

**SIMONE DE MIRANDA RODRIGUES**

**INFLUÊNCIA DE ANTIBIÓTICOS NA MORFOGÊNESE *in vitro*,  
TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA E ISOLAMENTO DE RNA DE URUCUM  
(*Bixa orellana* L.)**

**Tese apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Genética e  
Melhoramento, para obtenção do título  
de *Doctor Scientiae*.**

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2007

**SIMONE DE MIRANDA RODRIGUES**

**INFLUÊNCIA DE ANTIBIÓTICOS NA MORFOGÊNESE *in vitro*,  
TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA E ISOLAMENTO DE RNA DE URUCUM  
(*Bixa orellana* L.)**

**Tese apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Genética e  
Melhoramento, para obtenção do título  
de *Doctor Scientiae*.**

APROVADA: 23 de julho de 2007.

---

Prof<sup>a</sup>. Maria Catarina Megumi Kasuya

---

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros  
(Co-orientador)

---

Prof. Aloisio Xavier

---

Dr. Edgard Augusto de Toledo Picoli

---

Prof. Wagner Campos Otoni  
(Orientador)

À Deus,  
Aos meus pais Luiz e Ianete,  
As minhas irmãs Shirley e Sheyla,

Dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, acima de tudo, pela presença em todos os momentos da minha vida.

A meus pais amados, Luiz e Ianete, pelo apoio, força e incentivo durante todos os momentos da minha caminhada.

Às minhas irmãs Shirley e Sheyla, pela ajuda, alegria e amizade durante todo esse tempo.

Aos meus familiares, pelo carinho e estímulo nunca deixando que eu desistisse.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Genética e Melhoramento, pela oportunidade de realização do curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro.

Aos professores, pelas contribuições dadas à minha formação, em especial ao Prof. Wagner Campos Otoni, pela orientação, ensinamentos e apoio durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Marcio Gilberto Cardoso Costa, pela oportunidade de realizar parte desta tese na Universidade Estadual de Santa Cruz (Ilhéus, BA, Brasil), pela dedicação, ajuda e confiança.

Aos meus amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos-BIOAGRO, pela colaboração, auxílio e momentos de alegria proporcionados.

Aos brasileiros que, muitas vezes sem saber, financiaram meus estudos.

## **BIOGRAFIA**

Simone de Miranda Rodrigues, filha de Luiz Felipe Franco Rodrigues e Ianete de Fátima de Miranda Rodrigues, nasceu em Belém, PA.

Concluiu seus estudos de primeiro e segundo graus, na mesma cidade.

Em 1999, ingressou no curso de Ciências Biológicas na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, sendo bolsista de iniciação científica do CNPq, e diplomando-se em Bacharel e Licenciado em agosto de 2003.

Em agosto de 2003, iniciou o Mestrado no Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, na Universidade Federal de Viçosa, concluindo-o em fevereiro de 2005.

Em março de 2005 iniciou o Doutorado no mesmo Programa, na Universidade Federal de Viçosa, defendendo tese em julho de 2007.

## SUMÁRIO

	<i>Página</i>
<b>RESUMO</b> .....	vii
<b>ABSTRACT</b> .....	ix
Introdução Geral .....	1
Referências .....	6
<b>Capítulo I</b>	
Influência de antibióticos na morfogênese <i>in vitro</i> a partir de explantes hipocotiledonários e radiculares de urucum ( <i>Bixa orellana</i> L.).....	9
Resumo .....	9
Introdução .....	10
Material e Métodos .....	12
Resultados e Discussão .....	17
Efeito de antibióticos utilizados na seleção de plantas transformadas .....	17
Efeito de antibióticos utilizados na eliminação de bactérias do meio de cultura .....	25
Referências .....	35
<b>Capítulo II</b>	
Transformação genética via <i>Agrobacterium rhizogenes</i> e obtenção de plantas transgênicas de urucum ( <i>Bixa orellana</i> L.) .....	39

Resumo .....	39
Introdução .....	40
Material e Métodos .....	42
Resultados e Discussão .....	46
Fenótipo “hairy root” resultante da inoculação dos explantes com <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....	46
Morfogênese das raízes potencialmente transformadas em diferentes condições e cultivo .....	48
Regeneração de plantas de urucum a partir de raízes “hairy root” .....	52
Confirmação das plantas transgênicas via PCR .....	54
Referências .....	57

### **Capítulo III**

Isolation and purification of RNA from tissues rich in polyphenols, polysaccharides, and pigments of annatto .....	60
Abstract .....	60
Introduction .....	61
Materials and Methods .....	63
Results and Discussion .....	67
References .....	72

<b>CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	75
--------------------------------	----

## RESUMO

RODRIGUES, Simone de Miranda, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2007.  
**Influência de antibióticos na morfogênese *in vitro*, transformação genética e isolamento de RNA de urucum (*Bixa orellana* L.).** Orientador: Wagner Campos Otoni. Co-orientadores: Everaldo Gonçalves de Barros e Marcio Gilberto Cardoso Costa.

A introdução de genes envolvidos na via de biossíntese de bixina em *Bixa orellana* tem sido almejada, com o objetivo não somente de obter plantas que produzam alto conteúdo desse corante natural, mas principalmente, estudar a rota de biossíntese responsável pelo acúmulo desse carotenóide em sementes de urucum. Assim, a biotecnologia, por meio de técnicas de cultura de tecidos, é uma ferramenta alternativa para produzir plantas de urucum com alto conteúdo de bixina. Portanto, os objetivos deste trabalho foram estudar a influência de antibióticos na morfogênese *in vitro* e estabelecer um protocolo de transformação genética e isolamento de RNA para a espécie estudada. Avaliando o uso de higromicina na seleção de plantas transformadas de duas matrizes da variedade ‘Bico de Pato’ (‘M1’ e ‘M6’) de urucum, cultivadas em meio MS contendo 4,56  $\mu\text{M}$  de zeatina, observou-se que 4  $\text{mg L}^{-1}$  desse antibiótico foi capaz de inibir 100 % da frequência regenerativa de brotos provenientes de hipocótilos não submetidos a pré-cultivo; enquanto que essa mesma concentração foi ineficaz para inibir a regeneração de brotos a partir de hipocótilos pré-cultivados por 3 dias. Para segmentos radiculares da variedade ‘Peruana’, 2,5  $\text{mg L}^{-1}$  de higromicina foi capaz de reduzir 98 % das brotações. Também, não ocorreu regeneração de brotos em raízes cultivadas em meio contendo canamicina, sendo que 12,5 e 25  $\text{mg L}^{-1}$  desse antibiótico resultaram no alongamento de raízes, com

escurecimento dos explantes cultivados em meio contendo concentrações maiores que 50 mg L<sup>-1</sup> de canamicina. O estudo realizado para verificar as respostas morfogênicas a partir de hipocótilos e raízes de duas variedades de urucum, influenciado pela adição, no meio de cultura, de antibióticos que atuam na eliminação de bactérias, indicou que a regeneração de brotos provenientes de hipocótilos foi mais eficiente na condição controle, visto os antibióticos avaliados promoverem a inibição da regeneração de brotos provenientes desses explantes; enquanto que para segmentos de raízes, foi observado diferença entre as médias das variedades ‘Bico de Pato’ e ‘Peruana’, sendo que essa última apresentou os resultados mais baixos para todos os tratamentos avaliados. Esses resultados indicaram que a resposta morfogênica dos explantes de urucum é genótipo específico e dependente da fonte do explante utilizado. Um sistema eficiente de transformação genética via *Agrobacterium rhizogenes* R1601, carregando a construção quimérica *nos-nptII-nos*, foi adequado para explantes hipocotiledonares de urucum. Para os experimentos de transformação utilizaram-se duas matrizes da variedade ‘Bico de Pato’, ‘M2’ e ‘M6’, tendo sido verificado diferenças na intensidade de respostas entre essas matrizes. Condições de obtenção de brotos foram otimizadas, verificando-se que o uso de um período indutivo de 10 dias, em meio de cultivo líquido suplementado com 4,56 µM de zeatina, seguido de cultivo em meio semi-sólido, acelerou o calejamento e surgimento das raízes “hairy root”. Entretanto, menor quantidade de gemas foi observada, em tempo prolongado de cultivo, usando-se meio de cultura desprovido deste fitorregulador. Também, o protocolo utilizando MATAB a 2 % em solução salina 3 M foi eficiente para a extração de RNA de urucum, visto a dificuldade de isolamento de ácidos nucleicos para essa espécie vegetal, muito rica em polifenóis e polissacarídeos, o que favorecerá futuras análises envolvendo a introdução de genes de interesse agrônômico.

## ABSTRACT

RODRIGUES, Simone de Miranda, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2007.  
**Influence of antibiotics on *in vitro* morphogenesis, genetic transformation and RNA isolation of annatto (*Bixa orellana* L.)** Adviser: Wagner Campos Otoni. Co-advisers: Everaldo Gonçalves de Barros and Marcio Gilberto Cardoso Costa.

The manipulation of genes involved in carotenoid biosynthesis in *Bixa orellana* has been attempted with the objective of generating plants producing high content of a natural natural colorant, bixin, and studying the biosynthetic pathway for the accumulation of this unique carotenoid in annatto seeds. The biotechnology, by means of plant tissue culture techniques, offers an alternative tool to produce annatto plants with high bixin content. The present study aimed to evaluate the influence of antibiotics on *in vitro* morphogenesis and to establish a protocol of genetic transformation and RNA isolation to support further gene isolation and cloning studies of the species. It was observed that hygromycin 4 mg L<sup>-1</sup> effectively inhibited morphogenic responses of hypocotyl explants of both 'M1' and 'M6' sources of 'Bico de Pato' variety, cultured in MS medium containing 4.56 µM zeatin. However, the same antibiotic concentration was ineffective to inhibit shoot regeneration from hypocotyls precultured for 3 days in the same medium lacking hygromycin. Hygromycin 2.5 mg L<sup>-1</sup> lessened up to 98 % of the shoot regeneration in root segments of 'Peruana'. Also, despite the absence of shoot regeneration, when root explants were cultured onto MS liquid medium containing 12.5 and 25 mg L<sup>-1</sup> kanamycin, there was a marked root elongation; concentrations higher than 50 mg L<sup>-1</sup> kanamycin led to a tissue browning. All antibiotics used to control bacteria, namely timentin, meropenem, augmentin, and cefotaxime somehow lessened regeneration frequencies of hypocotyl and root explants

of 'Bico de Pato' and 'Peruana' varieties. The later, presented the lowest average for all the appraised treatments. Those results indicate that the morphogenic responses of the annatto explants are not only genotype-dependent, but also dependent of the source of the explants used. An efficient system of genetic transformation mediated by *Agrobacterium rhizogenes* R1601, carrying the chimerical construction *nos-nptII-nos*, was adapted for annatto hypocotyl explants. For the transformation assays two annatto sources were used, 'M2' and 'M6'. Differentiated roots from the inoculated distal ends of the explants were isolated and transferred to a semi-solid MS medium added with 100 mg L<sup>-1</sup> and 300 mg L<sup>-1</sup> timentin. Shoots spontaneously differentiated from roots growing in kanamycin-supplemented medium, however it was verified that the use of a 10 days induction period in liquid medium added with 4.56 µM zeatin, followed by cultivation in semi-solid medium, accelerated the callus formation and, or roots hairy root appearance, followed by adventitious shoot-bud formation. Finally, due to the difficulty of isolation good quality nucleic acid from annatto tissues, very rich in polyphenol and polysaccharide, a protocol using MATAB 2 % in NaCl 3 M was proposed. It was efficient for obtaining a high quality annatto RNA, that will favor future analyses on the isolation, cloning and expression of genes involved in carotenoid biosynthetic pathway, and the introduction of other genes of agronomic interest.

## INTRODUÇÃO GERAL

A espécie vegetal *Bixa orellana* L., nativa da América tropical, é um arbusto perene pertence à família Bixaceae, amplamente empregado na ornamentação devido à beleza de suas flores (APARNATHI et al., 1990; CASTRO et al., 1994). Pode ser encontrado em diversas regiões do mundo com diferentes nomes: Arnoto, em Ceilão; Atolé, Achiote, Bija, no Peru e em Cuba; Axiote, no México; Achiote, Achote, Anatto, Bija e Santo Domingo, em Porto Rico; Ditaque e Kifasu, em Angola; Bixa, na Guiana; Orleans Laum, na Alemanha; Roucou, Rocouyer, na França; Analto, em Honduras; Guajachote, em El Salvador; Onotto e Onotillo, na Venezuela; Shambu, no Peru; Achiote e Urucu, na Bolívia; Anatto e Anatto-Tree, na Inglaterra; Urucu, na Argentina; Roucou, em Trinidad; Roucou e Koessewee, no Suriname. No Brasil, essa espécie é conhecida com os nomes de urucum, urucu e açafrão da terra (SILVA e FRANCO, 2000).

Sua disseminação ocorreu devido a espécie permitir a obtenção de corantes de diversas tonalidades, que vão do amarelo ao castanho, passando pelo vermelho. Dentre os vários isoprenóides acumulados pelo urucum, os pigmentos bixina e norbixina são os principais produzidos, podendo chegar a mais de 80 % de bixina no arilo das sementes (PRESTON e RICKARD, 1980; MAGDA, 1989; MERCADANTE e PFANDER, 1998). Bixina é um apocarotenóide, éster dicarboxílico monometil que confere cor vermelha as sementes de *B. orellana*, ocupando atualmente, a segunda colocação dentre os corantes aditivos naturais mais utilizados (MERCADANTE e PFANDER, 1998).

Como é o único que produz esse corante natural, recentemente, ele tem despertado grande interesse científico, visto sua larga utilização nas indústrias farmacêutica,

cosmética, têxtil e, principalmente, alimentícia, em virtude da crescente proibição da utilização de aditivos sintéticos, considerados tóxicos e cancerígenos, além de possuir maior estabilidade e coloração atrativa (LAURO, 1991; PRENTICE-HERNANDEZ e RUSIG, 1992; MERCADANTE et al., 1997; MERCADANTE e PFANDER, 1998; AGNER et al., 2004).

Em 1999, a produção brasileira de grãos de urucum situava-se, em torno de 10.000 a 12.000 toneladas por ano, sendo que desse total, 60 % eram destinados à fabricação de corante/colorífico, 30 % à fabricação de corantes e 10 % à exportação; e em 2000, o consumo de colorífico no Brasil foi estimado em torno de 1.600 toneladas (FRANCO et al., 2002). Estima-se que mais de 2,8 toneladas/ano de bixina e norbixina sejam consumidos em alimentos como o iogurte, recheio de biscoitos, “snacks”, coloríficos, sobremesas em pó, bebidas lácteas, misturas em pó, confeitos, bebidas isotônicas, polpas, sucos de frutas, além de outras aplicações não alimentícias (FRANCO et al., 2002).

Apesar da importância econômica que o urucuzero representa, a ausência de cultivares de alto padrão de qualidade e a utilização de materiais provenientes de mistura de tipos cultivados são, algumas vezes, os principais fatores responsáveis pela má qualidade do produto final produzido. Portanto, é necessário investir em pesquisas científicas, com o objetivo de atender às exigências, em quantidade e qualidade, dos mercados internos e externos. Entretanto, o programa de melhoramento do urucum é ainda incipiente no Brasil, e a principal etapa, também considerada mais crítica, consiste na seleção de genótipos superiores quanto à produção de bixina (CARVALHO et al., 2005b). Dentre as principais metas almejadas atualmente para essa cultura, em face da grande heterogeneidade de tipos existentes na natureza, está a necessidade de caracterizar as variedades produtivas e adaptadas às características edafoclimáticas da cada região do País (CARVALHO et al., 2005b; FRANCO et al., 1990).

No passado, em consequência dos poucos estudos na área de melhoramento genético de urucum, aliado à sua elevada variabilidade genética, optou-se denominar “tipos cultivados”, ao invés de variedade, já que ainda não se tinha um material genético com características genotípicas devidamente fixadas (SÃO JOSÉ, 1990). Entretanto, recentemente, já é possível encontrar na literatura o emprego do termo variedade para alguns materiais vegetais de urucum (MAZZANI et al., 2000; ZALDÍVAR-CRUZ et al., 2003; RIVERA-MADRID et al., 2006). Uma das dificuldades encontradas no estudo do melhoramento genético para essa espécie consiste no desconhecimento quase total sobre

vários aspectos das variedades, como características botânicas, fenológicas e de produção, assim como também a forma de propagação e estudos de seleção das plantas (OLIVEIRA, 1990). Relata que as principais características agronômicas consideradas numa seleção visando ao melhoramento de um tipo cultivado são: tipo; origem; características referentes à produção por um período mínimo de três anos; porte; número de cachos/planta; número de frutos/cacho; número de sementes/fruto; densidade de sementes; uniformidade de maturação; época de produção; coloração do fruto; dureza do fruto; presença de trivalvares; coloração da semente em frutos deiscentes; coloração da flor e tipo de inflorescência; coloração da semente; forma da semente; resistência da queda das sementes em frutos deiscentes; teor de bixina; coloração da flor e tipo de inflorescência; coloração e forma da folha; tolerância a oídio, à cercosporiose e à antracnose; e tolerância ao tripses.

A propagação do urucuzeiro é realizada, preponderantemente, via seminífera. Entretanto, pode ser também realizada por via vegetativa utilizando-se os métodos da estaquia e/ou enxertia (SÃO JOSÉ e REBOUÇAS, 1990). As plantas obtidas via propagação sexuada apresentam variabilidade em consequência da constituição genética, segregação e combinação entre os genes, resultando assim em uma progênie muito heterogênea (LIMA, 1990, 1992). Outra desvantagem da propagação sexuada decorre da dormência das sementes, devido à presença do tegumento que impede a absorção de água na fase de embebição, refletindo em marcante desuniformidade na germinação das sementes. Apesar das vantagens obtidas com o uso desses métodos, no Brasil não existem grandes plantios comerciais estabelecidos via propagação assexuada (LIMA, 1992).

PINHEIRO et al. (1992) mostraram que a variabilidade genética de urucum é grande. Selecionaram e avaliaram 36 matrizes e suas progênies por mudas obtidas por sementes, verificando progênies com teores de norbixina variando de 1,87 % até 5,3 %. Ainda, SÃO JOSÉ e REBOUÇAS (1990) observaram que os teores de bixina podem variar de 1,0 a 6,0% em função da variedade e das condições ecológicas da região. Em vista da dificuldade para se obter progênies homogêneas, existe a necessidade de se produzir cultivares superiores de urucuzeiros mais uniformes pelo melhoramento genético, já que agricultores, em sua maioria, cultivam plantas resultantes da mistura de sementes nativas e provenientes de diferentes regiões do país, o que acarreta em variações nas características dos frutos (MAZZANI, 2000).

Na literatura há poucos relatos de trabalhos sobre o melhoramento genético de urucum. De fato, pouco tem sido feito na área de obtenção de cultivares de urucum, à exceção da seleção de tipos locais e as avaliações tradicionais dos tipos que participam dos

ensaios regionais e nacionais (FRANCO et al., 2002). As principais variedades do urucuzeiro são: ‘Peruana Paulista’ (São Paulo), ‘Bico de Pato’ (Bahia) e ‘Piave Vermelha’ (Pará) (SÃO JOSÉ e REBOUÇAS, 1990). A variedade ‘Bico de Pato’ é caracterizada como vigorosa, indeiscente, com 2,5 % de bixina, produtiva e com florescimento concentrado, sendo principalmente plantada no Estado da Bahia (OLIVEIRA, 1994). Essa variedade é a que tem sido mais utilizada em trabalhos de seleção, visto apresentar diversas características desejáveis, como boa tolerância ao oídio, alta produtividade, teores médios de bixina, acima do mínimo exigido para exportação (2,5 %) e produção mais tardia em relação aos demais tipos cultivados (SÃO JOSÉ et al., 1992).

Porém, mesmo para os plantios comerciais as mudas utilizadas são provenientes de reprodução sexuada, acarretando em heterogeneidade genética. Recentemente, foi apresentada uma metodologia para polinização artificial visando ao melhoramento genético do urucum, observando-se diferenças significativas nos conteúdos de carotenóides totais e bixina em sementes maduras das variedades estudadas (RIVERA-MADRID et al., 2006).

Assim, a utilização da biotecnologia associada aos conhecimentos descritivos das variedades permitirá direcionar os programas de melhoramento, identificando e selecionando combinações promissoras que resultem em tipos produtivamente favoráveis.

A engenharia genética, envolvendo a transformação de células e posterior regeneração *in vitro* de plantas, se aliada a técnicas do melhoramento convencional, tem grande potencial de contribuir para o sucesso dos programas de melhoramento, visto que a obtenção de transgênicos surge como alternativa para produzir tipos cultivados superiores, além de reduzir o tempo para a obtenção de variedades melhoradas (FERREIRA et al., 1998). Dentre os estudos de regeneração *in vitro* realizados para urucum, PAIVA NETO et al. (2003) e CARVALHO et al. (2005a) propuseram sistemas de regeneração a partir de segmentos de hipocótilos, e, mais recentemente, CRUZ (2007) relatou a regeneração adventícia de ramos em explantes radiculares de urucum, surgindo como mais uma alternativa a ser empregada no estabelecimento de protocolos de transformação genética da espécie.

A transformação genética em urucum poderá ser útil não apenas na obtenção de plantas com maiores conteúdos de bixina, mas também no entendimento de vias metabólicas envolvidas na biossíntese desse pigmento exclusivo da espécie, mediante a manipulação e introdução de genes de interesse agrônômico nessa espécie vegetal, como os genes envolvidos na via de biossíntese de bixina. Na literatura levantada, um único

relato de transformação genética de urucum foi detectado, em que um protocolo de transformação via *Agrobacterium tumefaciens* foi proposto para verificar a expressão transiente do gene da  $\beta$ -glucuronidase (*gus*) em duas variedades de urucum (ZALDÍVAR-CRUZ et al., 2003). Todavia, não foram obtidas plantas transgênicas neste estudo.

Portanto, protocolos de propagação *in vitro* para multiplicação e clonagem de genótipos superiores, associados à obtenção de plantas transgênicas e estudos de biologia molecular, surgem como alternativa para subsidiar programas de melhoramento, visando ao aumento da qualidade e da produtividade, além de possibilitar o estudo de rotas metabólicas, como a via de biossíntese do pigmento natural bixina.

## REFERÊNCIAS

- AGNER, A.R.; BARBISAN, L.F.; SCOLASTICI, C.; SALVADORI, D.M.F. Absence of carcinogenic and anticarcinogenic effects of annatto in the rat liver medium-term assay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 1687–1693, 2004.
- APARNATHI, K.; LATA, R.; SHARMA, R. Annatto (*Bixa orellana* L.): Its cultivation preparation and usage. **International Journal of Tropical Agriculture**, v. 8, p. 80-88, 1990.
- CARVALHO, J.F.R.P.; CARVALHO, C.R.; OTONI, W.C. Regeneração *in vitro* de urucum (*Bixa orellana* L.) a partir de diferentes tipos de explantes. **Revista Árvore**, v. 29, n.6, p. 887-895, 2005a.
- CARVALHO, J.F.R.P.; ROBINSON, I.P.; ALFENAS, A.C. Isozymic variability in a Brazilian collection of annatto (*Bixa orellana* L.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 7, p. 653-660, 2005b.
- CASTRO, C.B.; MARTINS, C.S.; FALESI, I.C.; NAZARÉ, R.F.R.; KATO, O.R.; STEIN, R.L.B.; VENTURIERI, M.N. **A cultura do urucum**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agroflorestral da Amazônia Oriental. Brasília: EMBRAPA - SPI, 61p., 1994.
- CRUZ, A.C.F. **Propagação *in vitro* do urucuzeiro (*Bixa orellana* L.) a partir de explantes juvenis e adultos**. Viçosa: MG: Universidade Federal de Viçosa, 2007. Tese de Mestrado – Universidade Federal de Viçosa, 85 p., 2007.
- FERREIRA, M.E.; CALDAS, L.S.; PEREIRA, E.A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa -SPI, p. 21-43, 1998.

- FRANCO, C.F.O.; SILVA, F.C.P.; CAZÉ FILHO, J.; BARREIRO NETO, M.; SÃO JOSÉ, A.B.; REBOUÇAS, T.N.H.; FONTINÉLLI, I.S.C. Etnobotânica e Taxonomia do Urucuzeiro. In: **A cultura do urucum no Brasil**. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Vitória da Conquista - BA, Brasil. 1ª ed. 109 p. 1990.
- FRANCO, C.F.O.; SILVA, F.C.P.; CAZÉ FILHO, J.; BARREIRO NETO, M.; SÃO JOSÉ, A.R.; REBOUÇAS, T.N.H.; FONTINÉLLI, I.S.C. Urucuzeiro – **Agronegócio de corantes naturais**. Emepa, SAIA, João Pessoa, 120p., 2002.
- LAURO, G.J. A primer on natural colors. **Cereal Foods World**, v. 36, n. 11, p. 949-953, 1991.
- LIMA, L.C.F. Opções incrementais integradas na propagação assexual do urucuzeiro. In: **A cultura do urucum no Brasil**. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Vitória da Conquista - BA, Brasil, p. 39-45, 1990.
- LIMA, L.C.F. Opções incrementais sistematizadas na propagação da cultura do urucu (*Bixa orellana* L.). **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v.1, p. 223-226, 1992.
- MAZZANI, E.; MARÍN, C.R.; SEGOVIA, V. Estudio de la variabilidad existente en la colección onoto (*Bixa orellana* L.) del CENIAP; FONAIAP; Venezuela. Variability within the venezuelan annatto (*Bixa orellana* L.) genebank. **Revista Faculdade de Agronomia**, v.17, p. 492-504, 2000.
- MAGDA, R.R. Bixin, a natural food color from annatto. **Food Marketing Technology**, v. 3, p. 6-8, 1989.
- MERCADANTE, A.Z.; PFANDER, H. Carotenoids from annatto: a review. **Recent Research Developments in Agriculture and Food Chemistry**, v. 2, p. 79-91, 1998.
- MERCADANTE, A.Z.; STECK, A.; PFANDER, H. Isolation and identification of new apocarotenoids from annatto (*Bixa orellana*) seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 4, p. 1050-1054, 1997.
- OLIVEIRA, V.P. Genética, melhoramento e variedades do urucum. In: **A cultura do urucum no Brasil**. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Vitória da Conquista-BA, Brasil. p. 61-63, 1990.
- OLIVEIRA, V.P. Melhoramento genético do urucuzeiro: uma visão do setor produtivo. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v.2, p. 1-6, 1994.
- PAIVA NETO, V.B.; MOTA, T.R.; OTONI, W.C. Direct organogenesis from hypocotyl-derived explants of annatto (*Bixa orellana*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 75, p. 159-167, 2003.
- PINHEIRO, A.L.; ALMEIDA, E.C. Avaliação de um híbrido artificial obtido entre duas variedades de urucum (*Bixa orellana* L.) em Viçosa - MG. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v. 1, p. 31-35, 1992.

- PINHEIRO, A.L.; RODRIGUES, J.P.F.; ALMEIDA, E.C. Algumas considerações sobre a fenologia do urucum (*Bixa orellana* L.) em plantios em Viçosa-Minas Gerais. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v. 1, p. 75-79, 1992.
- PRENTICE-HERNANDEZ, C.; RUSIG, O. Extrato de urucum (*Bixa orellana* L.) obtido utilizando álcool etílico como solvente. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 35, p. 63-74, 1992.
- PRESTON, H.D.; RICKARD, M.D. Extraction and chemistry annatto. **Food Chemistry**, v. 5, p. 47-56, 1980.
- RIVERA-MADRID, R.; ESCOBEDO-G.M., R.M.; BALAM-GALERA, E.; VERA-KU, M.; HARRIES, H. Preliminary studies toward genetic improvement of annatto (*Bixa orellana* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 106, p. 165-172, 2006.
- SÃO JOSÉ, A.B.; REBOUÇAS, T.N.H. Propagação de urucueiros e plantio. In: **A cultura do urucum no Brasil**. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Vitória da Conquista - BA, Brasil. 109 p., 1990.
- SÃO JOSÉ, A.B.; REBOUÇAS, T.N.H.; SOUZA, P.J.S.; SOUZA, I.V.B. Seleção de urucueiros (*Bixa orellana* L.), superiores da variedade Bico de Pato na região de Vitória da Conquista - BA. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v. 1, p. 106-113, 1992.
- SILVA, F.C.P.; FRANCO, C.F.O. Etnobotânica e Taxonomia do Urucuzeiro. In: **Urucuzeiro uma alternativa de agronegócio**. João Pessoa: EMEPA - PB, 1<sup>a</sup> ed. 64 p., 2000.
- ZALDÍVAR-CRUZ, J.M.; BALLINA-GOMEZ, H.; GUERRERO-RODRÍGUEZ, C, AVILES-BERZUNZA, E.; GODOY-HERNANDEZ, C.G. *Agrobacterium*-mediated transient transformation of annatto (*Bixa orellana*) hypocotyls with the *gus* reporter gene. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 73, p. 281-284, 2003.

## CAPÍTULO I

### INFLUÊNCIA DE ANTIBIÓTICOS NA MORFOGÊNESE *in vitro* A PARTIR DE EXPLANTES HIPOCOTILEDONARES E RADICULARES DE URUCUM

(*Bixa orellana* L.)

#### RESUMO

A espécie vegetal *Bixa orellana* L. tem despertando grande interesse por acumular em suas sementes um corante natural, bixina, o qual é amplamente empregado na indústria alimentícia. Sua propagação em larga escala tem sido relatada como uma dificuldade a ser vencida. Estudos utilizando hipocótilos e raízes como explantes para multiplicação *in vitro* evidenciaram o potencial propagativo desses sistemas. Assim, os objetivos desse trabalho foram estudar os efeitos de diferentes antibióticos, seletivos e aqueles utilizados na eliminação de bactérias pós-ensaios de transformação genética, sobre a regeneração de brotos a partir de segmentos de hipocótilos e de raízes. No primeiro caso, o uso de 4 mg L<sup>-1</sup> de higromicina para segmentos de hipocótilos das matrizes ‘M1’ e ‘M6’ da variedade ‘Bico de Pato’, não pré-cultivados, foi suficiente para inibir a regeneração de brotos, sendo, todavia, insuficiente para inibir a regeneração de brotos a partir desses explantes submetidos a pré-cultivo em meio MS com 4,56 µM de zeatina. Para raízes da variedade ‘Peruana’, 2,5 mg L<sup>-1</sup> usando esse antibiótico, ocorreu a redução em 98,95 % a frequência de brotações adventícias. Explantes radiculares de ‘Peruana’, mantidos em meio líquido contendo canamicina, apesar da ausência de regeneração de brotos, alongaram-se quando em presença de 12,5 ou 25 mg L<sup>-1</sup> desse agente seletivo. Entretanto, a partir de 50 mg L<sup>-1</sup> de canamicina, foi verificado marcante escurecimento dos explantes. As respostas morfogênicas desses mesmos explantes foram avaliadas quando cultivados em presença de antibióticos usados na eliminação de bactérias pós-ensaios de transformação genética: timentin, cefotaxima, augmentin e meropenem. Para hipocótilos, esses antibióticos inibiram diferencialmente a frequência de regeneração de brotos das variedades estudadas. Para os segmentos radiculares foram verificadas diferenças entre os tratamentos avaliados. Portanto, a resposta morfogênica *in vitro* dos explantes avaliados depende não somente da genótipo-especificidade do material vegetal, mas também da fonte de explante avaliada.

**Palavras chaves:** urucum, propagação *in vitro*, organogênese, cultura de tecidos.

## INTRODUÇÃO

A espécie vegetal *Bixa orellana* L. (urucum), nativa da América tropical, acumula vários carotenóides, sendo a bixina o principal apocarotenóide acumulado por essa espécie, podendo chegar a mais de 80 % no arilo das sementes (MAGDA, 1989; MERCADANTE et al., 1996; MERCADANTE et al., 1997). Esse corante confere cor vermelha às sementes de *B. orellana*, o qual vem sendo utilizado principalmente pela indústria alimentícia, ocupando a segunda colocação dentre os corantes naturais mais utilizados, atrás somente do caramelo, em virtude da crescente proibição da utilização de aditivos sintéticos, devido ao caráter tóxico e cancerígeno desses corantes (APARNATHI et al., 1990; LAURO, 1991; MERCADANTE e PFANDER, 1998; BOUVIER et al., 2003).

Sendo uma planta alógama e conseqüentemente propagada predominantemente por via seminífera, há marcante desuniformidade entre as plantas de uma mesma lavoura, em função da alta taxa de variabilidade genética comum nessa Bixaceae. O pouco conhecimento das variedades de urucum, associados à ausência de cultivares de alto padrão de qualidade além da utilização de materiais provenientes de mistura de tipos cultivados, muitas vezes resulta em má qualidade do produto final obtido (SÃO JOSÉ et al., 1992). Dentre as estratégias que podem ser adotadas para aumentar a produtividade dessa espécie vegetal é via a transferência de genes de interesse agrônômico, como os envolvidos na via de biossíntese de bixina, na determinação das características das flores e dos frutos ou envolvidos no sistema de defesa das plantas contra pragas, além de permitir o estudo funcional de genes, e o entendimento da regulação de vias metabólicas para essa espécie.

O pré-requisito fundamental para a introdução de genes exógenos em plantas está na necessidade de um sistema eficiente de regeneração e de seleção de plantas transformadas. Em urucum, foram relatados trabalhos de regeneração *in vitro* baseados na organogênese, com o emprego de gemas axilares e explantes nodais (D'SOUZA e SHARON, 2001), ou por indução de calogênese a partir de sementes e regeneração de plantas (SHA VALLI KHAN et al., 2002). PAIVA-NETO et al. (2003) e CARVALHO et al. (2005) sugeriram um protocolo eficiente de regeneração via organogênese direta de urucum a partir de explantes hipocotiledonares utilizando citocininas adicionadas ao meio de cultura semi-sólido. Mais recentemente, foi propôsto um sistema de regeneração *in vitro*, a partir de explantes radiculares com eficiente diferenciação de brotações adventícias em meio de cultura líquido (CRUZ, 2007).

Todavia, as respostas morfogênicas dos tecidos cultivados *in vitro* são influenciadas por compostos adicionados ao meio de cultura, incluindo antibióticos, existindo crescente número de trabalhos relatando os efeitos desses compostos na morfogênese vegetal (SARMA et al., 1995; NAUERBY et al., 1997; LING et al., 1998; COSTA et al., 2000; HOFFMANN e VIEIRA, 2000; LIMA et al., 2001; YU et al., 2001; DANILOVA e DOLGIKH, 2004; WIEBKE et al., 2006; ZHI-NENG et al., 2007). De modo particular, isso é importante para o processo de transferência de genes exógenos via transformação por *Agrobacterium* que requer, via de regra, a utilização de antibióticos durante as etapas de seleção e obtenção das plantas transformadas (OGAWA e MII, 2005). Existe a necessidade de eliminar a bactéria do meio, minimizando os riscos de interferirem no crescimento e na regeneração de tecidos de plantas, potencialmente transformados, e reduzir o risco de liberar bactéria engenheirada geneticamente no ambiente; além de evitar a regeneração e o crescimento de plantas falso positivas (OGAWA e MII, 2005). Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos de diferentes antibióticos na regeneração de hipocótilos e raízes, utilizados como explantes, em vista de apresentarem grande potencial regenerativo para a espécie estudada.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal

Sementes maduras de *Bixa orellana* L. da variedade ‘Bico de Pato’ das matrizes ‘M’1 e ‘M6’ obtidas de plantas cultivadas na Unidade de Crescimento de Plantas (UCP) do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, e sementes da variedade ‘Peruana’, cedidas pela Empresa Brasileira de Agropecuária (EMBRAPA - CENARGEN), foram utilizadas para a germinação e obtenção dos explantes utilizados nos experimentos de regeneração contendo diferentes antibióticos.

### Germinação das sementes *in vitro* e obtenção dos explantes

As sementes de urucum foram escarificadas manualmente utilizando um bisturi, na região oposta ao eixo do embrião, com um escalpe. O processo de desinfestação iniciou-se quando as sementes foram imersas em etanol comercial 97 % (v/v) durante 10 min, seguido de incubação por 30 min em solução de hipoclorito de sódio comercial (Super Globo, Brasil) a 2,5 % (v/v) acrescido de Tween 20 a 0,1 % (v/v), e então enxaguadas 5 vezes em água destilada autoclavada. As sementes foram colocadas para germinar em tubos de ensaio (150 x 25 mm; Vidrolabor, Brasil) contendo 10 mL de meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) autoclavado, suplementado com vitaminas do complexo B5 (GAMBORG et al., 1968), 3 % (p/v) de sacarose (Vetec, Brasil), 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol (Sigma Chem. Co., EUA), pH 5,7 ± 0,1, e solidificado com 0,8 % (p/v) de ágar (Ágar Brasileiro, Brasil). Após esse processo, as sementes foram colocadas para germinar

no escuro, sob temperatura de  $25 \pm 2$  °C, por um período de 30 dias antes das plântulas serem enverdecidas no claro.

As plântulas com 45 dias de idade foram usadas para a obtenção dos explantes. Em condições assépticas, hipocótilos e raízes foram removidos e utilizados, separadamente, nos experimentos para a avaliação do efeito dos antibióticos sobre o processo regenerativo de brotos de urucum. Tanto os hipocótilos quanto as raízes foram segmentados em, aproximadamente, 1 cm de comprimento e inseridos nos meios nutritivos MS semi-sólidos e líquidos, respectivamente.

### **Antibióticos usados em ensaios de seleção de plantas transformadas**

Segmentos de hipocótilos com aproximadamente 1 cm, resultantes da germinação de sementes da variedade ‘Bico de Pato’ das matrizes ‘M1’ e ‘M6’, foram cultivados horizontalmente em placas de Petri de poliestireno cristal estéreis (90 x 15 mm; J. Prolab, Brasil) contendo 30 mL de meio de cultura MS, acrescido de 4,56  $\mu\text{M}$  de zeatina (Sigma Chem. Co., EUA) (PAIVA-NETO et al., 2003) e solidificado com 0,9 % (p/v) de ágar (Ágar Brasileiro, Brasil). Os tratamentos consistiram na combinação dos antibióticos higromicina (Sigma Chem. Co., EUA) (2,5; 3,0; 3,5; 4,0  $\text{mg L}^{-1}$ ) e 300  $\text{mg L}^{-1}$  timetin (GlaxoSmithKlyne, Brasil), com 20 explantes em cada uma das 5 repetições, tanto para as condições de explantes submetidos a um período de pré-cultivo por 3 dias, em meio MS semi-sólido adicionado de 4,56  $\mu\text{M}$  de zeatina, quanto para explantes não submetidos ao período de pré-cultivo. Decorridos 15 dias da introdução do material, os explantes foram transferidos para novos meios de cultura, simulando ensaio de seleção de plantas transformadas após a realização da transformação genética.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento sob temperatura de  $25 \pm 2$  °C, fotoperíodo luminoso de 16 h e irradiância de 30  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Passados mais 15 dias, os explantes foram subcultivados e com 45 dias depois da introdução do material, o experimento foi avaliado de acordo com a porcentagem do número de hipocótilos que apresentaram brotações e o número total de brotos produzidos. Os dados experimentais foram submetidos à ANOVA seguidos de teste de Tukey a 5 % de probabilidade, usando o programa estatístico SISVAR.

Raízes resultantes da germinação de sementes de *B. orellana* da variedade ‘Peruana’ foram coletadas e segmentadas apresentando aproximadamente 1 cm e

cultivadas, aproximadamente 0,1 g de massa fresca, correspondendo as raízes de duas plântulas, a partir da região do coleto, em meio líquido descrito anteriormente, acrescido de 4.56  $\mu\text{M}$  de zeatina (CRUZ, 2007) em Erlenmeyers (Vidrolabor, Brasil) de 125 mL de capacidade contendo 30 mL de meio de cultura MS líquido, suplementado com vitaminas B5, 3 % (p/v) de sacarose e 100  $\text{mg L}^{-1}$  de mio-inositol. O pH foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$ , antes da autoclavagem. Os tratamentos consistiram na alteração da concentração de higromicina (1,25; 2,5; 5,0  $\text{mg L}^{-1}$ ) combinados com o antibiótico timetin 300  $\text{mg L}^{-1}$ , sendo avaliada a porcentagem de regeneração de brotos adventícios. Também, foram testadas alterações da concentração de canamicina (12,5; 25; 50; 75; 100  $\text{mg L}^{-1}$ ), combinados com timentin (300  $\text{mg L}^{-1}$ ).

As culturas foram mantidas em mesa agitadora orbital (Tecnal, Brasil) a 100 rpm, em sala de crescimento, sob temperatura de  $25 \pm 2$  °C, fotoperíodo luminoso de 16h e irradiância de 30  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Cada tratamento consistiu de 4 repetições, avaliadas com 40 dias após a introdução do material, de acordo com a porcentagem de raízes que responderam com regeneração de brotos adventícios, utilizando o programa estatístico SISVAR para a ANOVA, seguido de teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

### **Antibióticos usados na eliminação de agrobacteria após ensaio de transformação genética**

Segmentos de hipocótilos com aproximadamente 1 cm, resultantes da germinação de sementes de *B. orellana* das variedades ‘Bico de Pato’, matrizes ‘M1’ e ‘M6’, e ‘Peruana’, foram cultivados horizontalmente em placas de Petri de poliestireno cristal estéreis (90 x 15 mm; J. Prolab, Brasil) contendo 30 mL de meio de cultura MS, pH  $5,7 \pm 0,1$ , suplementado com vitaminas B5, sacarose 3 % (p/v), 100  $\text{mg L}^{-1}$  de mio-inositol, acrescido de 4.56  $\mu\text{M}$  de zeatina, e solidificado com 0,9 % (p/v) de ágar (Brasileiro, Brasil). Os tratamentos consistiram no acréscimo de antibióticos nos meios de cultura nas concentrações de timetin (300 ou 500  $\text{mg L}^{-1}$ ), meropenem (ABL, Brasil) (6,25; 12,5; 25; ou 50  $\text{mg L}^{-1}$ ), augmentin (GlaxoSmithKline, Hungary) (250 ou 500  $\text{mg L}^{-1}$ ), cefotaxima (Nova Farma, Brasil) (250 ou 500  $\text{mg L}^{-1}$ ), e como controle, hipocótilos foram cultivados no mesmo meio de cultura, entretanto sem antibióticos.

Cada tratamento consistiu de 20 explantes em cada uma das 4 repetições. As culturas foram mantidas em sala de crescimento sob temperatura de  $25 \pm 2$  °C, fotoperíodo

luminoso de 16h e irradiância de  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Decorridos 20 dias após a introdução do material, os explantes foram transferidos para novos meios de cultura, e mantidos nas mesmas condições experimentais. O experimento foi concluído após 60 dias de cultivo nos meios semi-sólidos, e avaliados calculando-se o número total de brotos emitidos, a porcentagem do número de hipocótilos que responderam com brotações e a frequência de calejamento dos explantes. Os dados experimentais foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido de teste de Tukey a 5 % de probabilidade, utilizando o programa estatístico SISVAR.

De modo semelhante, raízes resultantes da germinação de sementes de *B. orellana* das variedades 'Bico de Pato', matrizes 'M1' e 'M6', e 'Peruana' foram coletadas, segmentadas em cerca de 1 cm, aproximadamente 0,1 g de massa fresca, correspondendo as raízes de duas plântulas, a partir da região do coleto, e cultivadas em meio de cultura MS líquido suplementado com vitaminas B5, 3 % (p/v) de sacarose,  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de mio-inositol,  $\text{pH } 5,7 \pm 0,1$ , acrescido de  $4,56 \mu\text{M}$  de zeatina (CRUZ, 2007) em Erlenmeyers (Vidrolabor, Brasil) de 125 mL de capacidade contendo 30 mL de meio de cultura, como descrito anteriormente.

Os tratamentos consistiram na utilização de antibióticos nas concentrações de timetin ( $300 \text{ mg L}^{-1}$ ), meropenem (12,5; 25 ou  $50 \text{ mg L}^{-1}$ ), augmentin ( $250 \text{ mg L}^{-1}$ ), e como controle, foi utilizado o mesmo meio de cultura sem o uso de antibióticos. Passados 20 dias após a introdução do material, foi acrescentada a mesma quantidade inicial dos antibióticos nos respectivos meios de cultura. As culturas foram mantidas em mesa agitadora orbital (Tecnal, Brasil) a 100 rpm, em sala de crescimento, sob temperatura de  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , fotoperíodo luminoso de 16h e irradiância de  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Cada tratamento consistiu em 3 repetições, as quais foram avaliadas após 40 dias de cultivo, analisando-se o número de explantes radiculares que responderam com brotações adventícias. Os dados experimentais foram convertidos para porcentagem de raízes que responderam, visto a dificuldade de introduzir o mesmo número de raízes para serem cultivadas. Esses resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido de teste de Tukey a 5 % de probabilidade, utilizando o programa estatístico SISVAR.

## **Obtenção de plantas de urucum a partir dos brotos regenerados**

Após a obtenção dos brotos, tanto em meio semi-sólido quanto em meio líquido, estes foram excisados dos explantes originais, transferidos para meio MS suplementados com 4,56  $\mu\text{M}$  de zeatina (PAIVA-NETO et al., 2003) e solidificado com 0,8 % (p/v) de ágar (Brasileiro, Brasil), em frascos de vidro com capacidade para 250 mL, contendo 50 mL de meio de cultura, como anteriormente descrito, e selados com filme plástico PVC (Goodyear, Brasil). Após 30 dias, os brotos foram transferidos para meio de alongamento das brotações, caracterizado pela substituição da citocinina por 28,87  $\mu\text{M}$  de ácido giberélico ( $\text{GA}_3$ ; Sigma, EUA).

Do mesmo modo, as brotações provenientes das raízes em meio MS líquido, suplementado com vitaminas B5, 3 % (p/v) sacarose (Vetec, Brasil), 100  $\text{mg L}^{-1}$  de mio-inositol (Sigma Chem. Co., EUA), pH  $5,7 \pm 0,1$ , foram primeiramente transferidas para placas de Petri de poliestireno cristal estéreis (90 x 15 mm; J. Prolab, Brasil) contendo 30 mL de meio de indução de brotos solidificado com 0,9 % (p/v) de ágar (Brasileiro, Brasil). Os explantes foram mantidos nesse meio por 75 dias antes de serem subcultivados em meio de indução de brotação solidificado com 0,75 % (p/v) de ágar (Brasileiro, Brasil), em frascos de vidro com capacidade para 250 mL, contendo 50 mL de meio de cultura, como anteriormente descrito, e selados com filme plástico PVC. Após 45 dias foi realizado um terceiro subcultivo, nas mesmas condições já descritas, reduzindo-se a concentração de zeatina para 2,28  $\mu\text{M}$  e acrescentando-se 28,87  $\mu\text{M}$  de ácido giberélico ( $\text{GA}_3$ , Sigma, EUA).

## **Enraizamento e aclimação das plantas**

Os brotos alongados (> 3 cm) foram transferidos para tubos de ensaio (150 x 25 mm; Vidrolabor, Brasil) contendo 2 mL de meio MS sem regulador de crescimento, e mantidos em sala de crescimento sob temperatura de  $25 \pm 2$  °C, fotoperíodo luminoso de 16h e irradiância de 30  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Após o enraizamento, as plantas foram transferidas para copos descartáveis contendo água destilada, e envolvidas com sacos plásticos antes de serem plantados em vasos contendo substrato orgânico (Plantmax<sup>®</sup>).

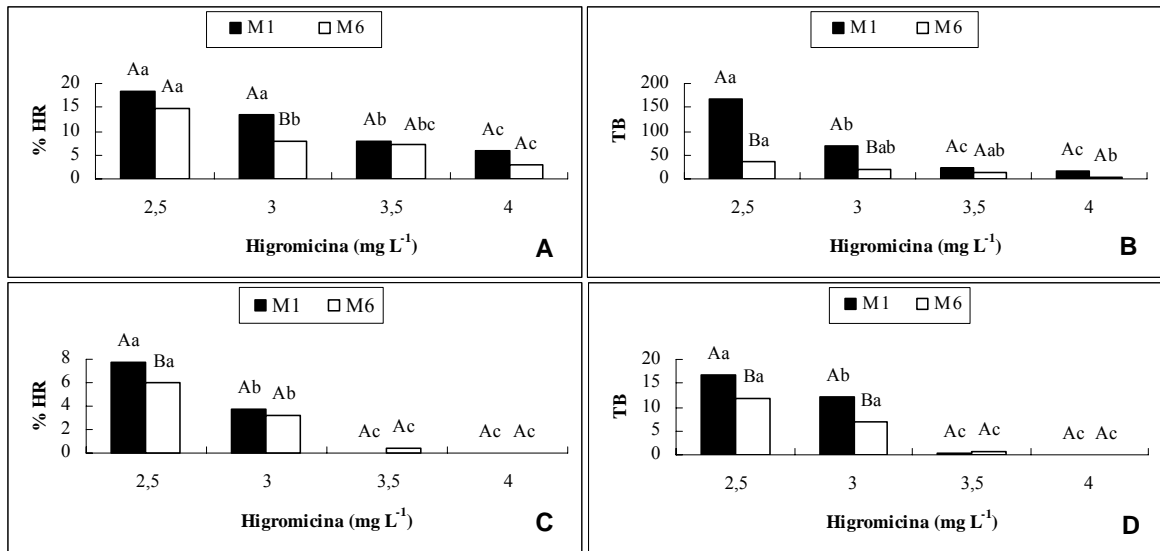
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### **Efeito de antibióticos utilizados na seleção de plantas transformadas**

#### ***Influência do antibiótico higromicina na morfogênese de brotos a partir de hipocótilos de urucum***

Optou-se por avaliar a influência do antibiótico higromicina na morfogênese de hipocótilos nas condições de pré-cultivo e sem pré-cultivo, já que pouco se conhece a respeito de transformação genética de urucum, onde até o presente momento nenhum protocolo de transformação genética seguindo a regeneração de plantas de urucum foi descrito. Após o primeiro cultivo dos hipocótilos em meio seletivo, foi possível observar o início do calejamento nos explantes. O subcultivo dos explantes foi realizado com o objetivo de simular um ensaio de transformação genética e seleção de brotos transformados.

Os tratamentos foram avaliados calculando-se a porcentagem de hipocótilos que responderam com brotações, e o total de brotos produzidos após 45 dias de cultivo, sendo possível observar a diminuição na frequência das respostas morfogênicas para ambos os fatores estudados, nas duas condições propostas (Figura 1). Estudos preliminares mostraram que concentrações menores que  $2,5 \text{ mg L}^{-1}$  de higromicina não foram suficientes para inibir a morfogênese de hipocótilos para essa espécie (dados não mostrados). Portanto, optou-se por avaliar a influência da higromicina sobre a regeneração de brotos, considerando um intervalo de concentração maior desse antibiótico ( $2,5\text{-}4,0 \text{ mg L}^{-1}$ ).



**Figura 1.** Influência do antibiótico higromicina associado a 300 mg L<sup>-1</sup> de timetin na morfogênese de brotos de urucum das variedades ‘Peruana’ e ‘Bico de Pato’, matrizes ‘M1’ e ‘M6’. Os valores 2,5; 3,0; 3,5; ou 4,0 mg L<sup>-1</sup> representam as concentrações de higromicina utilizadas nos meios. **A** - (% HR) porcentagem de hipocótilos pré-cultivados que responderam com brotações; **B** - (TB) total de brotos emitidos de hipocótilos pré-cultivados; **C** - (% HR) porcentagem de hipocótilos não pré-cultivados que responderam com brotações; **D** - (TB) total de brotos emitidos de hipocótilos não pré-cultivados. Comparações de médias entre os tratamentos são indicadas por letras minúsculas; enquanto que as comparações de médias dentro de cada tratamento são indicadas por letras maiúsculas. Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5 %.

As análises de médias apresentadas nos gráficos mostraram que a quantidade máxima de higromicina utilizada, 4 mg L<sup>-1</sup>, não conteve a diferenciação de brotações naqueles tratamentos em que os hipocótilos foram submetidos a pré-cultivos, os quais ainda apresentaram 36 e 11 % de hipocótilos com brotos, para as duas matrizes estudadas ‘M1’ e ‘M6’, respectivamente (Fig. 1A). Essa concentração de higromicina nos meios contendo hipocótilos pré-cultivados, resultou na regeneração de 95 e 11 brotações, de tamanho reduzido, para as matrizes ‘M6’ e ‘M1’, respectivamente (Fig. 1B).

Examinando-se os resultados é possível afirmar que na condição de hipocótilos pré-cultivados, a matriz ‘M6’ apesar de não apresentar diferença em relação à matriz ‘M1’, utilizando 4 mg L<sup>-1</sup> de higromicina, teve uma redução nas condições iniciais (2,5 e 3,0 mg L<sup>-1</sup> de higromicina) na frequência de emissão de brotos com relação a matriz ‘M1’, evidenciando a diferença de resposta entre os genótipos avaliados (Fig. 1B).

Avaliando-se as médias para a frequência de brotações e hipocótilos que responderam, considerando hipocótilos não pré-cultivados, pôde-se observar que tanto a concentração de 3,5 quanto 4,0 mg L<sup>-1</sup> de higromicina não apresentaram diferenças, sendo suficientes para reduzir a morfogênese dos explantes das duas matrizes (Fig. 1A). A concentração de 3,5 mg L<sup>-1</sup> de higromicina ao meio foi suficiente por conter 98 e 100 % das brotações ‘M1’ e ‘M6’, respectivamente, com 100 % de inibição dos hipocótilos avaliados e emissão de brotos nos meios suplementados com higromicina 4,0 mg L<sup>-1</sup> (Fig. 1D).

Os resultados apresentados para a condição de hipocótilos não submetidos à pré-cultivo, também mostraram diferenças na resposta morfogênica entre as duas matrizes analisadas, revelando médias superiores de número de brotos para a matriz ‘M1’, utilizando 2,5 e 3,0 mg L<sup>-1</sup> de higromicina no meio (Fig. 1D). Os hipocótilos avaliados que não apresentaram resposta morfogênica, caracterizaram-se por intensa oxidação, enquanto que as brotações avaliadas foram pouco desenvolvidas com o aumento da concentração de higromicina no meio de cultura, assim como também a incidência de calejamento nos explantes.

O número de brotações produzidas nos tratamentos submetidos à pré-cultivo foi maior do que os tratamentos realizados sem pré-cultivos, com o surgimento de 10 e 3 vezes mais brotos, para as matrizes ‘M1’ e ‘M6’, respectivamente, no tratamento contendo 2,5 mg L<sup>-1</sup> de higromicina. No tratamento considerando 3,5 mg L<sup>-1</sup> de higromicina foi possível observar a emissão de 115 e 17,5 vezes mais brotos, para as matrizes ‘M1’ e ‘M6’, respectivamente, na condição de pré-cultivo, comparando-se com os hipocótilos não submetidos à pré-cultivo.

Diferentemente, utilizando 3,5 mg L<sup>-1</sup> de higromicina foi possível verificar a emissão de apenas uma brotação, em média, para as duas matrizes não submetidas à pré-cultivo. A utilização do pré-cultivo dos explantes, possivelmente, induziu a competência organogênica dos explantes, sendo observado, portanto regeneração de gemas e brotos nos explantes ainda que expostos a 4 mg L<sup>-1</sup> do antibiótico seletivo, resultando em maiores frequências organogênicas, visto o período de pré-cultivo induzir a divisão celular nos explantes antes de cultivá-los em meio contendo o agente seletivo.

Portanto, a concentração de 4 mg L<sup>-1</sup> de higromicina pode ser usada para inibir completamente a morfogênese de explantes hipocotiledonares das matrizes ‘M1’ e ‘M6’ da variedade ‘Bico de Pato’, não submetidos à um período de pré-cultivo, em ensaios de transformação genética. Entretanto, estudos posteriores deverão ser realizados para avaliar

o efeito de concentrações maiores de higromicina na morfogênese de hipocótilos de urucum, para essas duas matrizes, submetidos à pré-cultivo de três dias nas mesmas condições de cultivo.

Como se observou diferença na resposta morfogênica entre as matrizes ‘Bico de Pato’, e entre essa variedade e a ‘Peruana’, a utilização do antibiótico higromicina influencia de modo diferenciado, a frequência de brotos formados, quando associado ao antibiótico timetin, refletindo assim, o caráter de genótipo-especificidade de respostas morfogênicas das plantas de urucum. O comportamento morfogênico dos explantes foi influenciado negativamente pela adição de higromicina no meio. A concentração máxima do agente seletivo utilizado é importante para evitar a regeneração de plantas falso positivas, sem ocasionar a morte dos hipocótilos utilizados em ensaios de transformação gênica.

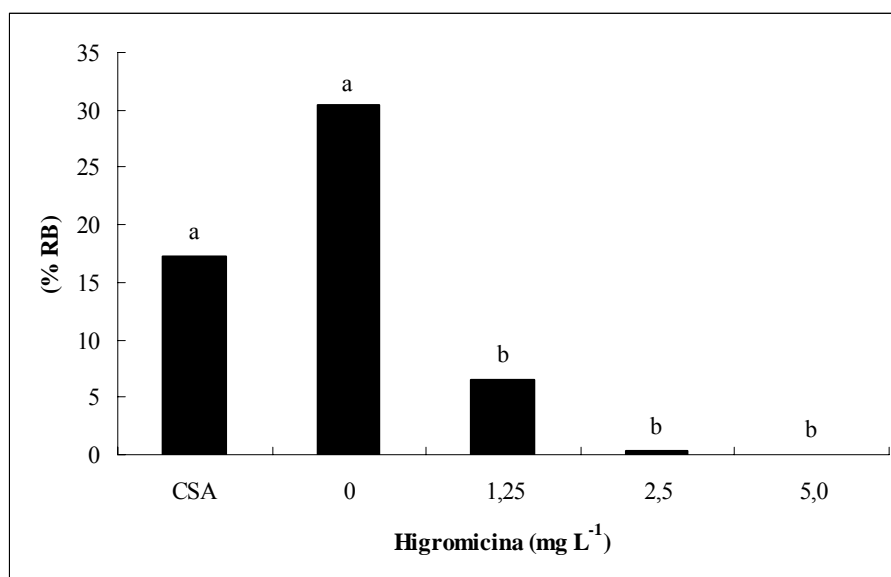
O uso de um bom marcador de seleção é fundamental para uma eficiente recuperação *in vitro*. A higromicina é um antibiótico que atua na proteína ribossomal 80s, bloqueando a síntese de proteínas em eucariotos (EADY e LISTER, 1998). Resultados positivos de sua utilização em protocolos de transformação de várias espécies como tabaco (WANG e WATERHOUSE, 1997), videira (TORREGROSA e BOUQUET, 1997), café (HATANAKA et al., 1999), berinjela (PICOLI et al., 2000) e citrus (COSTA et al., 2002), dentre outros, já foram relatados.

O menor número de escapes e as menores concentrações de higromicina, comparadas a outros produtos utilizados para seleção de células transformadas, fazem deste antibiótico uma alternativa promissora a ser utilizada em protocolos de transformação genética. Portanto, o antibiótico higromicina se mostrou promissor, podendo ser utilizado como mais uma opção de agente seletivo em futuras ensaiod de transformação genética, já que a literatura relata a existência de apenas um trabalho realizado por ZALDÍVAR-CRUZ et al. (2003), o qual avaliou a expressão transiente do gene para a  $\beta$ -glucuronidase, utilizando 75 mg L<sup>-1</sup> de canamicina como agente seletivo de segmentos hipocotiledonares de duas variedades de urucum, ‘Peruana’ e ‘Crioula’, transformadas com *Agrobacterium tumefaciens*.

### ***Influência dos antibióticos higromicina e canamicina na morfogênese de raízes da variedade 'Peruana'***

Após 25 dias foram observadas as primeiras brotações adventícias, e aos 40 dias de cultivo foi realizado o levantamento dos dados (Fig. 2). Observou-se redução da frequência de raízes que responderam com diferenciação de brotações, com o aumento da concentração do antibiótico higromicina no meio de cultura. O tempo de cultivo resultou em algumas brotações hiperídricas, visto que as brotações não surgiram todas ao mesmo tempo. Esses brotos hiperídricos foram contabilizados e usados na comparação de médias.

A emissão de brotos ocorreu, preferencialmente, nas extremidades das raízes que apresentavam diâmetro maior, principalmente em segmentos radiculares da raiz principal. Não foram encontradas brotações adventícias nas raízes secundárias de pequeno diâmetro e nem nas regiões das raízes que alongaram após o período de cultivo, semelhante ao relatado por CRUZ (2007). Em geral, as brotações originadas das raízes cultivadas em meio contendo higromicina, apresentaram tamanho reduzido, em relação às brotações emitidas nas condições controles, utilizando o fitorregulador zeatina mais o antibiótico timetin, ou somente zeatina. Usou-se zeatina em função da necessidade da presença de fitorreguladores no meio de cultura para induzir a emissão de brotos adventícios de urucum sob luminosidade (CRUZ, 2007).



**Figura 2:** Influência dos antibióticos timetin e higromicina na organogênese de raízes de urucum da variedade ‘Peruana’. CSA representa o tratamento controle sem antibiótico; RB representa o percentual médio de raízes que responderam com brotações. Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5 %.

A análise estatística não mostrou diferença entre os meios contendo apenas zeatina e o meio suplementado com zeatina e timetin. Entretanto, essas condições se mostraram superiores aos demais tratamentos que consideram o aumento progressivo de higromicina no meio de cultivo, chegando a zero por cento de emissão de brotações adventícias provenientes de raízes cultivadas quando a concentração de higromicina atingiu 5,0 mg L<sup>-1</sup> no meio de cultivo.

O tratamento contendo 1,25 mg L<sup>-1</sup> de higromicina, que consistiu no experimento que possuía a concentração mais baixa desse antibiótico no meio de cultura, reduziu a frequência de brotações em 78,89 %; enquanto que o tratamento contendo 2,5 mg L<sup>-1</sup> de higromicina reduziu 98,95 % a frequência de brotações emitidas pelas raízes. O tratamento utilizando 5,0 mg L<sup>-1</sup> de higromicina apesar de ter resultado na inibição de 100 % das brotações, foi observado um escurecimento dos explantes radiculares, diferentemente da cor visualizada pelas raízes nos demais tratamentos, que apresentaram colorações mais claras, com algumas raízes alongadas, exceto para o controle desprovido dos antibióticos.

A figura 3A mostra a emissão de brotos de pequeno tamanho e alguns explantes radiculares alongados resultantes do cultivo das raízes com 1,25 mg L<sup>-1</sup> de higromicina,

enquanto que na figura 3B é possível observar o escurecimento dos segmentos de raízes e a ausência da emissão de brotos ou alongamento das mesmas. O alongamento de algumas raízes, visualizado tanto no controle quanto nos tratamentos contendo concentrações reduzidas de higromicina, 1,25 e 2,5 mg L<sup>-1</sup>, deveu-se a influência do antibiótico timetin, o qual não exerceu efeito sobre as raízes no tratamento utilizando 5 mg L<sup>-1</sup> de higromicina no meio de cultivo.

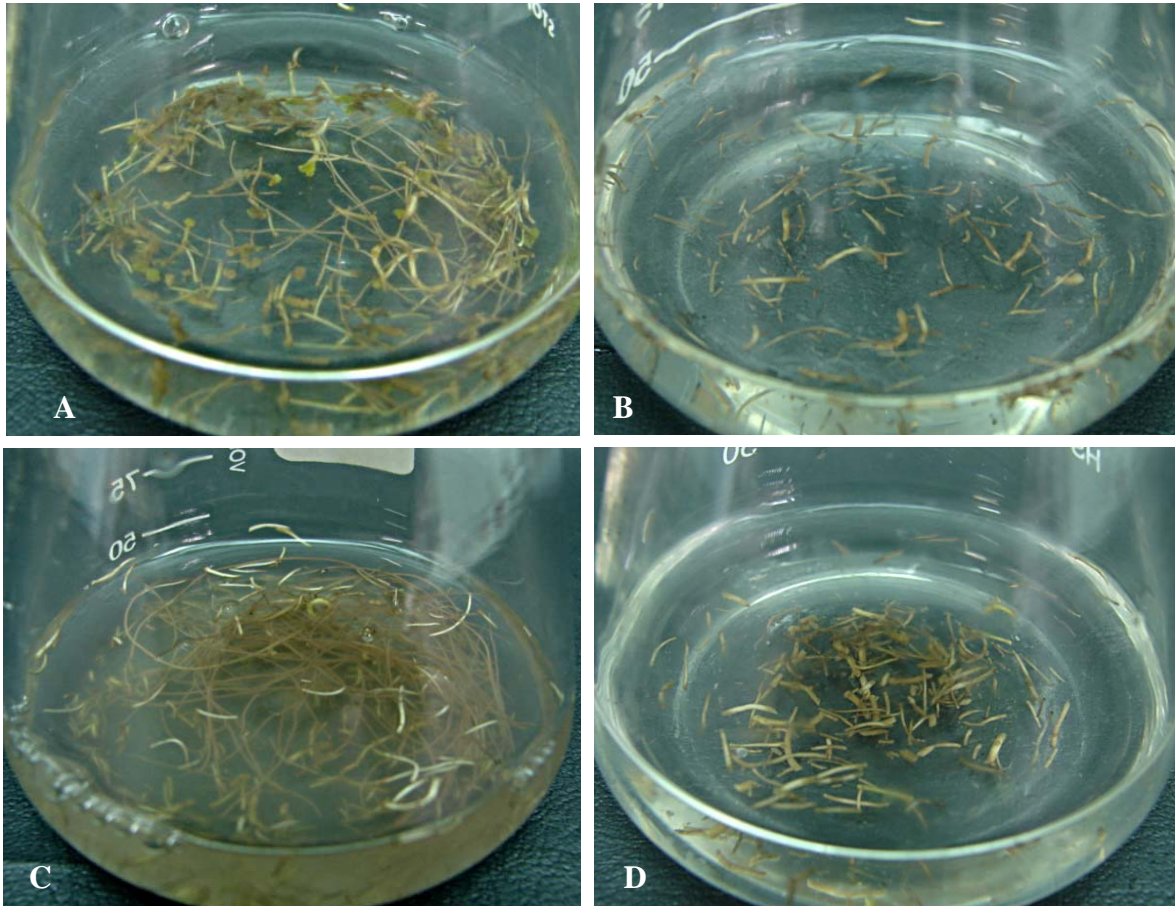
De acordo com os resultados apresentados, 5 mg L<sup>-1</sup> de higromicina foi suficiente para inibir a morfogênese *in vitro* de raiz para a variedade 'Peruana'. Entretanto outros estudos devem ser conduzidos com o objetivo de identificar uma quantidade de higromicina inferior à máxima utilizadas neste experimento, e superior a 2,5 mg L<sup>-1</sup>, que promova a inibição da regeneração de raízes, sem comprometer a qualidade ou o escurecimento dos explantes utilizados em ensaios de transformação genética para evitar a seleção de plantas falso positivas.

Igualmente ao realizado para higromicina, o experimento utilizando canamicina, como agente seletivo em diferentes concentrações no meio de cultura, foi realizado para raízes de *B. orellana* 'Peruana'. Após 25 dias de cultivo, observaram-se o alongamento de alguns explantes radiculares mantidas, principalmente, no tratamento contendo 12,5 mg L<sup>-1</sup> de canamicina, e em menor expressividade, nos meios contendo 25 mg L<sup>-1</sup> de canamicina.

O alongamento das raízes ficou evidente ao final do experimento, como é possível observar na figura 3C. A partir da concentração de 50 mg L<sup>-1</sup> de canamicina no meio, não foi mais visualizado o alongamento das raízes, mas somente o escurecimento das mesmas. A utilização de 100 mg L<sup>-1</sup> desse antibiótico no meio resultou no escurecimento intenso das raízes cultivadas. Comparando-se os dois experimentos utilizando os antibióticos canamicina e higromicina como agentes seletivos em ensaios de transformação de plantas, o experimento realizado com canamicina provocou 100 % de inibição de brotações em todas as concentrações de canamicina avaliadas.

Um estudo apresentado por LIMA et al. (2001) relatando a tolerância de calos de cana-de-açúcar a antibióticos, observaram que antibióticos utilizados em sistemas de transformação genética, canamicina e higromicina, inibiram a indução de calos e morfogênese *in vitro*, diferentemente do encontrado para geneticina. Em urucum, a presença de 12,5 mg L<sup>-1</sup> de canamicina no meio inibiu a regeneração de brotos *in vitro*, o que é uma vantagem quanto à utilização desse antibiótico como agente seletivo. Entretanto, estudos posteriores, avaliando a influência desse antibiótico na morfogênese de raízes utilizando concentrações mais baixas desse antibiótico, deverão ser realizados para

verificar se a regeneração de brotos a partir de raízes cultivadas com esse antibiótico em baixas concentrações não compromete a regeneração de brotos, e assim utilizar  $12,5 \text{ mg L}^{-1}$  ou uma concentração menor de canamicina no meio de cultivo.



**Figura 3:** Raízes de *B. orellana* 'Peruana' com 40 dias, cultivadas em meio líquido contendo zeatina e  $300 \text{ mg L}^{-1}$  de timetin, utilizando higromicina ou canamicina como agentes seletivos. **A** – Brotações emitidas de raízes cultivadas em meio contendo  $1,25 \text{ mg L}^{-1}$  de higromicina; **B** - Raízes cultivadas em meio contendo  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$  de higromicina; **C** - Raízes cultivadas em meio contendo  $12,5 \text{ mg L}^{-1}$  de canamicina; **D** - Raízes cultivadas em meio contendo  $75 \text{ mg L}^{-1}$  de canamicina.

## **Efeito de antibióticos utilizados na eliminação de bactérias do meio de cultura**

### ***Influência de antibióticos na morfogênese de brotos a partir de hipocótilos de urucum***

Os explantes hipocotiledonares apresentaram início de calejamento com 15 dias de cultivo, e um número reduzido de pequenas brotações foi observando, nos meios sem antibiótico ou suplementado com 250 mg L<sup>-1</sup> de augmentin. Entretanto, a maioria dos brotos emergiu após 20 dias do subcultivo, assim como também a intensidade de calejamento e oxidação dos explantes. Explantes com altos níveis de oxidação não responderam e apresentaram-se necrosados.

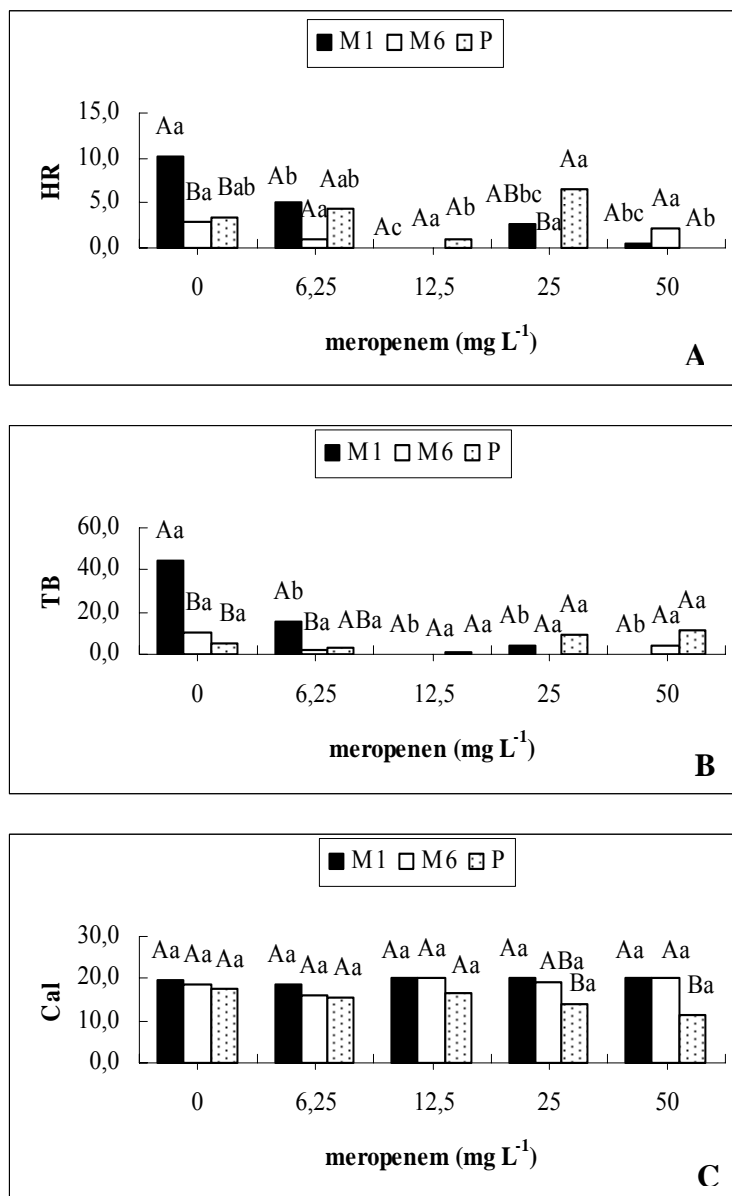
Após a coleta dos dados, foi realizada uma análise para inferir, quantitativamente, a respeito de quatro doses do antibiótico meropenem (6,25; 12,5; 25; e 50 mg L<sup>-1</sup>) para cada tipo vegetal, já que esse antibiótico tem sido utilizado positivamente em estudos de transformação genética. Considerando o número de hipocótilos que emitiram brotações, a matriz 'M1' apresentou melhor desempenho na condição controle, e dentre as concentrações do antibiótico utilizado, 6,25 mg L<sup>-1</sup> e 25 mg L<sup>-1</sup> apresentaram os melhores resultados para as variedades 'Bico de Pato', matriz 'M1', e 'Peruana', respectivamente, em relação ao número de hipocótilos que apresentaram brotações; enquanto que a matriz 'M6' da variedade 'Bico de Pato' não resultou em diferenças entre os tratamentos (Fig. 4A).

Também não foram encontradas diferenças entre o número total de brotos produzidos para a matriz 'M6' e 'Peruana; mas a matriz 'M1' apresentou melhor resultado no meio sem o uso do antibiótico meropenem. Nos tratamentos controle e 6,25 mg L<sup>-1</sup>, a matriz 'M1' apresentou médias superiores as demais plantas, enquanto que nos demais tratamentos não ocorreram diferença de médias entre as plantas estudadas (Fig. 4B).

A análise de calejamento dos hipocótilos mostrou que todos os antibióticos influenciaram positivamente o aumento dessa característica, não apresentando diferenças entre os tratamentos, apesar de ter sido observado uma diminuição na média de calejamento dos explantes do tipo 'Peruana' nos tratamentos contendo 25 e 50 mg L<sup>-1</sup> de meropenem, além de ser observado que a alta incidência de calejamento dos explantes inibiu a regeneração de brotos. (Fig. 4C).

Portanto, exceto para os hipocótilos da matriz 'M1' que sofreram influência negativa na presença do antibiótico meropenem nos distintos tratamentos, a regeneração de brotos a partir dos hipocótilos da matriz 'M6' não sofreu influência desse antibiótico,

assim como também foi verificado para o número de brotos produzido para o tipo cultivar ‘Peruana’.



**Figura 4:** Influência do antibiótico meropenem (0; 6,25; 12,5; 25; e 50 mg L<sup>-1</sup>) na organogênese de brotos provenientes de hipocótilos de urucum das variedades ‘Bico de Pato’, matrizes ‘M1’ e ‘M6’, e ‘Peruana’. **A** – (HR) Número de hipocótilos que responderam com brotações; **B** – (TB) Total de brotos; **C** – Número de hipocótilos que calejaram. Comparações de médias entre os tratamentos são indicadas por letra minúscula, enquanto que as comparações de médias dentro de cada tratamento são indicadas por letra maiúscula. Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5 %.

Após as análises realizadas para avaliar a influência do antibiótico meropenem na morfogênese *in vitro* de brotos de urucum, procedeu-se com as análises para avaliar a influência dos três tipos de antibióticos (meropenem, augmentin e timetin) na influência da morfogênese de brotos para essa espécie vegetal. Para as análises, consideraram-se os mesmos aspectos considerados para o antibiótico meropenem (número de hipocótilos que produziram brotos, número de brotos totais e número de explantes calejamentos), e utilizando 6,25 e 25 mg L<sup>-1</sup> do antibiótico meropenem, já que dentre as concentrações avaliadas desse antibiótico, foram as que induziram as melhores respostas morfogênicas dos explantes (tabela 1).

Em geral, os antibióticos augmentin, cefotaxima e timetin acarretaram drástica redução no número de hipocótilos que apresentaram brotações, sendo que a matriz 'M1' apresentou melhor média no tratamento controle, com redução do número de hipocótilos, principalmente utilizando-se os antibióticos augmentin, cefotaxima e timetin, quando comparados ao antibiótico meropenem. A matriz 'M6' e a variedade 'Peruana' não mostraram diferença entre as médias dos tratamentos avaliados.

Em relação ao número total de brotos produzidos, as matrizes 'M1' e 'M6' e a variedade 'Peruana' responderam melhor nos meios sem antibióticos, sendo que este último tipo apresentou as piores médias com o uso dos antibióticos timetin e cefotaxima, respondendo semelhante à condição controle, quando foi utilizado 25 mg L<sup>-1</sup> de meropenem. O tratamento contendo 6,25 mg L<sup>-1</sup> de meropenem produziu mais brotação que o uso dos demais antibióticos somente para a matriz 'M1'.

As brotações emitidas nos tratamento utilizando diferentes concentrações de meropenem para as duas matrizes 'Bico de Pato', apresentaram hiperidricidade e não foram contabilizadas para o cálculo da diferença entre médias, sendo considerados apenas as brotações normais, devido a dificuldade de se propagar brotos hiperídricos provenientes desse tipo de explante. Ainda, alguns antibióticos resultaram em alta porcentagem de oxidação dos explantes, como é possível observar nos resultados alcançados com timetin, augmentin e cefotaxima, o que de modo geral prejudicou não apenas a incidência de brotações, mas também auxiliou no calejamento dos explantes.

Também, não foram observadas alterações na frequência de hipocótilos calejados, em relação à condição controle, exceto pelo uso do antibiótico cefotaxima que acarretou diminuição do número de hipocótilos calejados para os três tipos de plantas estudadas. Esses resultados permitiram concluir que nas condições experimentais avaliadas, ocorreu a

inibição *in vitro* da regeneração de brotos a partir de hipocótilos dos três tipos de plantas analisados.

Tabela 1: Efeito de antibióticos meropenem (Mero), augmentin (Aug), cefotaxima (Cefo) e timentin (Tim) na indução de brotos por número de hipocótilos de urucum.

PLANTA	TRATAMENTOS									
	Controle	Mero 6.25	Mero 25	Aug 250	Aug500	Cefo 250	Cefo 500	Tim 300	Tim 500	
<b>HR</b>	M1	10.3 Aa	5 Ab	2,8 ABbc	3 Abc	0.8 Ac	0 Ac	0 Ac	0 Ac	0.8 Ac
	M6	3 Ba	1 Aa	0 Ba	0.8 Aa	0 Aa	0 Aa	0 Aa	0 Aa	0.8 Aa
	P	3.5 Bab	4.3 Aab	6,5 Aa	2.5 Ab	2.3 Ab	0.5 Ab	2 Ab	1 Ab	1.3 Ab
<b>TB</b>	M1	45 Aa	15.8 Ab	4,3 Ac	6.3 Abc	1 Ac	0 Ac	0 Ac	0 Ac	2.5 Ac
	M6	10 Ba	1.8 Bb	0 Ab	1.5 Ab	0 Ab	0 Ab	0 Ab	0 Ab	0.8 Ab
	P	4.8 Ba	2.8 Bab	9 Aa	2.3 Aab	3.3 Aab	0.5 Ab	2.5 Aab	1.5 Ab	1.8 Ab
<b>Cal</b>	M1	19.5 Aa	18.5 Aa	20 Aa	19.3 Aa	16 Aa	20 Aa	4.3 Bb	15.8 Aab	20 Aa
	M6	18.8 Aa	16 Aa	19,3 Aa	16.8 Aa	13.3 Aab	3.8 Cb	6 Bb	20 Aa	15 Aa
	P	17.5 Aa	15.8 Aa	14 Ba	14.8 Aa	16 Aa	10.8 Bb	14.3 Aa	12 Aa	15 Aa

Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). HR: brotos responsivos; TB: total de brotos; Cal: calejamento.

Letras maiúsculas comparam cada planta em cada tratamento (na linha); letras minúsculas comparam o conjunto de plantas em cada tratamento (coluna).

Como foram observadas diferenças entre os tipos de plantas analisadas, a resposta morfogênica observada para urucum foi genótipo dependente, semelhante aos resultados encontrados para a avaliação do efeito de antibióticos utilizados como agentes seletivos, relatados anteriormente, e os resultados obtidos por CRUZ (2007), o qual avaliou respostas morfogênicas *in vitro* de dez matrizes da variedade ‘Bico de Pato’. Em um experimento realizado por ALMEIDA et al. (1992), variedades de urucum que apresentavam maior teor de bixina, ou seja, apresentando característica agrônômica superior, possuem melhor índice germinativo, relatando que tipos cultivados superiores respondem melhor agronomicamente.

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram concluir que a utilização de antibióticos no meio de cultivo de explantes hipocotiledonáres, resultou na inibição da indução de brotos, principalmente para as matrizes ‘M1’ e ‘M6’ da variedade ‘Bico de Pato’. WIEBKE et al. (2006) verificaram a influência de diferentes antibióticos na transformação genética de soja, verificando que a sobrevivência dos embriões utilizados no experimento foi afetada negativamente pela adição de cefotaxima no meio de cultivo, diferentemente do encontrado quando se utilizou carbenicilina, e a associação desses dois antibióticos não comprometeu a sobrevivência dos embriões.

TANPRASERT e REED (1998) mostraram que combinações de antibióticos foram mais efetivos que antibióticos isolados, na indução de brotações, quando usados em

morango, envolvendo a combinação de timetin, estreptomicina e gentamicina. ZHI-NENG et al. (2007) mostraram a redução de brotações em *Platanus acerifolia*, cultivada *in vitro*, utilizando cefotaxima e 100 e 500 mg L<sup>-1</sup> de timetin, entretanto 300 mg L<sup>-1</sup> desse antibiótico facilitou a regeneração de brotos significativamente.

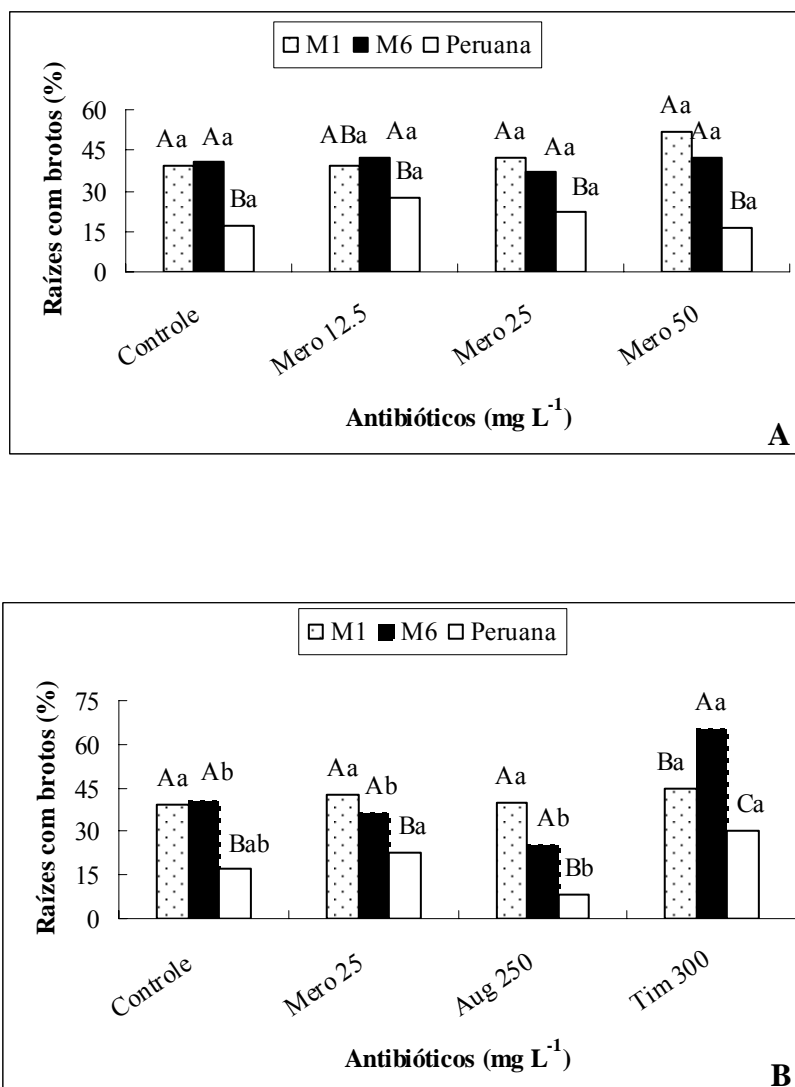
Assim, experimentos avaliando o potencial regenerativo de explante hipocotiledonares, envolvendo a combinação de antibióticos, assim como também, diferentes concentrações de antibióticos, ou subcultivo dos explantes alterando-se a concentração dos antibióticos utilizados, deverão ser realizados para verificar se tais combinações reduzirão a oxidação dos explantes e promoverá maior frequência de brotações, provando assim, não influenciarem negativamente na morfogênese de brotos de explantes hipocotiledonares utilizados em ensaios de transformação genética.

#### ***Influência de antibióticos na morfogênese de brotos a partir de explantes radiculares de urucum***

As primeiras brotações adventícias foram visualizadas com 25 dias após a introdução dos segmentos radiculares de *B. orellana* em meio líquido. Optou-se utilizar 40 dias de cultivo para evitar a hiperidricidade dos explantes. Entretanto, ainda foi visualizado alguns explantes hiperídricos, sendo, portanto necessário reduzir o tempo de cultivo das raízes, em futuros experimentos. Optou-se usar zeatina para induzir as brotações, visto os resultados alcançados por CRUZ (2007), que relatou a necessidade da presença de fitorreguladores no meio de cultura para induzir a emissão de brotos adventícios de urucum, sendo a zeatina e o tidiazurom, os reguladores de crescimento que promoveram maior número de brotações em meios líquido sob luminosidade.

Apesar da hiperidricidade apresentada por algumas brotações, estas foram contabilizadas para o cálculo da média entre os tratamentos, já que foi possível reverter o fenótipo de hiperidricidade. Observou-se que a emissão de brotos ocorreu em regiões dos explantes radiculares de diâmetro maior, não sendo, portanto, encontrado brotos emitidos nas regiões de meristema das raízes, que possuem alto potencial de crescimento. Também, o tamanho das brotações variou, sendo possível encontrar brotações menores e maiores, de acordo com o tempo de emissão de cada uma delas. Semelhante ao encontrado por CRUZ (2007) a maior incidência de formação de gemas, em raízes de urucum cultivadas em meio

líquido, ocorreu nas extremidades das raízes, em comparação as regiões centrais dos explantes radiculares de urucum.



**Figura 5:** Influência dos antibióticos meropenem (Mero), augmentin (Aug) e timetin (Tim) na organogênese de brotos provenientes de raízes de urucum das variedades ‘Bico de Pato’, matrizes ‘M1’ e ‘M6’, e ‘Peruana’. **A** – Comparação entre as diferentes concentrações do antibiótico meropenem (0; 12,5; 25; e 50 mg L<sup>-1</sup>); **B** - Comparação entre os antibióticos meropenem (25 mg L<sup>-1</sup>), augmentin (250 mg L<sup>-1</sup>) e timetin (300 mg L<sup>-1</sup>), e o controle. Comparações de médias entre os tratamentos são indicadas por letra minúscula, enquanto que as comparações de médias dentro de cada tratamento são indicadas por letra maiúscula. Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5 %.

A influência dos antibióticos na morfogênese de brotos de urucum a partir de explantes radiculares é mostrada nos gráficos da figura 5. A análise quantitativa entre as distintas concentrações do antibiótico meropenem evidenciou que não ocorreu diferença entre as concentrações desse antibiótico (Fig. 5A). A porcentagem de raízes que responderam com a emissão de brotações adventícias foi significativamente igual para os três tipos de plantas estudadas, variedades ‘Bico de Pato’, ‘M1’ e ‘M6’, e ‘Peruana’. Entretanto, as matrizes da variedade ‘Bico de Pato’ apresentaram médias superiores àquelas encontradas para a variedade ‘Peruana’.

Comparando-se os explantes radiculares após o tempo de cultivo em meio líquido, observou-se calejamento nas raízes da variedade ‘Peruana’ no meio suplementado com 25 mg L<sup>-1</sup> de meropenem. A análise qualitativa entre os diferentes antibióticos não evidenciou diferença entre os tratamentos para a matriz ‘M1’, a qual apresentou média superior a variedade ‘Peruana’ e inferior a matriz ‘M6’ quando foram utilizados 300 mg L<sup>-1</sup> do antibiótico timetin no meio de cultivo (Fig. 5B).

A matriz ‘M6’ da variedade ‘Bico de Pato’ apresentou o melhor resultado morfológico quando suas raízes foram subcultivadas em meio contendo 300 mg L<sup>-1</sup> de timetin, não apresentando diferença entre os demais antibióticos analisados. De modo semelhante aos resultados apresentados para a matriz ‘M1’, essa matriz também apresentou médias superiores que o encontrado para a variedade ‘Peruana’.

A variedade ‘Peruana’ apresentou melhores respostas morfológicas nos tratamentos em que os explantes radiculares foram cultivados em meio contendo 300 mg L<sup>-1</sup> de timetin e 25 mg L<sup>-1</sup> de meropenem, apesar do controle não ter apresentado diferença entre esses dois tratamentos, mas também ter sido considerado inferior e igual à média das raízes cultivadas em meio contendo 250 mg L<sup>-1</sup> de augmentin. Essa última análise resultou nos valores mais baixos da porcentagem de raízes que responderam com brotações, comparando-se todos os antibióticos e as plantas estudadas.

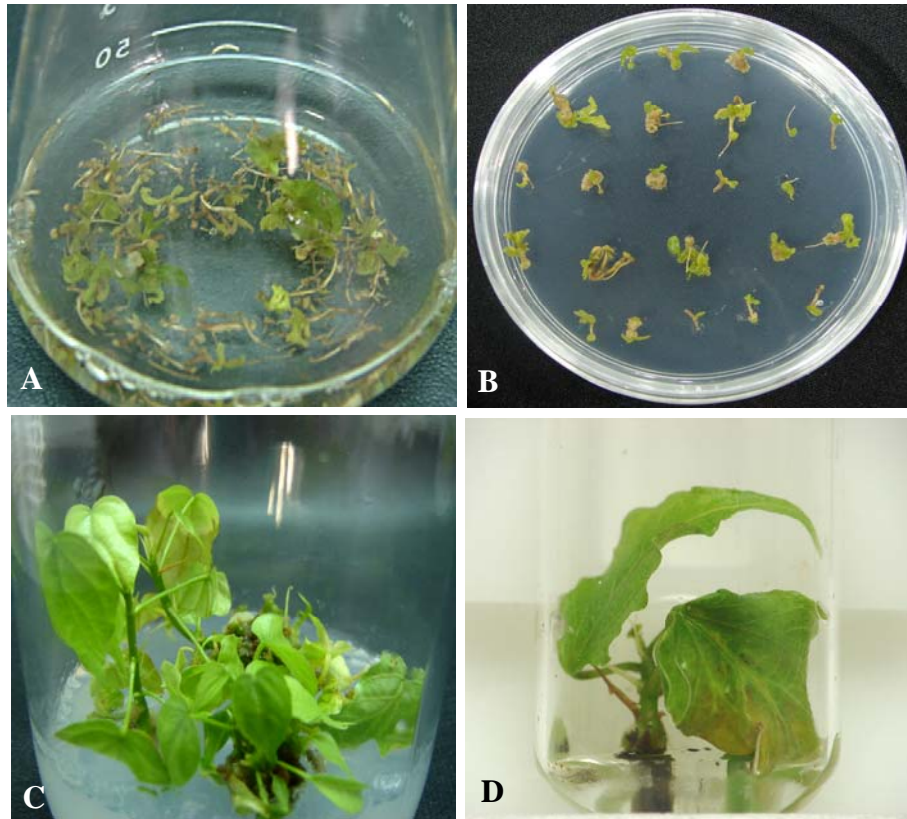
A resposta morfológica *in vitro* dos explantes avaliados sugere que o comportamento regenerativo das raízes é genótipo específico, já que foram observadas diferenças entre as médias de tratamentos de ambas as variedades, e entre duas matrizes de uma mesma variedade. Outra diferença encontrada entre os antibióticos, é que apenas nos tratamentos contendo timetin, ocorreu o alongamento de alguns explantes radiculares, principalmente daqueles que emitiram brotações adventícias na extremidade posterior ao alongamento das raízes.

### ***Obtenção de plantas de urucum a partir de explantes radiculares***

Após os 40 dias de cultivo dos explantes radiculares em meio líquidos, raízes contendo as brotações foram transferidas para meio semi-sólido contendo maior quantidade de ágar e suplementado com zeatina, semelhante ao proposto por PAIVA NETO et al. (2003) e CRUZ (2007), visto que esses explantes apresentarem melhor resposta morfogênica em meio contendo fitorregulador (Fig. 6A e B).

Semelhante ao estudo realizado por CARVALHO e BIASI (2004), os melhores resultados obtidos para a formação de brotações a partir de segmentos radiculares de caqui ocorreu na combinação de dois reguladores de crescimento, zeatina e ácido indolacético. Para a obtenção de brotos a partir de explantes radiculares de berinjela, os melhores resultados foram alcançados com a combinação dos fitorreguladores tidiazuron e 6-benziladenina (FRANKLIN et al., 2004).

Diferentemente, PARK et al. (2005) avaliaram a regeneração de raízes de *Eleutherococcus koreanum* cultivadas em meio líquido, variando a concentração de reguladores de crescimento e do meio MS, concluindo que para essa espécie, o melhor resultado alcançado foi utilizando 1/3 da força do meio MS livre de fitorreguladores. Portanto, a obtenção de brotos a partir de explantes radiculares depende da espécie vegetal estudada, assim como também do tipo e das combinações dos fitorreguladores e do meio de cultivo.



**Figura 6.** Efeito de antibióticos na morfogênese *in vitro* a partir de explantes radiculares de urucum. **A** – Regeneração de brotos a partir de raízes em meio líquido suplementado com zeatina e antibiótico; **B** – Brotos provenientes de raízes após 40 dias de cultivo em meio líquido suplementado com zeatina; **C** – Brotos regenerados a partir de raízes, após 45 dias da transferência dos brotos para o meio de alongamento, suplementado com zeatina e GA<sub>3</sub>; **D** – Brotos cultivados em meio líquido sem antibióticos, para enraizamento.

A etapa inicial de cultivo das brotações, associadas às raízes, em meio de cultura contendo maior porcentagem de ágar foi fundamental para a reversão da hiperidricidade de muitos explantes avaliados, permitindo assim seu crescimento e multiplicação. A partir do restabelecimento dos explantes, os brotos foram isolados e transferidos para frascos contendo o mesmo meio solidificado com menor quantidade de ágar, visto que segundo CRUZ (2007), o potencial regenerativo e o vigor das plantas de urucum aumentam *in vitro*, sob condições de baixa concentração de ágar.

Seguida a etapa de multiplicação das brotações, os brotos maiores foram isolados e transferidos para meio contendo os reguladores de crescimento zeatina e GA<sub>3</sub>, com o objetivo de promover o alongamento das brotações (Fig. 6C). Seguindo o alongamento dos

brotos, estes foram transferidos para tubos de ensaio, contendo meio de cultura líquido para o enraizamento das brotações antes de serem aclimatadas e levadas para casa-de-vegetação (Fig. 6D).

Alguns autores avaliaram a adição de antibióticos nos meios de cultura, relatando seus efeitos na influência morfogênica dos explantes. A maioria dos estudos envolve o uso dos antibióticos cefotaxima e timetin, assim como carbelicilina e cefotaxima, tem sido comumente usado para a eliminação ou supressão de *Agrobacterium* (ALSHEIKH et al., 2002; IEAMKHANG e CHATCHAWANKANPHANICH, 2005). Uma estratégia que tem sido utilizada positivamente é a combinação de antibióticos no meio de cultivo dos explantes (DANILOVA e DOLGIKH, 2004). Esses autores analisaram o efeito estimulatório do antibiótico cefotaxima na regeneração de trigo *in vitro*, verificando que não afetou a frequência de indução e o crescimento de calos embriogênicos, mas afetou sua morfogênese. Diferentemente, XIA et al. (2006) verificaram que o antibiótico cefotaxima inibiu a indução de brotos para *Populus euphratica*.

Portanto, os efeitos dos antibióticos sobre a regeneração de tecidos *in vitro* são específicos não somente para a espécie vegetal, mas também para os genótipos da espécie em estudo. Desse modo, experimentos posteriores envolvendo a combinação de antibióticos e a alteração da concentração de antibióticos, assim como também, a combinação de fitoreguladores em distintas concentrações, permitirão trazer melhorias na porcentagem de raízes que resultam na emissão de brotos adventícios, já que essas técnicas de regeneração mostraram ter, segundo resultados apresentados por PAIVA NETO et al. (2003), CARVALHO et al. (2005) e CRUZ (2007), grande potencial regenerativo para o desenvolvimento de protocolos de transformação genética e propagação, em larga escala, de tipos superiores de urucum.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, E.C.; PINHEIRO, A.L.; MIRANDA, M.M.M; ISOBATA, A.; SILVA, E.C.; CUNHA FILHO, J.G.; ALVES, J.M.V. Competição germinativa da semente de dez “tipos” de urucum (*Bixa orellana* L.) submetidos a diferentes temperaturas e luminosidades. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v.1, p. 125-132, 1992.
- ALSHEIKH, M.K.; SUSO, H.P.; ROBSON, M.; BATTEY, N.H.; WETTEN, A. Appropriate choice of antibiotic and *Agrobacterium* strain improves transformation of antibiotic-sensitive *Fragaria vesca* and *Fragaria vesca semperflorens*. **Plant Cell Reports**, v. 20, p. 1173-1180, 2002.
- APARNATHI, K.; LATA, R.; SHARMA, R. Annatto (*Bixa orellana* L.): Its cultivation preparation and usage. **International Journal of Tropical Agriculture**, v. 8, p. 80-88, 1990.
- BOUVIER, F.; DOGBO, O.; CAMARA, B. Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto). **Science**, v. 300, n. 5628, p. 2089-2091, 2003.
- CARVALHO, D.C; BIASI, L.A. Organogênese do caquiheiro a partir de segmentos radiculares. **Ciência Rural**, v.34, p. 1401-1406, 2004.
- CARVALHO, J.F.R.P.; CARVALHO, C.R.; OTONI,W.C. Regeneração *in vitro* de urucum (*Bixa orellana* L.) a partir de diferentes tipos de explantes. **Revista Árvore**, v.29, p. 887-895, 2005.
- CRUZ, A.C.F. **Propagação *in vitro* do urucuzeiro (*Bixa orellana* L.) a partir de explantes juvenis e adultos**. Viçosa: MG: Universidade Federal de Viçosa, 2007. Tese de Mestrado – Universidade Federal de Viçosa, 85 p., 2007.
- COSTA, M.G.C.; NOGUEIRA, F.T.S.; FIGUEIRA, M.L.; OTONI, W.C.; CECON, P.R.; BROMMONSCHENKEL, S.H. Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 327-332, 2000.

- COSTA, M.G.C.; OTONI, W.C.; MOORE, G.A. An evaluation of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus paradise* (Macf.) and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic genes. **Plant Cell Reports**, v. 21, p. 365–373, 2002.
- DANILOVA, S.A.; DOLGIKH, Y.I. The stimulatory effect of the antibiotic cefotaxime on plant regeneration in maize tissue culture. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 51, n. 4, p. 559-562, 2004.
- D'SOUZA, M.C.; SHARON, M. *In vitro* clonal propagation of annatto (*Bixa orellana* L.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 37, p. 168-172, 2001.
- EADY, C.C.; LISTER, C.E. A comparison of four selective agents for use with *Allium cepa* L. immature embryos and immature embryo-derived cultures. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.18, p. 117-121, 1998.
- FRANKLIN, G.; SHEEBA, C.J.; LAKSHMI SITA, G. Regeneration of eggplant (*Solanum melongena* L.) from root explants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 40, p. 188–191, 2004 .
- GAMBORG, O.L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, p. 151-158, 1968.
- HATANAKA, T.; CHOI, Y.E.; KUSANO, T.; SANO, H. Transgenic plants of coffee *Coffea canephora* from embryogenic callus via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. **Plant Cell Reports**, Dordrecht, v.19, p. 106-110, 1999.
- HOFFMANN, L.V.; VIEIRA, M.L.C. Resposta *in vitro* e suscetibilidade ao *Agrobacterium* de duas cultivares de *Stylosanthes guianensis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 733-742, 2000.
- IEAMKHANG, S.; CHATCHAWANKANPHANICH. O. Augmentin as an alternative antibiotic for growth suppression of *Agrobacterium* for tomato (*Lycopersicon esculentum*) transformation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 82, p. 213-220, 2005.
- LAURO, G.J. A primer on natural colors. **Cereal Foods World**, v. 36, n. 11, p. 949-953, 1991.
- LIMA, M.A.C.; GARCIA, R.O., MARTINS, G.S.; MANSUR, E. Morfogênese *in vitro* e susceptibilidade de calos de variedades nacionais de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) a agentes seletivos utilizados em sistemas de transformação genética. **Revista Brasileira de Botânica**, v.24, p.73-77, 2001.
- LING, H-Q, KRISELEIT, D.; GANAL, M.W. Effect of ticarcillin/potassium clavulonate on callus growth and shoot regeneration in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Plant Cell Reports**, v.17, p. 843-847, 1998.
- MAGDA, R.R. Bixin, a natural food color from annatto. **Food Marketing Technology**, v. 3, p. 6-8, 1989.

- MERCADANTE, A.Z.; PFANDER, H. Carotenoids from annatto: a review. **Recent Research Developments in Agriculture and Food Chemistry**, v. 2, p. 79-91, 1998.
- MERCADANTE, A.Z.; STECK, A.; PFANDER, H. Isolation and identification of new apocarotenoids from annatto (*Bixa orellana*) seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 1050-1054, 1997.
- MERCADANTE, A.Z.; STECK, A.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.; PFANDER, H.; BRITTON, G. Isolation of methyl (9 $\zeta$ Z)-apo-6 $\zeta$ -lycopenoate from *Bixa orellana*. **Phytochemistry**, v. 41, p. 1201-1203, 1996.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 13, p. 473-497, 1962.
- NAUERBY, B.; BILLING, K.; WYNDAELE, R. Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration compared to carbenicillin and cefotaxime in concentrations suitable for elimination of *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Science**, v. 123, p. 169-177, 1997.
- OGAWA, Y.; MII, M. Evaluation of 12  $\beta$ -lactam antibiotics for *Agrobacterium*-mediated transformation through in planta antibacterial activities and phytotoxicities. **Plant Cell Reports**, v. 23, p. 736-743, 2005.
- PAIVA-NETO, V.B. MOTA, T.R.; OTONI, W.C. Direct organogenesis from hypocotyls-derived explants of annatto (*Bixa orellana*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 75, p. 159-167, 2003.
- PARK, S-Y; AHN, J-K; LEE, W-Y; MURTHY, H.N; PAEK, K-Y. Mass production of *Eleutherococcus koreanum* plantlets via somatic embryogenesis from root cultures and accumulation of eleutherosides in regenerants. **Plant Science**, v.168, p. 1221-1225, 2005.
- PICOLI, E. A.T.; CECON, P.R.; FÁRI, M.G.; OTONI, W.C. Organogenesis in eggplant (*Solanum melongene* L. cv. Embú) as affected by antibiotics and growth regulators. **International Journal of Horticultural Science**, v. 8, n. 2, p. 76-82, 2002.
- SÃO JOSÉ, A.B.; LIMA, E.M.; LIMA, E.M.; SOUZA, I.V.B.; VILARES, A.S.; REBOUÇAS, T.N.H. Estudo da propagação vegetativa e sexual do urucum (*Bixa orellana* L.). **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v. 1, p. 20-24, 1992.
- SARMA, K.S.; EVANS, N.E.; SELBY, C. Effect of carbenicillin and cefotaxime on somatic embryogenesis of Sitka spruce (*Picea sitchensis* Bong.) Carr. **Journal of Experimental Botany**, v.46, p. 1779-1781, 1995.
- SHA VALLI KHAN, P.S.; PRAKASH, E.; RAO, K.R. Callus induction and plantlet regeneration in *Bixa orellana* L., an annatto-yielding tree. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 38, p. 186-190, 2002.
- TANPRASERT, P.; REED, B. M. Detection and identification of bacterial contaminants of strawberry runner explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 52, p. 53-55, 1998.

- TORREGROSA, L.; BOUQUET, A. *Agrobacterium rhizogenes* and *A. tumefaciens* co-transformation to obtain grapevine hairy roots producing the coat protein of grapevine chrome mosaic nepovirus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.49, p. 53-62, 1997.
- WANG, M.B.; WATERHOUSE, P.M. A rapid and simple method of assaying plants transformed with hygromycin or PPT resistance genes. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.15, p. 209-215, 1997.
- WIEBKE, B.; FERREIRA, F.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M.H.; DROSTE, A. Influence of antibiotics on embryogenic tissue and *Agrobacterium tumefaciens* suppression in soybean genetic transformation. **Bragantia**, v.65, p. 543-551, 2006.
- XIA, D.; XIAO-YANG, C.; WEI, L.; ZHI-YAN, D. Effects of antibiotics on plantlet regeneration via organogenesis in *Populus euphratica*, **Forestry Studies in China**, v. 8, p. 27–31, 2006.
- YU, T-A; YEH, S-D; YANG, J-S. Effects of carbenicillin and cefotaxime on callus growth and somatic embryogenesis from adventitious roots of papaya. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v.42, p. 281-286, 2001.
- ZALDÍVAR-CRUZ, J.M.; BALLINA-GOMEZ, H.; GUERRERO-RODRÍGUEZ, C. A.; VILES-BERZUNZA, E., GODOY-HERNANDEZ, C.G. *Agrobacterium*-mediated transient transformation of annatto (*Bixa orellana*) hypocotyls with the gus reporter gene. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 73, p. 281–284, 2003.
- ZHI-NENG, L.; GUO-FENG, F. MAN-ZHU, B. Adventitious shoot regeneration of *Platanus acerifolia* Willd facilitated by Timentin, an antibiotic for suppression of *Agrobacterium tumefaciens* in genetic transformation. **Forestry Studies in China**, v. 9, p. 14–18, 2007.

## CAPÍTULO II

### TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA VIA *Agrobacterium rhizogenes* E OBTENÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS DE *Bixa orellana* L.

#### RESUMO

A espécie vegetal *Bixa orellana* L. acumula um corante natural nas sementes denominado de bixina, o qual vem sendo amplamente utilizado industrialmente. Existem poucos relatos a respeito do melhoramento de urucum, bem como a escassez de informações das variedades, o que compromete a qualidade do produto final produzido. Uma das alternativas para acelerar o melhoramentogenético, além de permitir o estudo de vias metabólicas para essa espécie é a introdução de genes de interesse agrônômico via transformação genética por *Agrobacterium*. Assim, este trabalho propôs o estabelecimento de um protocolo de transformação de urucum utilizando *Agrobacterium rhizogenes* R1601 carregando a construção quimérica *nos-nptII-nos*, o qual confere resistência à canamicina. Para os experimentos de transformação foram utilizadas duas matrizes de urucum, ‘M2’ e ‘M6’. Condições de obtenção de brotos foram otimizadas, verificando-se que o uso de um período indutivo em meio MS líquido suplementado com 4,56 µM de zeatina, seguido de cultivo em meio semi-sólido acelera o calejamento e surgimento das raízes do tipo “hairy root”. Entretanto, foi observado o aparecimento de poucas gemas, em tempo maior, usando meio MS desprovido de fitorregulador. O diagnóstico de PCR confirmou a presença do Ri-TDNA em todos os transformantes independentes de urucum, sem nenhuma diferença morfológica aparente entre as plantas transgênicas e as plantas não transformadas. Este sistema mostra-se promissor para o estudo de genes com funções desconhecidas, assim como também, o estudo dos genes envolvidos na via de biossíntese de bixina, visto a facilidade de manipulação das raízes “hairy root” e possibilidade de regeneração adventícia de brotões e de plantas transformadas.

**Palavras chaves:** urucum, bixina, Ri-TDNA, “hairy root”, morfogênese *in vitro*.

## INTRODUÇÃO

Bixina é um corante de ocorrência natural acumulado no arilo das sementes da espécie vegetal *Bixa orellana* L. (urucum) e que vem sendo amplamente utilizado, principalmente na indústria alimentícia, devido a crescente proibição do uso de corantes artificiais, considerados maléficos para a saúde (MERCADANTE e PFANDER, 1998; BOUVIER et al., 2003). Devido a sua importância econômica, estudos que objetivem a obtenção de tipos cultivados melhorados agronomicamente e, conseqüentemente, o aumento da produção de bixina, é necessário (RIVERA-MADRID et al., 2006). Entretanto, o programa de melhoramento genético do urucum é ainda incipiente, sendo difícil introduzir genes de interesse econômico por meio do melhoramento convencional, visto que *B. orellana* é uma espécie alógama que apresenta longo ciclo reprodutivo e limitada variabilidade genética dentro de um germoplasma (APARNATHI et al., 1990).

Uma alternativa para superar essa limitação é a introdução de genes de interesse agrônômico por meio de transformação genética, usando um sistema natural presente em *Agrobacterium*, seguida da obtenção e propagação das plantas *in vitro*, o que possibilitará a diminuição do tempo para a obtenção de lavouras produtivas e uniformes. No caso da transformação utilizando *A. rhizogenes*, após a bactéria infetar a célula vegetal, o T-DNA entre as regiões TR e TL do plasmídeo-Ri da bactéria é transferido e integrado no genoma nuclear da planta hospedeira. O processo de transformação gera um produto denominado de raiz em cabeleira, que possui crescimento rápido e ramificado em meio livre de fitohormônio, além de produzir plantas transgênicas (HU e DU, 2006).

ZALDÍVAR-CRUZ et al. (2003), utilizando hipocótilos de urucum, mostraram um protocolo de transformação transiente para essa espécie via *A. tumefaciens*, sendo a eficiência de transformação monitorada pela presença do gene repórter da  $\beta$ -glucuronidase (*gus*). No entanto, não foi desenvolvido um protocolo de regeneração para a obtenção das plantas transgênicas *in vitro*. Até o momento, nada foi relatado na literatura a respeito da utilização de *A. rhizogenes* para a transformação de explantes de urucum. Assim, este trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo eficiente de transformação genética de explantes hipocotiledonares de urucum utilizando *A. rhizogenes* R1601 carregando o gene quimérico *no-nptII-nos*, o qual confere às plantas transgênicas resistência ao antibiótico canamicina.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal

Sementes maduras de *Bixa orellana* L. da variedade ‘Bico de Pato’ das matrizes ‘M2’ e ‘M6’ foram obtidas das plantas cultivadas na Unidade de Crescimento de Plantas (UCP) do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa; e utilizadas para a germinação e obtenção dos explantes utilizados nos experimentos de transformação genética.

### Germinação das sementes *in vitro* e obtenção dos explantes

As sementes de urucum foram manualmente escarificadas utilizando um bisturi, na região oposta ao eixo do embrião, com um escalpe. O processo de desinfestação iniciou-se quando as sementes foram imersas em etanol comercial 97 % (v/v) durante 10 min, seguido de incubação por 30 min em solução hipoclorito de sódio comercial (Super Globo, Brasil) a 2,5 % (v/v) acrescido de Tween 20 a 0,1 % (v/v). As sementes foram, então enxaguadas 5 vezes em água destilada autoclavada e colocadas em tubos de ensaio (150 x 25 mm; Vidrolabor, Brasil) contendo 10 mL de meio MS autoclavado (MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com vitaminas do complexo B5 (GAMBORG et al., 1968), 3 % (p/v) de sacarose (Vetec, Brasil), 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol (Sigma Chem. Co., EUA), pH 5,7 ± 0,1, e solidificado com 0,8 % (p/v) de ágar (Brasileiro, Brasil), segundo CRUZ (2007). Após esse procedimento, os tubos de ensaio contendo as sementes foram

colocados para germinar no escuro, sob temperatura de  $25 \pm 2$  °C, por um período de 20 dias. Posteriormente, as plântulas foram transferidas para sala de crescimento com a mesma temperatura e fotoperíodo luminoso de 16 h e irradiância de  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , para o enverdecimento do material. As plântulas com 45 dias de idade foram usadas para a obtenção dos explantes.

### **Linhagem e multiplicação bacteriana em meio de cultura**

Utilizou-se a estirpe bacteriana de *Agrobacterium rhizogenes* R1601 caracterizada por possuir o plamídeo pRiA4b contendo o gene quimérico (*nos-nptII-nos*) co-integrado no fragmento 21 no sítio *HindIII* do T-DNA, confere o fenótipo de supervirulência, sendo capaz de metabolizar agropina (PYTHOUD et al., 1987). A bactéria foi crescida em meio Rhizo (TEPFER e CASSE-DELBART, 1987) suplementado com canamicina  $100 \text{ mg L}^{-1}$  (Sigma, EUA) e ampicilina  $100 \text{ mg L}^{-1}$  (Sigma, EUA) por 16-18 h a 200 rpm (28 °C) até densidade óptica ( $\text{OD}_{\lambda:600\text{nm}}$ ) de 0,2-0,3. Em seguida a suspensão bacteriana foi centrifugada em tubos com capacidade para 15 mL a 5.000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em igual volume de meio MS líquido [2 % de sacarose (p/v), vitaminas B5, e  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de mio-inositol], pH  $5,7 \pm 0,1$ ], sem antibiótico.

### **Infecção bacteriana e cultura de raízes transformadas**

Em condições assépticas, hipocótilos com 2-3 cm foram obtidos das plântulas estioladas, e marcados em bisel na região apical para facilitar a inoculação da bactéria com o uso de seringa. Cada explante sofreu, em média, 5 microinjeções na porção distal do hipocótilo, usando-se seringa com agulha hipodérmica contendo a suspensão bacteriana. Em seguida, os explantes inoculados foram colocados na posição vertical e na orientação da polaridade fisiológica, com a região proximal em contato com o meio. Foram usados frascos de vidro com capacidade para 250 mL, contendo 50 mL de meio de cultura MS adicionado de vitaminas do complexo B5, 3 % (p/v) de sacarose,  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de mio-inositol, sem fitorreguladores, pH  $5,7 \pm 0,1$ , e solidificado com 0,9 % (p/v) de ágar (Brasileiro, Brasil). Os frascos foram selados com filme plástico PVC (Goodyear, Brasil).

Como controle, hipocótilos foram inoculados usando microinjeções, apenas com meio MS líquido. Os explantes inoculados foram mantidos por 3 dias no escuro antes de serem transferidos e mantidos em sala de crescimento sob temperatura de  $25 \pm 2$  °C, fotoperíodo luminoso de 16 h e irradiância de  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Após 45 dias, as raízes emitidas pelos hipocótilos inoculados com suspensão bacteriana foram transferidas para meio MS com vitaminas de B5, 3 % (p/v) de sacarose,  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de mio-inositol, pH  $5,7 \pm 0,1$ , solidificado com 0,8 % (p/v) de ágar (Brasileiro, Brasil), adicionado de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de canamicina. As culturas foram mantidas em sala de crescimento sob temperatura de  $25 \pm 2$  °C, fotoperíodo luminoso de 16 h e irradiância de  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Também, como controles, raízes não transformadas, obtidas de plântulas germinadas, foram colocadas sob as mesmas condições de propagação.

### **Cultivo de raízes transformadas**

Após a multiplicação da massa de raiz em meio semi-sólido, elas foram transferidas para, Erlenmeyers (Vidrolabor, Brasil) de 250 mL de capacidade contendo 50 mL de meio de cultura MS líquido, suplementado com vitaminas do complexo B5, sacarose 3 % (p/v),  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de mio-inositol, pH  $5,7 \pm 0,1$ , com e sem  $4,56 \mu\text{M}$  de zeatina, ambos suplementados com  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de canamicina e  $300 \text{ mg L}^{-1}$  de timetin, por 10 dias a 100 rpm. Partes das raízes foram transferidas para meio de cultura semi-sólido descrito acima, com e sem zeatina, ambos suplementados com  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de canamicina e  $300 \text{ mg L}^{-1}$  de timetin; enquanto que o restante das raízes permaneceu nos Erlenmeyers. As culturas foram mantidas em sala de crescimento sob temperatura de  $25 \pm 2$  °C, fotoperíodo luminoso de 16 h e irradiância de  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . A eficiência morfogênica dos explantes nos meios estudados foi avaliada de acordo com o surgimento das gemas.

### **Obtenção das plantas transgênicas**

Brotos e gemas emitidos dos explantes radiculares transformados, provenientes dos meios semi-sólidos e líquidos, foram transferidos para frascos de vidro com capacidade para 250 mL, contendo 50 mL de meio de cultura MS, suplementado com vitaminas do complexo B5, sacarose 3 % (p/v) (Vetec, Brasil), mio-inositol  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , pH  $5,7 \pm 0,1$ ,

solidificados 0,8 % (p/v) de ágar (Brasileiro, Brasil), suplementado com 4,56  $\mu\text{M}$  de zeatina e 300  $\text{mg L}^{-1}$  de timetin, ou 4,56  $\mu\text{M}$  de zeatina, 300  $\text{mg L}^{-1}$  de timetin e 28,87  $\mu\text{M}$  de ácido giberélico ( $\text{GA}_3$ ); e selados com filme plástico PVC.

Após 30 dias, os brotos multiplicados foram transferidos para meio de alongamento das brotações, composto dos sais de MS, vitaminas do complexo B5, 3 % (p/v) de sacarose, 100  $\text{mg L}^{-1}$  de mio-inositol, pH  $5,7 \pm 0,1$ , solidificados com 0,9 % (p/v) de ágar (Brasileiro, Brasil), desprovido de fitorreguladores e antibióticos, seguindo subcultivos a cada 30 dias em sala de crescimento sob temperatura de  $25 \pm 2$  °C, fotoperíodo de 16 h e irradiância de 30  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

### **Isolamento de DNA e análise de PCR**

O DNA genômico das amostras das raízes foram isolados segundo protocolo para extração de ácidos nucleicos proposto no terceiro capítulo desta tese, exceto pela adição de RNase na concentração de 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , incubados à 37 °C por 30 min antes da quantificação e confecção da reação de polimerização em cadeia (PCR). A confirmação das plantas transformadas por meio de PCR foi feita para uma reação final de 25  $\mu\text{l}$  utilizando 30 ng de DNA de cada uma das amostras, Tris 10 mM pH 8,3, KCl 50 mM, dNTP's 0,2 mM de cada desoxirribonucleotídeo,  $\text{MgCl}_2$  2 mM, 0,2  $\mu\text{M}$  dos “primers” específicos para a detecção dos genes *nptII* e *nos* [“forward” (5'-TCAGCGCAGGGGCGCCCGG-3') e “reverse” (5'-GCGGTCAGCCCATTCGCCGCC-3')], e 1 unidade de Taq DNA polimerase (Promega Ltd., UK). As reações de amplificação foram feitas em termociclador Perkin-Elmer 9600, iniciado em um passo de desnaturação, seguidas de 30 ciclos de 94 °C por 30 s de desnaturação, 49 °C por 30 s de anelamento e 72 °C por 40 s de polimerização, seguido de um passo final de 72 °C por 10 min. Os produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de 0,8 % (p/v) agarose, corados com brometo de etídeo 0,1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e fotodocumentados, sob luz ultravioleta, usando o equipamento Eagle Eye II (Stratagene, USA).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### **Fenótipo “hairy root” resultante da inoculação dos explantes com *Agrobacterium rhizogenes***

As primeiras raízes emitidas foram observadas com 20 dias após a inoculação da bactéria, caracterizando-se pela emissão de raízes na região distal dos hipocótilos, semelhante ao fenótipo típico “hairy root” identificado em outras espécies (Fig. 1A). Em alguns pontos do hipocótilo, inoculados com a bactéria, foi observado apenas o calejamento, sem o desenvolvimento de raízes. Nenhuma raiz foi emitida quando se inoculou meio de cultivo líquido, ao invés de suspensão bacteriana.

Os fragmentos das raízes emitidas foram transferidos para o cultivo em meio semi-sólido livre de fitorreguladores, mas acrescido de antibióticos para evitar o crescimento bacteriano e favorecer a multiplicação das raízes potencialmente transformadas (Fig. 1B). A frequência de raízes emitidas diferiu entre as matrizes, sendo maior nos explantes provenientes da matriz M2 (dados não mostrados).

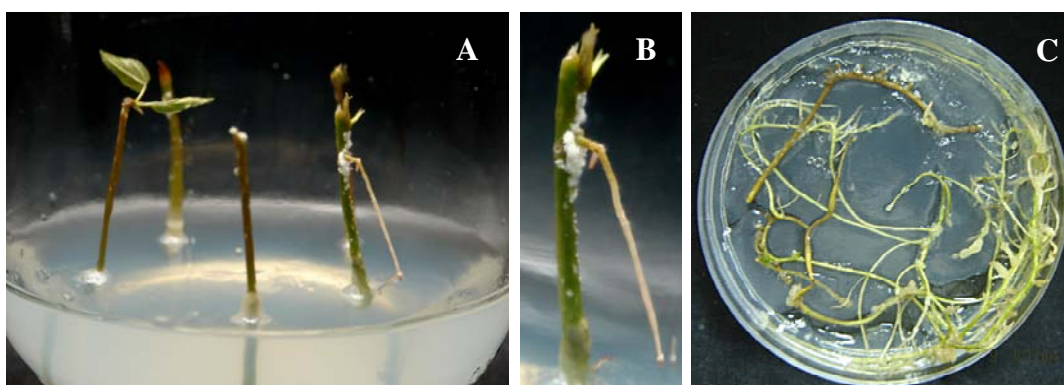
Segundo ALMEIDA et al. (1992), variedades de urucum que apresentam maior teor de bixina possuem maior taxa de germinação. Estudos preliminares verificaram que a matriz M2 acumula maior quantidade de bixina, possui melhor comportamento germinativo e, assim, como encontrados nos trabalhos apresentados por CRUZ (2007), apresenta melhor capacidade morfogênica *in vitro* em relação à matriz M6.

As raízes, com cerca de 40 dias após a introdução no meio MS semi-sólido, aumentaram consideravelmente em comprimento, além de ser observado intensa ramificação, geotropismo negativo e calejamento em alguns pontos das raízes (Fig. 1C).

Somente com 60 dias, as raízes passaram a emitir gemas que se diferenciaram em brotações (Fig. 3F, Fig. 4).

A regeneração de brotos espontâneos a partir de raízes transformadas é um fenômeno comum e tem sido relatada para várias espécies. STILLER et al. (1997), SUBOTIC et al. (2003), FUKUDA et al. (2006), REIS et al. (2007), descreveram a obtenção de brotos a partir de explantes inoculados com *A. rhizogenes* em meios desprovidos de reguladores de crescimento. Entretanto, esses autores observaram a regeneração de brotos em um tempo menor do que o observado para *B. orellana*.

Assim, o tempo que leva desde a emissão das gemas até a diferenciação dos brotos é relativo para cada espécie vegetal, sendo que o meio de cultura e as condições de cultivo em que os explantes estão submetidos exercem influencias sobre eles. Como esperado, as raízes dos tratamentos controles não sobreviveram ao meio MS suplementado com canamicina e timetin, já que raízes não transformadas não possuem competência para crescerem e se desenvolverem em meio contendo o antibiótico canamicina (REIS et al., 2007).



**Figura 1.** Cultivo de explantes de urucum em meio MS após 45 dias da inoculação com *A. rhizogenes* evidenciando o fenótipo de “hairy root”. **A** – Região apical dos hipocótilos de urucum, evidenciando o crescimento de raiz potencialmente transformada; **B** – Região de emissão da raiz em maior aumento, potencialmente transformada, no hipocótilo apresentando calejamento; **C** – Multiplicação da massa de raízes em meio MS, contendo  $100 \text{ mg L}^{-1}$  canamicina e  $300 \text{ mg L}^{-1}$  timetin, após 35 dias de cultivo.

## Morfogênese das raízes potencialmente transformadas em diferentes condições de cultivo

Após o intenso crescimento das raízes em meio MS semi-sólido, foi possível transferir parte desse material tanto para meio semi-sólido quanto para em meio líquido e comparar qualitativamente o crescimento das raízes nessas duas condições, considerando a presença e a ausência de regulador de crescimento no meio de cultura. As raízes que permaneceram em meio de cultivo sem fitorregulador apresentaram alta proliferação das raízes em 40 dias (Fig. 2A), em relação ao crescimento das raízes observadas para o meio de cultivo semi-sólido sem fitorregulador. As raízes que foram mantidas em meio acrescido de zeatina apresentaram pequeno incremento no seu tamanho, além de ser observado o surgimento de brotações, principalmente nas extremidades dos explantes radiculares (Fig. 2B e 2C). Nos dois tratamentos observou-se a turbidez do meio líquido provocado pelo caelejamento e liberação de células a partir dos tecidos.



**Figura 2:** Cultivo de raízes “hairy root” de urucum em meio de cultivo líquido, após 30 dias a partir da introdução dos segmentos de raízes. **A** – Detalhe da intensa proliferação de raízes em meio de cultura contendo canamicina  $100 \text{ mg L}^{-1}$  e  $300 \text{ mg L}^{-1}$  timetin; **B** – Detalhe de Erlenmeyer mostrando responsividade morfogênica das raízes potencialmente transformadas em meio MS contendo zeatina, canamicina e timetin; **C** – Detalhe do segmento de raiz com diferenciação de brotos.

As raízes submetidas ao período indutivo de 10 dias, seguidos de transferência para meios semi-sólidos variaram tanto na frequência quanto no tempo de emissão de gemas. Com 30 dias após a introdução das raízes nos meios semi-sólidos foi possível observar as

diferenças entre os tratamentos. Aquelas raízes mantidas inicialmente em meio de cultivo líquido desprovido de fitorregulador e transferidas para meios semi-sólidos sem regulador de crescimento apresentaram um aumento no comprimento das raízes e calejamento (Figura 3A e B), de modo semelhante ao observado para as raízes mantidas em meio de cultura semi-sólido, não submetidas ao período indutivo, além de ser observado grande ramificação e emissão de raízes novas.

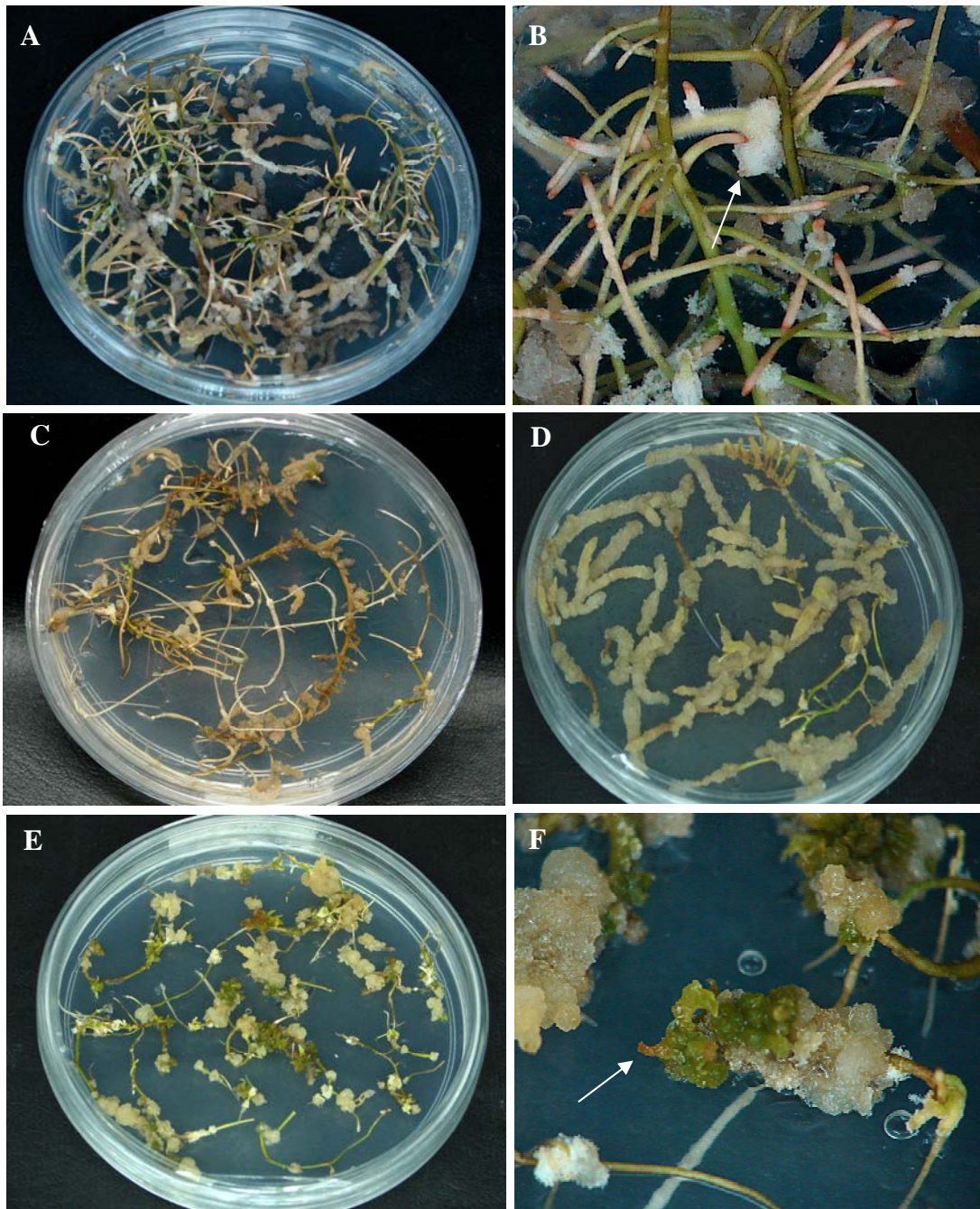
De modo diferente ocorreu para os tratamentos em que segmentos de raízes foram submetidos ao período indutivo em meio de cultivo líquido sem fitorregulador, seguido da transferência dos explantes para meio semi-sólido suplementado com zeatina. Esse tratamento resultou em expansão reduzida das raízes, baixa ramificação e alto nível de calejamento das raízes “hairy root”, como é possível observar o calejamento completo dos explantes na figura 3D.

Quando o período indutivo ocorreu em meio líquido suplementado com zeatina, seguido de transferência para meio de cultivo semi-sólido sem fitorregulador, foi observado o desenvolvimento de poucas raízes e indução de gemas (Fig. 3C). Entretanto, o melhor resultado foi o obtido quando o período indutivo em meio de cultivo líquido suplementado com zeatina foi seguido da manutenção das raízes em meio de cultivo semi-sólido suplementado com o mesmo regulador de crescimento. Ocorreu a emissão de várias gemas, assim como também o calejamento em vários pontos dos explantes, apesar de ser observada a inibição do desenvolvimento das raízes (Figura 3 E e F).

Os resultados apresentados são semelhante aos encontrados por PAIVA NETO et al. (2003), CARVALHO et al. (2005) e CRUZ (2007). Ao avaliarem a indução de brotações em explantes de *B. orellana*, concluíram que a melhor resposta morfogênica *in vitro* ocorre quando o meio de cultura é suplementado com fitorreguladores, indicando a necessidade de se incorporar essas substâncias ao meio de cultura. Ainda, entre os fitorreguladores utilizados nesses experimentos, zeatina induziu maior frequência de brotações alongadas quando comparado aos demais reguladores de crescimento avaliados, 6-benzilaminopurinopuina (BAP) e tidiazuron (TDZ).

Resultados parecidos foram alcançados por CHO e WILDHOLM (2002), os quais relataram que o cultivo de “hairy root” de *Astragalus sinicus* L. com ácido 2,4-diclorofenoxiacético desenvolveu embriões somáticos. Assim como também, brotos foram regenerados de “hairy root” de *Robinia pseudoacacia* L. pela adição de ácido naftalenoacético (ANA) e BAP no meio de cultivo das raízes (HAN et al., 1993).

Igualmente, JACOB e MALPATHAK (2005) analisaram a influência de distintas concentrações de ácido indolil-acético (AIA) e zeatina no crescimento e produção de brotos a partir de “hairy root” de *Solanum khasianum*, tendo sido observado efeito positivo desses dois fitorreguladores para essa espécie. Ainda, relataram que de acordo com a linhagem de *Solanum* estudada, baixas concentrações de cinetina favorecem a diferenciação de brotos, enquanto que outras linhagens mostram inibição de crescimento na presença de fitorreguladores. Diferentemente, raízes “hairy root” de *Antirrhinum majus* L cultivadas em meio suplementado com fitorregulador resultou na produção de calos verdes sem a regeneração de brotos (HOSHINO e MII, 1998).

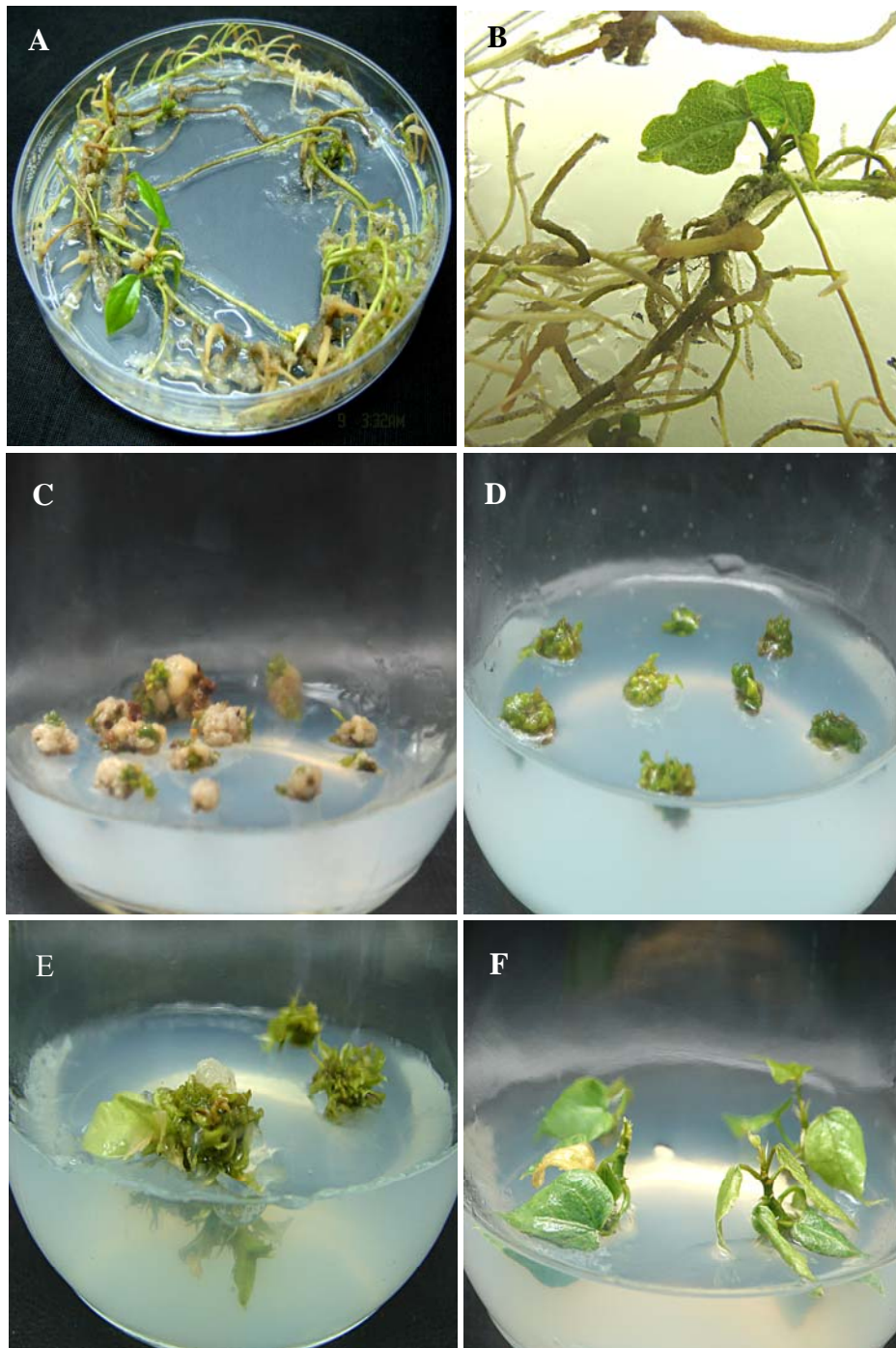


**Figura 3:** Cultivo de raízes “hairy root”, em meio semi-sólido, após o período indutivo de 10 dias. Indução em meio de cultivo líquido sem fitorregulador, seguido de cultivo em meio semi-sólido. **A** – Cultivo em meio MS; **B** – Aumento do tratamento mostrado na Figura 3A mostrando calejamento em algumas regiões dos explantes, indicado por seta, e alta ramificação das raízes; **C** – Cultivo em meio MS suplementado com zeatina. Indução em meio de cultivo líquido contendo zeatina, seguido de cultivo em meio semi-sólido. **D** - Cultivo em meio MS; **E** - Cultivo em meio MS suplementado com zeatina; **F** – Aumento do tratamento mostrado na Figura 3E evidenciando uma região de emissão de gemas, mostrada pela seta, juntamente com o calejamento do explante nessa região.

## **Regeneração de plantas de urucum a partir de raízes “hairy root”**

A organogênese direta resultou no surgimento de gemas seguidas da emissão de brotos que se desenvolveram como mostrado nas figuras 4A e 4B. Tanto as gemas quanto os brotos obtidos com o subcultivo em meios de cultura semi-sólidos, com e sem o período indutivo em meio líquido, foram transferidos para frascos contendo meio MS semi-sólido suplementado com zeatina ou com zeatina e GA<sub>3</sub>. Com cerca de 20 dias de cultivo as gemas mantidas em meio de cultura suplementado com zeatina e GA<sub>3</sub> apresentaram calejamento excessivo e não se desenvolveram (Fig. 4C), enquanto que as gemas subcultivadas somente com zeatina se multiplicam e desenvolveram (Fig. 4D). As brotações emitidas das raízes mantidas em meio suplementado com zeatina surgiram em menor tempo e maior frequência quando comparadas às brotações emitidas em meio sem fitorregulador, visto que o fitorregulador acarretou o calejamento dos explantes, e o surgimento das gemas ocorreu após o calejamento das raízes. A multiplicação e emissão de brotos ficaram bem evidentes com aproximadamente 45 dias de cultivo (Fig. 4E), sendo em seguida separados e transferidos para meios de cultura semi-sólidos, e subcultivados a cada 30 dias (Fig. 4F). As brotações transgênicas bem desenvolvidas foram observadas fenotipicamente, sendo considerados normais quando comparados às plantas controles.

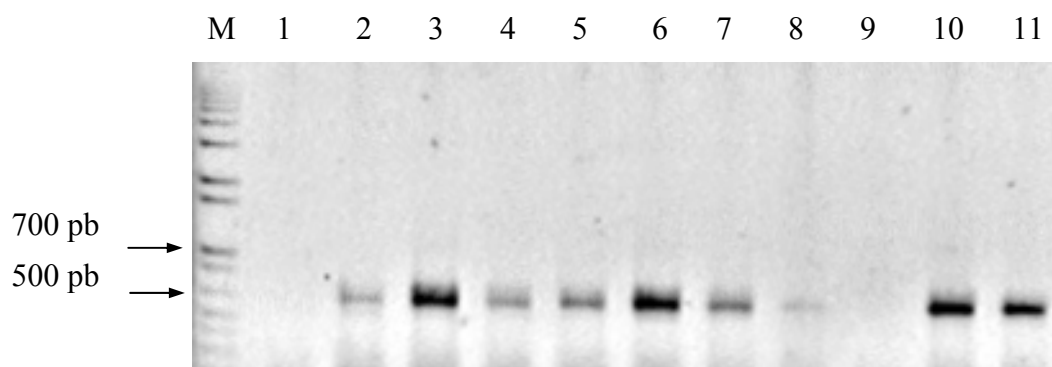
O subcultivo dos brotos foi necessário para a retirada das eventuais raízes “hairy root” emitidas na base das brotações, as quais são prejudiciais para o desenvolvimento normal dos brotos, visto que a emissão destas raízes acarreta um desbalanço hormonal nos brotos, impedindo seu desenvolvimento por favorecer a multiplicação das raízes “hairy root” em meio de cultura livre de reguladores. A regeneração de plantas a partir de “hairy roots” tem sido relatada em várias espécies (HAN et al., 1993; XU et al. 1996; HOSHINO e MII, 1998; SEVON et al., 2002; SUBOTIC et al., 2003; JACOB e MALPATHAK, 2005; FUKUDA et al., 2006; REIS et al., 2007). O sucesso da regeneração depende principalmente das condições da cultura *in vitro* para cada espécie em particular, entretanto, a idade, o tipo de explante e o genótipo são também importantes. Frequentemente, as plantas regeneradas a partir de “hairy roots” possuem folhas enrugadas, raízes abundantes apresentando plagiotropismo, reduzida dominância apical e reduzido comprimento dos internos ou folhas, além destas poderem se apresentar variegadas. Essas anormalidades são geradas possivelmente devido à interferência genômica resultante da inserção do DNA exógeno em regiões inadequadas do genoma ou variações somaclonais como resultado do cultivo *in vitro* (HAN et al., 1993; HU e DU, 2006).



**Figura 4:** Morfogênese *in vitro* de brotos a partir de raízes “hairy root”. **A** – Multiplicação das raízes em meio de cultura livre de fitorreguladores; **B** - Broto de urucum formado em uma região de calejamento; **C** – Gemas individuais com 30 dias, cultivadas em meio contendo zeatina e GA<sub>3</sub>; **D** - Gemas individuais com 30 dias, cultivadas em meio contendo zeatina; **E** – Multiplicação de brotos após 45 dias de cultivo das gemas em meio contendo zeatina; **F** – Brotos individuais subcultivados em meio MS.

## Confirmação das plantas transgênicas via PCR

A presença do Ri T-DNA carregando a construção quimérica *nos-nptII-nos* nas raízes “hairy root” foi diagnosticado por PCR (“Polimerase Reaction Chain”), usando oligonucleotídeos específicos para o gene *nptII* (Figura 5). A incorporação do gene *nptII* foi confirmada em pelo menos nove transformantes independentes de raízes de urucum T0 [T0 M2 (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7) e T0 M6 (1 e 2)], pelo tamanho do fragmento de 550bp, referente a amplificação da seqüência da construção quimérica, a partir dos respectivos DNA genômicos. Amostras de DNA genômico das raízes de ambas as matrizes, ‘M2’ e ‘M6’, foram amplificadas e utilizadas como controles negativos, o que foi confirmado pela ausência da banda amplificada para essas amostras. A presença do inserto foi confirmada para todas as raízes “hairy root”, admitindo assim, a transgenia das plantas regeneradas obtidas a partir dessas raízes. A confirmação fisiológica da natureza transformada foi verificada pela resistência à canamicina nos meios de cultura, pois apenas as raízes “hairy root” se desenvolveram, semelhante ao relatado para outras espécies; enquanto que as plantas que regeneraram a partir dessas raízes apresentaram sistema radicular vigoroso e marcadamente ramificado (HOSHINO e MII, 1998; CHO e WILDHOLM, 2002; JACOB e MALPATHAK, 2005; FUKUDA et al., 2006; REIS et al., 2007).



**Figura 5:** Eletroforese em gel de agarose do DNA genômico de raízes “hairy root” de *B. orellana* infectadas com *A. rhizogenes* R1601 contendo a construção quimérica *nos-nptII-nos*, e controles, amplificados por PCR. Fragmentos de 550 pb confirmam a presença do transgene. (M) é o marcador padrão de 100 pb; (1) e (9) representam a planta de *B. orellana* matriz ‘M2’ e ‘M6’ não-transformadas, respectivamente; (2-8) representam transformantes independentes da planta de urucum matriz ‘M2’ T0 M2 [(I), (II), (III), (IV), (V), (VI) e (VII)]; (10 e 11) representam transformantes independentes da planta de urucum matriz ‘M6’ T0 M6 [(I) e (II)].

Como demonstrado nos experimentos para urucum, a obtenção de plantas transgênicas via transformação utilizando *A. rhizogenes* é uma ferramenta promissora para obter cultivares melhorados agronomicamente por engenharia genética, e proporcionar o estudo de vias metabólicas para esta espécie. REIS et al. (2007) relataram que a produção de “hairy root” tem sido usada para o estudo de interações *in vitro*, propriedades bioquímicas dos genes e expressão das vias metabólicas, assim como também, na elucidação de intermediários e enzimas fundamentais envolvidas na biogênese de metabólitos secundários. Esse sistema possui grande potencial para a produção de metabólitos secundários, especialmente farmacêuticos, já que proporciona alta taxa de crescimento, fácil manipulação genética e da cultura e, principalmente, a habilidade aumentada para produzir metabólitos úteis que não podem ser produzidos por células, mas somente por plantas completamente formadas (SEVON et al., 2002; HU e DU, 2006).

Entretanto, problemas potenciais como a existência da variação na habilidade de síntese entre diferentes clones, possível perda de cromossomos, modificações fenotípicas na planta regenerada, e a co-supressão entre genes endógenos e exógenos (XU et al., 1996; AYORA-TALAVERA et al., 2002; MOYANO et al., 2003; HU e DU, 2006). O Ri T-DNA contém genes *rol*, os quais provavelmente interferem com a via de transdução de sinais de hormônios nas plantas.

A indução de “hairy roots” e a regeneração de brotos a partir dessas raízes são pré-requisitos importantes para o sucesso da produção de plantas transgênicas usando *A. rhizogenes* (FILIPPINI et al., 1996). Brotos regenerados a partir dos explantes “hairy root” geralmente não possuem dominância apical e alterações no geotropismo positivo, além de poderem apresentar problemas na fertilidade (HU e DU, 2006). Assim, existe a necessidade de se realizar mais estudos em plantas transgênicas resultantes da transformação via *A. rhizogenes* e verificar quais são as reais vantagens oferecidas por este sistema.

Para urucum, um sistema de transformação e regeneração de plantas transgênicas é importante visto a carência de protocolos de transformação genética para essa espécie. O principal progresso em se propor tal sistema de transformação genética via *A. rhizogenes* para urucum é a obtenção de muitas raízes transgênicas independentes, as quais são consideradas clones distintos, e que podem ser produzidas e multiplicadas em curto espaço de tempo.

Outra vantagem obtida com esse tipo de transformação é considerar as diversas brotações originárias a partir de uma mesma raiz como clones transgênicos, o que facilita o

estudo da inserção de genes exógenos para essa espécie. Como os brotos transgênicos de urucum provenientes das raízes “hairy root” aparentemente não apresentaram diferenças morfológicas com as plantas controles, esse sistema de transformação genética torna-se promissor, visto permitir não somente a inserção de genes exógenos em variedades superiores de urucum, para posterior utilização das plantas transgênicas em programas de melhoramento genético, mas também, permitirá o estudo da função de genes desconhecidos, além de possibilitar o estudo da influência de genes envolvidos em vias metabólicas, como por exemplo, os genes envolvidos na biossíntese do pigmento bixina para essa espécie.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, E.C.; PINHEIRO, A.L.; MIRANDA, M.M.M; ISOBATA, A.; SILVA, E.C.; CUNHA FILHO, J.G.; ALVES, J.M.V. Competição germinativa da semente de dez “tipos” de urucum (*Bixa orellana* L.) submetidos a diferentes temperaturas e luminosidades. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v. 1, p. 125-132, 1992.
- APARNATHI, K.; LATA, R.; SHARMA, R. Annatto (*Bixa orellana* L.): Its cultivation preparation and usage. **International Journal of Tropical Agriculture**, v. 8, p. 80-88, 1990.
- AYORA-TALAVERA, T.; CHAPPELL, J.; LOZOYA-GLORIA, E.; LOYOLA-VARGAS, V.M. Overexpression in *Catharanthus roseus* hairy roots of a truncated hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase gene. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 97, p. 135–145, 2002.
- BOUVIER, F.; DOGBO, O.; CAMARA, B. Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto). **Science**, v. 300, n. 5628, p. 2089-2091, 2003.
- CARVALHO, J.F.R.P.; CARVALHO, C.R.; OTONI, W.C. Regeneração *in vitro* de urucum (*Bixa orellana* l.) a partir de diferentes tipos de explantes. **Revista Árvore**, v. 29, p. 887-895, 2005.
- CHO, H.J.; WILDHOLM, J.M. Improved shoot regeneration protocol for hairy roots of the legume *Astragalus sinicus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 259–269, 2002.
- CRUZ, A.C.F. **Propagação *in vitro* do urucuzeiro (*Bixa orellana* L.) a partir de explantes juvenis e adultos**. Viçosa: MG: Universidade Federal de Viçosa, 2007. Tese de Mestrado – Universidade Federal de Viçosa, 85 p., 2007.
- FILIPPINI, F.; ROSSI, V.; MARIN, O.; TROVATO, M.; DOWNEY, P.M.; CONSTANTINO, P.; LO SCHIAVO, F.; TERZI, M. The *rolB* plant oncogene is a tyrosine phosphatase. **Nature**, v.379, p. 499-500, 1996.

- FUKUDA, K-I; DAIMON, H.; MISHIBA, K-I; MII, M. Histological observation of root bud formation of hairy roots in *Lotus corniculatus* L. **Grassland Science**, v. 53, p. 51–53, 2007.
- GAMBORG, O.L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, p. 151-158, 1968.
- HAN, K.H.; KEATHLEY, D.E.; DAVIS, J.M.; GORDON, M.P. Regeneration of a transgenic woody legume (*Robinia pseudoacacia* L. black locust) and morphological alterations induced by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation. **Plant Science**, v. 88, p. 149–157, 1993.
- HOSHINO, Y.; MII, M. Bialaphos stimulates shoot regeneration from hairy roots of snapdragon (*Antirrhinum majus* L.) transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 256–261, 1998.
- HU, Z.-B; DU, M. Hairy root and its application in plant genetic engineering. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 48, p. 121-127, 2006.
- JACOB, A.; MALPATHAK, N. Plantlet regeneration enhances solasodine productivity in hairy root cultures of *Solanum khasianum* Clarke. **In Vitro Cell Development Biology - Plant**, v.41, p. 291–295, 2005.
- MERCADANTE, A.Z.; PFANDER, H. Carotenoids from annatto: a review. **Recent Research Developments in Agriculture and Food Chemistry**, v. 2, p. 79-91, 1998.
- MOYANO, E.; JOUHIKAINEN, K.; TAMMELA, P. Effect of *pmt* gene overexpression on tropane alkaloid production in transformed root cultures of *Datura metel* and *Hyoscyamus muticus*. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, p. 203–211, 2003.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 13, p. 473-497, 1962.
- PAIVA NETO, V.B.; MOTA, T.R.; OTONI, W.C. Direct organogenesis from hypocotyl-derived explants of annatto (*Bixa orellana*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 75, p. 159-167, 2003.
- PYTHOUD, F.; SINKAR, V.P.; WESTER, E.W.; GORDON, M.P. Increased virulence of *Agrobacterium rhizogenes* conferred by the vir region of pTiBo542; Applications to genetic engineering of poplar. **BioTechnology**, v. 5, p. 1323-1327, 1987.
- REIS, L.B.; SILVA, M.L.; LIMA, A.B.P.; OLIVEIRA, M.L.P.; PINTO, D.L.P.; LANI, E.R.G.; OTONI, W.C. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of passionfruit species: *Passiflora cincinnata* and *P. edulis flavicarpa*. **Acta Horticulturae**, v. 738, p. 425-431, 2007.
- RIVERA-MADRID, R.; ESCOBEDO-GM, R.M.; BALAM-GALERA, E.; VERA-KU, M.; HARRIES, H. Preliminary studies toward genetic improvement of annatto (*Bixa orellana* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 109, p. 165–172, 2006.

- SEVON, N.; OKSMAN, C.; KIRSI, M. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation: Root cultures as a source of alkaloids. **Planta Medica**, v. 68, p. 859–868, 2002.
- STILLER, J.; MARTIRANI, L.; TUPPALE, S.; CHIAN, R-J; CHIURAZZI, M.; GRESSHOFF, P. M. High frequency transformation and regeneration of transgenic plants in the model legume *Lotus japonicus*. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, p. 1357-1365, 1997.
- SUBOTIC, A.; BUDIMIR, S.; GRUBISIC, D.; MOMCILOVIC, I. Direct regeneration of shoots from hairy root cultures of *Centaureum erythraea* inoculated with *Agrobacterium rhizogenes*. **Biologia Plantarum**, v.47, p. 617-619, 2003.
- TEPFER, M.; CASSE-DELBART, F. *Agrobacterium rhizogenes* as a vector for transforming higher plants. **Microbiological Science**, v. 4, p. 24-28, 1987.
- XU, Z.Q.; JIA, J.F. The reduction of chromosome number and the loss of regeneration ability during subculture of hairy root cultures of *Onobrychis viciaefolia* transformed by *Agrobacterium rhizogenes* A4. **Plant Science**, v. 120, p. 107–112, 1996.
- ZALDÍVAR-CRUZ, J.M.; BALLINA-GOMEZ, H.; GUERRERO-RODRÍGUEZ, C.; AVILES-BERZUNZA, E.; GODOY-HERNANDEZ, C.G. *Agrobacterium*-mediated transient transformation of annatto (*Bixa orellana*) hypocotyls with the gus reporter gene. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 73, p. 281–284, 2003.

### CAPÍTULO III

#### ISOLATION AND PURIFICATION OF RNA FROM TISSUES RICH IN POLYPHENOLS, POLYSACCHARIDES, AND PIGMENTS OF ANNATTO

##### ABSTRACT

The tropical plant *Bixa orellana* L. (annatto) produces an array of natural products, including the pigment bixin used in the food and cosmetics industries. To understand the biochemical and molecular basis of the biosynthesis of these natural products, a reliable method for isolating high yields of high-quality RNA is required. Here we described a successful and reproducible method for isolation and purification of high-quantity and high-quality RNA from different tissues of annatto. This protocol overcomes the usual problems associated with large amounts of polyphenols, polysaccharides, pigments, and other secondary metabolites that are not easily removed by conventional extraction procedures. Furthermore, the proposed protocol can be easily carried out in any laboratory and it could be also extended to isolate RNA from other plant species showing similar abundance of compounds that interfere with RNA extractions. The yield and quality of the RNA were monitored by spectrophotometric analysis, separation on agarose gel, RT-PCR, and construction of a cDNA library.

**Keywords:** RNA extraction, MATAB (mixed alkyl trimethyl ammonium bromide), RT-PCR, cDNA library

## INTRODUCTION

*Bixa orellana* L. (annatto) is a perennial tree species, native to tropical America, which accumulates several carotenoid derivatives (including bixin and norbixin), terpenoids, tocotrienols, arenes, and flavonoids in seeds and/or leaves (LAWRENCE and HOGG, 1973; HARBONE, 1975; JONDIKO and PATTENDEN, 1989; FREGA et al., 1998; PINO and CORREA, 2003; SATYANARAYANA et al., 2003; SHILPI et al., 2006). This plant has raised a growing interest by the scientific community worldwide, since it is the sole source of the natural pigment bixin extracted from the pericarp of the seeds and used in food and cosmetics industries (GIULIANO et al., 2003). Due to the prohibition on the use of specific synthetic color additives in several countries, bixin is second only to caramel as the most used natural colorant in industry (MERCADANTE and PFANDER, 1998).

In spite of recent clarification of the biochemical and molecular basis of bixin biosynthesis (BOUVIER et al., 2003), most enzymes and the genes regulating the biosynthesis of carotenoids and other natural products have not been identified or characterized yet in annatto. A pre-requisite to conduct such research is the isolation of intact nucleic acids, especially RNA. Unfortunately, isolating sufficient yields of high-quality RNA from tissues of annatto has been particularly difficult. Besides pigments, the major obstacles are the large amounts of polyphenols and polysaccharides that co-precipitate with nucleic acids upon isolation (ECHEVARRIA-MACHADO et al., 2005). Furthermore, most published protocols [e.g., guanidinium thiocyanate (CHOMCZYNSKI and SACCHI, 1987, hot phenol (DE VRIES et al., 1988)] and commercial kits [e.g., RNeasy (QIAGEN), Trizol (Gibco-BRL Life Technologies)] available for RNA isolation

were not designed for use with plant materials rich in polyphenols and polysaccharides (HU et al., 2002; TAO et al., 2004).

As far as we are concerned, to date, only one study has examined the isolation of RNA from different tissues of annatto (NARVÁEZ et al., 2001), resulting in a relatively low RNA yield. Here we presented a successful procedure for isolation and purification of high-quantity and high-quality RNA from different tissues of annatto based upon a modification of the protocol described by GESTEIRA and co-workers (2003). The proposed protocol overcomes the problems associated with polyphenol, polysaccharide, and pigment contaminations and can be easily carried out in any laboratory. The yield and quality of the RNA obtained was consistently high, as confirmed by spectrophotometric analysis, separation on agarose gel, RT-PCR, and construction of a cDNA library.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant Material

Samples of seeds and leaves at different developmental stages were collected from 14 years-old annatto plants (*Bixa orellana* L. var. 'Bico-de-Pato') growing in an experimental field plot at Federal University of Viçosa, Brazil. After harvest, the samples were immediately submerged in RNAlater™ RNA stabilization reagent (Qiagen, USA), incubated overnight at 4 °C, and then transferred and maintained at -20 °C until use.

### Equipment and Reagents

1. Mortar, pestles, and spatulas.
2. Diethylpyrocarbonate (Sigma).
3. 2-mL sterile microcentrifuge tube (Scientific Specialties).
4. Homogenization buffer: 0.2 M boric acid, 10 mM EDTA, pH adjusted to 7.6 with Tris, 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS), and 0.286 M  $\beta$ -mercaptoethanol.
5. Phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1; v/v/v).
6. Mixed alkyl trimethyl ammonium bromide (MATAB) solution (2% MATAB, 3 M NaCl).
7. Chloroform/isoamyl alcohol (24:1; v/v).
8. Cold isopropyl alcohol.

9. 3 M sodium acetate pH 4.5.
10. Ethyl alcohol.
11. DEPC-treated water.
12. DNase I (Invitrogen).
13. GeneQuant pro spectrophotometer (Biochrom).
14. 10 mM Tris-HCl, pH 7.5.
15. Taq DNA polymerase (Promega).
16. PTC-200 thermocycler (MJ Research).

### **RNA Extraction**

All solutions were treated with 0.1 % (v/v) diethylpyrocarbonate (DEPC). Mortars, pestles, and spatulas were soaked overnight in 0.1 % (v/v) DEPC and then autoclaved prior to using.

1. One hundred milligrams of each tissue sample were ground to a fine powder using liquid nitrogen and then transferred into a 2-mL sterile microcentrifuge tube.
2. One milliliter of homogenization buffer was added. The mixture was shaken for 5 min and then incubated at room temperature for the same time just before centrifugation at 15,000x g for 10 min, at room temperature.
3. The supernatant containing nucleic acids and a large amount of polysaccharides and pigments was carefully removed into a new microcentrifuge tube and treated with equal volume of phenol/chloroform/isoamyl alcohol, shaken for 5 min, and then centrifuged at 15,000x g for 10 min, at room temperature.
4. About 500  $\mu$ L of the upper aqueous phase was carefully removed into a new microcentrifuge tube. To eliminate residual polyphenols and polysaccharides, purification of the upper aqueous phase was carried out by adding one volume of MATAB solution and 1-mL of phenol/chloroform/isoamyl alcohol, followed by incubation at 65 °C for 10 min.

5. About 900  $\mu\text{L}$  of the upper aqueous phase was carefully removed into a new microcentrifuge tube and an equal volume of chloroform/isoamyl alcohol was added. Samples were shaken for 5 min prior to centrifugation at 15,000x  $g$  for 10 min, at 4°C.

6. The upper aqueous phase was collected and the nucleic acids were precipitated by adding one volume of cold isopropyl alcohol and one-tenth volume of 3 M sodium acetate pH 4.5. The tubes were kept on ice for 15 min and then centrifuged at 15,000x  $g$  for 10 min at 4 °C. The supernatant was discarded and the pellet was washed with 70 % (v/v) ethyl alcohol and resuspended in 60  $\mu\text{L}$  of DEPC-treated water.

7. The samples were treated with RNase-free DNase I (Invitrogen, USA), according to the manufacturer's instructions, and stored at -80 °C for later use.

8. An aliquot of the RNA was electrophoresed on 1 % DEPC-treated agarose gel and stained with ethidium bromide (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) to confirm its integrity.

## **RNA Analysis**

### *Spectrophotometric analysis*

The purity and concentration of the isolated RNA were assayed spectrophotometrically at 260 nm and 280 nm. For accurate measure, samples were diluted (1:50) in 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, since the  $A_{260}/A_{280}$  ratio is influenced considerably by pH.

### *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)*

The first-strand cDNA was synthesized from 1  $\mu\text{g}$  total RNA of developing seeds using the First Strand cDNA Synthesis kit (Fermentas, USA) and the provided random hexamer primer, following the instructions of the manufacturer. The cDNA was used for PCR amplification of the annatto 18S rRNA sequence under the following conditions: 1  $\mu\text{L}$  of first-strand cDNA, 0.2  $\mu\text{M}$  of 18S forward and reverse primers, 0.2 mM each dNTP, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , and 1 U of Taq DNA polymerase (Promega Co., USA). The following

primers were used: 18SF (5'-CAAGCGATCTTTTCGTAGGC- 3') and 18SR (5'-CGAAGATAAAATCCGAGCTTGT-3'). PCR was done in a PTC-200 thermocycler using the following program: 94 °C for 5 min, 30 cycles of 94 °C for 30 s, 55 °C for 45 s, 72 °C for 1 min, and a final step of 72 °C for 7 min.

#### *cDNA Library Construction*

The cDNA library was constructed using the Creator<sup>TM</sup> SMART<sup>TM</sup> cDNA library construction kit (Clontech, USA), according to manufacturer's instructions, except for cDNA fragments that were cloned into pGEM-T Easy vector (Promega Co., USA) and subsequently introduced into ElectroMAX DH10B competent cells Invitrogen, USA). To validate the library, PCR was performed from randomly selected colonies. Each PCR reaction was carried out in 25 µl volume containing 0.2 mM of each dNTP, 0.25 µM of each M13 forward and M13 reverse oligonucleotide primers, 0.25 U *Taq* DNA polymerase and 100 ng of plasmidial DNA. The reactions were amplified in a PTC-200 thermocycler with an initial denaturing at 94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 1 min of denaturing at 94 °C, 30 s of annealing at 55 °C, and 2 min elongation at 72 °C for 2 min, followed by a final cycle of 10 min at 72 °C. Amplified DNA fragments were monitored in an 1 % agarose gel.

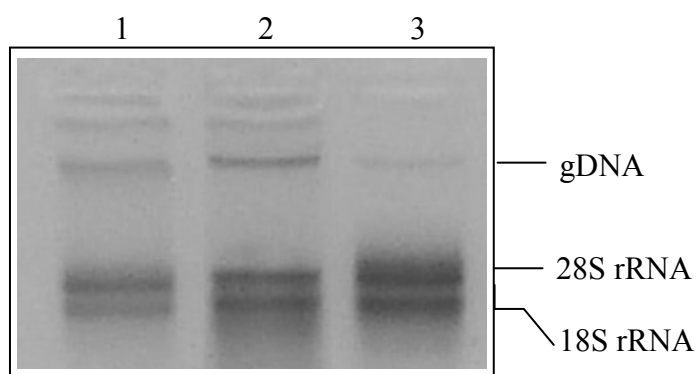
## RESULTS AND DISCUSSION

A few protocols have previously reported the isolation of RNA from recalcitrant plant tissues (SCHULTZ et al., 1994; BURGOS et al., 1995; ASIF et al., 2000; CHIMANZANERO et al., 2000; WANG et al., 2000; NARVÁEZ et al., 2001; HU et al., 2002; GESTEIRA et al., 2003; TAO et al., 2004), mainly because the high content of polyphenols, polysaccharides, pigments, and other unidentified compounds that preclude the isolation of feasible amounts of high-quality nucleic acids. We have chosen to improve the method of RNA isolation developed for recalcitrant tissues of cacao (GESTEIRA et al., 2003), a tropical tree showing similar problems of high content of polyphenol, polysaccharide, and pigments in its organs, which makes difficult to remove them by conventional extraction procedures. Annatto RNA extraction was successfully carried out using the modified method described in this report, which requires few reagents and can be easily carried out in any laboratory.

The homogenization buffer containing boric acid, associated with SDS and  $\beta$ -mercaptoethanol, facilitated the recovery of RNA by enhancing the dissolution of the cell wall and denaturation of proteins. Moreover, the use of the homogenization buffer avoided the oxidation of phenolic compounds and, therefore, the binding of the phenolics to the RNA (GESTEIRA et al., 2003). Also, the polyphenol oxidase activity was reduced due to the alkaline pH of the homogenization buffer. The phenol/chloroform/isoamyl alcohol step contributed not only to eliminate the denatured proteins and pigments, but also to aid in the precipitation of large amounts of polysaccharides, as observed in the bottom of the tubes after the centrifugation step. To better purify nucleic acids from polyphenols and polysaccharides, the tertiary-butanol step (GESTEIRA et al., 2003) was further replaced by

an efficient purification step using 2 % of the anionic detergent MATAB associated to 3 M of NaCl. As confirmed by our results, this method was very effective in avoiding co-precipitation of polysaccharides, polyphenols and nucleic acids, resulting in the precipitation of nucleic acids free from these contaminants (Fig. 1).

The procedures for RNA isolation must be evaluated by monitoring the quantity, quality, and integrity of the RNA obtained (ASIF et al., 2000). The integrity of the RNA samples from different tissues of annatto was confirmed by visualizing intact bands of 28S and 18S rRNAs in an 1 % agarose gel (Fig. 1). The RNA integrity was not affected by the subsequent DNase treatment step for removal of genomic DNA.



**Figure 1.** RNA visualization in agarose gel electrophoresis after the polyphenol and polysaccharide elimination step using MATAB associated to NaCl. RNA was extracted from the following tissues of annatto: developing seeds (lane 1), young leaves (lane 2), and mature leaves (lane 3). gDNA, genomic DNA; rRNA, ribosomal RNA.

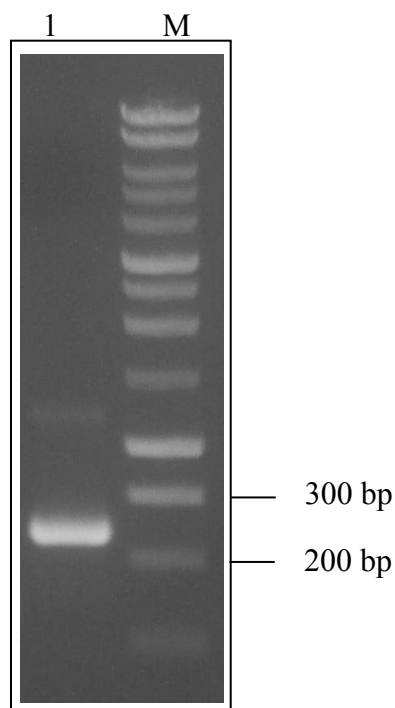
Spectrophotometric quantification at 260 nm, after DNase treatment (step 7 of RNA extraction protocol) of the samples, demonstrated that our method in fact yielded large amounts of RNA (138.9-745.2  $\mu\text{g/g}$  of fresh weight; Table 1). In contrast, only 36.3-90  $\mu\text{g}$  of RNA per gram of fresh weight was produced by the modified hot-phenol method previously reported for annatto (NARVÁEZ et al., 2001). The absorbance at 260/280 nm ranged from 1.70-1.80 (Table 1), suggesting that the RNA could be applied for further analysis.

**Table 1.** Spectrophotometric quantification of total RNA extracted from different tissues of annatto

Tissues	Total RNA ( $\mu\text{g/g FW}$ )	$A_{260/280}$ ratio
Developing seeds	$745.2 \pm 35.4$	$1.80 \pm 0.05$
Young leaves	$138.9 \pm 3.6$	$1.76 \pm 0.03$
Mature leaves	$320.4 \pm 15.0$	$1.70 \pm 0.02$

$\pm$  Standard deviation; n = 4

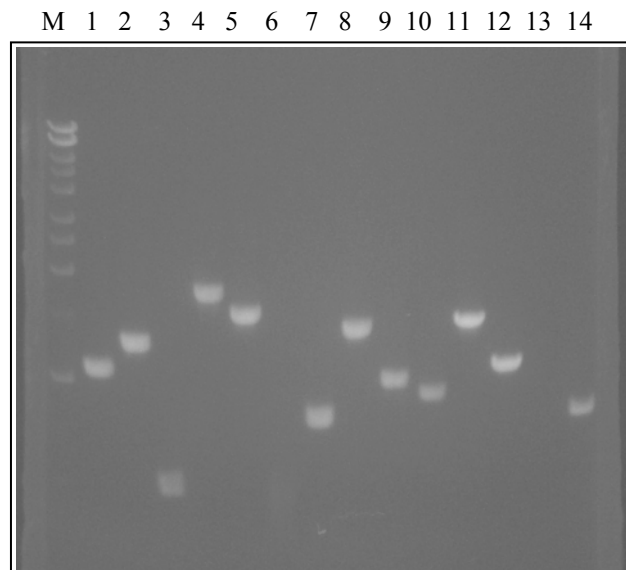
To determine whether the isolated RNA could in fact be used for further analysis, it was used as a template for RT-PCR. By using the first-strand cDNA from developing seeds, RT-PCR was performed with 18S primers and the products were separated in 1 % agarose gel electrophoresis. A major PCR product of 250-bp, corresponding to the amplification of 18S cDNA sequence, was successfully obtained (Fig. 2). This result confirms the high quality of the RNA obtained by our protocol.



**Figure 2.** Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified 250-bp 18S fragment from developing seed cDNA. M, 100-bp DNA ladder; lane 1, 18S cDNA.

Confirmation whether the isolated RNA was suitable for use in further experiments also came from construction of a cDNA library and evaluation of randomly selected colonies by PCR. PCR products from fourteen clones demonstrated that most of them had a cDNA size ranging from 1 kb to 2 kb (Fig. 3).

Taken together, these results confirmed that the isolated RNA is suitable for use in further molecular biology experiments, without any inhibition of enzymatic reactions. Thus, the protocol presented here facilitates future investigations of biochemical and molecular basis of natural product biosynthesis in annatto. It could be also useful for other plant species containing high levels of polyphenols, polysaccharides, and pigments, as we have observed for *Musa* spp. (banana) and *Genipa americana* (jenipapo) (data not shown).



**Figure 3.** Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified cDNA fragments from selected clones of the library. Primers M13 forward and reverse were used in the PCR reactions. M, 1-kb DNA ladder; lanes 1-14, *E. coli* clones. Lanes 6 and 13 indicate false-positive clones.

## REFERENCES

- ASIF, M.H.; DHAWAN, P.; NATH, P. A simple procedure for the isolation of high quality RNA from ripening banana fruit. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.18:109-115, 2000.
- BOUVIER, F.; DOGBO, O.; CAMARA, B. Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto). **Science**, v. 300, p. 2089-2091, 2003.
- BURGOS, R.C.; CHIANG, V.L.; ZHANG, X.H.; CAMPBELL, E.R.; PODILA, G.K.; CAMPBELL, W.H. RNA isolation from plant tissues recalcitrant to extraction in guanidine. **BioTechniques**, v. 19, p. 734-737, 1995.
- CHI-MANZANERO, B.; ROBERT, M.L.; RIVERA-MADRID, R. Extraction of total RNA from a high pigment content plant marigold (*Tagetes erecta*). **Molecular Biotechnology**, v. 16, p.17-21, 2000.
- CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, v. 162, p. 156-159, 1987.
- DE VRIES, S.; HOGE, H.; BISEEING, T. Isolation of total and polysomal RNA from plant tissues. **Plant Molecular Biology Manual**, B, v. 6, p. 64-71, 1988.
- ECHEVARRIA-MACHADO, I.; SANCHEZ-CACH, L.A.; HERNANDEZ-ZEPEDA, C.; RIVERA-MADRID, R.; MORENO-VALENZUELA, O.A. A simple and efficient method for isolation of DNA in high mucilaginous plant tissues. **Molecular Biotechnology**, v. 31, p. 129-135, 2005.
- FREGA, N.; MOZZON, M.; BOCCI, F. Identification and estimation of tocotrienols in the annatto lipid fraction by gas chromatography mass spectrometry. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 75, p.1723-1727, 1998.

- GESTEIRA, A.S.; MICHELI, F.; FERREIRA, C.F.; CASCARDO, J.C.M. Isolation and purification of functional total RNA from different organs of cacao tree during its interaction with the pathogen *Crinipellis pernicioso*. **BioTechniques**, v. 35, p. 494-500, 2003.
- GIULIANO, G.; ROSATI, C.; BRAMLEY, P.M. To dye or not to dye: biochemistry of annatto unveiled. **Trends in Biotechnology**, v. 21, p. 513-516, 2003.
- HARBONE, J.B. Flavonoid bisulfates and their co-occurrences with ellagic acid in the Bixaceae, Frankeniaceae, and related families. **Phytochemistry**, v.14, p. 1331-1337, 1975.
- HU, C.G., HONDA, C.; KITA, M.; ZHANG, Z.L.; TSUDA, T.; MORIGUCHI, T. A simple protocol for RNA isolation from fruit trees containing high levels of polysaccharides and polyphenol compounds. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 20, p.69a-69g, 2002.
- JONDIKO, I.J.O.; PATTENDEN, G. Terpenoids and an apocarotenoid from seeds of *Bixa orellana*. **Phytochemistry**, v. 28, p. 3159-3162, 1989.
- LAWRENCE, B.M.; HOGG, J.W. Ishwarane in *Bixa orellana* leaf oil. **Phytochemistry**, v. 12, 2995, 1973.
- MERCADANTE, A.Z.; PFANDER, H. Carotenoids from annatto: a review. **Recent Research Development in Agricultural and Food Chemistry**, v. 2, p. 79-91, 1998.
- NARVÁEZ, J.A., FLORES-PERES, P.; HERRERA-VALENCIA, V.; CASTILLO, F.; KU-CAUICH, R.; CANTO-CANCHÉ, B.B.; BUZZY, N.S.; RIVERA-MADRID, R. Development of molecular techniques for studying the metabolism of carotenoids in *Bixa orellana* L. **HortScience**, v. 36, p. 982-986, 2001.
- PINO, J.A.; CORREA, M.T. Chemical composition of the essential oil from annatto (*Bixa orellana* L.) seeds. **Journal of Essential Oil Research**, v. 15, p. 66-67, 2003.
- SATYANARAYANA, A.; RAO, P.G.P.; RAO, D.G. Chemistry, processing and toxicology of annatto (*Bixa orellana* L.). **Journal of Food Science and Technology**, v. 40, p. 131-141, 2003.
- SCHULTZ, D.J.; CRAIG, R.; COX-FOSTER, D.L.; MUMMA, R.O.; MEDFORD, J.I. RNA isolation from recalcitrant plant tissue. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 12, p. 310-316, 1994.
- SHILPI, J.A.; TAUFIQ-UR-RAHMAN, M.D.; UDDIN, S.J.; ALAM, M.D.S.; SADHU, S.K. SEIDEL, V. Preliminary pharmacological screening of *Bixa orellana* L. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, p. 264-271, 2006.
- TAO, N., CHENG, Y.; XU, J.; XU, Q.; DENG, X. An effective protocol for the isolation of RNA from the pulp of ripening citrus fruits. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 22, p. 305a-305f. 2004.

WANG, S.X.; HUNTER, W.; PLANT, H. Isolation and purification of functional total RNA from woody branches and needles of Sitka and White Spuce. **BioTechniques**, v. 28, p. 292-296, 2000.

## CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos com este estudo permitem obter as seguintes conclusões:

- O uso de 4 mg L<sup>-1</sup> de higromicina para hipocótilos não pré-cultivados das matrizes ‘M1’ e ‘M6’ da variedade ‘Bico de Pato’, é suficiente para inibir a regeneração de brotos;
- A regeneração de brotos a partir de hipocótilos das matrizes ‘M1’ e ‘M6’ da variedade ‘Bico de Pato’, submetido à pré-cultivo de 3 dias, não é completamente inibida com o uso de 4 mg L<sup>-1</sup> de higromicina;
- Explantes radiculares da variedade ‘Peruana’ apresentam redução de 98,95% na frequência de brotação, quando cultivadas com 2,5 mg L<sup>-1</sup> de canamicina;
- Explantes radiculares da variedade ‘Peruana’ cultivado em meio contendo canamicina, resultam no alongamento dos segmentos de raízes quando se utiliza 12,5 e 25 mg L<sup>-1</sup> desse antibiótico;
- Os antibióticos meropenem, timetin, augmentin e cefotaxima usados no cultivo de hipocótilos inibem a frequência morfogênica dos hipocótilos das variedades ‘Peruana’ e matrizes ‘M1’ e ‘M6’ ‘Bico de Pato’;
- Segmentos radiculares das variedades ‘Peruana’ e matrizes ‘M1’ e ‘M6’ ‘Bico de Pato’ apresentam diferenças na frequência de emissão de brotos nos meios utilizando os antibióticos meropenem, timetin ou augmentin;
- A resposta morfogênica *in vitro* de explantes urucum depende não somente do genótipo especificidade do material, mas também da fonte de explante avaliada;

- O fenótipo “hairy root” é visualizado como resultado da transformação de hipocótilos de urucum com *Agrobacterium rhizogenes* R1601, assim como também a emissão de brotos em meio sem fitorregulador;

- A utilização de 4,56  $\mu\text{M}$  de zeatina no meio de cultura acelera o surgimento e a multiplicação de brotos de urucum, em relação à utilização de meio livre desse fitorregulador;

- O cultivo das raízes “hairy root” em meio líquido estimula o crescimento dessas raízes em meio sem regulador de crescimento, além da regeneração de brotos em meio contendo 4,56  $\mu\text{M}$  de zeatina;

- O protocolo de isolamento e obtenção de RNA utilizando MATAB 2% em solução de NaCl 3 M realizado para essa espécie vegetal, é eficiente para análises moleculares.