônia (Haines & Prakash, 1980). As células pró-embriônicas da fileira superior (pU) formam o suspensor (S), e as células da fileira inferior (pE) originam a capa (c) e as células centrais do grupo embrional (tE) (Fig. 1D-F) (Burlingame, 1915). Segundo Haines & Prakash, (1980) a principal diferença entre a embriogênica da família *Araucariaceae* em relação as outras coníferas, é que as células da fileira mais inferior (pc) (Fig. 1D) não contribuem para formação do embrião, estando associadas com a organização da capa.

Dogra (1978) observou a ausência de divisão interna nas gimnospermas mais primitivas, sugerindo a formação de uma plano basal de desenvolvimento mais simples do que o observado para as coníferas mais evoluídas (Fig. 2A-I). Entretanto, em *Araucaria juss* (Haines & Prakash, 1980) e *Agathis robusta* (Kaur & Bhatnagar, 1983) a divisão interna do pró-embrião proporciona a formação do plano basal de desenvolvimento U.S.E., composto pela fileira de células superior (U) fileira de células de suspensor (S) e fileira de células embrionária (tE) e células da capa (c) (Fig. 1F-H).

O número de arquegônias produzidas por um megagametófito simples em *Araucariaceae* varia consideravelmente, dependendo da espécie (Gifford & Foster, 1988). Em *A. angustifolia*, o megagametófito contém quatro células arquegoniais, as quais uma vez fertilizados, podem originar um número equivalente de complexos celulares pró-embriônicos. Este fenômeno é denominado de poliembriônica simples ou poliembriônica polizigótica (Dogra, 1978). Devido à competição, somente um destes pró-embriões (Fig. 1G) irá se desenvolver em um embrião maturo (Gifford & Foster, 1988).

Nas coníferas existem duas formas de poliembriônica com respeito à origem dos embriões: a) simples, devido a fertilização de várias células ovo; e b) clivagem, devido a separação da fileira apical de células em quatro embriões filamentosos (Fig. 2H-I) (Buchholz, 1926). Em *Araucariaceae* somente a poliembriônica simples tem sido observada (Haines & Prakash, 1980).

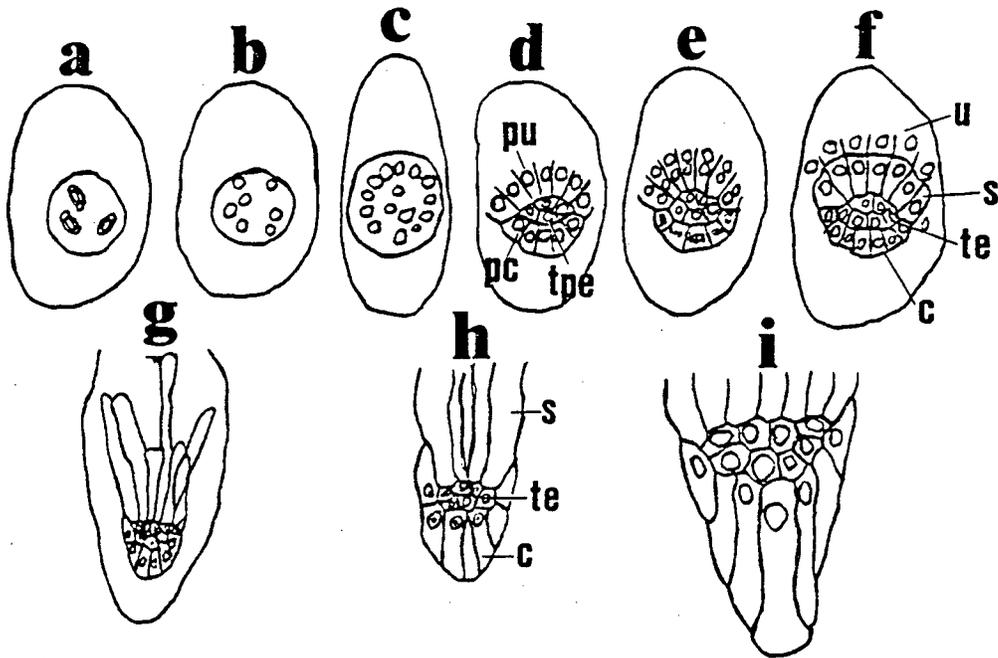


Figura 1. Desenvolvimento do pró-embrião em Araucariaceae. A-B) desenvolvimento do pró-embrião durante o estágio de núcleo livre. **C)** pró-embrião com núcleos livres angulares e regularmente arranjados. **D)** pró-embrião primário. **E)** pró-embrião primário sofrendo divisão celular interna. **F)** pró-embrião secundário formado após a divisão interna. **G)** pró-embrião preenchendo totalmente a arqueônia. **H-I)** embrião zigótico após alongamento do suspensor. (pu) células pró-embriônicas da fileira superior; (pc) capa primária; (tpe) grupo embrional primário; (u) fileira de células superior; (s) fileira de células de suspensor; (te) grupo embrional; (c) capa. Adaptado de Buchholz (1920) e Haines & Prakash (1980).

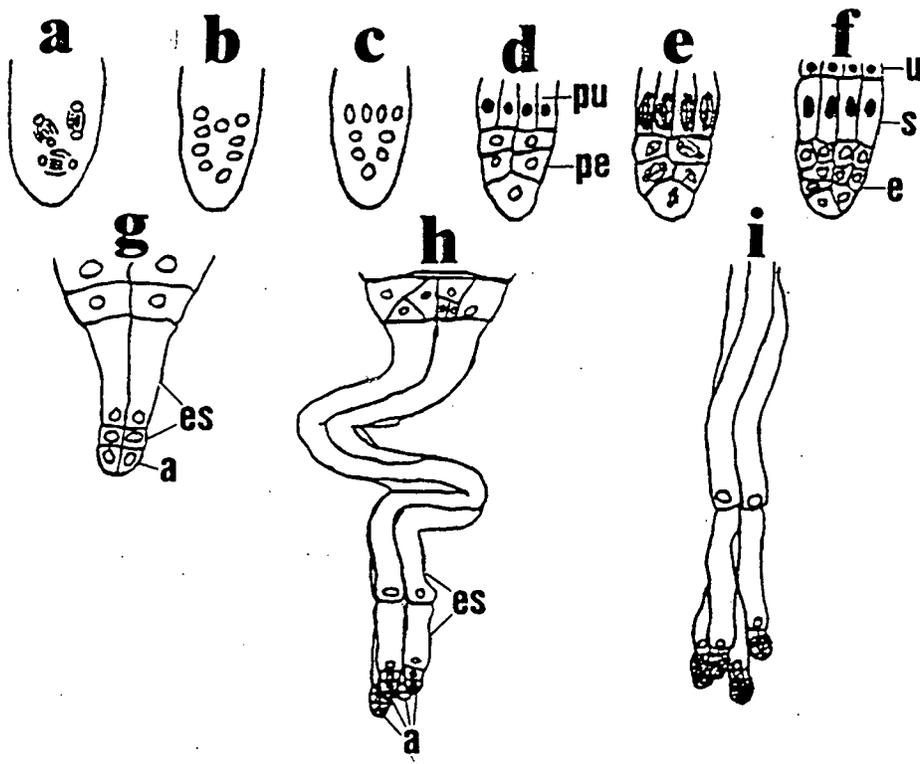


Figura 2. Desenvolvimento do pró-embrião em *Pinus sp.* A-C) estágio de núcleo livre. C-D) formação de paredes celulares e do pró-embrião primário. E) pró-embrião primário sofrendo divisão celular interna. F) estabelecimento das três regiões do pró-embrião secundário. G) alongamento das primeiras células suspensor embrionárias. H) separação do pró-embrião em quatro embriões potenciais (poliembriogênese por clivagem) e formação de células suspensor embrionárias adicionais. I) série de quatro embriões em competição, formados por clivagem. (pu) células pró-embriônicas da fileira superior; (pe) fileira de células embrionárias primárias; (u) fileira de células superior; (s) fileira de células do suspensor; (e) fileira embrionária; (es) células suspensor embrionárias; (a) ápice embrionário. Adaptado de Buchholz (1920) e Gifford & Foster (1988).

Melhoramento Florestal e Propagação *in vitro*

As florestas são um dos mais importantes recursos naturais do mundo. Boa parte das espécies florestais ainda encontram-se em estádios variados de domesticação e melhoramento, e assim, muita da madeira consumida atualmente ainda é proveniente de florestas naturais (Sederoff, 1999). A diversidade e extensão das florestas mundiais estão em declínio, e a tendência para o século 21 é que o consumo atual de madeira dobre. A fim de satisfazer esta demanda crescente, a produtividade florestal das terras atualmente utilizadas terá que ser aumentada, enquanto que outras áreas deverão permanecer intocáveis (Gupta *et al.*, 1993). O desafio para o setor florestal será manter a diversidade biológica natural nos ecossistemas florestais em conjunto com os plantios florestais clonais compostos de genótipos diversificados, selecionados para a produção de madeira e outros produtos florestais (Kriebel, 1995).

Para atender a crescente demanda mundial por produtos florestais, existe a necessidade da produção massal de plantios com alta performance nas mais variadas espécies. O aumento de produtividade é alvo de todos os setores da área florestal, não só para atender o consumo de uma população atualmente em expansão, mas também por contribuir para um sistema sustentável e, conseqüentemente, com estabilidade social e ambiental (Robinson, 1999). Métodos convencionais de seleção e melhoramento florestal oferecem apenas possibilidades limitadas para suprir esta demanda crescente (Minocha & Minocha, 1995). Técnicas de melhoramento convencional utilizando cruzamento controlado para transferência de caracteres de interesse são demorados e aliado ao longo ciclo reprodutivo das árvores tornam-se um sério obstáculo para o melhoramento florestal (Chalupa, 1990).

O uso da propagação clonal e o emprego das demais técnicas biotecnológicas serão os principais responsáveis pela produção dos plantios florestais necessários para as necessidades futuras (Thorpe & Harry, 1990). Como parte das modernas técnicas do melhoramento florestal, a seleção clonal seguida pela propagação massal de genótipos selecionados representa a principal estratégia para captura do efeito não-aditivo dos genes e maximização do ganho genético. Entretanto, esta estratégia tem sido impedida nas coníferas pela falta de um eficiente sistema de propagação clonal (Isabel & Tremblay, 1995).

Técnicas de propagação clonal incluem o uso da estaquia e a cultura de tecidos. Destas, a propagação por estaquia tem se mostrado pouco eficiente. As principais restrições são o declínio na capacidade de enraizamento com o envelhecimento do ortete e o limitado

número de gemas que podem ser produzidas a partir de cada planta matriz (Högberg *et al.*, 1998). Técnicas de cultura de tecidos podem eliminar estes problemas (Farmem *et al.*, 1983).

As técnicas *in vitro* usualmente empregadas para a propagação clonal de coníferas, incluem o desenvolvimento de gemas pré-existentes, a indução e o desenvolvimento de gemas adventícias (organogênese), e mais recentemente, a indução e desenvolvimento de embriões somáticos (Attree *et al.*, 1991).

A propagação clonal *in vitro* via organogênese é difícil e pouco eficiente para as coníferas, e, portanto não se constitui, ainda, numa opção viável para aplicação comercial. A embriogênese somática, por outro lado, representa uma alternativa para propagação massal de material melhorado geneticamente. Além disto, a criopreservação de culturas embriogênicas garante a manutenção da juvenildade do material durante os testes de campo (Klimaszewska, 1995).

Embriogênese somática

A embriogênese somática, assexual ou adventícia é o desenvolvimento de embriões a partir de células que não são o produto da fusão de gametas (Attree *et al.*, 1991). A exposição do tecido gamético ou somático a certas condições específicas de cultura, incluindo a presença no meio de cultura de uma auxina, pode proporcionar a indução e diferenciação de tecido embriogênico (Staxén *et al.*, 1994). Divisão celular assimétrica, determinação celular e alterações na polaridade celular são condições básicas para iniciação dos embriões somáticos (Dodeman *et al.*, 1997). Dois padrões gerais de desenvolvimento da embriogênese *in vitro* são comumente distinguíveis (i) embriogênese direta: os embriões originam-se diretamente do tecido matriz na ausência de proliferação de calo; (ii) embriogênese indireta: a proliferação de calo é pré-requisito para o desenvolvimento do embrião (Sharp *et al.*, 1980, Guerra *et al.*, 1999a)

Em condições *in vitro*, os embriões somáticos desenvolvem-se através de estádios similares aos observados na embriogênese zigótica, exceto pelo fato de que os embriões somáticos não tornam-se dormentes e por não ocorrer a formação de integumentos e endosperma para sua conservação e germinação respectivamente (Dodeman *et al.*, 1997). O fato de que a estrutura e o desenvolvimento de embriões normais possam ser desenvolvidos a partir de células somáticas, demonstra que a programação genética para a embriogênese e sua elaboração estão totalmente contidas dentro da célula e podem funcionar completamente na ausência de produtos gênicos provenientes do ambiente materno (Zimmerman, 1993).

A regeneração de plântulas através da embriogênese somática pode ser dividida em quatro passos: (1) iniciação de embriões somáticos a partir do explante primário, (2) proliferação das culturas embriogênicas, (3) maturação dos embriões somáticos e (4) regeneração de plântulas a partir de embriões somáticos (von Arnold *et al.*, 1996).

Uma estratégia geral a ser empregada para a indução e modulação da embriogênese somática encontra-se esquematizada na figura 1. O primeiro passo consiste em determinar na planta matriz a melhor fonte de explantes. No ciclo A, um embrião zigótico, em estágio inicial de desenvolvimento, é excisado e inoculado em meio contendo 2,4-D. Estas culturas são normalmente mantidas no escuro e geram complexos ou massa celulares pró-embriônicas, que por processos de embriogênese repetitiva, resultam em um ciclo repetitivo de divisões celulares, formando complexos celulares suspensor-embriônicos. Biorreatores podem ser empregados para a produção em larga escala das culturas nesta fase. No ciclo B, esses pró-embriões são estimulados a prosseguir o seu desenvolvimento pela retirada das auxinas no meio, ou pela inclusão de ABA, citocininas e de agentes que promovam um estresse osmótico. Nesta fase as culturas são mantidas em condições de luminosidade. Esse ciclo de maturação forma embriões somáticos que podem ser convertidos à plantas, ou que podem então serem encapsulados para obtenção de sementes sintéticas (Guerra *et al.*, 1999a).

O uso da embriogênese somática permite elucidar questões referentes aos eventos iniciais da formação do embrião (Binarova *et al.*, 1996), proporciona a propagação de material vegetal *in vitro* e a produção de sementes artificiais (Osuga & Komamine, 1994). Adicionalmente, o uso de sementes sintéticas permite o armazenamento, a longo prazo, de germoplasma via criopreservação e o estabelecimento de bancos de germoplasma para manutenção de linhagens de germoplasma elite (Jain & Ishii, 1997). Entretanto, do ponto de vista florestal o principal motivo para o desenvolvimento da tecnologia da embriogênese somática está no seu potencial para multiplicação de plantas transgênicas (Kriebel, 1995) e no estabelecimento de florestas clonais de alto valor (Park *et al.*, 1998).

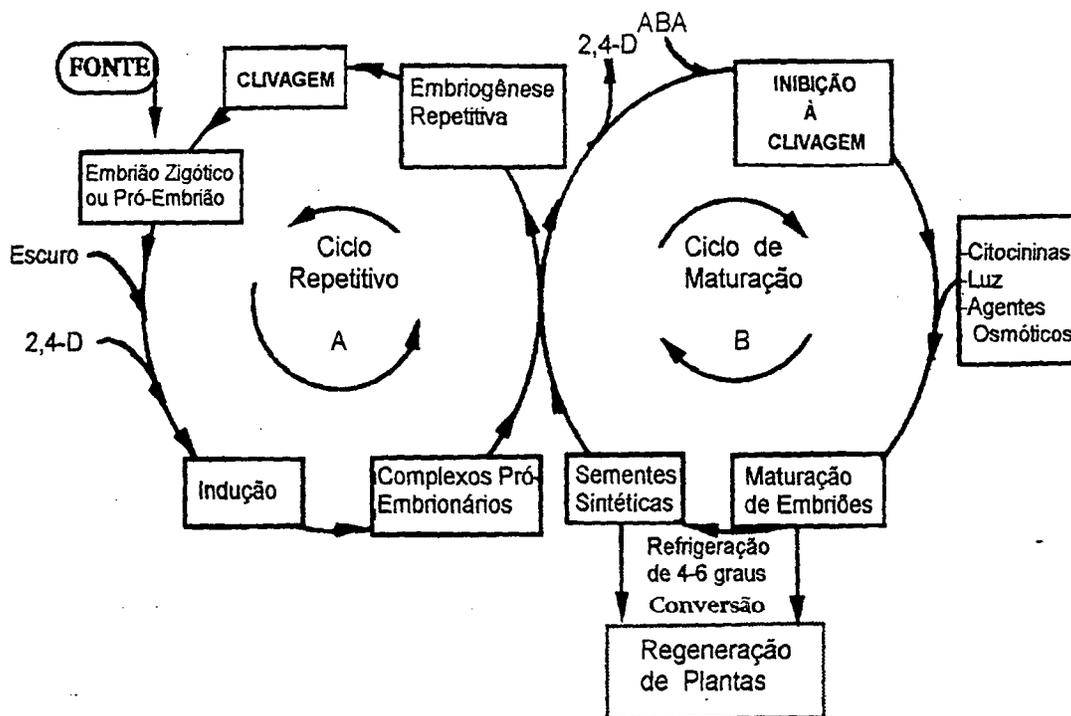


figura 3. Processo de dois ciclos para a indução e modulação da embriogênese somática (Guerra *et al.*, 1999a, adaptado de Durzan, 1988).

Nas coníferas ocorrem duas formas de poliembrião: simples ou por clivagem (Dogra, 1978). A poliembriogênese somática é a formação não-adventícia, por reconstituição, de mais de um embrião a partir de uma massa suspensor-proembriionária (Durzan, 1988), pré-existente na embriogênese zigótica de coníferas, diferenciando este processo daquele observado na embriogênese somática de angiospermas (Guerra *et al.*, 1999a). Portanto, culturas embriogênicas de gimnospermas diferem morfológicamente de culturas embriogênicas de angiospermas, embora seus padrões de proliferação por embriogênese somática repetitiva ou secundária sejam homólogos (Litz *et al.*, 1997).

O primeiro relato da embriogênese somática e regeneração de plantas em coníferas foi feito em *Picea abies* (Chalupa 1985; Hakman *et al.*, 1985). Os primeiros estudos da embriogênese somática em *A. angustifolia* foram relatados por Guerra e Kemper (1992). A indução, estabelecimento e multiplicação das culturas embriogênicas em *A. angustifolia* foram descritos por Astarita e Guerra (1998). A influência do meio de cultura, data de coleta e genótipo na frequência de induções foram estudados por Silveira e Guerra (1998). Guerra *et al.*, (2000) procederam uma descrição dos avanços obtidos na embriogênese somática de *A. angustifolia*, bem como das perspectivas futuras para o estabelecimento de um protocolo regenerativo nesta espécie. Astarita e Guerra (2000), apresentaram os padrões celulares e

morfológicos das culturas embriogênicas e estudaram aspectos do metabolismo das suspensões celulares de *A. angustifolia*.

Apesar de bem estabelecido o ciclo A de indução e modulação da embriogênese somática em *A. angustifolia*, até o presente momento não foi possível determinar as condições necessárias para a progressão no ciclo B. Esta espécie apresenta uma embriogênia atípica e especializada em relação às outras coníferas, aspecto que dificulta a comparação com outras espécies, para as quais já foram estabelecidos protocolos regenerativos baseados na embriogênese somática. Neste sentido, para *A. angustifolia* novos estudos devem ser realizados objetivando o aprofundamento das questões morfo-fisiológicas e bioquímicas relacionadas com a poliembriogênese zigótica e somática.

OBJETIVOS

Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é contribuir para o estabelecimento de um protocolo para a obtenção de embriões somáticos de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, através do estudo e elucidação dos pontos de controle do desenvolvimento embrionário.

Objetivos específicos

- a) Dar continuidade ao desenvolvimento do protocolo para embriogênese somática em *Araucaria angustifolia*;
- b) Induzir e estabelecer culturas embriogênicas em diferentes meios de cultura;
- c) Testar diferentes fontes e níveis de fitorreguladores, agentes osmóticos e de carboidratos na fase de maturação das linhagens celulares embriogênicas;
- d) Estudar os perfis das proteínas totais presentes nas linhagens celulares embriogênicas, embriões zigóticos cotiledonares e megagametófitos;
- e) Analisar a dinâmica de crescimento, valores de pH e concentração de glucose no meio de cultura e quantificação de proteínas extracelulares associados em suspensões celulares mantidas em duas diferentes condições de cultura;

REFERÊNCIAS

- ASTARITA, L.V., GUERRA, M.P. Early somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* – induction and maintenance of embryonal-suspensor mass cultures, **Brazilian Journal of Plant Physiology** 10, 1998. p. 113-118.
- ASTARITA, L.V., GUERRA, M.P. Conditioning of the culture medium by suspension cells and formation of somatic proembryo in *Araucaria angustifolia* (Coniferae), **In Vitro Cell. Dev. Biol.** (no prelo), 2000.
- ATTREE, S.M., DUNSTAN, D.I., FOWKE, L.C. White spruce [*Picea glauca* (Moench) Voss] and black spruce [*Picea mariana* (Mill) B.S.P.], in Y.P.S. Bajaj (eds), **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, v. 16, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1991. p. 423-445.
- BINAROVA, P., CIHALIKOVA, C., DOLEZEL, J., GILMER, S., FOWKE, L.C. Actin distribution in somatic embryos and embryogenic protoplasts of white spruce (*Picea glauca*), **In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant** 32, 1996. p. 59-65.
- BUCHHOLZ, J.T. Embryo development and polyembryony in relation to the phylogeny of conifers, **American Journal of Botany** 7, 1920. p. 125-145.
- BUCHHOLZ, J.T. Origin of cleavage polyembryony in conifers, **Bot. Gaz.** 81, 1926. p. 55-71.
- BURLINGAME, L.L. The morphology of *Araucaria brasiliensis*, II. The ovulate cone and female gametophyte, **Bot. Gaz.** 57, 1914. p. 490-508.
- BURLINGAME, L.L. The morphology of *Araucaria brasiliensis*, III. Fertilization, the embryo and the seed, **Bot. Gaz.** 59, 1915. p. 1-39.
- CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**, EMBRAPA-CNPQ, Colombo PR, 1994. p. 70-78.
- CHALUPA, V. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured immature and mature embryos of *Picea abies* (L.) Karst **Communi. Inst. For. Cech.** 14, 1985. p. 53-57.
- CHALUPA, V. **Biotechnology in forest tree improvement: trees of the future**, in: R. Rodriguez (eds.), **Plant Aging: Basic and Applied Approaches**, Plenum Press, New York, 1990. p. 311-317.
- De HOOGH, R.J. **Site-nutrition-growth relationship of *Araucaria angustifolia* (Bert) O Ktze in southern Brazil**, Dissertation zur Erlangung de Doktorwurde de Forstwissenschaftlichen Fakultät de Albert-Ludwig-Universität zu Freiburg im Breisgau, Freiburg, 1981.
- DODEMAN, V.L., DUCREUX, G., KREIS, M. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis, **Journal of Experimental Botany** 48, 1997. p. 1493-1509.
- DOGRA, P.D. Morphology, development and nomenclature of conifer embryo, **Phytomorphology** 28, 1978. p. 307-322.
- DURZAN, D.J. **Process control in somatic polyembryogenesis**, in J.E. Hällgren, (ed.), **Proceedings of Frans Symposium Department of Forest Genetics and Plant Physiology. Swedish University of Agricultural Sciences** 8, 1988. p. 147.
- FARNUM, P., TIMMIS, R., KULP, J.L. Biotechnology of forest yield, **Science** 219, 1983. p. 694-702.
- FILHO, J.A.S., KRAUS, J.E. Breve histórico das matas de araucária, **Forest** 99, Rio de Janeiro, 1999. p. 37-40.
- FRANCIS, J.K. *Araucariaceae* in Puerto Rico, **Turrialba** 3, 1988. p. 202-207.
- GIFFORD, E.M., FOSTER, A.S. **Morphology and evolution of vascular plants**, W. H. Freeman Co, New York, 1988. p. 401-453.

- GUERRA, M.P. **Poliembriogênese zigótica e somática em coníferas: *Picea abies* e *Araucaria angustifolia***, Tese para concurso de Professor Titular CCA/UFSC, 1993.
- GUERRA, M.P., KEMPER, E. Tecnologias Futuras: Aplicação da poliembriogênese somática para a propagação massal de plantas elite de *Araucaria angustifolia* (Bert) O Ktze., in Anais do Congresso Nacional Sobre Essências, São Paulo, 1992. p. 1233-1236.
- GUERRA, M.P., TORRES, A.C., TEIXEIRA, J.B. **Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas**, in A.C. TORRES, L.S. CALDAS, e J.A. BUSO (eds.), Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas v. 2, Embrapa, Brasília, 1999a. p. 533-568.
- GUERRA, M.P., REIS, M.S., SCHEINEDE, L. SILVEIRA, V. **Inventário dos Recursos Florestais da Mata Atlântica - *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze**, Conselho Nacional da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica, São Paulo, 1999b. p. 135.
- GUERRA, M.P., SILVEIRA, V., SANTOS, A.L.W., ASTARITA, L.V., NODARI, R.O. **Somatic Embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze**, in S. JAIN, P. GUPTA e R. NEWTON (eds.), Somatic Embryogenesis in Woody Plants, v. 6, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (in press), 2000.
- GUPTA, P.K., PULLMAN, G., TIMMIS, R., KREITINGER, M., CARLSON, W.C., GROB, J., WELTY, E. Forestry in the 21st Century, **Bio/technology** 11, 1993. p. 454-459.
- HAINES, R.J., PRAKASHA, N. Proembryo development and suspensor elongation in *Araucaria juss*, **Australian Journal of Botany** 28, 1980. p. 511-522.
- HAKMAN, I., FOWKE, L., von ARNOLD, S., ERIKSSON, T. The development of somatic embryos in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway spruce), **Plant Science** 38, 1985. p. 53-59.
- HÖGBERG, K.A., EKBERG, I., NORELL, L., von ARNOLD, S. Integration of somatic embryogenesis in a tree breeding programme: a case study with *Picea abies*, **Canadian Journal of Forest Research** 28 (10), 1998. p. 1536-1545.
- ISABEL, N., TREMBLAY, F.M. **Somatic embryogenesis in red spruce (*Picea rubens* Sarg)**, in S. JAIN, P. GUPTA e R. NEWTON (eds.), Somatic Embryogenesis in Woody Plants, v. 3, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1995. p. 111-123.
- JAIN, S.M., ISHII, K. Recent advances in somatic embryogenesis in forest trees, in Recent Advances in Biotechnology for Tree Conservation and Management, Florianópolis, 1997. p. 214-231.
- JARENKOW, J.A. Tipologias florestais com araucária no sul do Brasil, in Anais do 50 ° Congresso Nacional de Botânica, Blumenau, 1999. p. 299.
- KAUR, D., BHATNAGAR, S.P. Studies in the family *Araucariaceae*, **Beitr. Biol. Pflanzen** 58, 1983. p. 369-381.
- KLEIN, R.M. O aspecto dinâmico do pinheiro brasileiro, **Sellowia** 12, 1960. p. 17-44.
- KLIMASZEWSKA, K. **Somatic embryogenesis in *Picea mariana* (Mill.)** in S. JAIN, P. GUPTA e R. NEWTON (eds.), Somatic Embryogenesis in Woody Plants, v. 3, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1995. p. 67-79.
- KRIEBEL, H.B. **Introduction**, in: S. Jain, P. Gupta, e R. Newton (eds), Somatic Embryogenesis in Woody Plants, v. 1, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1995. p. 1-8.
- LIMA, A.R., CAPOBIANCO, J.P.R. **Mata Atlântica: avanços legais e institucionais para sua conservação**, Instituto Socioambiental, Brasília, pp. 118 (Documentos do ISA nº 004), 1997.
- LITZ, R.E., CHAVEZ, V.M., MOON, P.A. Induction of embryogenic cultures from mature-phase tropical and subtropical trees and control of somatic embryo maturation and germination, in Recent Advances in Biotechnology for Tree Conservation and Management, Florianópolis, 1997. p. 232-243.

- LONGHI, S.J. **Floresta Ombrófila Mista**, Trabalho Acadêmico de Doutorado. Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Curso de Pós-graduação em Engenharia Florestal, Curitiba, 1993. p. 61.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**, Editora Plantarum, São Paulo, 1992.
- MATTOS, J.R. **O Pinheiro Brasileiro**, Artes gráficas princesa Ltda, Lages, 1994. p. 225.
- MINOCHA, S.C., MINOCHA, R. **Historical aspects of somatic embryogenesis in woody plants**, in: S. JAIN, P. GUPTA, e R. NEWTON (eds), *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, v. 1, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1995. p. 9-22.
- ONDRO, W.J., COUTO, L., BETTERS, D.R. The status and practice of forestry in Brazil in the early 1990s, **The Forestry Chronicle** 71, 1995. p. 106-119.
- OSUGA, K., KOMAMINE, A. Synchronization of somatic embryogenesis from carrot cells at high frequency as a basis for the mass production of embryos, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 39, 1994. p. 125-135.
- PARK, Y.S., BARRET, D.J., BONGA, J.M. Application of somatic embryogenesis in high-value clonal forestry: deployment, genetic control, and stability of cryopreserved clones, **In Vitro Cellular and Development Biology-Plant** 34, 1998. p. 231-239.
- REITZ, R., KLEIN, R.M., REIS, A. **Projeto madeira de Santa Catarina**, HBR, Itajaí, 1978. p. 320.
- RIZZINI, C.T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil**, EDUSP, São Paulo, 1976. p. 294
- ROBINSON, C. Making forest biotechnology a commercial reality, **Nature Biotechnology** 17, 1999. p. 27-30.
- SEDEROFF, R. Building better trees with antisense, **Nature Biotechnology** 8, 1999. p. 750.
- SEITZ, R. (1986) Crow development of *Araucaria angustifolia* in its natural environment during sixty years. Crow and Canopy Structure in Relation to Productivity. in: T. FUJIMORI e D. WHITEHEAD (eds), *Forestry and Forest Products Research Institute*, Ibaraki, 1986. p. 129-145.
- SEWARD, A.C., FORD, S.O. **The Araucariaceae, recent and extinct**, Phil. Trans. R. Soc. London, 1905.
- SETOGUCHI, H., OSAWA, T.A., PINTAUD, J.C., JAFFRÉ, T., VELLON, J.M. Phylogenetic relationships within *Araucariaceae* based on rbcL gene sequences, **American journal of botany** 85, 1998. p. 1507-1516.
- SHARP, W.R., SONDAHL, M., CALDAS, L.S., MARAFFA, S.B. The physiology on in vitro asexual embryogenesis, **Hortic. Rev.** 2, 1980. p. 268-310.
- SHIMIZU, J.Y., OLIVEIRA, Y.M.M. **Distribuição, variação e usos dos recursos genéticos da araucária no sul do Brasil**, EMBRAPA-URPFCS, Documentos, 04, Curitiba, 1981. p. 9.
- SILVEIRA, V., GUERRA, M.P. Indução à Poliembriogênese Somática em *Araucaria angustifolia* (Bert) O Ktze., **Genetics and Molecular Biology** 21 (supplement), 1998. p. 226.
- STAXÉN, I., KLIMASZEWSKA, K., BORNMAN, T. Microtubular organization in protoplasts and cells of somatic embryo-regenerating and non-regenerating cultures of *Larix*, **Physiologia Plantarum** 91, 1994. p. 680-686.
- THOMSON, R.B. The *Araucariaceae* - a "Proto-Siphonogamic" method of fertilization, **Science** 25, 1907. p. 271-272.
- THORPE, T.A., HARRY, I.S. **Special problems and prospects in the propagation of woody species**, in: R. RODRIGUEZ (eds.), *Plant Aging: Basic and Applied Approaches*, Plenum Press, New York, 1990. p.67-74.

- von ARNOLD, S., CLAPHAM, D., EGERTSDOTTER, U., MO, L.H. Somatic embryogenesis in conifers - A case study of induction and development of somatic embryos in *Picea abies*, **Plant Growth Regulation** 20, 1996. p. 3-9.
- ZIMMERMAN, J.L. Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants, **The Plant Cell** 5, 1993. p. 1411-1423.

Capítulo 1

Indução e manutenção de culturas embriogênicas em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze.

INTRODUÇÃO

Nas coníferas, diversos fatores afetam a frequência de indução de culturas embriogênicas. Normalmente, são destacados: a influência do genótipo, o efeito do estágio de desenvolvimento do explante e o potencial indutivo do meio de cultura (Radojevic *et al.*, 1999), particularmente a sacarose, a composição e os níveis de nitrogênio, os elementos minerais, o agar, os fitorreguladores e o pH (Tautorus *et al.*, 1991).

Embriões zigóticos imaturos e maduros têm sido frequentemente utilizados como fontes de explantes para o estabelecimento de culturas embriogênicas (Hakman & von Arnold, 1988), embora o uso de megagametófitos também seja possível (Nagmani & Bonga, 1985). Os tipos e níveis dos fitorreguladores variam consideravelmente entre as diferentes espécies de coníferas estudadas. Para a maioria das espécies, é necessário o uso conjunto de uma auxina e citocinina, apesar de que em *Abies* spp (Salajova *et al.*, 1996) *Picea omorika* (Vujcic & Budimir, 1995) e *Araucaria angustifolia* (Astarita & Guerra, 1998) o uso de apenas citocininas seja efetivo na indução de culturas embriogênicas. Em casos mais restritos, é possível a indução e manutenção de culturas embriogênicas na ausência de fitorreguladores como em *Pinus sylvestris* e *Pinus pinaster* (Lelu *et al.*, 1999) e *Araucaria angustifolia* (Silveira & Guerra, 1998).

Culturas embriogênicas de coníferas são usualmente mantidas em meio de cultura similar ao meio de indução, o qual normalmente inclui uma auxina, uma citocinina e uma baixa concentração de sacarose (Attree & Fowke, 1993). A manutenção destas culturas requer o regular subcultivo em meio semi-sólido ou líquido, em intervalos de duas a quatro semanas, com níveis constantes de fitorreguladores.

No presente trabalho, avaliou-se a influência da composição do meio de cultura, do genótipo da planta matriz e do estágio de desenvolvimento do explante na indução e estabelecimento de culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Cones femininos de *A. angustifolia* foram coletados quinzenalmente no período de novembro de 1998 a fevereiro de 1999 (30/11, 17/12, 05/01, 25/01, 10/02) em três árvores pertencentes a uma população de um remanescente florestal, situado no município de Lages,

SC. Após a retirada da camada externa das pinhas, os pinhões imaturos foram individualizados e armazenados a 4° C por 24 a 48 horas. A assepsia da superfície dos pinhões jovens foi feita pela imersão em álcool 70% durante dois minutos e posteriormente em água sanitária 40% por 10 minutos. Em seguida, o material foi levado para a câmara de fluxo laminar onde os pinhões imaturos foram submetidos a três passagens em água destilada autoclavada. Embriões zigóticos em estágio pré-cotiledonar (Fig. 1a) foram excisados com o auxílio de bisturis e pinças, sob estereomicroscópio, e inoculados em placas de petri contendo 20 mL meio de cultura indutivo.

Indução das culturas embriogênicas

Os meios de cultura utilizados foram baseados nas formulações salinas LP (von Arnold & Eriksson, 1981) e BM (Gupta & Pullman, 1991). O pH do meio de cultura foi ajustado com NaOH (0,5 N) e HCl (0,5 N) para 5,8 antes da adição do phytigel (Sigma®). O meio de cultura foi autoclavado a 121° C durante 15 minutos. Caseína hidrolisada (Sigma®), L-glutamina (Sigma®), mio-inositol (Sigma®) e vitaminas foram filtroesterelizados e adicionados ao meio de cultura resfriado (aproximadamente 50° C). Os fitorreguladores utilizados (2,4-D, BAP e Kin) foram todos padrão Sigma®. Cerca de 20 mL de cada um dos tipos de meio de cultura foram despejados em placas de petri descartáveis. Os explantes foram inoculados nos meios LP₀, LP₅, BM₀ e BM₅ (Tabela 1). Para cada um dos tratamentos foram utilizadas cinco repetições. Cada repetição foi constituída por uma placa de petri contendo nove embriões (três por planta). A manutenção destas culturas deu-se no escuro a 25 ± 2° C. Após trinta dias da data de inoculação, determinou-se a frequência de indução (%), por genótipo, meio de cultura e estágio de desenvolvimento do explante (data de coleta dos cones).

Manutenção das culturas embriogênicas

As culturas embriogênicas provenientes dos meios de indução foram separadas do explante de origem e subcultivadas em intervalos de 20 dias. Culturas embriogênicas induzidas nos tratamentos LP₀ e BM₀ foram subcultivadas na mesma composição de meio de cultura em que foram induzidas. Aquelas provenientes dos tratamentos LP₅ e BM₅ foram subcultivadas nos meios de cultura LP₂ e BM₂ (Tabela 1) respectivamente. As culturas foram

mantidas no escuro em temperatura de $25 \pm 2^\circ \text{C}$. Características morfológicas presentes nas culturas embriogênicas foram observadas através de avaliações histoquímicas com carmim acético e azul de Evans (Gupta & Durzan, 1987).

Análise estatística

O delineamento estatístico utilizado para o experimento de indução foi o de parcela subdividida. Os dados de porcentagem de indução foram transformados por $\sqrt{x+2}$ sendo posteriormente submetidos a análise de variância (ANOVA) e ao teste de separação de médias Student Newman Kewls (SNK) ao nível de 5% de significância. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o suporte do programa estatístico Statgraf versão 7.0.

Tabela 1. Meios de cultura utilizados para a indução e a manutenção de culturas embriogênicas de *A. angustifolia*, a partir de embriões zigóticos imaturos.

Formulação salina	(von Arnold & Eriksson, 1981) LP*	(Gupta & Pullman, 1991) BM
Sacarose (g.L ⁻¹)	30,0	30,0
Phytigel (g.L ⁻¹)	2,0	2,0
Vitaminas (mg.L ⁻¹)		
Ácido nicotínico	0,5	0,5
Piridoxina - HCl	0,5	0,5
Tiamina - HCl	1,0	1,0
Glicina	2,0	2,0
L-glutamina (mg.L ⁻¹)	450,0	1000,0
Caseína hidrolisada (mg.L ⁻¹)	500,0	500,0
Mio-inositol (mg.L ⁻¹)	100,0	1000,0
Fitorreguladores (µM)		
LP ₀ = sem reguladores		BM ₀ = sem reguladores
LP ₅ = 2,4-D (5) + BAP (2) + Kin (2)		BM ₅ = 2,4-D (5) + BAP (2) + Kin (2)
LP ₂ = 2,4-D (2) + BAP (1) + Kin (1)		BM ₂ = 2,4-D (2) + BAP (1) + Kin (1)

* Modificado para NH₄NO₃ (2.400 mg.L⁻¹)

RESULTADOS

Efeito do meio de cultura

A análise estatística demonstrou não haver diferenças significativas ($P \leq 5$) entre as freqüências de indução nos quatro tratamentos testados (Tabela 2). A formulação salina empregada e a presença ou ausência de fitorreguladores nas condições testadas não foram fatores limitantes para a indução de culturas embriogênicas em *A. angustifolia* (Fig. 1b).

Tabela 2. Freqüência de indução de culturas embriogênicas de *A. angustifolia* a partir de embriões zigóticos imaturos inoculados em meio basal LP (von Arnold & Eriksson, 1981) e BM (Gupta & Pullman, 1991), suplementado com 2,4-D, BAP e Kin.

Meio de Cultura	No. Explantes	Indução (%)
BM ₀	225	15,55 a
LP ₅	225	15,11 a
BM ₅	225	14,22 a
LP ₀	225	14,22 a

- Letras diferentes indicam que as médias apresentam diferença estatística em nível de 5 % de significância pelo teste SNK

- BM₀= sem fitorreguladores

- BM₅= suplementado com 2,4-D (5 µM) + BAP (2 µM) + Kin (2 µM)

- LP₀= sem fitorreguladores

- LP₅= suplementado com 2,4-D (5 µM) + BAP (2 µM) + Kin (2 µM)

Efeito do estágio de desenvolvimento do explante

O estágio de desenvolvimento do explante influenciou significativamente ($P \leq 5$) a freqüência de indução de culturas embriogênicas em *A. angustifolia* (Tabela 3). A maior taxa de indução (23,33 %) foi obtida na primeira coleta, e, com exceção da segunda (10,55 %), ocorreu um declínio progressivo nesta taxa de indução à medida em que ocorreu o desenvolvimento da semente. Neste estudo não houve a preocupação de se utilizar apenas o embrião dominante como fonte de explante. Assim, os embriões não dominantes foram excisados em estágio pré-cotiledonar. Nas duas primeiras induções, trabalhou-se com os embriões dominantes e não-dominantes e a partir da terceira indução trabalhou-se exclusivamente com os embriões não-dominantes. Apesar disso, foi possível a obtenção de valores expressivos de indução como 19,44 % e 17,77 % para a terceira e quarta induções, respectivamente. Na quinta coleta foram obtidas freqüências de indução de 2,77 % mesmo com o embrião dominante já estando em fase cotiledonar.

Tabela 3. Frequência de indução de culturas embriogênicas de *A. angustifolia* a partir de embriões zigóticos imaturos coletados em diferentes estádios de desenvolvimento.

Data da Coleta	No. Explantes	Indução (%)
30/11/98	180	23,33 a
05/01/99	180	19,44 b
25/01/99	180	17,77 c
17/12/98	180	10,55 d
10/02/99	180	2,77 e

- Letras diferentes indicam que as médias apresentam diferença estatística em nível de 5 % de significância pelo teste SNK

Influência do genótipo

O genótipo da planta doadora também influenciou significativamente ($P \leq 5$) a frequência de indução (Tabela 4). Para os três genótipos testados foi possível a obtenção de culturas embriogênicas. As frequências de indução variaram de 9,99 % a 19,99 % sendo a árvore B a de melhor performance.

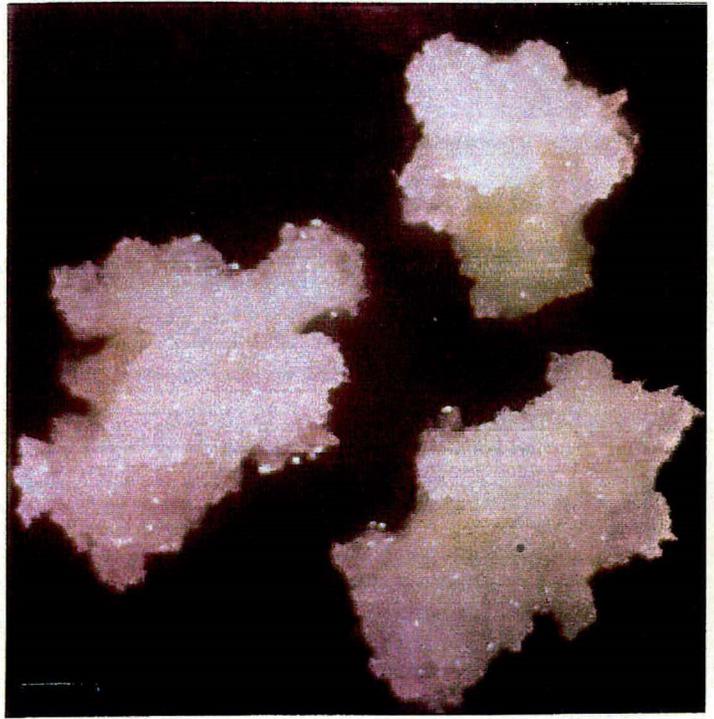
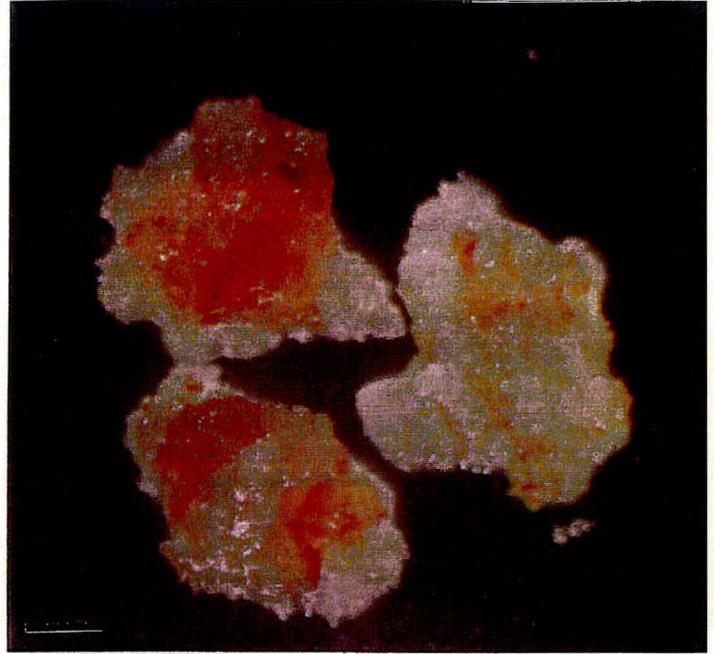
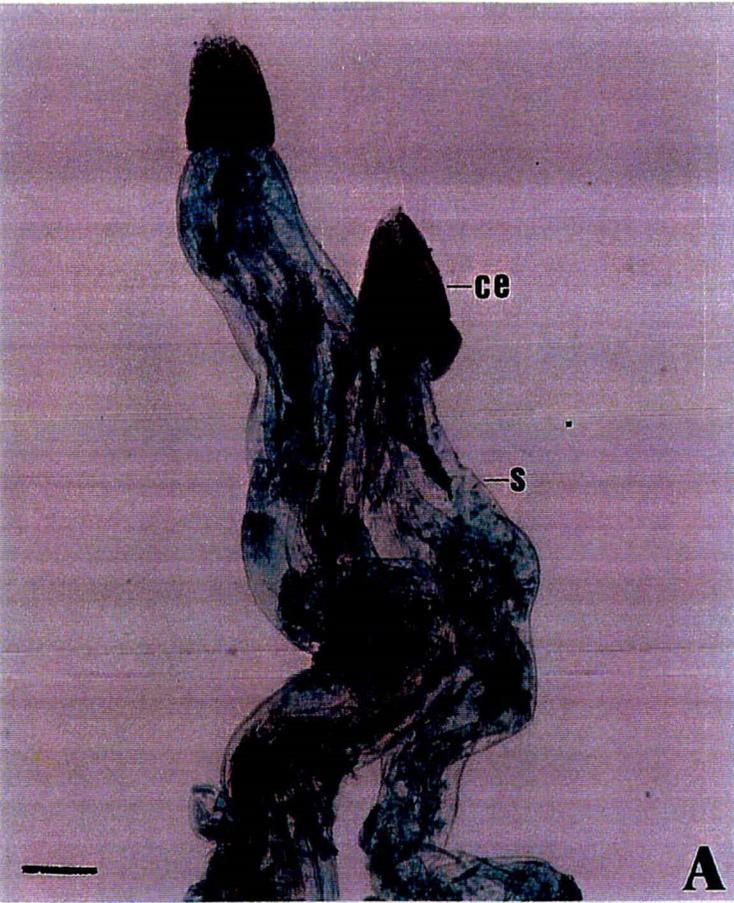
Tabela 4. Efeito dos diferentes genótipos sobre a frequência de indução de culturas embriogênicas de *A. angustifolia* a partir de embriões zigóticos imaturos.

Genótipo	No. Explantes	Indução (%)
Planta B	300	19,99 a
Planta A	300	14,99 b
Planta C	300	9,33 c

- Letras diferentes indicam que as médias apresentam diferença estatística em nível de 5 % de significância pelo teste SNK

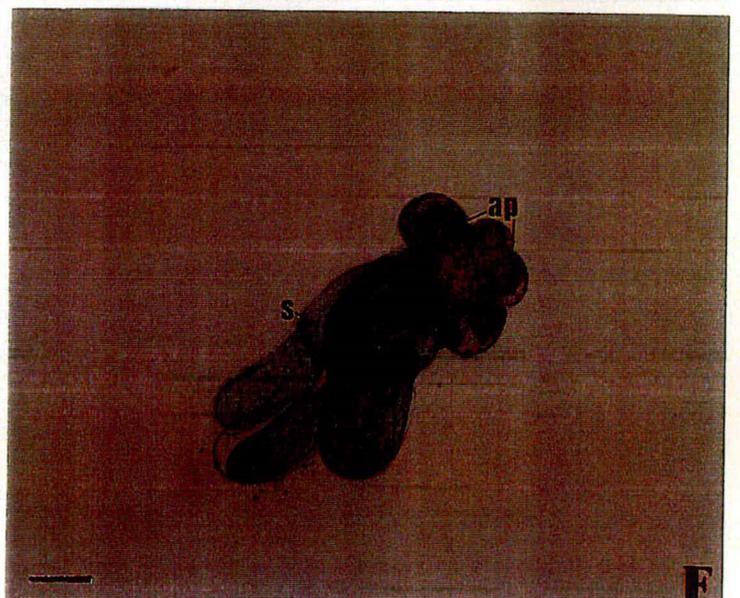
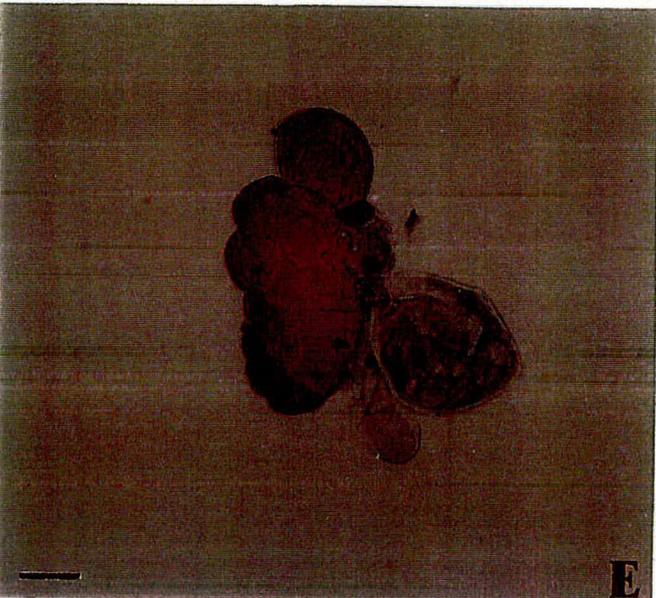
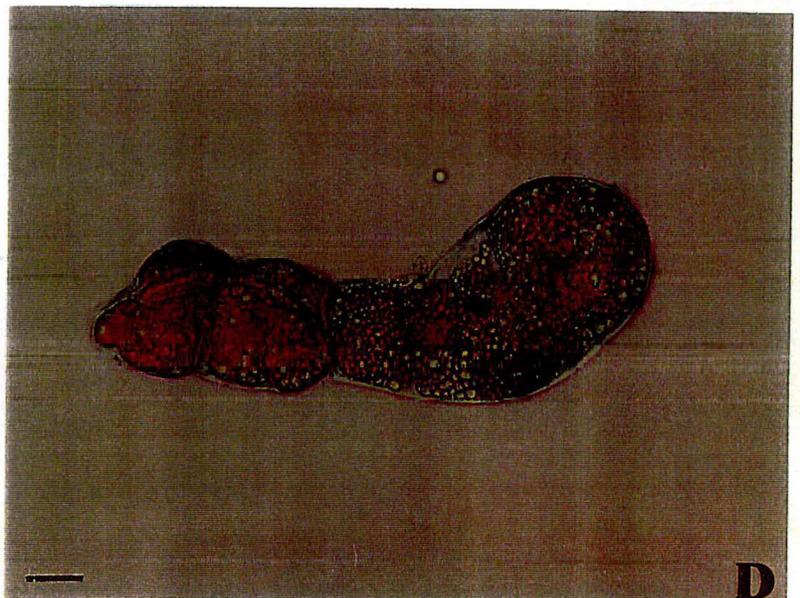
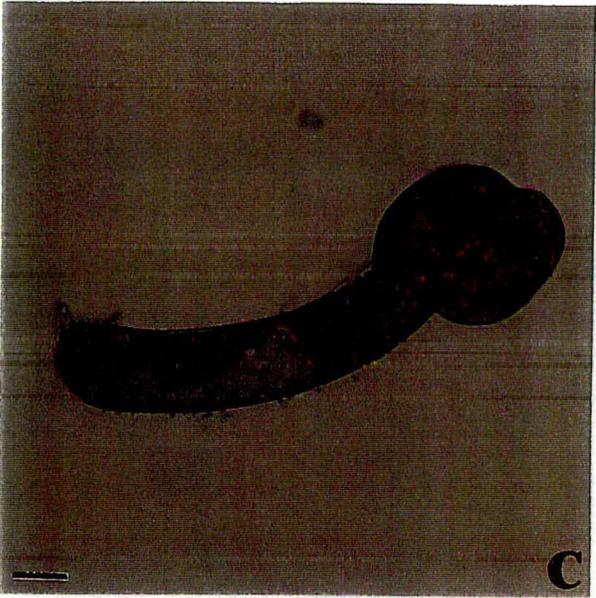
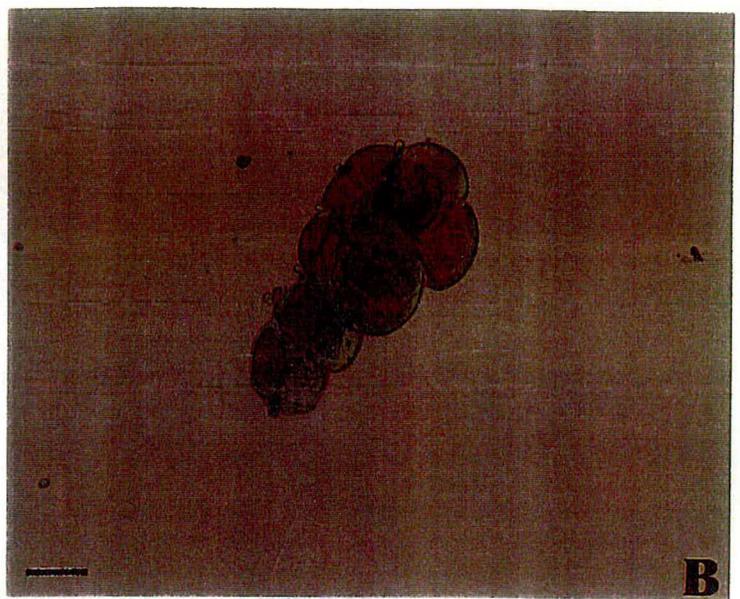
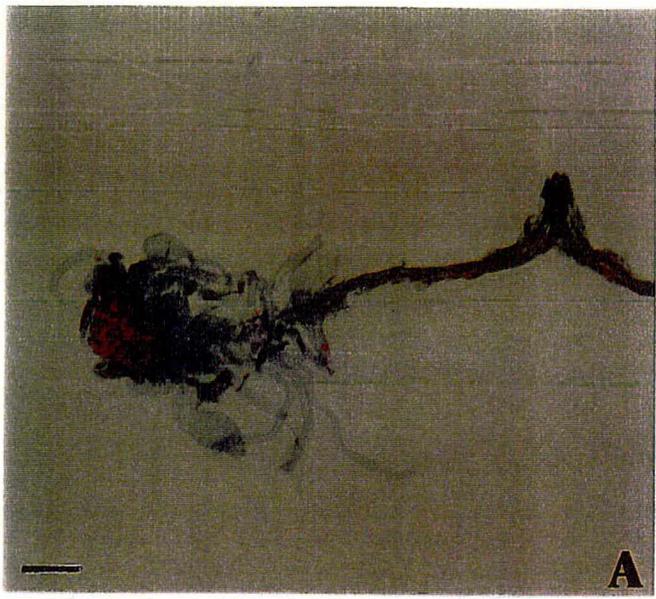
Manutenção e estabilização das culturas embriogênicas

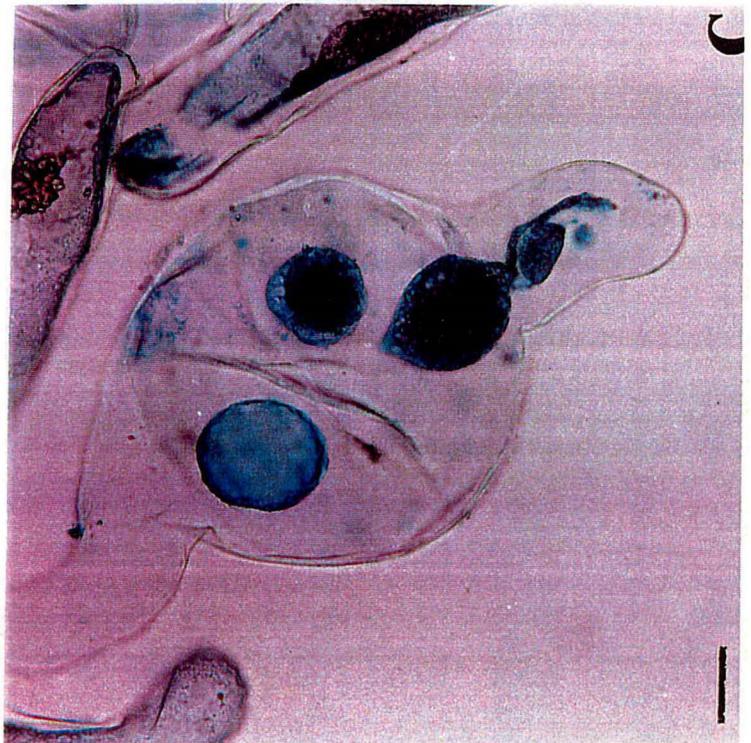
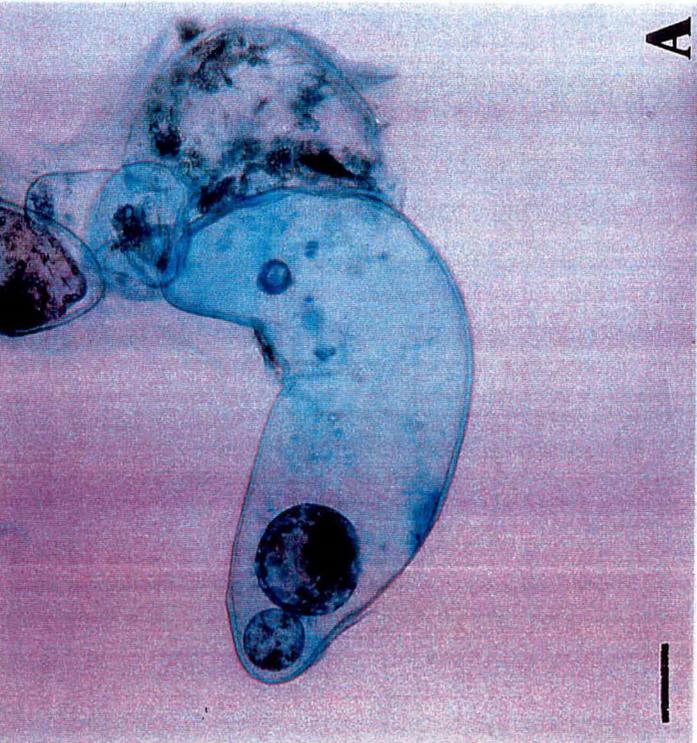
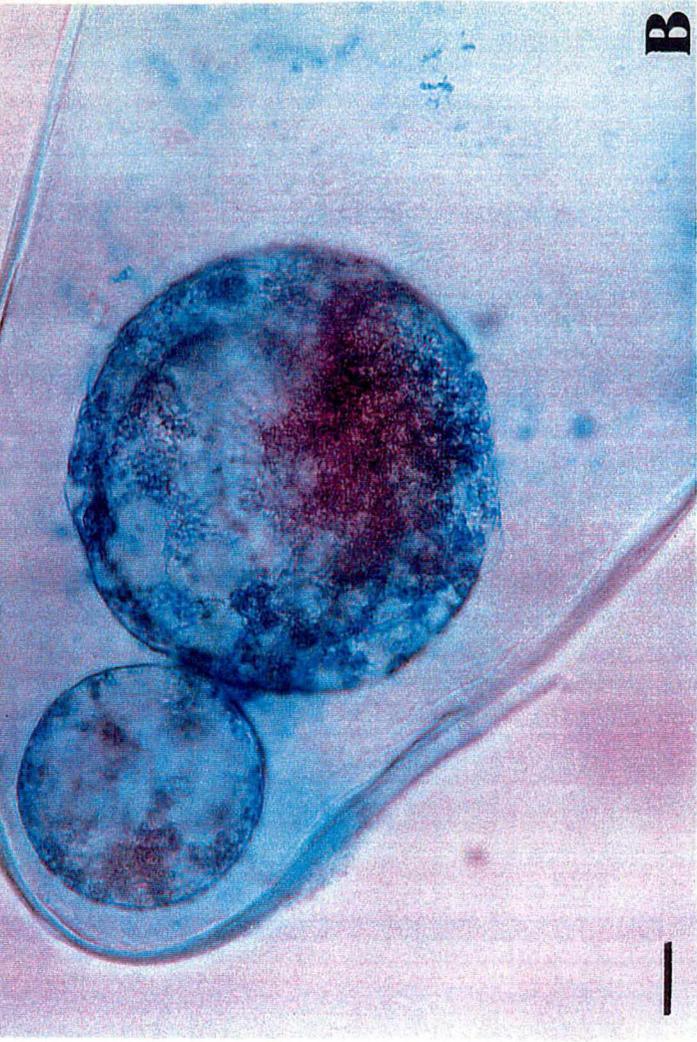
Na fase de manutenção, a morfologia dos cultivos mantidos em meio de cultura basal isento de auxinas e citocininas diferiu do tratamento suplementado com estes fitorreguladores. Culturas embriogênicas induzidas e mantidas em meio de cultura isento de fitorreguladores escureceram e oxidaram rapidamente (Fig. 1c). Apesar disto, muitas culturas revelaram setores com capacidade proliferativa, os quais foram selecionados e sub-cultivados. Nas porções escurecidas, a análise histoquímica revelou não haver presença de pró-embriões, sendo estes setores compostos apenas por células de suspensor e células embrionárias dispersas. Diferentemente, para as linhagens celulares induzidas e mantidas em meio de cultura com fitorreguladores, após 20 dias de subcultivo, o padrão principal foi a coloração



branco-translúcida (Fig. 1d), e com menor frequência foram observados pontos de escurecimento nestas culturas.

Através da análise histoquímica foram identificados nas culturas embriogênicas, distintos padrões celulares, formados basicamente por maciços celulares de diferentes tamanhos, compostos de células isodiamétricas, bem como uma intensa rede de células de suspensor e pró-embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento (Fig. 2a, 2b, 2c, 2d e 2e). Os pró-embriões somáticos isolados apresentaram células embrionárias em um pólo, e no outro extremo, a presença de um sistema de células de suspensores curtos, revelando morfologia bipolar (Fig. 2f). Além disso, em menor frequência foi identificada a presença de células cilíndricas, alongadas, binucleadas com comprimento variando entre 150 e 200 μm (Fig. 3a, 3b, 3c e 3d). Análises preliminares indicaram uma maior capacidade de organização dos pró-embriões no meio isento de fitorreguladores, entretanto no transcorrer dos subcultivos, esta tendência foi menos visível.





DISCUSSÃO

Diversos fatores afetam a frequência de indução de culturas embriogênicas em coníferas. Neste estudo, para *A. angustifolia*, o estágio de desenvolvimento e o genótipo da planta doadora influenciaram significativamente ($P \leq 5$) a frequência de induções. O uso de diferentes formulações salinas (LP e BM) bem como a presença ou ausência de fitorreguladores (2,4-D, BAP e Kin) não influenciaram significativamente a indução de culturas embriogênicas.

No presente trabalho, a indução de culturas embriogênicas em *A. angustifolia*, ocorreu em alta frequência quando comparada a outros relatos em coníferas. Nesta espécie, o potencial indutivo de culturas embriogênicas diminui com o início da formação dos cotilédones (Astarita & Guerra, 1998). Ou seja, a medida em que se avança o estágio de desenvolvimento dos embriões zigóticos, menor é a resposta na frequência de induções.

Em coníferas, diversos relatos discutem a influência da data de coleta e do estágio de desenvolvimento na frequência de indução de culturas embriogênicas. Em *Cryptomeria japonica* (Ogita *et al.*, 1999), *Abies alba x Abies cephalonica* (Salajova *et al.*, 1996), *Picea glauca engelmannii* (Roberts *et al.*, 1989), *Pinus elliotti* (Jain *et al.*, 1989), *Pinus taeda* (Li & Huang, 1996), a taxa de indução embriogênica obtida foi positivamente correlacionada com período de coleta dos cones, conseqüentemente, com o estágio de desenvolvimento dos embriões zigóticos. Os explantes primários que originam embriões somáticos em coníferas são restritos a tecidos juvenis, tais como embriões zigóticos pré-cotiledonares e cotiledonares, e raramente, explantes originados de mudas (Nagmani *et al.*, 1995). O estágio de desenvolvimento do explante é de fundamental importância para a transição da célula somática em célula embriogênica (Jong *et al.*, 1993). Entretanto, ainda não está claro se isto seria reflexo de diferenças genéticas na habilidade das células somáticas em tornarem-se embriogênicas, ou em função da frequência de um tipo celular responsivo presente nestes tecidos (Jong *et al.*, 1993). Neste trabalho para *A. angustifolia* foram observados diferentes tipos celulares (Fig. 2), possivelmente relacionados ao desenvolvimento de pró-embriões somáticos.

No presente estudo, o emprego de embriões zigóticos não-dominantes em estágio pré-cotiledonar resultou em induções embriogênicas em frequências expressivas (coleta 3 e 4), mesmo quando o embrião dominante atingiu o estágio cotiledonar (coleta 5). Apesar de não ocuparem a cavidade de corrosão, na qual estão armazenadas uma série de substâncias de reserva que garantem o desenvolvimento do embrião dominante, os embriões não-dominantes

demonstraram-se fisiologicamente receptivos aos estímulos fornecidos pelos tratamentos de indução.

Em *Pinus taeda*, a embriogênese somática pode ser iniciada a partir de embriões zigóticos que não sejam o embrião dominante (Becwar et al., 1991). Comparativamente à embriogênese somática de *Picea sp*, a indução de culturas embriogênicas a partir de embriões zigóticos não-dominantes não é uma questão relevante, já que neste gênero o embrião dominante é prontamente exisado da semente (Becwar & Pullman, 1995). Apesar de em *A. angustifolia* a excisão do embrião dominante não ser um aspecto impeditivo, a possibilidade de se utilizar o embrião não-dominante, mesmo com o pinhão em estádios avançados de desenvolvimento, pode proporcionar a ampliação do período de indução, além de poder gerar maior variabilidade genética para o conjunto de culturas embriogênicas induzidas. Em *A. angustifolia* ocorre poliembrionia simples, sendo os pró-embriões zigóticos heterogênicos (Dogra, 1978). Consequentemente, podem ser obtidas culturas embriogênicas geneticamente distintas. Se a embriogênese somática é proporcionada somente por poucos genótipos, uma perda de diversidade genética pode ocorrer nos programas de melhoramento genético, principalmente nos programas de melhoramento clonal (Park et al., 1993).

Em *A. angustifolia*, diferentes combinações e concentrações de auxinas e citocininas já foram testadas visando estabelecer culturas embriogênicas. Astarita e Guerra (1998) obtiveram freqüências de 68,7% quando embriões zigóticos imaturos foram inoculados em meio basal LP suplementado com 2,4-D (45 μM), BAP (11 μM) e Kin (11 μM). Entretanto, parte significativa das linhagens geradas não sobreviveram à redução gradual dos níveis de fitorreguladores na fase de manutenção. Também em *A. angustifolia*, foram obtidas respostas de 16,7% até 43,7% na freqüência de indução de culturas embriogênicas em meio de cultura basal isento de fitorreguladores e em meio de cultura suplementado com 2,4-D (2-10 μM), BAP (0,5-4 μM) e Kin (0,5-4 μM) (Guerra et al., 2000).

No presente estudo, a opção pelo emprego de baixas concentrações de fitorreguladores esteve intimamente associada às etapas seguintes do protocolo, visando o estabelecimento de culturas embriogênicas aptas ao processo de manutenção e maturação. A possibilidade de induzir com baixos níveis de fitorreguladores pode reduzir as perdas provenientes pela redução gradual nos níveis de fitorreguladores, além de gerarem culturas embriogênicas mais aptas ao processo de maturação. Existem evidências de que auxinas (2,4-D ou AIA) em níveis acima de 2,5 μM no meio de cultura podem resultar em distúrbios na evolução morfológica das linhagens celulares, afetando o seu desenvolvimento (Korlach & Zoglauer, 1995). O uso de baixos níveis de fitorreguladores tem se demonstrado vantajoso em outras coníferas. Em

Pinus elliottii (Jain *et al.*, 1989) e *Pinus taeda* (Li *et al.*, 1998) o emprego de baixas concentrações de fitorreguladores foi vantajosa para a produção de culturas embriogênicas de boa qualidade. Nesta linha, a possibilidade de se obterem culturas embriogênicas em meio basal livre de fitorreguladores representa uma estratégia interessante na obtenção de linhagens celulares autônomas com relação a suplementação de fitorreguladores no meio de cultura. Neste trabalho, foi possível a indução e manutenção de culturas embriogênicas nos meios de cultura LP e BM isentos de fitorreguladores (2,4-D, BAP e Kin). Segundo Guerra *et al.*, (1999), em alguns casos, a combinação precisa entre o meio de cultura e o estágio fisiológico do explante pode eliminar a necessidade da suplementação com fitorreguladores. Em *Pinus sylvestris* e *Pinus pinaster* (Lelu *et al.*, 1999), a indução de culturas embriogênicas e a progressão para estádios subsequentes foram obtidos em altas frequências em meios de cultura isentos de fitorreguladores. Nas coníferas, este fenômeno tem sido relatado por outros autores, mas sempre em frequências muito baixas (0,2 - 0,8 %) (Lelu *et al.*, 1999).

Nas coníferas, ocorre especificidade genotípica para indução de culturas embriogênicas (Attree & Fowke, 1993). No presente trabalho, para os genótipos de *A. angustifolia* testados, foram observadas diferenças de até 10,66 % na frequência de induções embriogênicas. Nesta mesma espécie, foram obtidas diferenças de até 29,16 % entre os genótipos testados (Silveira & Guerra, 1998). Em *Pinus strobus*, foram encontradas taxas de indução de 2,6 % até 23 % nos diferentes genótipos testados (Garin *et al.*, 1998). A qualidade das sementes e o genótipo utilizado podem afetar as taxas de indução da embriogênese somática (von Arnold *et al.*, 1995). Em *Picea glauca*, variações significativas na frequência de indução foram atribuídas à interação família x tratamento (Park *et al.*, 1993) e à procedência e lote de sementes (Tremblay, 1990). Em *Picea abies* as frequências de indução dependem da idade do explante primário, bem como do genótipo (von Arnold *et al.*, 1996).

Na fase de manutenção, as culturas embriogênicas induzidas e mantidas na ausência de fitorreguladores apresentaram rápido escurecimento em relação as culturas induzidas e mantidas com fitorreguladores. A este processo de escurecimento foi associada a redução na proliferação das culturas embriogênicas além da ausência de pró-embriões somáticos. Mesmo assim, as culturas mantidas em meios de cultura isentos de fitorreguladores demonstraram inicialmente um maior potencial para organização dos pró-embriões. Em *Pinus taeda*, o escurecimento do tecido embriogênico também foi relacionado à perda da capacidade embriogênica das culturas, embora o potencial embriogênico pudesse ser restabelecido através da imediata repicagem para novos meios de cultura (Li & Huang, 1996). Em *Pinus pinaster*, algumas linhagens celulares escureceram e perderam seu potencial embriogênico após cinco

meses de subcultivos (Bercetche & Pâques, 1995). Durante a fase de manutenção, diferentes linhagens celulares originadas de diferentes genótipos de *Pinus caribaea* demonstraram distintos requerimentos nutricionais para o seu crescimento (David *et al.*, 1995). Em *Picea rubens*, períodos de subcultivo superiores a 21 dias provocaram o escurecimento das culturas embriogênicas (Harry & Thorpe, 1991). Entretanto, o escurecimento das culturas não provocou a diminuição na taxa de crescimento das culturas na fase de manutenção bem como a sua capacidade de formação de embriões (Ísabel & Tremblay, 1995).

Adicionalmente, aos padrões celulares já descritos por Astarita e Guerra (2000) constituídos basicamente de células embriogênicas, grupos pró-embrionários e células de suspensor, foi identificado, no presente trabalho, a presença de células cilíndricas, alongadas e binucleadas (Fig. 3). Em *Larix leptolepis*, células longas binucleadas sofrem contínuo processo de divisão celular resultando no desenvolvimento de pró-embriões somáticos adventícios que apresentavam uma região embriogênica e outra de suspensor (Ogita *et al.*, 1997). Em *Picea abies*, Durzan *et al.*, (1994) descreveu esta rota ontogenética de formação de novos pró-embriões a partir de células especializadas denominadas de tubo embrionárias. Entretanto, a presença de células tubo embrionárias é comum ao modelo de desenvolvimento do embrião zigótico em *Pinaceae*. Em *Araucariaceae* no plano basal de desenvolvimento do pró-embrião secundário (padrão U.S.E), o grupo embrionário (E) é composto apenas de células embrionárias (tE) e células de capa (c), não havendo menção da formação de células tubo embrionárias. A presença de células binucleadas em culturas embriogênicas de *A. angustifolia*, pode estar associada à presença de diferentes rotas de desenvolvimento do embrião somático. Em *Pinus koraiensis*, foram identificadas duas diferentes rotas de desenvolvimento dos embriões somáticos, sendo que a estas rotas foram associadas estratégias diferenciadas na formação dos pró-embriões, bem como nos distintos tipos celulares (Bozhkov *et al.*, 1997).

CONCLUSÕES

- A) Embriões zigóticos pré-cotiledonares não-dominantes podem induzir culturas embriogênicas de *A. angustifolia*;
- B) Ambas as formulações salinas LP (von Arnold & Eriksson, 1983) e BM (Gupta & Pullman, 1991) permitiram a indução de culturas embriogênicas;
- C) O genótipo da planta doadora influenciou significativamente a frequência de indução de culturas embriogênicas;

- D) A indução das culturas embriogênicas foi possível tanto em meios de cultura suplementados com 2,4-D, BAP e Kin, quanto em meios de cultura isentos de fitorreguladores;
- E) A indução de culturas embriogênicas em meio de cultura isento de 2,4-D, BAP e Kin proporcionou a formação de linhagens celulares autônomas com relação a suplementação de fitorreguladores;
- F) Culturas embriogênicas induzidas e mantidas em meio de cultura isento de fitorreguladores, sofreram perda do potencial embriogênico mais rapidamente do que culturas embriogênicas induzidas e mantidas em meio de cultura suplementado com 2,4-D, BAP e Kin;
- G) O grau de organização (bipolaridade) dos pró-embriões somáticos nas linhagens celulares embriogênicas induzidas e mantidas em meio de cultura isento de fitorreguladores (2,4-D, BAP e Kin) foi superior ao das linhagens celulares embriogênicas induzidas e mantidas em meio de cultura suplementado com 2,4-D, BAP e Kin;
- H) A presença de células cilíndricas, alongadas e binucleadas sugere a indução de uma nova rota ontogenética de formação de pró-embriões somáticos em linhagens celulares embriogênicas.

REFERÊNCIAS

- ASTARITA, L.V., GUERRA, M.P. Early somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* – induction and maintenance of embryonal-suspensor mass cultures, **Brazilian Journal of Plant Physiology** 10, 1998. p. 113-118.
- ASTARITA, L.V., GUERRA, M.P. Conditioning of the culture medium by suspension cells and formation of somatic proembryo in *Araucaria angustifolia* (Coniferae), **In Vitro Cell. Dev. Biol.**, 2000 (no prelo).
- ATTREE, S.M., FOWKE, L.C. Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 35, 1993. p. 1-35.
- BECWAR, M.R., BLUSH, T.D., BRONW, D.W., CHESICK, E.E. Multiple paternal genotypes in embryogenic tissue derived from individual immature loblolly pine seeds, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 26, 1991. p. 37-44.
- BECWAR, M.R., PULLMAN, G.S. Somatic embryogenes in loblolly pine (*Pinus taeda* L.), in S. JAIN, P. GUPTA e R. NEWTON (eds.), Somatic Embryogenesis in Woody Plants, v. 3, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1995. p. 287-301.
- BERCETHE, J., PÂQUES, M. Somatic embryogenesis in maritime pine (*Pinus pinaster*), in S. JAIN, P. GUPTA e R. NEWTON (eds.), Somatic Embryogenesis in Woody Plants, v. 3, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1995. p. 221-242.
- BOZHKOV, P.V., AHN, I.S., PARK, Y.G. Two alternative pathways of somatic embryo origin from polyembryonic mature stored seeds of *Pinus koraiensis* Sieb et Zucc., **Can. J. Bot.** 75, 1997. p. 509-512.
- DAVID, A., LAINE, E., DAVID, H. Somatic embryogenesis in *Pinus caribaea*, in S. JAIN, P. GUPTA e R. NEWTON (eds.), Somatic Embryogenesis in Woody Plants, v. 3, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1995. p. 145-181.
- DOGRA, P.D. Morphology, development and nomenclature of conifer embryo, **Phytomorphology** 28, 1978. p. 307-322.
- DURZAN, D.J., JOKINEN, K., GUERRA, M.P., SANTERRE, A., CHALUPA, V., HAVEL, L. Latente diploid parthenogenesis and parthenote cleavage in egg-equivalents of norway spruce, **Int. J. Plant Sci.** 155, 1994. p. 677-688.
- GARIN, E., ISABEL, N., PLOURDE, A. Screening of large numbers of seed families of *Pinus strobus* L. for somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos, **Plant Cell Reports** 18, 1998. p. 37-43.
- GUERRA, M.P., TORRES, A.C., TEIXEIRA, J.B. Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas, in A.C. TORRES, L.S. CALDAS, e J.A. BUSO (eds.), Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas v. 2, Embrapa, Brasília, 1999. p. 533-568.
- GUERRA, M.P., SILVEIRA, V., SANTOS, A.L.W., ASTARITA, L.V., NODARI, R.O. Somatic Embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, in S. JAIN, P. GUPTA e R. NEWTON (eds.), Somatic Embryogenesis in Woody Plants, v. 6, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2000 (in press).
- GUPTA, P.K., DURZAN, D.J. Biotechnology of somatic polyembryogenesis and plantlet regeneration in loblolly pine, **Bio/Technology** 5, 1987. p. 147-151.
- GUPTA, P.K., PULLMAN, G.S. Method for reproducing coniferous plants by somatic embryogenesis using abscisic acid and osmotic potential variation, U.S. Patent No. 5,036,007, 1991.
- HAKMAN, I., von ARNOLD, S. Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of *Picea glauca* (White spruce), **Physiologia Plantarum** 72, 1988. p. 579-587.

- HARRY, I.S., THORPE, T.A. Somatic embryogenesis and plant regeneration from mature zygotic embryos of red spruce, **Bot. Gaz.** 152, 1991. p. 446-452.
- ISABEL, N., TREMBLAY, F.M. Somatic embryogenesis in red spruce (*Picea rubens* Sarg), in S. JAIN, P. GUPTA e R. NEWTON (eds.), Somatic Embryogenesis in Woody Plants, v. 3, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1995. p. 111-123.
- JAIN, S.M., DONG, N., NEWTON, R.J. Somatic embryogenesis in slash pine (*Pinus elliottii*) from immature embryos cultured in vitro, **Plant Science** 65, 1989. p. 233-241.
- JONG, A.J., SCHMIDT, E.D.L., de VRIES, S.C. Early events in higher-plant embryogenesis, **Plant Molecular Biology** 22, 1993. p. 367-377.
- KORLACH, J., ZOGLAUER, K. Developmental patterns during direct somatic embryogenesis in protoplasts culture of european larch (*Larix decidua* Mill.), **Plant Cell Reports** 15, 1995. p. 242-247.
- LELU, M.A., BASTIEN, C., DRUGEAULT, A., GOUEZ, M.L., KLIMASZEWSKA, K. Somatic embryogenesis and plantlet development in *Pinus sylvestris* and *Pinus pinaster* on medium with and without growth regulators, **Physiologia Plantarum** 105, 1999. p. 719-728.
- LI, X.Y., HUANG, F.H. Induction of somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda* L.), **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant** 32, 1996. p. 129-135.
- LI, X.Y., HUANG, F.H., GBUR, E.E. Effect of basal medium, growth regulators and phytigel concentration on initiation of embryogenic cultures from immature zygotic embryos of loblolly pine (*Pinus taeda* L.), **Plant Cell Reports** 17, 1998. p. 298-301.
- NAGMANI, R., DINER, A.M., GARTON, S., ZIPF, A.E. Anatomical comparison of somatic and zygotic embryogeny in conifers, in: S. JAIN, P. GUPTA, e R. NEWTON (eds), Somatic Embryogenesis in Woody Plants, v. 1, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1995. p. 23-48.
- NAGMANI, R., BONGA, J. M. Embryogenesis in subcultured callus of *Larix decidua*, **Canadian Journal of Forest Research** 15, 1985. p. 1088 - 1091.
- OGITA, S., ISHIKAWA, H., KUBO, T. Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos of *Cryptomeria japonica* I: Embryogenic cell induction and its morphological characteristics, **J. Wood Sci** 45, 1999. p. 87-91.
- OGITA, S., KUBO, T., FUSHITANI, M. Anatomical characteristics in early embryogenesis from immature embryo of *Larix leptolepis*, **Forest Resources Environ.** 35, 1997. p. 45-51.
- PARK, Y.S., POND, S.E., BONGA, J.M. Initiation of somatic embryogenesis in white spruce (*Picea glauca*): genetic control, culture treatment effects, and implications for tree breeding, **Theor. Appl. Genet.** 86, 1993. p. 427-436.
- ROBERTS, D.R., WEBSTER, F.B., FLINN, B.S., LAZAROFF, W.R., McINNIS, S.M., SUTTON, B.C.S. Application of somatic embryogenesis to clonal propagation of interior spruce, Somatic Cell Genetics of Woody Plants, IUFRO Meeting, Placerville, CA, 1989.
- RADOJEVIC, L., ÁLVAREZ, C., FRAGA, M.F., RODRÍGEUZ, R. Somatic embryogenic tissue establishment from mature *Pinus nigra* Arn. ssp. *Salzmannii* embryos, **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant** 35, 1999. p. 206-209.
- SALAJOVA, T., JASIK, J., KORMUTAK, A., SALAJ, J., HAKMAN, I. Embryogenic culture initiation and somatic embryo development in hybrid firs (*Abies alba* x *Abies cephalonica*, and *Abies alba* x *Abies numidica*), **Plant Cell Reports** 15, 1996. p. 527-530.
- SILVEIRA, V., GUERRA, M.P. Indução à Poliembriogênese Somática em *Araucaria angustifolia* (Bert) O Ktze., **Genetics and Molecular Biology** 21 (supplement), 1998. p. 226.
- TAUTORUS, T.E., FOWKE, L.C., DUNSTAN, D.I. Somatic embryogenesis in conifers, **Canadian Journal of Botany** 69, 1991. p. 1873-1899.

- TREMBLAY, F.M. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from embryos isolated from stored seeds of *Picea glauca*, **Can. J. Bot.** 68, 1990. p. 236-242.
- von ARNOLD, S., ERIKSSON, T. In vitro studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*, **Canadian Journal of Botany** 59, 1981. p. 870-874.
- von ARNOLD, S., CLAPHAM, D., EGERTSDOTTER, U., MO, L.H. Somatic embryogenesis in conifers - A case study of induction and development of somatic embryos in *Picea abies*, **Plant Growth Regulation** 20, 1996. p. 3-9.
- von ARNOLD, S., EGERTSDOTTER, U., EKBERG, I., GUPTA, P., MO, H., NØRGAARD, J. **Somatic Embryogenesis in Norway spruce (*Picea abies*)**, in S. JAIN, P. GUPTA e R. NEWTON, (eds.), *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, v. 3, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1995. p. 17-36.
- VUJICIC, R., BUDIMIR, S. **Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Picea omorika***, in S. JAIN, P. GUPTA e R. NEWTON, (eds.), *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, v. 3, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1995. p. 81-97.

Capítulo 2

Maturação de linhagens celulares embriogênicas de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze.

INTRODUÇÃO

Nas sementes, o desenvolvimento e a maturação dos embriões zigóticos encontram-se associados à processos fisiológicos distintos entre os quais a acumulação de substâncias de reserva, a dessecação do tecido embriogênico, a interrupção da atividade metabólica (Klimaszewska & Smith, 1997) e o aumento nos níveis de ABA (Dodeman *et al.*, 1997). A maturação de embriões somáticos *in vitro* é dependente da redução no crescimento das culturas embriogênicas e do acúmulo de proteínas, carboidratos e lipídios (Tautorus *et al.*, 1991).

Embriões somáticos imaturos de coníferas podem ser induzidos à maturação pela presença do ABA e de um agente osmótico de alto peso molecular no meio de cultura (Fowke *et al.*, 1995). O ABA inibe a clivagem poliembrionária, permitindo então a individualização do embrião e o posterior desenvolvimento e maturação (Gupta *et al.*, 1993). Além disso, são associados à presença deste fitorregulador a ativação de genes responsáveis pela síntese e armazenamento de proteínas de reserva (Dunstan *et al.*, 1998), o controle da expansão celular (Gutmann *et al.*, 1996) e a biossíntese de triacilgliceróis (Attree *et al.*, 1992).

A eficiência do tratamento com ABA pode ser melhorada pelo aumento na osmolaridade do meio de cultura pela adição de um açúcar-alcool, ou de polímeros neutros como o polietilenoglicol (Bonga *et al.*, 1995). A presença de um agente osmótico permite o estabelecimento de um ambiente com aumento de osmolaridade, de forma similar aqueles observados durante os estádios iniciais de desenvolvimento do embrião zigótico. Além disso, ABA e o estresse hídrico estão envolvidos reciprocamente na acumulação de substâncias de reserva em embriões somáticos de coníferas (Attree & Fowke, 1993).

Durante a maturação de embriões somáticos de coníferas, são encontrados quatro estádios distintos de desenvolvimento: Estádio 1: o embrião somático apresenta as células de suspensor translúcidas, distintas das células do ápice embrionário, que apresentam aspecto de plano a globular. Estádio 2: é caracterizado pelo suspensor, elevando um ápice embrionário denso, proeminente, com coloração de creme a amarela. Estádio 3: o embrião somático possui pequenos cotilédones emergentes. Estádio 4: plântula verde com cotilédones alongados, com hipocótilo e radícula desenvolvidos (Tautorus *et al.*, 1991).

Linhagens celulares embriogênicas de *A. angustifolia* cultivadas em meio de manutenção apresentam embriões somáticos em estágio inicial de desenvolvimento. Entretanto estas culturas não respondem ao estímulo fornecido pelo ABA (Guerra *et al.*, 2000). Assim, no presente trabalho, testou-se diferentes fontes e níveis de fitorreguladores

(BAP e Kin), agentes osmóticos (PEG 3350, PEG 8000, soro albumina bovina e inositol) e de carboidratos e derivados (maltose e inositol) na fase de maturação das linhagens celulares embriogênicas, visando a progressão do desenvolvimento dos pró-embriões a um estágio em que os mesmos possam responder aos tratamentos com ABA.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Linhagens celulares embriogênicas de *A. angustifolia*, denominadas BM₂211, BM₂212 e BM₀202, iniciadas a partir de embriões zigóticos imaturos de sementes coletadas em uma população natural localizada no município de Lages (SC). As culturas foram induzidas a partir de sementes provenientes da mesma data de coleta (17/12/98) e vem sendo mantidas em meio semi-sólido e líquido no escuro a $25 \pm 2^\circ \text{C}$, com ciclos de repicagem a cada 20 dias. Entretanto, tanto a fase de indução como a de manutenção destas linhagens celulares embriogênicas ocorreram em meios de cultura diferentes com relação a suplementação de fitorreguladores. A linhagem BM₀202 foi induzida e mantida em meio de cultura BM₀, composto pela formulação salina de Gupta & Pullman (1991) suplementada com sacarose $30,0 \text{ g.L}^{-1}$, ácido nicotínico $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$, piridoxina-HCl $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$, tiamina-HCl $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$, glicina $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$, L-glutamina $1000,0 \text{ mg.L}^{-1}$, caseína hidrolisada $500,0 \text{ mg.L}^{-1}$, mio-inositol 1000 mg.L^{-1} e agar $6,5 \text{ g.L}^{-1}$. As linhagens celulares embriogênicas BM₂212 e BM₂211 foram induzidas em meio de cultura BM₅, composto pelo meio BM₀ suplementado com 2,4-D ($5 \mu\text{M}$), BAP ($2 \mu\text{M}$) e Kin ($2 \mu\text{M}$), sendo na fase de manutenção subcultivadas em meio BM₂ composto pelo meio BM₀ suplementado com 2,4-D ($2 \mu\text{M}$) BAP ($1 \mu\text{M}$) e Kin ($1 \mu\text{M}$).

Meio de cultura

Foi utilizado o meio BM₀, suplementado com cada um dos componentes dos meios de maturação. O pH do meio foi ajustado com NaOH ($0,5 \text{ N}$) e HCl ($0,5 \text{ N}$) para 5,8 antes da adição do agar. O meio de cultura foi autoclavado por 15 minutos a 121°C . Vitaminas, caseína hidrolisada (Sigma[®]), L-glutamina (Sigma[®]) e inositol (Sigma[®]) foram filtroesterelizados e adicionados ao meio resfriado (aproximadamente 50°C). Placas de petri de borossilicato foram preenchidas com 20 mL deste meio de cultura.

Tratamentos e condições de cultura

No primeiro experimento (meio de maturação 1), testou-se o uso de um pré-tratamento com inositol 0 ou 1 % (p/v) (etapa I). Posteriormente, transferiram-se as linhagens celulares embriogênicas para três diferentes concentrações de ABA (0, 30, 60 μM) (etapa II) e em seguida avaliou-se o efeito conjunto do ABA (0, 30, 60 μM) com diferentes regimes fotoperiódicos (etapa III). A etapa I durou 14 dias, e as etapas II e III tiveram duração de 20 dias cada. Em todas as etapas as linhagens celulares embriogênicas foram mantidas no escuro (exceto a etapa III) a $25 \pm 2^\circ \text{C}$.

No segundo experimento (meio de maturação 2), empregou-se o PEG 8000 nas quantidades 0, 3 e 6 % (p/v) (etapa I), e em seguida testou-se as diferentes combinações de PEG 8000 (0, 3 e 6 %) com ABA (0 ou 60 μM) (etapa II). A etapa I durou 20 dias e a etapa II teve duração de 80 dias (três subcultivos de 20 dias). Durante as duas etapas as linhagens celulares embriogênicas foram mantidas no escuro em temperatura de $25 \pm 2^\circ \text{C}$.

No terceiro experimento (meio de maturação 3), testaram-se diferentes concentrações de BSA 0,1, 0,2 e 0,3 % (p/v), juntamente com BAP (1 μM) e Kin (1 μM) (etapa I). Em seguida, mantiveram-se as linhagens celulares embriogênicas apenas com BAP (2,5 μM) e Kin (2,5 μM) (etapa II). Posteriormente, transferiu-se as linhagens celulares embriogênicas para quatro diferentes concentrações de ABA (0, 5, 10 e 15 μM) juntamente com BAP (2,5 μM) e Kin (2,5 μM) (etapa III). As duas primeiras etapas tiveram duração de 20 dias e a terceira etapa durou 40 dias (dois subcultivos de 20 dias). Em todas as etapas as linhagens celulares embriogênicas foram mantidas no escuro a $25 \pm 2^\circ \text{C}$.

No quarto experimento (meio de maturação 4), testaram-se quatro combinações de maltose e PEG 3350, 0 + 0, 3 + 3 %, 6 + 6 % e 9 + 9 % (p/v) além da presença, em todos os tratamentos, de BAP (1 μM) e Kin (1 μM). As linhagens celulares embriogênicas foram mantidas nestes tratamentos durante 80 dias (4 subcultivos de 20 dias), no escuro a $25 \pm 2^\circ \text{C}$.

Cada um dos tratamentos foi composto por três repetições. Cada repetição foi constituída de uma placa de petri contendo cada uma três colônias com 0,25 g de linhagem celular embriogênica. O ABA (Sigma[®]) utilizado nos meios de maturação 1, 2 e 3, foi dissolvido em NaOH (1 N) e diluído em água, sendo a solução resultante posteriormente filtroesterelizada e adicionada ao meio de cultura resfriado (50°C).

Ao término de cada etapa, foram feitas avaliações citoquímicas visando o acompanhamento da evolução das linhagens celulares embriogênicas nas diferentes condições

de meio testadas. Utilizaram-se três tipos de coloração: carmim acético e azul de Evans (visualização de embriões somáticos), lugol (grânulos de amido) e sudam III (lipídios).

RESULTADOS

Meio de maturação 1

Após 14 dias no meio de maturação suplementado com inositol (1 %) a morfologia das linhagens celulares embriogênicas pouco se diferenciou daquela observada no tratamento controle. A avaliação citoquímica não revelou evolução na morfologia dos pró-embriões. Durante a primeira etapa, mesmo sem haver avanço para os estádios subsequentes de desenvolvimento, grande parte dos pró-embriões observados conservaram a morfologia bipolar (Fig. 1a). Na segunda etapa, a passagem das culturas para o meio de maturação suplementado com ABA (0, 30 e 60 μM) também não permitiu a evolução dos pró-embriões para estádios mais avançados de desenvolvimento. Pelo contrário, houve a perda da morfologia bipolar dos pró-embriões, ocorrendo a transição para uma organização mais difusa tornando difícil a delimitação do ápice embrionário e do suspensor (Fig. 1b). Adicionalmente, nos tratamentos suplementados com ABA, foi acentuada a presença de agregados celulares formados por células isodiamétricas, sem organização alguma que pudesse caracterizar um avanço na morfologia das linhagens celulares embriogênicas. Esta tendência foi acentuada na medida em que se aumentaram as concentrações de ABA no meio de cultura. Outra característica evidenciada pelo aumento na concentração do ABA no meio de cultura foi a menor proliferação das linhagens celulares embriogênicas, bem como o aumento no grau de oxidação das mesmas. Na terceira etapa, a repicagem das linhagens celulares embriogênicas para meios de cultura contendo as mesmas concentrações de ABA e associadas aos diferentes regimes fotoperiódicos também não se traduziu em uma evolução no desenvolvimento dos pró-embriões. Nestas condições, a organização dos pró-embriões foi predominantemente difusa, além de haver quase que total oxidação das culturas.

A avaliação citoquímica demonstrou acúmulo de grânulos de amido tanto nas células de suspensor como no ápice embrionário, independentemente da presença do inositol, ABA ou regime fotoperiódico. Independentemente do tratamento empregado, corpos lipídicos eram evidentes concentrados no ápice embrionário e quase ausentes nas células de suspensor. À medida em que as culturas foram passadas para os tratamentos suplementados com ABA a

presença de corpos lipídicos no ápice embrionário foi realizada em comparação ao tratamento controle.

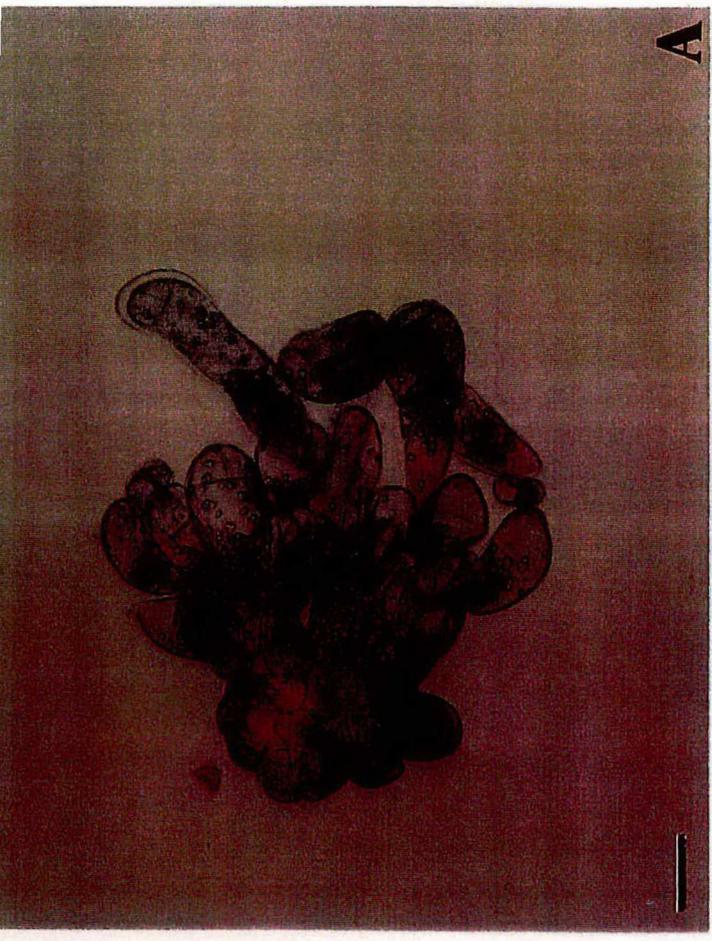
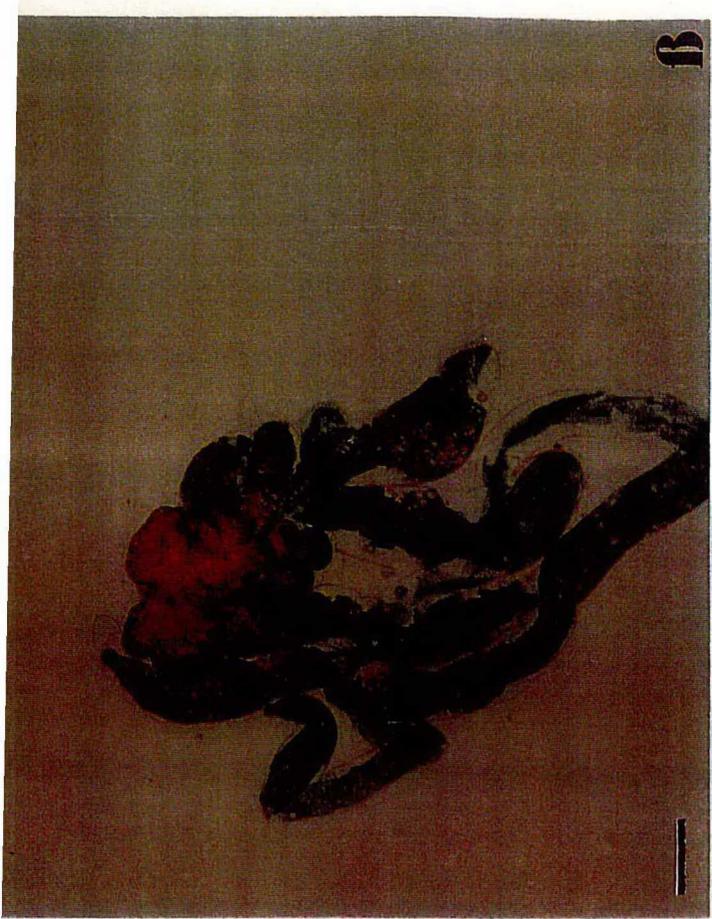
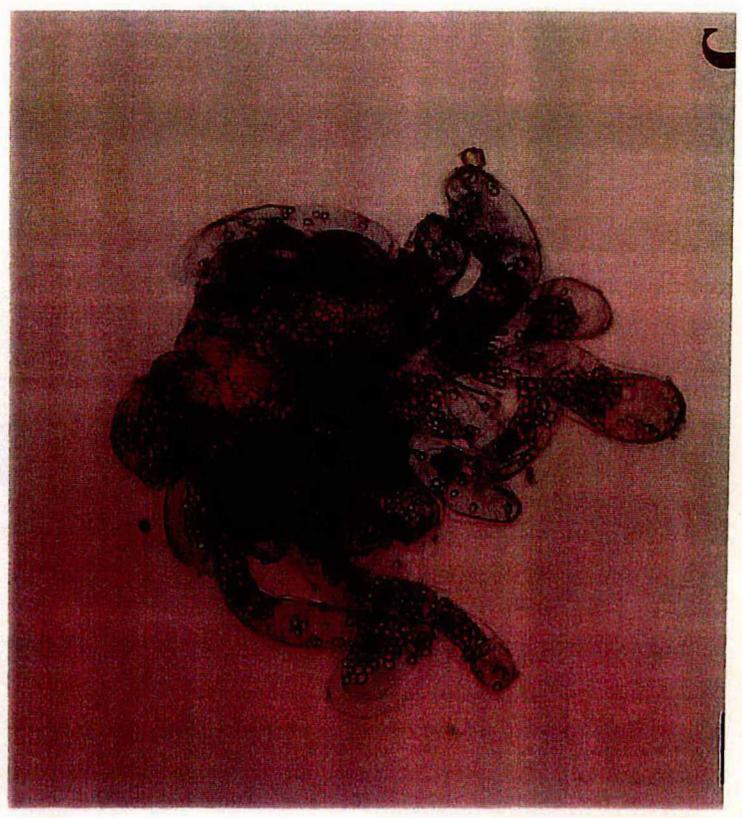
Meio de maturação 2

Após 20 dias da primeira etapa no meio de maturação suplementado com PEG 8000 (0, 3 e 6 %) não houveram avanços na morfologia, grau de organização ou individualização dos pró-embriões. Na segunda etapa, a repicagem das linhagens celulares embriogênicas para meio de cultura suplementado com as mesmas concentrações de PEG e na presença ou ausência de ABA (60 μM) resultou no estabelecimento de uma organização difusa dos pró-embriões e aumento na formação de agregados celulares (Fig. 1c). Após quatro repicagens em meio de maturação suplementado somente com PEG (6 %), observou-se a formação de projeções celulares sem contudo indicarem uma possível organização de embriões somáticos. O uso associado de PEG e ABA atenuou o grau de oxidação das linhagens celulares embriogênicas quando comparada às culturas mantidas apenas na presença do ABA (60 μM). Ao término do experimento só foi possível a identificação de pró-embriões bipolares no tratamento isento de PEG e ABA. Estes pró-embriões, contudo, não evoluíram para estádios posteriores de desenvolvimento.

Houve acúmulo de grânulos de amido tanto na região do ápice embrionário quanto na região do suspensor, principalmente para os tratamentos mantidos com PEG e PEG + ABA. Corpos lipídicos ocorreram principalmente concentrados na região do ápice embrionário ao término da primeira etapa. Após as repicagens para o meio de cultura suplementado com PEG e PEG + ABA foi possível a identificação de corpos lipídicos na região do suspensor. No tratamento controle foi possível identificar a presença de poucos corpos lipídicos na porção embriogênica.

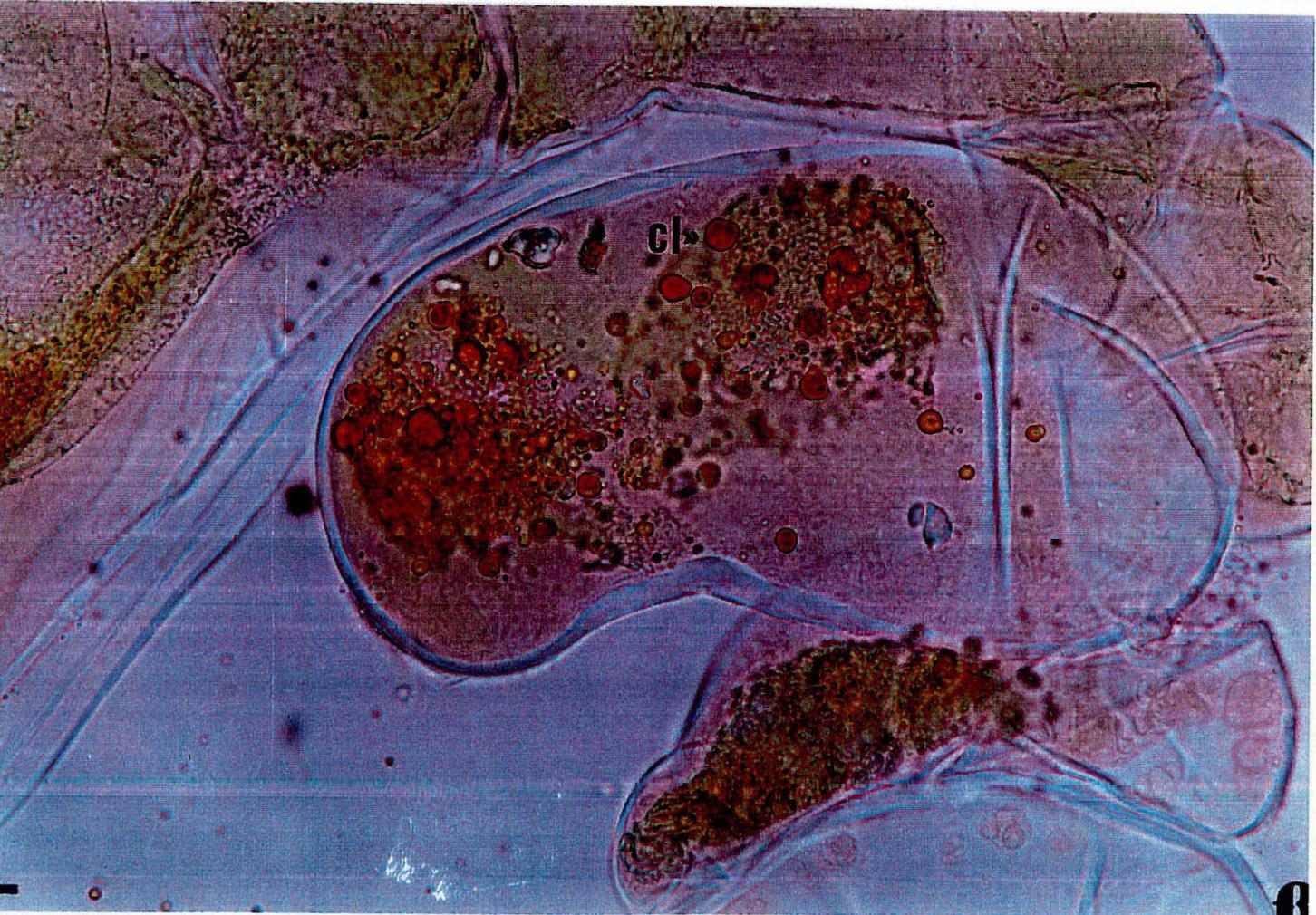
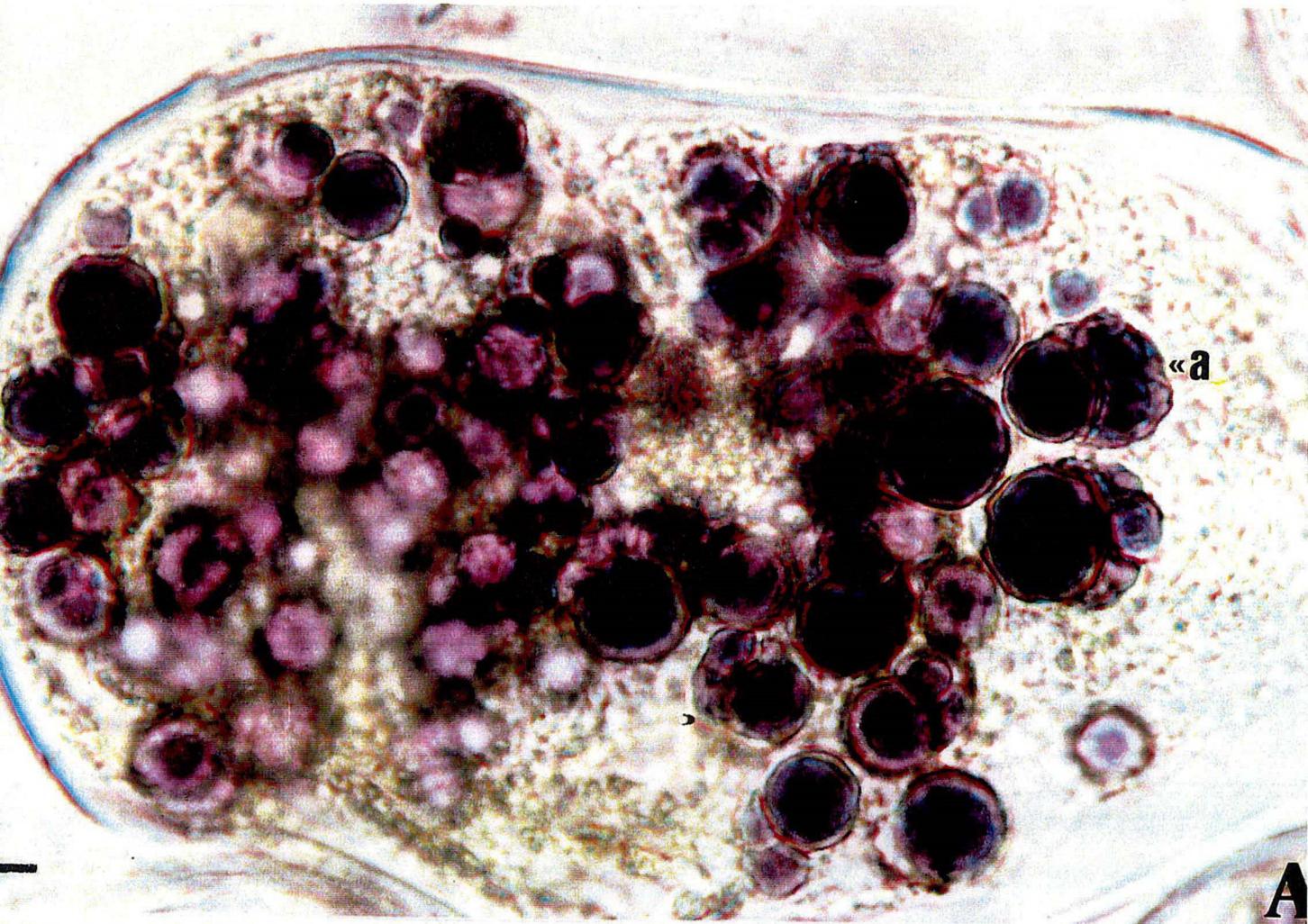
Meio de maturação 3

Na primeira etapa, a suplementação do meio de cultura com diferentes concentrações de BSA (0,1, 0,2 e 0,3 %), associado à presença de BAP (1 μM) e Kin (1 μM) proporcionou uma evolução na organização do pró-embrião, tanto na região do ápice embrionário quanto na região do suspensor, além da manutenção da morfologia bipolar (Fig. 1d). Entretanto, estes tratamentos não promoveram a individualização dos pró-embriões, sendo que estes, quando identificados, apareceram coalescidos na região do ápice embrionário. Na segunda e terceira



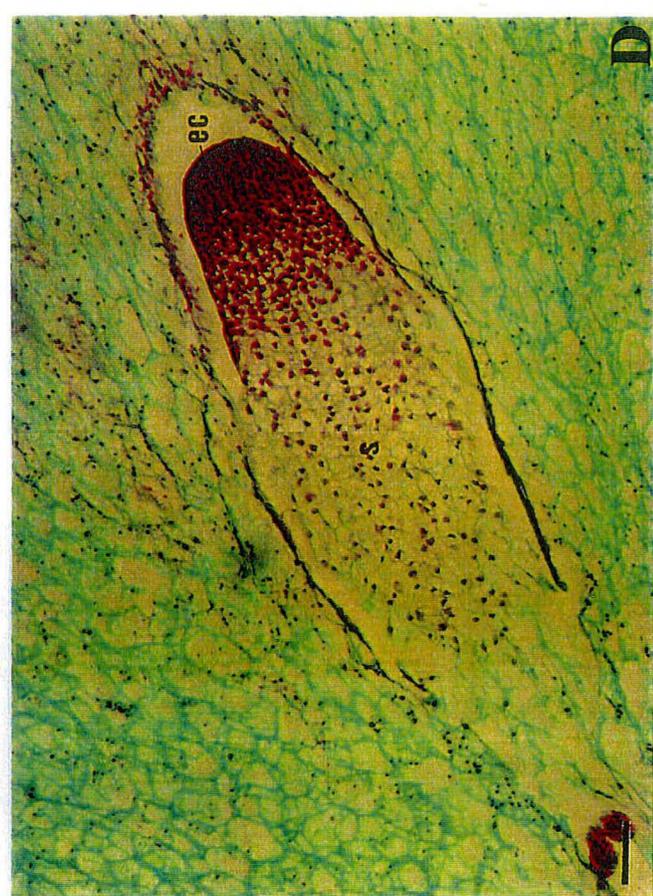
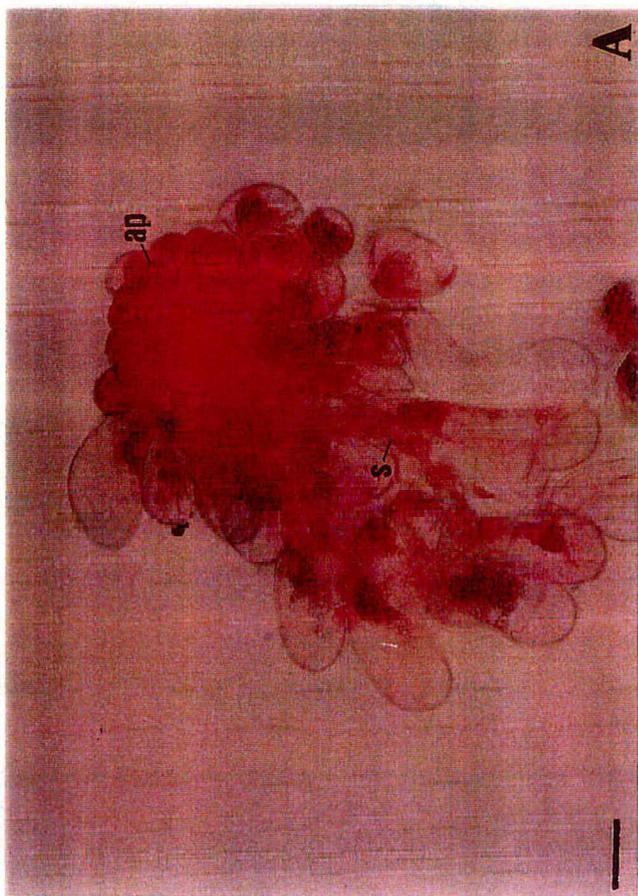
etapa, os meios de cultura suplementados com BAP (2,5 μ M) e Kin (2,5 μ M) e posteriormente suplementados com ABA (5, 10 e 15 μ M), também não foram efetivos na melhor organização dos embriões somáticos. O uso do ABA mesmo em baixas concentrações promoveu a formação de pró-embriões com morfologia difusa, resultando na perda do desenvolvimento obtido nas etapas anteriores. Entretanto, quando comparado aos meios de maturação 1 e 2 nos quais foram utilizadas concentrações maiores de ABA, o grau de oxidação das linhagens celulares embriogênicas diminuiu.

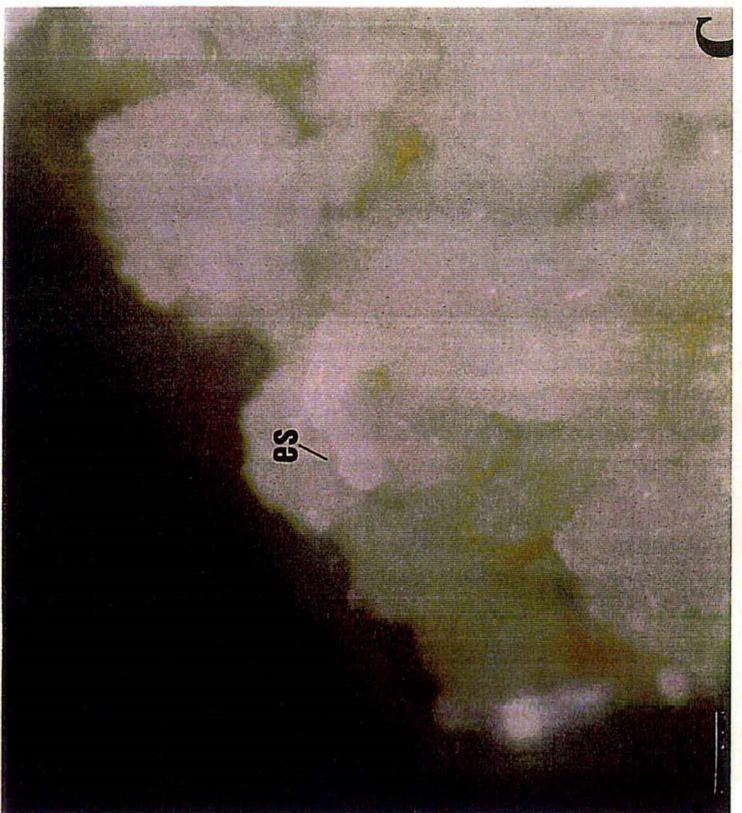
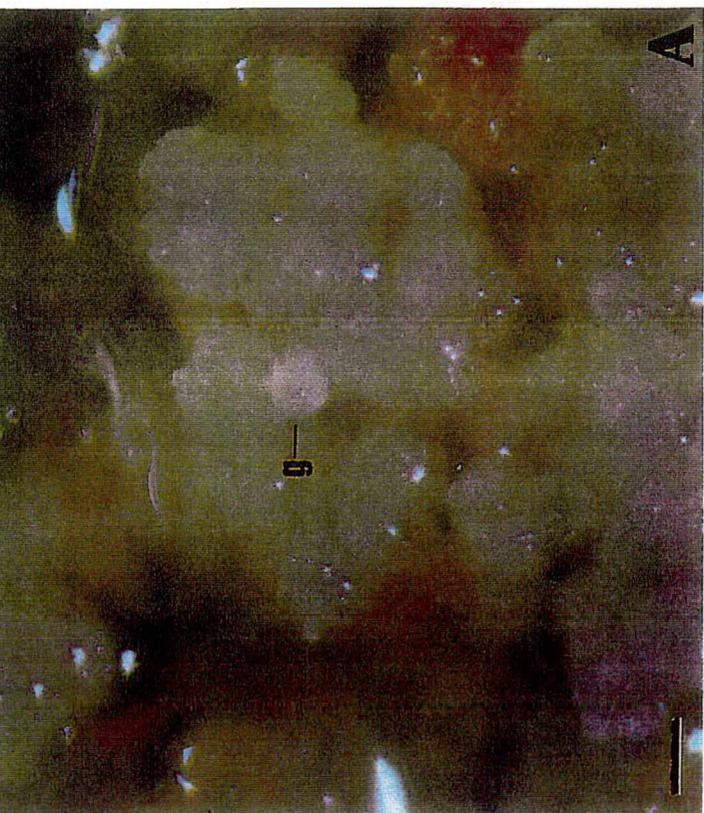
Em todas as etapas, grânulos de amido (Fig. 2a) foram evidenciados tanto nas células de suspensor quanto nas células do ápice embrionário. Corpos lipídicos (Fig. 2b), predominantemente concentrados no ápice embrionário, foram mais evidentes nos tratamentos suplementados com ABA.



Meio de maturação 4

A suplementação do meio de cultura com PEG 3350 (6 e 9%) e maltose (6 e 9%) permitiu uma melhor organização, desenvolvimento e individualização dos embriões somáticos. No tratamento com PEG (6%) e maltose (6%) os pró-embriões evoluíram de um estágio inicial de desenvolvimento, caracterizado por um ápice embrionário contendo poucas células isodiamétricas e por um conjunto de células curtas de suspensor (Fig. 3a), para embriões somáticos possuindo um ápice embrionário organizado e formado por células isodiamétricas conectadas a um sistema-suspensor com células mais alongadas (Fig. 3b e 3c), resultando em uma morfologia semelhante à do embrião zigótico pré-cotiledonar (Fig. 3d). Neste tratamento, foi possível a identificação de embriões somáticos na superfície das linhagens celulares embriogênicas (Fig. 4b). No tratamento suplementado com PEG (9 %) maltose (9 %), na terceira repicagem, foi possível a identificação na superfície das culturas de embriões somáticos globulares (Fig. 4a). Na quarta repicagem neste mesmo tratamento ocorreu o alongamento destes embriões (Fig. 4c e 4d), caracterizando a formação de embriões somáticos no estágio 2 de desenvolvimento (estádio pré-cotiledonar). Nos tratamentos suplementados com PEG (9 %) e maltose (9%) foi evidenciado o encurtamento das células do suspensor, quando comparados aos suspensores presentes nas culturas mantidas em meio de cultura suplementado com PEG (6%) e maltose (6%). Quando comparado ao tratamento controle, o meio de cultura contendo PEG (3%) e maltose (3%), possibilitou a manutenção da morfologia bipolar e uma maior organização dos pró-embriões, sem contudo ocorrer sua individualização. Corpos lipídicos apresentavam-se concentrados principalmente no ápice embrionário, porém sua presença foi detectada também nas células do suspensor, sobretudo nos tratamentos contendo PEG e maltose. Acúmulo de grânulos de amido foi observado tanto nas células de suspensor e ápice embrionário.





DISCUSSÃO

Apesar de pouco eficiente nas condições testadas para o presente trabalho, o ABA exógeno tem se mostrado eficiente para o estímulo e desenvolvimento de embriões somáticos em várias espécies de coníferas (Dunstan & Bock, 1997). Em *Picea rubens*, o ABA (10-50 μM) permitiu o desenvolvimento de embriões somáticos bipolares (Harry & Thorpe, 1991). Em *Picea glauca*, o pré-tratamento em meio isento de 2,4-D e posterior subcultivo em meio de cultura contendo 48 μM de ABA, possibilitou a maturação dos embriões (Dunstan & Bethune, 1996). Em *Picea mariana* e *Picea glauca*, a permanência das culturas embriogênicas durante 28 dias em meio suplementado com ABA (8-16 μM) resultou nas melhores respostas (Attree & Fowke, 1990). Já para *Picea abies*, a maturação foi obtida quando o meio de cultura foi suplementado com ABA (1 μM) e IBA (1 μM) (Becwar *et al.*, 1989). Em *Abies fraseri*, embriões somáticos cotiledonares foram obtidos em meio de cultura suplementado com de ABA (5 a 80 μM) (Guevin & Kirby, 1997). Em *Larix x leptoeuropaea*, os embriões somáticos maturaram após quatro semanas em meio de cultura suplementado com ABA (60 μM) (Gutmann *et al.*, 1996).

Mesmo considerando-se a eficiência deste fitorregulador em promover a maturação de embriões somáticos de coníferas, as concentrações empregadas variam consideravelmente, mesmo em espécies de um mesmo gênero. Assim, em *Larix* os níveis empregados variaram de 0,025 μM até 60 μM (Bonga *et al.*, 1995). Mesmo entre diferentes linhagens celulares de uma mesma espécie como em *Larix leptolepis*, os níveis de ABA suplementados aos meios de cultura variaram de 0,1 μM até 50 μM (Ogita *et al.*, 1999).

Um fator crítico para a maturação de embriões somáticos parece ser a seleção de tecidos embriogênicos em um estágio de desenvolvimento que seja responsivo ao tratamento com ABA (Newton *et al.*, 1995). Em *Pinus pinaster*, a dificuldade na regeneração de plantas a partir do tecido embriogênico pode ser explicada pelo nível de organização dos embriões somáticos em diferentes linhagens celulares (Bercetche & Pâques, 1995). Nesta mesma espécie, o desenvolvimento de embriões somáticos em estágio avançado de desenvolvimento só foi possível em linhagens celulares contendo embriões somáticos com um ápice embrionário conspicuo conectado aos suspensores. Em *Pinus caribaea*, o requerimento de ABA foi dependente das linhagens celulares: algumas necessitaram somente de ABA para a maturação dos embriões (diferenciação do hipocótilo e cotilédones), enquanto outras foram dependentes deste fitorregulador para ativar o estágio 2 de desenvolvimento (David *et al.*, 1995). Para *Picea abies*, embriões somáticos polarizados com ápice embrionário

conectado a um sistema susensor bem desenvolvido (tipo A, polar) e embriões somáticos com simetria radial (tipo A, solar), atingiram o estágio 3 de desenvolvimento em resposta ao ABA suplementado ao meio de cultura (Jalonon & von Arnold, 1991). Para as linhagens menos desenvolvidas (tipo B, não desenvolvido), estes autores sugeriram um possível bloqueio no desenvolvimento dos embriões somáticos e a não ocorrência do estágio necessário para responder ao tratamento com ABA. Este bloqueio poderia indicar que as células na região embriogênica separam-se uma das outras durante o desenvolvimento inicial ao invés de se desenvolverem em ápices embrionários (von Arnold *et al.*, 1996).

No presente trabalho, a combinação de ABA (60 μM) com PEG 8000 (3 e 6 %) não permitiu a evolução das linhagens celulares embriogênicas. Apesar disso, Silveira e Guerra (1998) obtiveram embriões somáticos de *A. angustifolia* nos estádios 1 e 2 de desenvolvimento em meios de cultura suplementados com ABA (50 μM) e PEG 4000 (1%) após 90 dias em cultura. O emprego do ABA, associado à inclusão de um agente osmótico como o PEG, aumenta expressivamente a frequência de embriões maduros (Fowke & Attree, 1996). Adicionalmente, o aumento da osmolaridade do meio pela inclusão de um agente osmótico pode levar ao desenvolvimento do ápice embrionário (Gupta *et al.*, 1993). Em *Picea abies*, a inclusão de PEG 4000 (5%) aumentou em 50% o número de embriões somáticos maduros, sendo que a concentração de ABA pouco influenciou nos resultados já que não foram detectadas diferenças entre os tratamentos com 15 μM de ABA + PEG e 40 μM de ABA + PEG (Find, 1997). Nesta mesma espécie, a adição de PEG 4000 (3,75 %) ao meio contendo ABA (20 μM), acelerou o processo de maturação em duas semanas, além de causar mudanças nas características morfogenéticas do embrião, como um aumento de até 40% no ápice embrionário (Svobodová *et al.*, 1999).

O meio de cultura de tecidos e células vegetais contém carboidratos, geralmente supridos como sacarose ou glucose, os quais atuam como agentes osmóticos e fontes de carbono e energia (Tremblay & Tremblay, 1991), além de influenciarem a morfologia das culturas (Norgaard & Krogstrup, 1995). A embriogênese somática *in vitro* ocorre em dois estádios distintos: iniciação de células poliembriogênicas e desenvolvimento do embrião, o que pode resultar em diferentes requerimentos de carboidratos, dependendo do estágio de desenvolvimento da cultura (Thompson & Thorpe, 1987).

No presente trabalho, o inositol pouco influenciou o desenvolvimento das culturas. Por outro lado, a maltose associada ao PEG 3350, promoveu a formação de embriões somáticos nos estádios 1 e 2 de desenvolvimento. Diferentes fontes de carboidratos já foram avaliadas para a maturação de linhagens celulares embriogênicas de *A. angustifolia*. Assim, nesta

espécie, tratamentos de maturação com sacarose e frutose resultaram no crescimento das culturas mas não promoveram a formação de embriões somáticos. Já o uso de glicose, manitol, sorbitol e inositol em concentrações isomolares (90 mM) resultaram na necrose e morte das colônias após duas semanas de cultivo (Astarita & Guerra, 1998). Em *Abies alba*, lactose e amido solúvel aumentaram o número de embriões somáticos no estágio 1 de desenvolvimento (Schuller & Reuther, 1993). O uso da maltose, em substituição à sacarose tem demonstrado melhores respostas durante a indução de culturas embriogênicas e no desenvolvimento de embriões cotiledonares (Gupta *et al.*, 1997). Em *Pinus taeda* o ABA (151 μ M) combinado com PEG 3350 (7,5 %) e KCL (10 mM) resultou no maior número de embriões maduros nas diferentes linhagens testadas (Li *et al.*, 1997). Posteriormente, meios de cultura suplementados com maltose (4 %) e PEG 3350 (6 %) associados aos mesmos níveis de ABA promoveram um aumento na frequência de embriões somáticos cotiledonares em *Pinus taeda* (Li *et al.*, 1998). Para *Abies alba*, o estágio 3 de desenvolvimento foi obtido combinando-se ABA (20 μ M) com maltose (111 mM) (Hristoforoglu *et al.*, 1995).

Embora amplamente utilizada na embriogênese de gimnospermas, o ABA isolado ou associado a um agente osmótico, pode não ser efetivo ou mesmo necessário para a maturação de embriões somáticos de algumas espécies. Em *Pinus sylvestris*, embriões somáticos maturaram espontaneamente quando iniciados e mantidos sob o mesmo meio isento de fitorreguladores (Lelu *et al.*, 1999). Em *Cupressus sempervirens*, somente a adição de BSA (1 g.L⁻¹) ao meio de cultura permitiu o desenvolvimento e a maturação dos embriões somáticos (Sallandrouze *et al.*, 1999). O desenvolvimento e a maturação de embriões somáticos de *Ceratozamia euryphyllidia*, só foi possível após o cultivo em meio de cultura isento de fitorreguladores (Chavez *et al.*, 1998). Em *A. angustifolia*, somente a suplementação com BSA permitiu maior grau de organização das linhagens celulares embriogênicas.

O comportamento apresentado durante a maturação de embriões somáticos em diferentes espécies pode estar associado às características presentes na embriogênia ou tipo de semente da espécie. Neste sentido, o modelo de desenvolvimento apresentado pela planta pode influenciar na presença ou ausência dos componentes necessários ao desenvolvimento do embrião. Em *Picea glauca*, espécie cuja maturação dos embriões somáticos é dependente da presença de ABA no meio de cultura, os pró-embriões zigóticos apresentaram a maior concentração de ABA aos 38 dias após a polinização e este valor coincidiu com a redução dos níveis de ABA no megagametófito e precedeu a síntese de substâncias de reserva (Carrier *et al.*, 1999).

Em embriões zigóticos de *Pseudotsuga menziesii* a clivagem poliembrionária não tem sido observada. A hipótese é a de que a semente conteria altas quantidades de ABA impedindo a ocorrência da clivagem (Gupta *et al.*, 1995). Se em *Pseudotsuga* este fato realmente ocorre, os efeitos do ABA na restrição da clivagem nos estádios iniciais do desenvolvimento dos embriões zigóticos, devem ocorrer nos estádios que antecedem a chegada do embrião dominante à cavidade de corrosão. Em *Araucariaceae*, somente a poliembrionia simples tem sido observada (Haines & Prakash, 1980) e a ausência de clivagem poderia estar relacionada à presença, na região do ápice embrionário, da camada de células da capa, as quais circundam as células do ápice embrionário, dificultando a ocorrência da clivagem. A camada de células da capa encontrada em *Araucariaceae*, é uma característica de especialização envolvida de alguma forma na evolução desta família (Buchholz, 1920). É provável que o pró-embrião zigótico em *Araucariaceae* tenha divergido durante o estágio inicial de evolução do padrão pró-embriônico das outras coníferas, sofrendo uma considerável especialização em uma direção não relacionada às tendências evolucionárias reconhecíveis entre as outras coníferas (Haines & Prakash, 1980). Assim, os resultados obtidos no presente trabalho, sugerem que em *Araucariaceae*, esta característica histológica poderia impedir a ocorrência da clivagem. Como decorrência, as culturas embriogênicas de *A. angustifolia* não responderiam aos tratamentos com ABA, como demonstrado no presente trabalho, bem como naqueles de Astarita e Guerra (1998) e Silveira e Guerra (1998).

Além do embrião zigótico possuir características morfológicas que o distinguem das demais coníferas, as sementes de *A. angustifolia* são do tipo recalcitrante (Farrant *et al.*, 1989). A maioria das sementes de angiospermas e coníferas são do tipo ortodoxo (Attree & Fowke, 1993). Este fato pode trazer uma nova abordagem para a maturação de embriões somáticos nesta espécie e sugere que as condições descritas para a embriogênese somática de coníferas do hemisfério norte (tipo ortodoxo) podem não se ajustar aquelas necessárias para a embriogênese somática de *A. angustifolia*. Em coníferas com semente recalcitrante como por exemplo *Podocarpus henkelii*, os embriões zigóticos continuam a acumular metabólitos e proteínas de reserva mesmo após as sementes terem atingido a maturidade (Dodd *et al.*, 1989). Segundo os autores, este comportamento estaria associado como parte da estratégia de desenvolvimento de sementes recalcitrantes, correspondendo a manutenção da plena atividade metabólica para o contínuo crescimento na ausência da interrupção do desenvolvimento, o qual ocorre após perda de água em sementes ortodoxas. Em cicadáceas, as sementes são recalcitrantes e em função desta característica parecem não responder aos tratamentos com ABA ou agentes osmóticos, os quais tem sido efetivos na interrupção da proliferação dos pró-

embriões somáticos de coníferas e no estímulo para a maturação dos embriões somáticos (Litz *et al.*, 1995).

Por outro lado, Farrant *et al.*, (1996) trabalhando com eixos embrionários de sementes de espécies recalcitrantes de clima tropical e temperado, incluindo *A. angustifolia*, demonstrou haver uma relação entre a presença de uma classe especial de proteínas semelhantes a deidrina e altos níveis de ABA nas sementes. Estas proteínas podem proporcionar proteção contra baixas temperaturas e perda de água em condições nas quais as sementes de espécies de clima temperado podem ser naturalmente expostas tendo sido detectadas em tecidos do eixo embrionário de *A. angustifolia* (Farrant *et al.*, 1996).

O padrão de desenvolvimento do embrião zigótico em *A. angustifolia* pode em parte explicar alguns dos resultados obtidos no presente trabalho. Porém, além disto, a ineficiência dos tratamentos com ABA poderia também estar relacionada a não presença de pró-embriões somáticos fisiologicamente receptivos à ação deste regulador. Neste caso, a suplementação do meio de cultura com um agente osmótico associado a fonte de carboidrato apropriada poderia permitir a progressão à estádios em que o ABA possa ser efetivo, possibilitando então a maturação dos embriões.

CONCLUSÕES

- A) A adição do PEG 3350 (6 e 9 %) e da maltose (6 e 9 %) ao meio de cultura BM (Gupta & Pullman, 1991) suplementado com BAP (1 μM) e Kin (1 μM) proporcionou a individualização e o desenvolvimento de embriões somáticos nos estádios 1 e 2 de desenvolvimento (pré-cotiledonar);
- B) O ABA (0, 5, 10, 15, 30 e 60 μM), adicionados ao meio de cultura BM não permitiu uma melhor histogênese dos pró-embriões somáticos e, na maioria dos casos, provocou a oxidação das linhagens celulares embriogênicas;
- C) A suplementação com BSA (0,1, 0,2 e 0,3 %) ao meio de cultura BM contendo BAP (1 μM) e Kin (1 μM) permitiu uma melhor organização e histogênese dos pró-embriões somáticos;
- D) O emprego do inositol (1 %) e PEG 8000 (3 e 6 %), como osmorreguladores não promoveram uma melhor organização dos pró-embriões somáticos.

REFERÊNCIAS

- ASTARITA, L.V., GUERRA, M.P. Early somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* – induction and maintenance of embryonal-suspensor mass cultures, **Brazilian Journal of Plant Physiology** 10, 1998. p. 113-118.
- ATTREE, S.M., FOWKE, L.C. Somatic embryo maturation, germination, and soil establishment of plants of black and white spruce (*Picea mariana* and *Picea glauca*), **Can. J. Bot** 68, 1990. p. 2583-2589.
- ATTREE, S.M., POMEROY, M.K., FOWKE, L.C. Manipulation of conditions for the culture of somatic embryos of white spruce for improved triacylglycerol biosynthesis and desiccation tolerance, **Planta** 187, 1992. p. 395-404.
- ATTREE, S.M., FOWKE, L.C. Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 35, 1993. p. 1-35.
- BECWAR, M.R., NOLAND, T.L., WYCKOFF, J.L. Maturation, germination, and conversion of norway spruce (*Picea abies* L.) somatic embryos to plants, **In Vitro Cellular & Developmental Biology** 25, 1989. p. 575-580.
- BERCETCHE, J., PÂQUES, M. Somatic embryogenesis in maritime pine (*Pinus pinaster*), in S. JAIN, P. GUPTA e R. NEWTON (eds.), Somatic Embryogenesis in Woody Plants, v. 3, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1995. p. 221-242.
- BONGA, J.M., KLIMASZEWSKA, K., LELU, M.A., von ADERKAS, P. Somatic embryogenesis in *Larix*, in S. JAIN, P. GUPTA e R. NEWTON (eds.), Somatic Embryogenesis in Woody Plants, v. 3, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1995. p. 315-340.
- BUCHHOLZ, J.T. Embryo development and polyembryony in relation to the phylogeny of conifers, **American Journal of Botany** 7, 1920. p. 125-145.
- CARRIER, D.J., KENDALL, E.J., BOCK, C.A., CUNNINGHAM, J.E., DUNSTAN, D.I. Water content, lipid deposition, and (+)-abscisic acid content in developing white spruce seeds, **Journal of Experimental Botany** 50, 1999. p. 1359-1364.
- CHAVEZ, V.M., LITZ, R.E., MONROY, M., MOON, P.A., VOVIDES, A.M. Regeneration of *Ceratozamia euryphyllidia* (Cycadales, Gymnospermae) plants from embryogenic leaf cultures derived from mature-phase trees, **Plant Cell Reports** 17, 1998. p. 612-616.
- DAVID, A., LAINE, E., DAVID, H. Somatic embryogenesis in *Pinus caribaea*, in S. JAIN, P. GUPTA e R. NEWTON (eds.), Somatic Embryogenesis in Woody Plants, v. 3, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1995. p. 145-181.
- DODD, M.C., Van STADEN, J., SMITH, M. Seed development in *Podocarpus henkelii*: an ultrastructural and biochemical study, **Annals of Botany** 64, 1989. p. 297-310.
- DODEMAN, V.L., DUCREUX, G., KREIS, M. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis, **Journal of Experimental Botany** 48, 1997. p. 1493-1509.
- DUNSTAN, D.I., BETHUNE, T.D. Variability in maturation and germination from white spruce somatic embryos, as affected by age and use of solid or liquid culture, **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant** 32, 1996. p. 165-170.
- DUNSTAN, D.I., BOCK, C.A. Abscisic acid [(+)-ABA] content in white spruce somatic embryo tissues related to concentration of fed ABA, **J. Plant Physiol.** 150, 1997. p. 691-696.
- DUNSTAN, D.I., DONG, J.Z., CARRIER, D.J., ABRAMS, S.R. Events following ABA treatment of spruce somatic embryos, **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant** 34, 1998. p. 159-168.

- FARRANT, J.M., PAMMENTER, N.W., BERJAK, P. Germination associated events and the desiccation sensitivity of recalcitrant seeds: a study on three unrelated species, *Planta* 178, 1989. p. 189-198.
- FARRANT, J.M., PAMMENTER, N.W., BERJAK, P., FARNSWORTH, E.J., VERTUCCI, C.W. Presence of dehydrin-like proteins and levels of abscisic acid in recalcitrant (desiccation sensitive) seeds may be related to habitat, *Seed Science Research* 6, 1996. p. 175-182.
- FIND, J.I. Changes in endogenous ABA levels in developing somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) in relation to maturation medium, desiccation and germination, *Plant Science* 128, 1997. p. 75-83.
- FOWKE, L.C., ATTREE, S.M., BINAROVA, P., GALWAY, M.E., Wang, H. Conifer somatic embryogenesis for studies of plant cell biology, *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 31, 1995. p. 1-7.
- FOWKE, L., ATTREE, S. Conifer somatic embryogenesis: studies of embryo development and the cell biology of conifer cells and protoplasts, *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 2, 1996. p. 124-130.
- GUERRA, M.P., SILVEIRA, V., SANTOS, A.L.W., ASTARITA, L.V., NODARI, R.O. Somatic Embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, in S. JAIN, P. GUPTA e R. NEWTON (eds.), Somatic Embryogenesis in Woody Plants, v. 6, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2000 (in press).
- GUEVIN, T.G., KIRBY, E.G. Induction of embryogenesis in cultured mature zygotic embryos of *Abies fraseri* (Pursh) Poir, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 49, 1997. p. 219-222.
- GUPTA, P.K., PULLMAN, G.S. Method for reproducing coniferous plants by somatic embryogenesis using abscisic acid and osmotic potential variation, U.S. Patent No. 5,036,007, 1991.
- GUPTA, P.K., PULLMAN, G., TIMMIS, R., KREITINGER, M., CARLSON, W.C., GROB, J., WELTY, E. Forestry in the 21st Century, *Bio/technology* 11, 1993. p. 454-459.
- GUPTA, P.K., TIMMIS, R., TIMMIS, K.A., CARLSON, W.C., WELTY, D.E. Somatic embryogenesis in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*), in S. JAIN, P. GUPTA e R. NEWTON (eds.), Somatic Embryogenesis in Woody Plants, v. 3, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1995. p. 303-313.
- GUPTA, P.K., TIMMIS, R., LEFF, S., HOLMSTROM, D., BUDWORTH, D. Production of higher yields of good quality cotyledonary conifer embryos from large number of genotypes using maltose in maintenance medium, Joint Meeting of the IUFRO Working Parties 2.04-07 e 2.04-06 Somatic Cell Genetics and Molecular Genetics of Trees, Quebec, 1997. p. 18.
- GUTMANN, M., von ADERKAS, P., LABEL, P., LELU, M.A. Effects of abscisic acid on somatic embryo maturation of hybrid larch, *Journal of Experimental Botany* 47, 1996. p. 1905-1917.
- HAINES, R.J., PRAKASHA, N. Proembryo development and suspensor elongation in *Araucaria juss*, *Australian Journal of Botany* 28, 1980. p. 511-522.
- HARRY, I.S., THORPE, T.A. Somatic embryogenesis and plant regeneration from mature zygotic embryos of red spruce, *Bot. Gaz.* 152, 1991. p. 446-452.
- HRISTOFOROGLU, K., SCHMIDT, J., NORDENKAMPF, H.B. Development and germination of *Abies alba* somatic embryos, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 40, 1995. p. 277-284.
- JALONEN, P., von ARNOLD, S. Characterization of embryogenic cell lines of *Picea abies* in relation to their competence for maturation, *Plant Cell Report* 10, 1991. p. 384-387.

- KLIMASZEWSKA, K., SMITH, D.R. Maturation of somatic embryos of *Pinus strobus* is promoted by a high concentration of gellan gum, **Physiologia Plantarum** 100, 1997. p. 949-957.
- LELU, M.A., BASTIEN, C., DRUGEAULT, A., GOUEZ, M.L., KLIMASZEWSKA, K. Somatic embryogenesis and plantlet development in *Pinus sylvestris* and *Pinus pinaster* on medium with and without growth regulators, **Physiologia Plantarum** 105, 1999. p. 719-728.
- LI, X.Y., HUANG, F.H., GBUR, E.E. Polyethylene glycol-promoted development of somatic embryos in loblolly pine (*Pinus taeda* L.), **In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant** 33, 1997. p. 184-189.
- Li, X.Y., HUANG, F.H., MURPHY, J.B., GBUR, E.E. Polyethylene glycol and maltose enhance somatic embryo maturation in loblolly pine (*Pinus taeda* L.), **In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant** 34, 1998. p. 22-26.
- LITZ, R.E., CHAVES, V.M., MOON, P.A. Somatic embryogenesis in the Cycadales, in S. JAIN, P. GUPTA e R. NEWTON (eds.), Somatic Embryogenesis in Woody Plants, v. 3, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1995. p. 1-15.
- NEWTON, R.J., MAREK-SWIZE, K.A., MAGALLANES-CEDENO, M.E., DONG, N., SEN, S., JAIN, S.M. Somatic embryogenesis in Slash pine (*Pinus elliottii* Engelm.), in S. JAIN, P. GUPTA e R. NEWTON (eds.), Somatic Embryogenesis in Woody Plants, v. 3, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1995. p. 183-195.
- NORGAARD, J.V., KROGSTRUP, P. Somatic embryogenesis in *Abies* spp., in S. JAIN, P. GUPTA e R. NEWTON (eds.), Somatic Embryogenesis in Woody Plants, v. 3, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1995. p. 341-355.
- OGITA, S., ISHIKAWA, H., KUBO, T. Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos of *Cryptomeria japonica* I: Embryogenic cell induction and its morphological characteristics, **J. Wood Sci** 45, 1999. p. 87-91.
- SALLANDROUZE, A., FAUROBERT, M., MAATAOUI, M.E., ESPAGNAC, H. Two-dimensional electrophoretic analysis of proteins associated with somatic embryogenesis development in *Cupressus sempervirens* L., **Electrophoresis** 20, 1999. p. 1109-1119.
- SCHULLER, A., REUTHER, G. Response of *Abies alba* embryonal-suspensor mass to various carbohydrate treatments, **Plant Cell Reports** 12, 1993. p. 199-202.
- SILVEIRA, V., GUERRA, M.P. Indução à Poliembriogênese Somática em *Araucaria angustifolia* (Bert) O Ktze., **Genetics and Molecular Biology** 21 (supplement), 1998. p. 226.
- SVOBODOVÁ, H., ALBRECHTOVÁ, J., KUMSTÝROVÁ, L., LIPA VSKÁ, H., VÁGNER, M., VONDRÁKOVA, Z. Somatic embryogenesis in Norway spruce: Anatomical study of embryo development and influence of polyethylene glycol on maturation process, **Plant Physiol. Biochem.** 37, 1999. p. 209-221
- TAUTORUS, T.E., FOWKE, L.C., DUNSTAN, D.I. Somatic embryogenesis in conifers, **Canadian Journal of Botany** 69, 1991. p. 1873-1899.
- THOMPSON, M.R., THORPE, T.A. Metabolic and non-metabolic roles of carbohydrates, in J.M. BONGA e D.J. DURZAN (eds.), Cell and Tissue Culture in Forestry, v. 1, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, 1987. p. 89-112.
- TREMBLAY, L., TREMBLAY, F. Effects of gelling agents, ammonium nitrate, and light on the development of *Picea rubens* Sarg. (Red spruce) somatic embryos, **Plant Science** 77, 1991. p. 233-242.
- von ARNOLD, S., CLAPHAM, D., EGERTSDOTTER, U., MO, L.H. Somatic embryogenesis in conifers - A case study of induction and development of somatic embryos in *Picea abies*, **Plant Growth Regulation** 20, 1996. p. 3-9.

Capítulo 3

Aspectos bioquímicos e parâmetros de crescimento celular em linhagens celulares embriogênicas de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze.

INTRODUÇÃO

Suspensões celulares normalmente exibem um padrão de crescimento celular descrito por uma curva sigmóide (Krogstrup, 1990), apresentando uma fase de desenvolvimento inicial, seguida por uma fase exponencial linear, e estacionária de crescimento. A fase inicial de desenvolvimento é caracterizada por um período de adaptação, durante o qual as células assimilam nutrientes disponíveis no meio de cultura, utilizando-os para sustentar uma intensa atividade de biossíntese celular. Esta atividade declina com o início da próxima fase, ou seja a fase exponencial, a qual é caracterizada por um período de intensa divisão celular. Na fase linear, a taxa de crescimento celular declina uniformemente com o tempo, até alcançar a fase estacionária onde já ocorreu o aumento máximo no número de células (Grey *et al.*, 1987; George, 1993).

O estabelecimento de ciclos repetitivos de divisão celular e o controle restrito dos processos de diferenciação celular pode ser considerado o ponto de partida para o estabelecimento e manutenção de linhagens celulares embriogênicas (Guerra *et al.*, 1999). Suspensões celulares mantidas em biorreatores, agitadores rotatórios ou agitadores convencionais tem sido rotineiramente empregadas para a multiplicação e manutenção de culturas embriogênicas de coníferas (Tautorus *et al.*, 1991). Além disso, o uso de suspensões celulares proporciona um sistema experimental adequado para estudos sobre a nutrição e dinâmica de crescimento das culturas embriogênicas (Lulsdorf *et al.*, 1992), permite elucidar aspectos básicos da biologia celular de coníferas (Fowke *et al.*, 1997), a produção de metabólitos de interesse como por exemplo alcalóides (Schripsema & Verpoorte, 1992) e é fonte de células para programas de transformação genética (Wenck *et al.*, 1999).

Suspensões celulares são consideradas a forma mais apropriada para o cultivo massal de células vegetais (Wickremesinhe & Arteca, 1994), permitindo a redução dos custos da propagação clonal (Vasil, 1994). Com o propósito de aumentar o potencial da embriogênese somática como sistema de propagação vegetativa e tornar economicamente viável a produção de embriões somáticos destinados à formação de plantios florestais clonais, é necessário o desenvolvimento de condições de cultura apropriadas para manutenção e multiplicação de culturas embriogênicas em suspensões celulares (Lulsdorf *et al.*, 1992). Neste sentido, estudos que contemplem a avaliação das culturas embriogênicas em suspensão, juntamente com estudos nutricionais e bioquímicos permitirão a obtenção de parâmetros para a elaboração e emprego de biorreatores, possibilitando o uso da embriogênese somática a nível comercial (Tautorus *et al.*, 1991).

De forma semelhante, o conhecimento do ambiente bioquímico básico associado com o desenvolvimento e germinação de embriões zigóticos pode auxiliar no desenvolvimento de meios de cultura mais racionais na embriogênese somática de coníferas (Feirer, 1995), além de proporcionar a identificação de marcadores bioquímicos que sejam indicativos de estádios específicos do desenvolvimento embrionário (Jain & Ishii, 1997). Dentre os aspectos bioquímicos relacionados com a poliembriogênese zigótica e somática em coníferas, atenção especial tem sido direcionada ao estudo do acúmulo e mobilização de proteínas de reserva nas sementes (Hakman, 1993).

As proteínas nas sementes podem ser subdivididas em categorias, denominadas de proteínas de reserva, as quais compõem a maior parte das proteínas e que servem como fonte de aminoácidos para uso durante a germinação e crescimento da muda (Higgins, 1984; Shewry *et al.*, 1995), proteínas estruturais, as quais são essenciais para o normal metabolismo celular (Higgins, 1984) e proteínas enzimáticas. Proteínas de reserva são consideradas marcadores do processo de maturação em embriões zigóticos de gimnospermas e angiospermas (Dunstan *et al.*, 1998). Nas coníferas, tanto embriões somáticos como embriões zigóticos acumulam proteínas de reserva em abundância, durante a fase de maturação dos embriões (Hakman *et al.*, 1990). Estudos referentes ao controle do processo de maturação, tanto em sementes como em embriões somáticos, requerem um melhor entendimento das mudanças estruturais nos tecidos ativos na acumulação de substâncias de reserva, bem como o conhecimento das proteínas de reserva presentes na semente (Hakman, 1993).

O objetivo deste estudo foi analisar alguns parâmetros de crescimento de suspensões celulares de *A. angustifolia*, mantidas na ausência ou presença de fitorreguladores (2,4-D, BAP e Kin). Além disso, foi feito um estudo comparativo do padrão de proteínas totais apresentado por linhagens celulares embriogênicas, embriões zigóticos cotiledonares e seus respectivos megagametófitos.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

Neste experimento, foram utilizadas as linhagens celulares embriogênicas BM₀202 e BM₂212 além de embriões zigóticos cotiledonares e seus respectivos megagametófitos excisados de sementes maduras de *A. angustifolia* coletadas de uma planta matriz no município de Lages (SC). As linhagens celulares embriogênicas BM₀202 e BM₂212 foram

induzidas no mesmo período (dezembro/98) e passaram pelo mesmo número de subcultivos em meio semi-sólido, e vem sendo mantidas no escuro a $25 \pm 2^\circ \text{C}$. Entretanto, tanto a fase de indução como a de manutenção foi realizada em tratamentos diferentes. A linhagem celular embriogênica BM_0202 foi induzida e mantida em meio de cultura BM_0 , composto pela formulação salina de Gupta e Pullman (1991) suplementada com sacarose $30,0 \text{ g.L}^{-1}$, ácido nicotínico $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$, piridoxina-HCl $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$, tiamina-HCl $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$, glicina $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$, L-glutamina $1000,0 \text{ mg.L}^{-1}$, caseína hidrolisada $500,0 \text{ mg.L}^{-1}$, mio-inositol 1000 mg.L^{-1} e agar $6,5 \text{ g.L}^{-1}$. A linhagem celular embriogênica BM_2212 foi induzida em meio de cultura BM_5 , composto pelo meio de cultura BM_0 suplementado com fitorreguladores 2,4-D ($5 \mu\text{M}$), BAP ($2 \mu\text{M}$) e Kin ($2 \mu\text{M}$), sendo na fase de manutenção subcultivada em meio de cultura BM_2 composto pelo meio de cultura BM_0 suplementado com 2,4-D ($2 \mu\text{M}$), BAP ($1 \mu\text{M}$) e Kin ($1 \mu\text{M}$).

Suspensões celulares

As linhagens celulares embriogênicas BM_0202 e BM_2212 foram estabelecidas como suspensões celulares, utilizando-se os mesmos meios de cultura utilizados na fase de manutenção (BM_0 e BM_2) com exceção do agar. Como inóculo inicial utilizou-se $0,25 \text{ g}$ (peso fresco) de linhagem celular embriogênica, inoculadas em frascos de Steward contendo 120 mL de meio de cultura. Os frascos contendo as suspensões celulares foram mantidos no escuro a temperatura de 25°C , em agitador rotatório horizontal (1 rpm). Foram utilizados 16 frascos de Steward (oito frascos para cada linhagem celular embriogênica) para medição do pH e concentração de glicose do meio de cultura, e quantificação de proteínas extracelulares. Cada um dos frascos correspondeu a uma amostra com cerca de 120 mL de meio de cultura retirada com 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 dias de cultivo. Para a medição do pH do meio de cultura foram feitas medições logo após a autoclavagem deste. Para o acompanhamento da dinâmica de crescimento das linhagens celulares embriogênicas BM_0202 e BM_2212 , através da técnica volumétrica ou de sedimentação celular, foram utilizados quatro frascos de Steward (dois frascos para cada linhagem celular embriogênica), adaptados com tubos graduados de centrífuga, realizando-se as medições a cada três dias (42 dias de cultivo). No estudo da dinâmica de crescimento das linhagens celulares embriogênicas a quantidade de inóculo inicial, volume de meio de cultura e condições de armazenamento foram as mesmas empregadas para os frascos utilizados na quantificação das proteínas extracelulares e medição do pH e concentração de glicose no meio de cultura.

Parâmetros de crescimento

A determinação do volume celular sedimentado consistiu na inversão da posição dos frascos de Steward para sedimentação das células no tubo de centrifuga. Após 30 minutos, realizou-se a leitura do volume de células sedimentadas em cada um dos quatro frascos.

Para quantificação das proteínas extracelulares, e medição do pH e concentração de glucose no meio de cultura, as suspensões celulares BM₀202 e BM₂212 foram filtradas em malha de 200 µm e posteriormente centrifugadas por 15 minutos a 5.000 rpm. Três alíquotas de 10 mL do meio de cultura (sobrenadante) foram utilizadas para determinação do pH do meio de cultura. Ao restante do meio de cultura (80-90 mL) foram adicionadas duas gotas de 1 mM de fenilmetil sulfonil fluoreto (PMSF), sendo posteriormente armazenado a 0° C até o momento da quantificação das proteínas extracelulares.

As proteínas extracelulares foram precipitadas durante 24 horas, a 4° C, adicionando-se 15 mL de álcool etílico absoluto em 20 mL do meio de cultura (proporção de 1 volume de álcool etílico absoluto para cada 1,5 volume de meio de cultura). Em seguida, as amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 8.000 rpm a temperatura de 0° C. O precipitado formado foi ressuspensionado em 250 µL de solução 50 mM de fosfato de sódio dibásico (pH 7,0) sendo o sobrenadante descartado. A concentração de proteínas extracelulares ressuspensionadas na solução de fosfato de sódio dibásico foi estimada espectrofotometricamente (UV-120, Shimadzu[®]) utilizando-se o método colorimétrico de Bradford (1976) medindo-se a absorvância a 595 nm.

Para determinação da concentração de glucose presente no meio de cultura, utilizaram-se 100 µL de meio de cultura, ao qual adicionou-se 1 mL de água destilada. Em seguida retirou-se 100 µL da amostra diluída, e adicionou-se 2 mL do reagente de cor. A solução formada foi aquecida durante 10 minutos em banho-maria (100° C) e posteriormente resfriada durante dois minutos em água (temperatura ambiente). A concentração de glucose presente em cada amostra foi determinada espectrofotometricamente (UV-120, Shimadzu[®]) pelo uso de um kit para dosagem de glucose (Analiza[®]) lendo-se a intensidade de absorvância a 630 nm.

Extração das proteínas totais e eletroforese

Aproximadamente um grama das linhagens embriogênicas BM₀202 e BM₂212, embriões zigóticos cotiledonares e seus respectivos megagametófitos foram utilizados para

extração das proteínas totais. Os embriões zigóticos e os megagametófitos foram extraídos das sementes em banho de gelo (4° C) e posteriormente congelados até o momento da extração das proteínas totais. As linhagens celulares embriogênicas foram retiradas do meio de cultura semi-sólido BM₀ e BM₂ (Capítulo 1, pag. 22) e logo em seguida foram utilizadas para extração das proteínas totais.

Independentemente do tipo de material vegetal utilizado (*in vivo* ou *in vitro*), foi adotada a mesma metodologia para extração das proteínas totais. O material vegetal foi transferido para um cadinho de porcelana mantido em banho de gelo (4° C), onde posteriormente adicionou-se nitrogênio líquido e macerou-se o material vegetal até ser pulverizado. O material vegetal pulverizado foi homogeneizado em 200 µL de tampão de extração (previamente resfriado) contendo 50 mM de fosfato de sódio dibásico (pH 7,0), 1,5 % de β-mercaptoetanol, 0,5 % de SDS e 1mM de PMSF. O extrato obtido foi centrifugado a 5.000 rpm por 10 minutos a 0° C. As proteínas totais presentes no sobrenadante foram precipitadas a 4° C por pelo menos 24 horas, após a adição de um a dois volumes de álcool etílico absoluto. Em seguida, a amostra contendo as proteínas totais precipitadas foi centrifugada a 8.000 rpm, por 20 minutos, a 0° C. O sobrenadante obtido foi descartado e o material sedimentado foi ressuspensionado em 250 µL de solução 50 mM de fosfato de sódio dibásico (pH 7,0) e, em seguida, aquecido por dois a cinco minutos em banho maria (aproximadamente 70-80° C) para completa homogeneização da amostra. A concentração de proteínas totais contida em cada amostra foi determinada espectrofotometricamente (UV-120, Shimadzu®) através do método colorimétrico de Bradford (1976) medindo-se a absorvância a 595 nm.

Determinada a concentração de proteínas totais, as amostras foram diluídas com tampão de amostra, sendo o padrão de proteínas totais determinado por eletroforese em gel de poliacrilamida (12 %) em condições desnaturantes (Laemmli, 1970). Aproximadamente 25 µL de cada amostra contendo 80 µg de proteínas foi depositada por poço. O padrão para determinação do peso molecular das proteínas foi: miosina, 205 kDa; β-galactosidase, 116 kDa; fosforilase b, 97,4 kDa; albumina bovina, 66 kDa; ovoalbumina, 45 kDa; anidrase carbônica, 29 kDa. Após a eletroforese, o gel foi banhado em solução 20 % (p/v) de TCA e em seguida corado com Coomassie brilliant blue R-250 durante 12 horas no escuro.

RESULTADOS

Dinâmica de crescimento das suspensões celulares

Após 42 dias de cultivo, as suspensões celulares das linhagens embriogênicas BM₀202 e BM₂212 apresentaram um volume celular sedimentado de 38,50 e 39,75 mL respectivamente (Fig. 1). O crescimento médio na linhagem celular embriogênica BM₀202 foi de 0,92 mL/dia, enquanto que na linhagem celular embriogênica BM₂212 foi de 0,95 mL/dia. Apesar das linhagens celulares embriogênicas apresentarem um volume final de células sedimentadas semelhante, o perfil da cinética de crescimento nas fases da curva foi diferenciado. Comparativamente, a suspensão celular da linhagem celular embriogênica BM₂212 mantida no meio de cultura BM₂ apresentou de forma distinta, durante os 42 dias de cultivo, as fases de desenvolvimento inicial, exponencial, linear e estacionária. Já a suspensão celular da linhagem celular embriogênica BM₀202 mantida no meio de cultura BM₀, apresentou uma fase exponencial pouco pronunciada e até o 42° dia de cultivo ainda não havia entrado na fase estacionária. Até o 9° dia de cultivo, as linhagens celulares embriogênicas BM₀202 e BM₂212 mantiveram-se na fase de desenvolvimento inicial. Após este ponto, a linhagem celular embriogênica BM₂212 deu início à fase exponencial de crescimento, aumentando rapidamente o volume de células sedimentadas. Entre o 22° e 38° dia de cultivo, a linhagem celular embriogênica BM₂212 apresentou menores variações no volume de células sedimentadas, demonstrando a tendência de um padrão linear de crescimento. A partir do 39° dia houve uma desaceleração na taxa de crescimento da linhagem celular embriogênica BM₂212, indicando o início da fase estacionária de crescimento.

Para a linhagem celular embriogênica BM₀202 a fase exponencial durou do 10° até o 21° de cultura, entretanto esta fase foi menos evidente quando comparada a linhagem celular embriogênica BM₂212. A fase linear da linhagem celular embriogênica BM₀202 começou no 22° dia de cultivo, não sendo identificada a fase estacionária após 42 dias de cultivo.

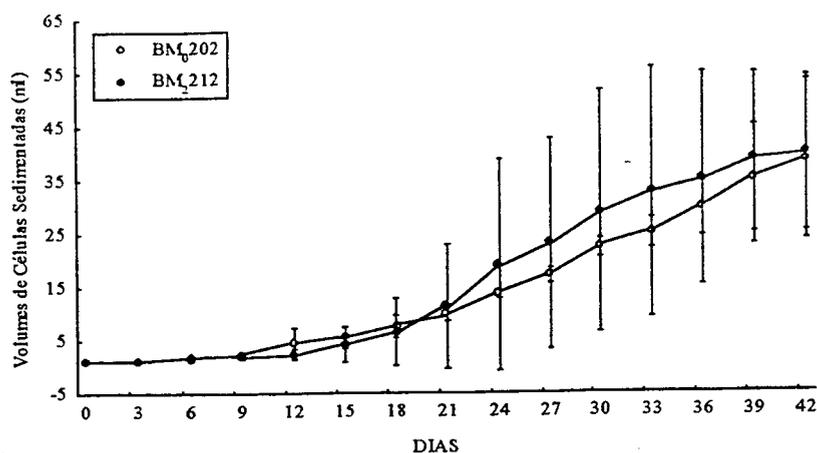


Figura 1. Curva de crescimento das suspensões celulares de linhagens celulares embriogênicas de *A. angustifolia*, em meio de cultura BM₀202 e BM₂212. Média e desvio padrão de duas repetições por ponto.

pH do meio de cultura

Com relação ao valor do pH do meio de cultura, as suspensões celulares das linhagens celulares embriogênicas BM₀202 e BM₂212 pouco diferiram inicialmente entre si em relação ao seu comportamento (Fig. 2). Até o início da fase exponencial de crescimento o valor do pH do meio de cultura na suspensão celular da linhagem celular embriogênica BM₂212 manteve-se em níveis superiores ao da suspensão celular da linhagem celular embriogênica BM₀202, alternando este panorama em seguida. Na suspensão celular da linhagem celular embriogênica BM₂212 após o meio de cultura ser autoclavado (pH 5,43) até a fase estacionária da curva de crescimento (pH 3,09) houve uma queda progressiva nos valores do pH do meio de cultura. Para a suspensão celular da linhagem celular embriogênica BM₀202, o valor do pH do meio de cultura observado após este ser autoclavado foi de 5,39, ocorrendo posteriormente a queda nos valores até o 30º dia de cultivo (pH 3,79) havendo um aumento a partir deste ponto (pH 5,02) e uma nova queda ao término das medições (pH 4,22).

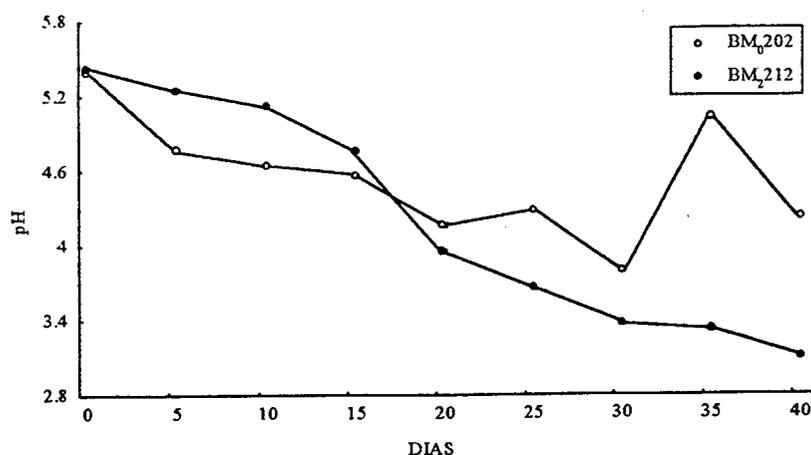


Figura 2. Variações de pH do meio de cultura de suspensões celulares de linhagens celulares embriogênicas de *A. angustifolia*, em meio de cultura BM₀202 e BM₂212. Média e desvio padrão de três repetições por ponto.

Proteínas extracelulares

Com relação às proteínas extracelulares, as linhagens celulares embriogênicas BM₀202 e BM₂212 apresentaram um comportamento semelhante de aumento da quantidade de proteínas extracelulares com o transcorrer do tempo de cultivo (Fig. 3). Entretanto, na suspensão celular da linhagem celular embriogênica BM₀202 foram encontrados, em todos os pontos analisados, valores superiores de proteínas extracelulares quando comparados com a suspensão celular BM₂212. Na linhagem BM₂212, até início da fase exponencial de crescimento, não foi possível a quantificação das proteínas extracelulares. A partir deste ponto, à medida em que houve o aumento no volume de células sedimentadas, foi possível a quantificação das proteínas extracelulares. Já, para a suspensão celular da linhagem celular embriogênicas BM₀202, desde a fase inicial de desenvolvimento foi possível a quantificação das proteínas extracelulares.

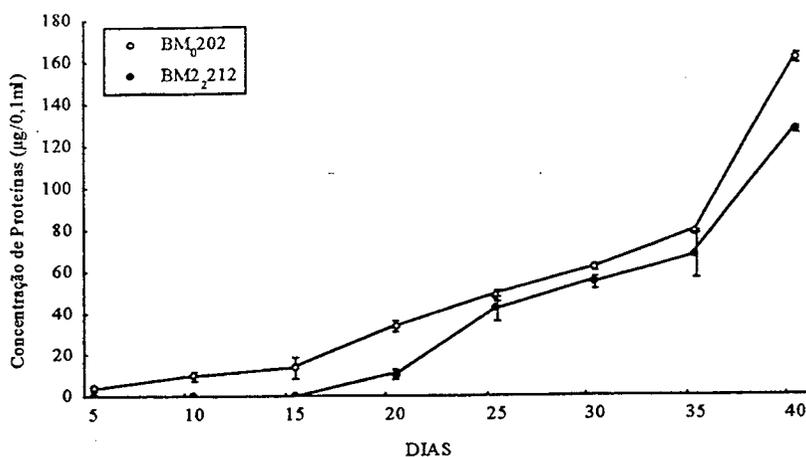


Figura 3. Variações na quantidade de proteínas extracelulares em suspensões celulares de linhagens celulares embriogênicas de *A. angustifolia*, em meio de cultura BM₀202 e BM₂212. Média e desvio padrão de duas repetições por ponto.

Concentração de glucose no meio de cultura

As suspensões celulares BM₀202 e BM₂212 demonstraram perfis distintos quanto ao consumo de glucose presente no meio de cultura (Fig. 4). O perfil de utilização de glucose pela linhagem BM₀202 caracterizou-se por um período de consumo inicial baixo (desenvolvimento inicial e fase exponencial), aumentando posteriormente até atingir um ponto máximo, ocorrendo em seguida uma queda progressiva na sua concentração no meio de cultura (fase linear). Na linhagem BM₂212, também foi caracterizado um consumo inicial baixo de glucose (desenvolvimento inicial e fase exponencial), seguido por um perfil de oscilação entre aumento e diminuição na sua presença no meio de cultura (fase linear e estacionária de crescimento).

Na suspensão celular BM₂212, o ponto máximo na concentração de glucose no meio de cultura ocorreu no 35º dia de cultivo, diminuindo progressivamente seu valor a partir deste ponto e, este ponto coincidiu com a entrada na fase estacionária de crescimento (35º dia). Para suspensão celular da linhagem BM₀202, a quantidade máxima de glucose no meio de cultura, ocorreu no 30º dia de cultivo, declinando nas fases posteriores da curva de crescimento. Este ponto foi quantificado durante o transcorrer da fase linear de crescimento, e ao final dos 40 dias de cultivo a concentração de glucose presente no meio de cultura da suspensão celular da linhagem celular embriogênicas BM₀202 foi menor que a quantidade presente no meio de cultura da suspensão celular BM₂212.

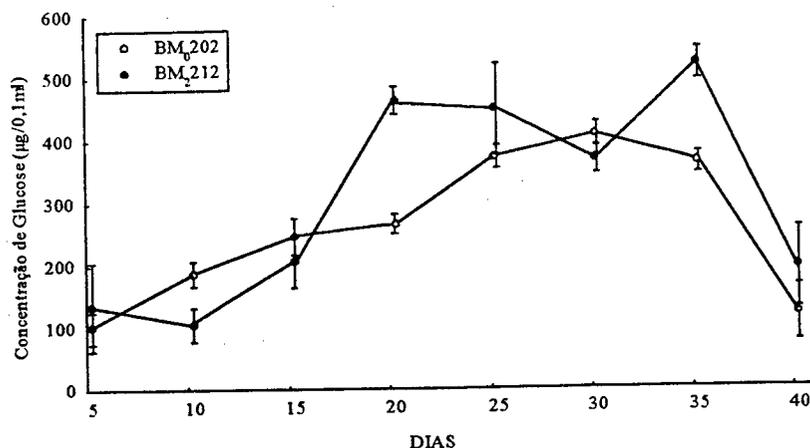


Figura 4. Variações na concentração de glicose do meio de cultura em suspensões celulares de linhagens celulares embriogênicas de *A. angustifolia*, em meio de cultura BM₀202 e BM₂212. Média e desvio padrão de três repetições por ponto.

Padrão de proteínas totais

O perfil protéico apresentado pelas linhagens celulares BM₀202 e BM₂212 pouco diferiu entre si (Fig. 5). Nas duas linhagens foram detectadas proteínas na faixa acima de 205 kDa até 45 kDa. Contudo, na linhagem BM₂212, mantida na presença de fitoreguladores (2,4-D, BAP e Kin), a expressão destas proteínas foi mais pronunciada, com exceção da banda com massa molecular de aproximadamente 45 kDa que se destacou de forma semelhante nas duas linhagens celulares embriogênicas. De forma similar, o perfil protéico observado para os embriões zigóticos cotiledonares e megagametófitos também foi semelhante entre si (Fig. 5). Comparativamente, as linhagens BM₀202 e BM₂212 apresentaram uma banda com massa molecular de aproximadamente 45 kDa não identificada nos embriões zigóticos cotiledonares e megagametófitos. Por outro lado, os embriões zigóticos e megagametófitos apresentaram uma banda com proteínas de massa molecular entre 66 kDa e 45 kDa e outras duas bandas abaixo de 29 kDa não observadas nas linhagens celulares embriogênicas BM₀202 e BM₂212.

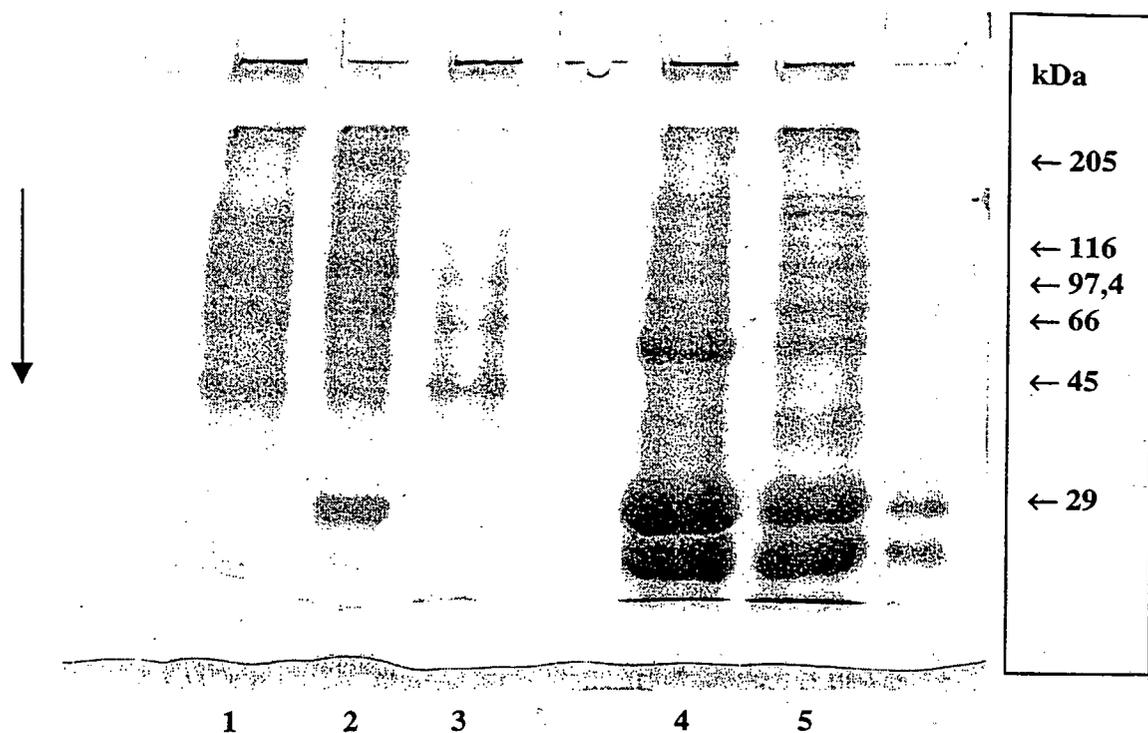


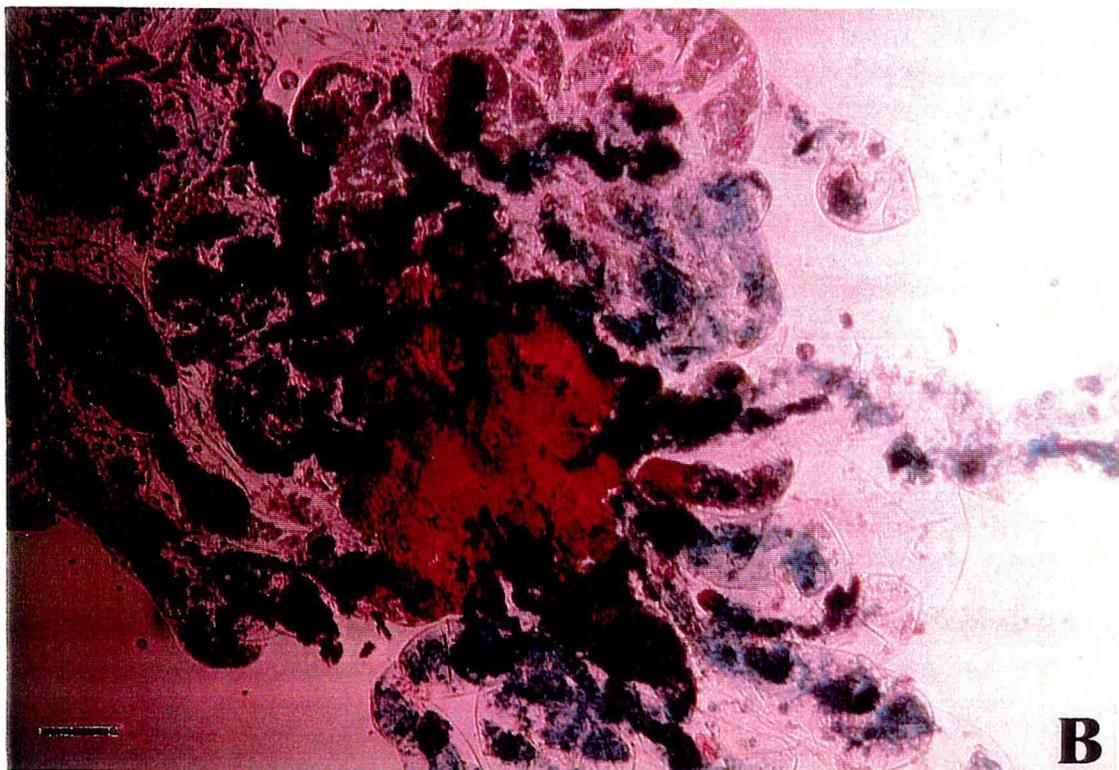
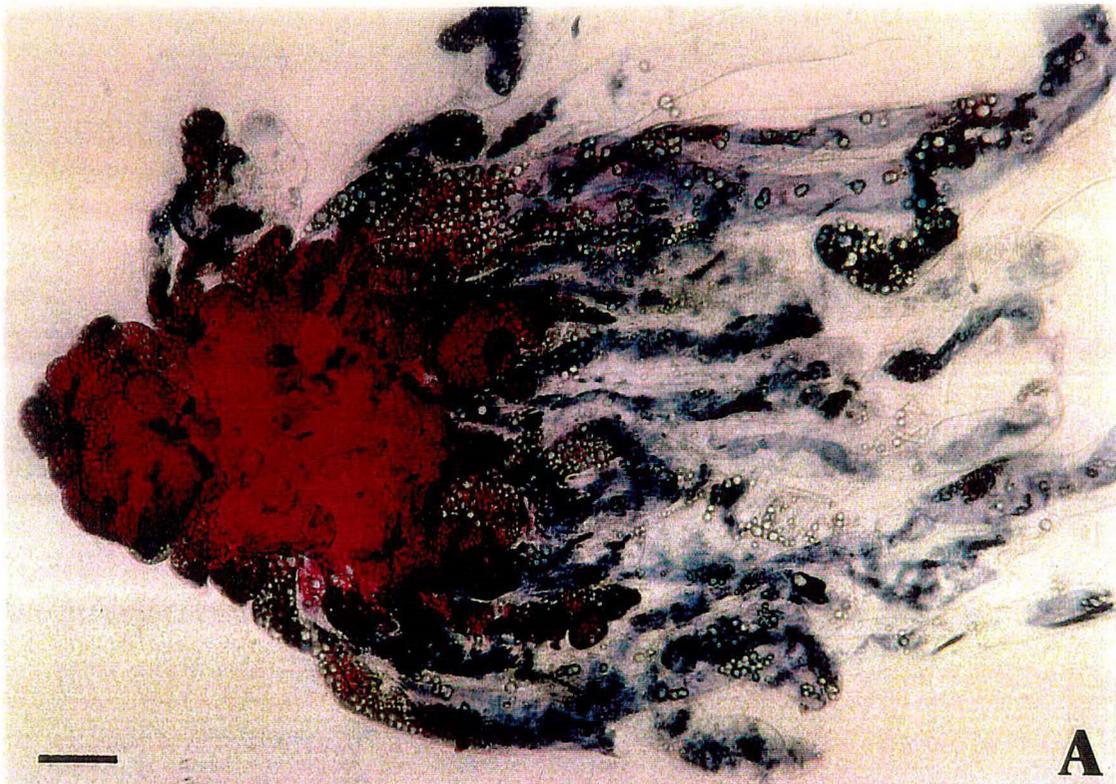
Figura 5. Eletroforese de proteínas totais da linhagem celular BM₂212 (linha 1); padrão peso molecular das proteínas (linha 2); linhagem celular BM₀202 (linha 3); embrião zigótico cotiledonar (linha 4); megagametófito (linha 5). Gel foi corado com Commassie Brilliant Blue R-250 e a massa molecular do padrão de proteínas (indicado no quadro da direita) foi composto por: miosina, 205 kDa; β -galactosidase, 116 kDa; fosforilase b, 97,4 kDa; albumina bovina, 66 kDa; ovoalbumina, 45 kDa; anidrase carbonica, 29 kDa.

DISCUSSÃO

Dinâmica de crescimento das suspensões celulares

Apesar de revelarem uma taxa média de crescimento semelhante, após 42 dias de cultivo, as suspensões celulares das linhagens BM₀202 e BM₂212 diferiram em relação ao número de dias necessários para atingir a fase estacionária de crescimento. É possível que este perfil possa estar relacionado ao nível de organização celular apresentado pelas culturas. No meio de manutenção em meio de cultura semi-sólido, as linhagens celulares mantidas em meio de cultura BM₀ apresentam um padrão de organização típico de pró-embriões (bipolaridade), com histogênese mais conspícua do que a observada nas linhagens celulares mantidas em meio de cultura BM₂ (Fig. 6). Em *Pinus pinaster*, o nível de organização das linhagens celulares embriogênicas influenciou o crescimento no meio líquido, sendo que normalmente culturas embriogênicas menos organizadas cresceram melhor (Bercetche & Pâques, 1995). Em *Picea abies*, culturas embriogênicas tipo A (embriões somáticos bipolares) apresentam menor crescimento no meio líquido quando comparados a cultura tipo B (embriões somáticos pouco desenvolvidos) (Egertsdotter *et al.*, 1993).

Nas suspensões celulares das linhagens BM₀202 e BM₂212, a fase inicial de desenvolvimento durou nove dias, diferindo a partir daí com relação ao volume sedimentado de células. Para a suspensão celular da linhagem BM₂212, a fase estacionária de crescimento foi atingida no 36º dia de cultivo, enquanto que a suspensão celular da linhagem BM₀202 não atingiu este mesmo patamar após o 42º dia de cultivo. Este longo período registrado na fase de desenvolvimento inicial pode estar associado com a densidade de inóculo inicial utilizada (0,25 g) para o estabelecimento das suspensões celulares. A densidade de inóculo inicial afeta a taxa inicial de crescimento *in vitro*. Quantidades de inóculo inicial maiores geralmente crescem mais rápido no início da suspensão celular do que quantidades menores (George, 1993). Em suspensões celulares de *A. angustifolia*, Astarita e Guerra (1998) utilizaram uma grama de células como inóculo inicial, obtendo uma fase de desenvolvimento inicial que se estendeu até o 5º dia de cultivo sendo no 30º dia atingida a fase estacionária. Em suspensões celulares de *Picea glauca-engelmanni* e *Picea mariana* foram utilizadas duas gramas de inóculo inicial, não sendo observada a fase de desenvolvimento inicial e no 21º dia de cultivo atingiu-se a fase estacionária (Lulsdorf *et al.*, 1992).



pH do meio de cultura

Os valores de pH do meio de cultura obtidos para as suspensões celulares das linhagens celulares embriogênicas BM₀202 e BM₂212, mantidas em meio de cultura BM₀ e BM₂, apresentaram comportamento diferenciado em relação a outros relatos em coníferas. Normalmente, existe uma tendência de queda no valor do pH do meio de cultura com posterior aumento no seu valor durante o transcorrer da curva de crescimento. Este comportamento é normalmente observado em meios de cultura contendo nitrogênio na forma reduzida (NH₄⁺) e na forma oxidada (NO₃⁻) (George, 1993). Em suspensões celulares de *A. angustifolia* mantidas em meio LP (von Arnold & Eriksson, 1981), o qual apresenta NO₃⁻ e NH₄⁺, o pH do meio de cultura diminui a partir da primeira metade do período de cultura (pH 4,94) e aumentou posteriormente (pH 5,6) (Atarita e Guerra, 2000). Em suspensões celulares de *Picea glauca-engelmannii* e *Picea mariana*, também mantidas em meio LP, foi observado uma redução no valor do pH do meio de cultura após o 1º dia de cultivo, havendo posteriormente o aumento gradual no seu valor (Lulsdorf *et al.*, 1992).

As variações ocorridas no valor do pH do meio de cultura são geralmente relacionadas às mudanças na forma de utilização do nitrogênio, se na forma reduzida (NH₄⁺) ou na forma oxidada (NO₃⁻). As plantas utilizam preferencialmente o nitrogênio na forma reduzida para o seu metabolismo, e a sua absorção pelas células provoca a diminuição no valor do pH externo em função da excreção de prótons (H⁺) no meio (George, 1993). A utilização do nitrato pelas células ocorre preferencialmente em pH ácido e depende da atividade da enzima nitrato redutase, que reduz o nitrato a nitrito, composto que em seguida é reduzido a amônio através da ação da enzima nitrito redutase (George, 1993). Além da utilização diferencial de NH₄⁺ e NO₃⁻, são relacionados os seguintes mecanismos modificadores do pH extracelular: (1) absorção de CO₂ pelo meio; (2) excreção de ácidos orgânicos e aminoácidos pelas células e (3) secreção ou troca de H⁺ pelas células (Minocha, 1987).

Contudo, a suplementação do meio de cultura com aminoácidos e/ou caseína hidrolisada também pode servir como fonte de nitrogênio para tecidos vegetais cultivados *in vitro* (George, 1993). Tecidos de coníferas são incapazes de suportar altas quantidades de NH₄⁺, entretanto as culturas podem ser supridas com níveis equivalentes de nitrogênio reduzido na forma de aminoácidos sem a ocorrência de toxicidade (Durzan, 1982). A caseína hidrolisada e a L-glutamina são freqüentemente adicionadas ao meio de cultura para indução e manutenção de calos embriogênicos, e para o subsequente crescimento de embriões somáticos em coníferas (Feirer, 1995). Destes, a L-glutamina desempenha função vital no

metabolismo do nitrogênio em espécies de coníferas, devido à sua habilidade em servir como molécula transportadora/doadora de nitrogênio para o metabolismo de aminoácidos (Feirer, 1995). Entretanto, quando aminoácidos são adicionados ao meio de cultura, e estes são absorvidos pelas células ocorre o decréscimo do pH do meio de cultura, de forma similar ao que ocorre quando ions NH_4^+ são absorvidos pelas células (George, 1993). Possivelmente, a manutenção dos baixos valores de pH observados até o final do cultivo das suspensões celulares BM₀202 e BM₂212 em relação aos observados por Astarita e Guerra (2000) possa estar relacionada ao consumo preferencial da L-glutamina e da caseína hidrolizada em relação as fontes de inorgânicas de nitrogênio (NH_4^+ e NO_3^-) presentes no meio de cultura BM.

Comparativamente, a manutenção dos menores valores de pH do meio de cultura na suspensão BM₂212 em relação a suspensão celular BM₀202, observada a partir do 20º dia de cultivo pode ser atribuída à suplementação com fitorreguladores em especial o 2,4-D (2 μM). Uma das formas pelas quais as auxinas promovem o crescimento de tecidos vegetais ocorre através da secreção de íons hidrogênio (H^+) provocando a diminuição do pH e ativação de enzimas responsáveis pela flexibilização de componentes estruturais da parede celular (teoria do crescimento ácido) (Taiz & Zeiger, 1991). Na cultura de tecidos vegetais, a liberação de H^+ pelas células pode provocar a diminuição do pH do meio de cultura (George, 1993). Adicionalmente, o menor grau de organização celular da linhagem celular embriogênica da suspensão celular BM₂212 também pode estar relacionada com os menores valores de pH do meio de cultura observados. Em suspensões celulares de *Picea abies*, foram observadas diferenças pronunciadas no valor do pH do meio de cultura nas culturas embriogênicas tipo A (embriões somáticos bipolares) e tipo B (embriões somáticos pouco desenvolvidos) (Find *et al.*, 1998). A suspensão celular da cultura embriogênica tipo A, atingiu um pico no valor do pH do meio de cultura em 6,5, estabilizando seu valor posteriormente em 6,0. Já a suspensão celular da cultura embriogênica tipo B, sofreu queda progressiva no valor do pH do meio de cultura estabilizando o seu valor em aproximadamente 4,5 (Find *et al.*, 1998).

Proteínas extracelulares

Nas duas linhagens celulares embriogênicas analisadas ocorreu um aumento progressivo na quantidade de proteínas secretadas para o meio de cultura durante os 40 dias de cultivo. Em *A. angustifolia*, o aumento na acumulação de proteínas extracelulares no meio de cultura sugere um intensivo processo de excreção, o qual pode ser relacionado a modificações bioquímicas ou mudanças celulares estruturais como o aumento da

permeabilidade da membrana e porosidade da parede celular, resultando na lise celular (Astarita & Guerra, 2000). Assim como no volume celular sedimentado, o grau de organização celular das linhagens celulares pode influenciar a quantidade de proteínas secretadas para o meio de cultura. Nos experimentos, a linhagem celular com maior grau de organização celular (em meio de cultura BM₀) demonstrou em todos os pontos analisados uma maior excreção de proteínas para o meio de cultura, quando comparada à linhagem celular com menor grau de organização (em meio de cultura BM₂). Diferenças de morfologia e padrão de crescimento em culturas embriogênicas parecem estar correlacionadas com a secreção de proteínas (Egertsdotter *et al.*, 1993). Em *Picea abies*, a maior proporção de pequenas células meristemáticas nas culturas embriogênicas tipo A promove a excreção para o meio de cultura de proteínas que diferem no tipo e quantidade, em relação as secretadas pela alta proporção de células vacuoladas presentes nas culturas embriogênicas tipo B (Find *et al.*, 1998).

Concentração de glucose no meio de cultura

Durante o período de intenso crescimento das suspensões celulares BM₀202 e BM₂212, ocorreu um aumento na concentração de glucose no meio de cultura. Astarita e Guerra (2000) observaram um comportamento semelhante em suspensões celulares de *A. angustifolia* mantidas em meio de cultura LP suplementadas com sacarose (3 %). Segundo estes autores, a concentração de glucose e frutose no meio de cultura atinge valor máximo em momentos distintos da curva de crescimento, havendo o consumo de frutose durante as fases iniciais de crescimento das células, para só então ocorrer o consumo de glucose do meio de cultura.

Além da *A. angustifolia*, outras coníferas também demonstram um padrão seletivo de assimilação de glucose e frutose. Suspensões celulares de culturas embriogênicas de *Picea mariana*, metabolizam preferencialmente glucose enquanto que as de *Picea glauca-engelmannii* consomem preferencialmente frutose (Tautorus *et al.*, 1994). Em suspensões celulares de *Taxus media*, a glucose foi consumida mais rapidamente que a frutose (Wickremesinhe & Arteca, 1994). Em *Picea abies*, suspensões celulares de culturas embriogênicas tipo A e tipo B apresentaram diferentes taxas de consumo para glucose e frutose, mas não demonstraram uma clara preferência com respeito a qual monossacarídeo seria consumido durante o período de cultura (Find *et al.*, 1998).

As diferenças observadas no perfil de acúmulo e consumo de glucose do meio de cultura nas suspensões celulares BM₀202 e BM₂212, também podem estar relacionadas à suplementação do meio de cultura com 2,4-D (2 µM). Segundo Gautheret (1955), as auxinas podem promover a mobilização de carboidratos, entretanto seus efeitos sobre a permeabilidade celular e respiração dificultam o estabelecimento de um padrão de comportamento geral. Se o meio de cultura contém açúcares como glucose, sacarose, ou frutose, estes são absorvidos pelas células, reduzindo o consumo interno de carboidratos ou mesmo resultando em um estado mais ou menos transitório de acúmulo dentro do tecido (Gautheret, 1955). Neste caso, possivelmente, a presença de auxinas, ao invés de atuarem em favor da depletação do açúcar causaria sua acumulação o que pode ser explicado em parte por mudanças na permeabilidade celular (Gautheret, 1955).

Padrão de proteínas totais

A análise da eletroforese das proteínas totais revelou não haver grandes diferenças no perfil protéico apresentado entre as linhagens celulares mantidas na presença ou ausência de fitorreguladores (2,4-D, BAP, e Kin) tanto para os megagametófitos como para os embriões zigóticos cotiledonares. Entretanto, quando se compararam os perfis apresentados pelo material *in vivo* e *in vitro* foram encontradas claras diferenças nos perfis protéicos. A presença de banda de proteína com massa molecular de aproximadamente 45 kDa no material *in vitro* e sua não ocorrência no material *in vivo* pode estar relacionada ao estágio de desenvolvimento do embrião zigótico ou somático. Dunstan *et al.*, (1998) descreveu cinco diferentes grupos de polipeptídios envolvidos durante o processo de maturação de embriões somáticos de *Picea glauca*. Segundo estes autores, a presença ou ausência de alguns destes grupos estaria intimamente associada aos estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos. No caso de *A. angustifolia*, isto torna-se bastante evidente na medida em que foram comparados perfis protéicos de linhagens celulares embriogênicas contendo pró-embriões somáticos em estádios iniciais de desenvolvimento com embriões zigóticos cotiledonares. Em *Pinus caribaea*, foi identificada uma classe de proteínas com massa molecular de 25 kDa (similar à germinina) ligadas ionicamente à superfície celular de embriões somáticos em estágio pré-globular. Estas proteínas parecem estar relacionadas a esta fase desenvolvimento (embriões polarizados), já que as mesmas não foram observadas em calos não embriogênicos (Neutelings *et al.*, 1998). Em *Picea abies*, nenhuma das proteínas caracterizadas como proteínas de reserva foram identificadas nas culturas embriogênicas contendo embriões somáticos imaturos (Hakman *et*

al., 1990). Em embriões somáticos cotiledonares de *Abies alba* x *Abies alba* foram encontradas proteínas com massa molecular de 27 e 29 kDa não detectadas nos embriões zigóticos cotiledonares (Vooková *et al.*, 1998). Segundo estes autores, as proteínas de 27 e 29 kDa são consideradas proteínas de estresse produzidas em consequência de tratamentos prolongados e concentrações impróprias de agentes osmóticos utilizados na fase de maturação e de desenvolvimento dos embriões somáticos.

No presente trabalho, de forma semelhante, a presença de certas proteínas no embrião zigótico cotiledonar e megagametófito também pode estar relacionada ao estágio de desenvolvimento embrionário. A presença da proteína entre 66 kDa e 45 kDa pode estar relacionada à presença de uma classe de proteínas altamente insolúveis denominadas de cristalóides. As cristalóides, são as principais proteínas de reserva em coníferas e sua síntese é regulada no transcorrer do desenvolvimento embrionário (Attree & Fowke, 1993). As proteínas cristalóides apresentam peso molecular de 55 até 63 kDa e são possivelmente compostas de várias subunidades (Hakman, 1993). Em *Picea glauca*, estas proteínas em sua forma não-reduzida apresentam massa molecular de 57 kDa e na sua forma reduzida migram em três subunidades com massa molecular alcançando de 42 kDa, 34,5-35 kDa e 22,5-23 kDa (Misra & Green, 1990). Com relação às proteínas de massa molecular inferiores a 29 kDa, existem evidências de que a sua presença também seja influenciada pelo estágio de desenvolvimento embrionário. Farrant *et al.*, (1996) trabalhando com eixos embrionários maduros de *A. angustifolia*, identificou nesta espécie uma classe de proteínas homólogas as LEA's (late embryogenesis abundant) denominadas de proteínas similares a deidrina apresentando massa molecular de 23, 26 e 28 kDa. Segundo estes autores esta classe de proteínas estaria associada a altos níveis de ácido abscísico (ABA) nas sementes, conferindo resistência a perda de água e contra baixas temperaturas em sementes de clima temperado.

CONCLUSÕES

- A) As linhagens celulares com e sem fitorreguladores apresentaram um crescimento médio semelhante de 0,92 mL/dia e 0,95 mL/dia, respectivamente. Contudo o padrão de desenvolvimento nas fases da curva de crescimento foi diferenciado;
- B) A quantidade de inóculo inicial utilizada nas suspensões celulares pode resultar em períodos mais curtos ou mais longos no desenvolvimento inicial da curva de crescimento;
- C) O consumo preferencial pelas linhagens celulares embriogênicas de fontes orgânicas de nitrogênio, em detrimento das fontes inorgânicas de nitrogênio presentes no meio de

cultura BM (Gupta & Pullman, 1991) e a presença de auxinas (2,4-D) no meio de cultura, podem reduzir o pH do meio de cultura das suspensões celulares;

- D) Ficou evidente para as duas suspensões celulares (com e sem reguladores de crescimento) o consumo preferencial de glicose nos estádios mais tardios da curva de crescimento (linear e estacionária). Contudo, as suspensões celulares com e sem fitorreguladores apresentaram perfil diferenciado de concentração de glicose no meio de cultura;
- E) O perfil de excreção de proteínas extracelulares foi similar para as suspensões celulares BM₀202 e BM₂212. Entretanto, nos períodos de cultivo analisados, a concentração de proteínas extracelulares foi maior nas suspensões celulares isenta de fitorreguladores (BM₀202), possivelmente em função de sua histogênese mais conspícua;
- F) A eletroforese das proteínas totais revelou não haver grandes diferenças no perfil protéico apresentado entre as linhagens celulares embriogênicas mantidas na presença ou ausência de fitorreguladores (2,4-D, BAP e Kin) tanto para os megagametófitos como para os embriões zigóticos cotiledonares. Entretanto, quando se compararam os perfis apresentados pelo material *in vivo* e *in vitro* foram encontradas claras diferenças nos perfis protéicos, sendo estas diferenças provavelmente relacionadas a estádios específicos do desenvolvimento embrionário.

REFERÊNCIAS

- ASTARITA, L.V., GUERRA, M.P. Early somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* – induction and maintenance of embryonal-suspensor mass cultures, **Brazilian Journal of Plant Physiology** 10, 1998. p. 113-118.
- ASTARITA, L.V., GUERRA, M.P. Conditioning of the culture medium by suspension cells and formation of somatic proembryo in *Araucaria angustifolia* (Coniferae), **In Vitro Cell. Dev. Biol. (no prelo)**, 2000.
- ATTREE, S.M., FOWKE, L.C. Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 35, 1993. p. 1-35.
- BERCETCHE, J., PÂQUES, M. Somatic embryogenesis in maritime pine (*Pinus pinaster*), in S. JAIN, P. GUPTA e R. NEWTON (eds.), Somatic Embryogenesis in Woody Plants, v. 3, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1995. p. 221-242.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding, **Analytical Biochemistry** 72, 1976. p. 248-253.
- DUNSTAN, D.I., DONG, J.Z., CARRIER, D.J., ABRAMS, S.R. Events following ABA treatment of spruce somatic embryos, **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant** 34, 1998. p. 159-168.
- DURZAN, D.J. Nitrogen metabolism and vegetative propagation of forest trees, in JM BONGA e DJ DURZAN (eds.), Tissue Culture in Forestry, Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk, The Hague, 1982. p. 256-324.
- EGERTSDOTTER, U., MO, L.H., von ARNOLD, S. Extracellular proteins in embryogenic suspension cultures of Norway spruce (*Picea abies*), **Physiol. Plant.** 88, 1993. p. 315-321.
- FARRANT, J.M., PAMMENTER, N.W., BERJAK, P., FARNSWORTH, E.J., VERTUCCI, C.W. Presence of dehydrin-like proteins and levels of abscisic acid in recalcitrant (desiccation sensitive) seeds may be related to habitat, **Seed Science Research** 6, 1996. p. 175-182.
- FEIRER, R.P. The Biochemistry of Conifer Embryo Development: Amino acids, polyamines and storage proteins, in: S. JAIN, P. GUPTA, e R. NEWTON (eds), Somatic Embryogenesis in Woody Plants, v. 1, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1995. p. 317-359.
- FIND, J.I., NORGAARD, J.V., KROGSTRUP, P. Growth parameters, nutrient uptake and maturation capacity of two cell-lines of Norway-spruce (*Picea abies*) in suspension culture, **J. Plant Physiol.** 152, 1998. p. 510-517.
- FOWKE, L., ATTREE, S., KONG, L., BINAROVA, P., EVANS, D. Conifer Somatic Embryogenesis: A modal system for studies of embryo development and cell biology, Joint Meeting of the IUFRO Working Parties 2.04-07 e 2.04-06 Somatic Cell Genetics and Molecular Genetics of Trees, Quebec, 1997. p. 14.
- GAUTHERET, R.J. The nutrition of plant tissue cultures, **Ann. Rev. Plant Physiol.** 6, 1955. p. 433-484.
- GEORGE, E.F. The components of culture media, Plant Propagation by Tissue Culture Part 1, Exegetics Ltd., England, 1993. p. 273-343.
- GREY, D., SARKISSIAN, G.S., FOWLER, M.W. Biochemistry of forest tree species in culture, in J.M. BONGA e D.J. DURZAN (eds.), Cell and Tissue Culture in Forestry, v. 2, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, 1987. p. 31-60.
- GUERRA, M.P., TORRES, A.C., TEIXEIRA, J.B. Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas, in A.C. TORRES, L.S. CALDAS, e J.A. BUSO (eds.), Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas v. 2, Embrapa, Brasília, 1999. p. 533-568.

- GUPTA, P.K., PULLMAN, G.S. **Method for reproducing coniferous plants by somatic embryogenesis using abscisic acid and osmotic potential variation**, U.S. Patent No. 5,036,007, 1991.
- HAKMAN, I., STABEL, P., ENGSTRÖM, P., ERIKSSON, T. (1990) Storage protein accumulation during zygotic and somatic embryo development in *Picea abies* (Norway spruce), **Physiologia Plantarum** 80, 1990. p. 441-445.
- HAKMAN, I. Embryology in Norway spruce (*Picea abies*). An analysis of the composition of seed storage proteins and deposition of storage reserves during seed development and somatic embryogenesis, **Physiologia Plantarum** 87, 1993. p. 148-159.
- HIGGINS, T.J.V. Synthesis and regulation of major proteins in seeds, **Ann. Rev. Plant Physiol.** 35, 1984. p. 191-221.
- JAIN, S.M., ISHII, K. Recent advances in somatic embryogenesis in forest trees. in *Recent Advances in Biotechnology for Tree Conservation and Management*, Florianópolis, 1997. p. 214-231.
- KROGSTRUP, P. Effect of culture densities on cell proliferation and regeneration from embryogenic cell suspensions of *Picea sitchensis*, **Plant Sci.** 72, 1990. p.115-123.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, **Nature** 227, 1970. p. 680-685.
- LULSDORF, M.M., TAUTORUS, T.E., KIKCIO, S.I., DUNSTAN, D.I. Growth parameters of embryogenic suspension culture of Interior spruce (*Picea glauca* – *engelmanni* complex) and black spruce (*Picea mariana* Mill.), **Plant Science** 82, 1992. p. 227-234.
- MINOCHA, S.C. **pH of the medium and the growth and metabolism of cells in culture**, in J.M. BONGA e D.J. DURZAN (eds.), *Cell and Tissue Culture in Forestry*, v. 1, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, 1987. p. 125-141.
- MISRA, S., GREEN, M.J. Developmental gene expression in conifer embryogenesis and germination .I. Seed proteins and protein body composition of mature embryo and the megagametophyte of white spruce (*Picea glauca* [Moench] Voss.), **Plant Science** 68, 1990. p. 163-173.
- NEUTELINGS, G., DOMON, J.M., MEMBRÉ, N., BERNIER, F., MEYER, Y., DAVID, A., DAVID, H. Characterization of a germin-like protein gene expressed in somatic and zygotic embryos of pine (*Pinus caribaea* Morelet), **Plant Molecular Biology** 38, 1998. p. 1179-1190.
- SCHRIPSEMA, J., VERPOORTE, R. Search for factors related to the indole alkaloid production in cell suspension cultures of *Tabernaemontana divaricata*, **Planta Med.** 58, 1992. p. 245-249.
- SHEWRY, P.R., NAPIER, J.A., TATHAM, A.S. Seed storage proteins: structures and biosynthesis, **The Plant Cell** 7, 1995. p. 945-956.
- TAIZ, L., ZEIGER, E. **Plant Physiology**, The Benjamin Cummings Redwood, cap 16, 1991. p. 398-425.
- TAUTORUS, T.E., FOWKE, L.C., DUNSTAN, D.I. Somatic embryogenesis in conifers, **Canadian Journal of Botany** 69, 1991. p. 1873-1899.
- TAUTORUS, T.E., LULSDORF, M.M., KIKCIO, S.I., DUNSTAN, D.I. Nutrient utilization during bioreactor culture, and maturation of somatic embryo cultures of *Picea mariana* and *Picea glauca-engelmanni*, **In Vitro Cell. Dev. Biol** 30, 1994. p. 58-63.
- VASIL, I.K. Automation of plant propagation, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 39, 1994. p. 105-108.
- von ARNOLD, S., ERIKSSON, T. *In vitro* studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*, **Canadian Journal of Botany** 59, 1981. p. 870-874.

- VOOKOVÁ, B., GAJDOSOVÁ, A., MATÚSOVÁ, R. Somatic embryogenesis in *Abies alba* x *Abies alba* and *Abies alba* x *Abies nordmanniana*, **Biologia plantarum** 40, 1998. p. 523-530.
- WENCK, A.R., QUINN, M., WHETTEN, R.W., PULLMAN, G., SEDEFOFF, R. High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of Norway spruce (*Picea abies*) and loblolly pine (*Pinus taeda*), **Plant Molecular Biology** 39, 1999. p. 407-416.
- WICKREMESINHE, E.R.M., ARTECA, R.N. Taxus cell suspension cultures: Optimizing growth and production of taxol, **J. Plant Physiol.** 144, 1994. p. 183-188.

Considerações Finais e Perspectivas Futuras

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Desde o século XIX diversos estudos vêm sendo realizados sobre a embriogênia de coníferas. Entretanto, grande parte dos primeiros relatos sobre tais estudos foram desenvolvidos com espécies de coníferas do hemisfério Norte, principalmente com aquelas pertencentes aos diferentes gêneros da família *Pinaceae*. Com o passar dos anos, na medida em que foram sendo realizados estudos com as demais famílias de coníferas, descobriu-se que o modelo de embriogênia da família *Pinaceae* era altamente especializado e, portanto, não poderia ser utilizado como um padrão geral para as demais famílias.

De forma semelhante, os estudos iniciais referentes a embriogênese somática em coníferas foram realizados com diferentes espécies da família *Pinaceae*, em especial as do gênero *Picea* sp. Contudo, os métodos desenvolvidos para a indução, desenvolvimento e maturação de embriões somáticos em *Picea* sp nem sempre têm se mostrado eficientes para os demais famílias de coníferas, bem como para alguns gêneros da família *Pinaceae*. Perante tal situação, novos estudos em diferentes áreas da poliembriogênese zigótica e somática de coníferas ainda terão que ser realizados como forma de suporte ao desenvolvimento de protocolos de embriogênese somática eficientes nas diversas espécies e gêneros.

Os resultados obtidos no presente trabalho elucidam alguns aspectos básicos e aplicados relacionados ao desenvolvimento embrionário em *Araucaria angustifolia*. Contudo, ainda são necessários avanços no conhecimento da embriogênese desta espécie para que o protocolo de embriogênese somática possa ser aplicado com sucesso. Assim, apesar do uso de embriões zigóticos imaturos possibilitar a indução de culturas embriogênicas em altas frequências, novos estudos devem ser realizados visando a indução de culturas embriogênicas a partir de tecidos mais maduros. Na fase de manutenção e maturação das linhagens celulares embriogênicas, novas condições de meio de cultura devem ser testadas levando-se em conta o modelo de desenvolvimento embrionário em sementes recalcitrantes.

O estudo e caracterização de aspectos metabólicos em suspensões celulares de *A. angustifolia* são necessários para uma melhor compreensão dos fatores que controlam e afetam o potencial embriogênico das culturas. Adicionalmente, a possibilidade da identificação de estádios específicos do desenvolvimento embrionário através de marcadores bioquímicos, morfo-fisiológicos e genéticos é altamente desejável para o entendimento dos mecanismos associados ao desenvolvimento embrionário. Assim, o maior conhecimento sobre estes aspectos poderá permitir o desenvolvimento de protocolos mais precisos e menos empíricos de embriogênese somática aplicados às coníferas.

ANEXOS

Anexo 1. Análise de variância para os fatores, meio de cultura (M), planta (P) e data de coleta dos cones (C).

Anova para os dados transformados Raiz de $(y + 2)$

Causas da Variação	GL	SQ	QM	F	P<0,05	F tab.
Meio	3	1,237	0,412	0,069	ns	2,8
Planta	2	72,468	36,234	6,065	*	3,19
Int M x P	6	35,381	5,897	0,987	ns	2,29
Erro (a)	48	286,750	5,974	-		
Sub-total	59	395,836	-	-		
Coleta	4	222,300	55,575	9,341	*	2,42
Int M x C	12	37,947	3,162	0,532	ns	1,8
Int P x C	8	40,273	5,034	0,846	ns	1,99
Int M x P x C	24	97,756	4,073	0,685	ns	1,57
Erro (b)	192	1142,347	5,950	-		
Total	299	1936,460	-	-		

(*) Asterisco indica valores significativos da interação

CVEa (%)= 76,07

CVEb (%)= 75,92

Anexo 2. Componentes da formulação salina dos meios de cultura LP (von Arnold & Eriksson, 1981) e BM (Gupta & Pullman, 1991).

Constituintes	Concentração (mg/L)	
	BM	LP
NH_4NO_3	603,8	1.200,0
KNO_3	909,9	1.900,0
KH_2PO_4	136,1	340,0
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	236,2	-
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	-	1760,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246,5	370,0
$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	256,5	-
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	50,0	-
KI	4,15	0,75
H_3BO_3	15,5	0,63
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	10,5	2,23
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	14,4	-
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,125	0,025
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,125	0,0025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,125	0,0025
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	6,95	13,9
EDTA	9,33	18,7
$\text{ZnNa}_2 \cdot \text{EDTA}$	-	4,05