

VESPASIANO BORGES DE PAIVA NETO

MORFOGÊNESE *in vitro* DE URUCUM (*Bixa orellana* L.)

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2002

RESUMO

PAIVA NETO, Vespasiano Borges de, D.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2002. **Morfogênese *in vitro* de urucum (*Bixa orellana* L.)**. Orientador: Wagner Campos Otoni. Conselheiros: Eldo Antonio Monteiro da Silva, Paulo Roberto Cecon e Elizabeth Pacheco Batista Fontes.

Bixa orellana L. (Bixaceae) é uma espécie lenhosa conhecida como urucum e que, recentemente, tem despertado o interesse da indústria cosmética e alimentícia por acumular em suas sementes um corante natural, constituído basicamente pelos carotenóides bixina e norbixina. O urucum possui elevada taxa de polinização cruzada, e sendo propagado basicamente via sementes, os plantios comerciais apresentam marcante heterozigose. Por isso, a aplicação de um sistema eficiente de propagação *in vitro* pode ajudar na multiplicação de 'tipos elite', em especial aqueles com elevado teor de carotenóides. Além disso, a propagação *in vitro* é fundamental para o desenvolvimento de protocolo de transformação genética visando maior acúmulo dos carotenóides nas sementes mediante a superexpressão de enzimas relacionadas à rota biossintética desses compostos. Objetivando estabelecer protocolo de regeneração *in vitro* de urucum, diferentes explantes [hipocótilos invertidos (HI) e segmentos de hipocótilo (SH)] obtidos de plântulas germinadas *in vitro*, e embriões zigóticos imaturos foram inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de reguladores para obtenção de organogênese e embriogênese somática, respectivamente. Dentre os fatores avaliados, a melhor combinação para obtenção de organogênese consistiu de inoculação de hipocótilos invertidos em meio MS suplementado

com 4,56 μM Zea, 87,6 mM sacarose e 2,8 g dm^{-3} Fitigel[®]. A utilização de TDZ não resultou em brotações alongadas, embora tenha ocorrido a formação de multibrotações, enquanto que BAP resultou em resposta intermediária. TDZ induziu intensa divisão mitótica, resultando na formação de inúmeras zonas de proliferação localizadas próximas à epiderme e tecido cortical periférico. A melhor resposta para enraizamento das brotações adventícias alongadas foi obtida com 5,0 μM AIB, apesar da presença indesejável de calos.

A obtenção de embriogênese somática só foi possível a partir de embriões zigóticos imaturos e quando carvão ativo estava presente no meio, independente da presença de regulador de crescimento. Apesar disso, a presença de 2,4-D e/ou cinetina acelerou a obtenção de embriões somáticos. A ausência de carvão ativo determinou calogênese e posterior embriogênese somática indireta. Embriões somáticos primários diretos originaram-se preferencialmente das camadas de tecidos externos do explante, como protoderme e meristema fundamental. No entanto, evidenciou-se que a indução de embriogênese somática em urucum pode ser afetada pelo genótipo e explante.

Em outro experimento, verificou-se a possibilidade de utilização do carboidrato manose na seleção de plantas de urucum transformadas com o gene fosfomanose isomerase (PMI). Para isso, HI e SH, e embriões somáticos imaturos foram inoculados em meio MS com os melhores fatores para indução de organogênese e embriogênese somática, respectivamente, sendo que a sacarose do meio parcial ou totalmente substituída por manose, a fim de obter a curva de morte dos explantes. Desta forma, observou-se que o urucum foi incapaz de regenerar brotações adventícias na presença de manose como única forma de carbono, ou ainda de formar embriões somáticos quando até 25% da manose foi substituída por sacarose. Assim, o urucum pode ser transformado usando manose como agente seletivo em substituição aos agentes seletivos convencionalmente usados (herbicidas e antibióticos).

Para verificar a influência do etileno no enraizamento de brotações de urucum *in vitro*, ápices caulinares, excisados de plântulas de urucum obtidas a partir da germinação de sementes *in vitro*, foram inoculados em meio MS básico (controle) ou suplementado com 5 μM AIB ou ANA isolados, ou em

combinação com um inibidor (AVG) ou promotor (ACC) da síntese de etileno. Os resultados obtidos mostraram que o uso das auxinas AIB e ANA aumentou a frequência de enraizamento e o número médio de raízes adventícias por brotação, e concomitantemente aumentou a biossíntese de etileno e a presença indesejável de calos nos tecidos epidérmico e cortical da extremidade proximal das brotações. Análises histológicas revelaram, ainda, a origem das raízes adventícias a partir dos parênquimas do floema e, ou, xilema secundários. No entanto, AVG adicionado ao meio de enraizamento controlou a biossíntese de etileno e a indução de calos na extremidade proximal de ápices caulinares de urucum, mantendo inalterados a epiderme, córtex e demais tecidos internos. Por outro lado, ACC aumentou a frequência de enraizamento, retardou o enraizamento e aumentou o calejamento quando comparado ao tratamento controle, resultando em intensa proliferação celular predominantemente nos tecidos cortical e vascular, enquanto a epiderme tornou-se extremamente alterada.

Finalmente, após uma ampla revisão de literatura, e tendo em vista a importância da fonte de carbono nos processos morfogênicos, e o aumento do uso de novos genes seletivos baseados na fonte de carbono, como por exemplo, o gene fosfomanose isomerase, supõe-se que a padronização da concentração molar como referência para comparar diferentes fontes de carbono é preferível à concentração percentual, comumente utilizada. Essa padronização, juntamente com maior criticismo em relação aos dados encontrados na literatura, irão contribuir positivamente a fim de evitar a perpetuação de erros na elaboração de tratamentos envolvendo diferentes suplementações de açúcares ao meio de cultivo.

ABSTRACT

PAIVA NETO, Vespasiano Borges de, D.S., Universidade Federal de Viçosa, February, 2002. ***In vitro* morphogenesis of annatto (*Bixa orellana* L.)**. Adviser: Wagner Campos Otoni. Committee members: Eldo Antonio Monteiro da Silva, Paulo Roberto Cecon and Elizabeth Pacheco Batista Fontes.

Bixa orellana L. (Bixaceae) is a woody species known as annatto that has raised the interest of the industry due to accumulate in its seeds a natural dye, constituted mainly by bixin and norbixin carotenoids, having wide application in the cosmetic and food industries. Annatto is a cross-pollinated species predominantly propagated by seeds, though leading to a markedly heterozygosis. Therefore, the application of a reliable *in vitro* propagation system would unquestionably aid in multiplication of elite types, in special those with high-producing carotenoid contents. Moreover, the *in vitro* propagation is fundamental for the development of a protocol for genetic transformation of annatto to improve accumulation of carotenoids in the seed coat by over-expressing key-enzymes of biosynthetic pathway of these compounds. Aiming to establish *in vitro* regeneration protocol of annatto from inverted hypocotyls (IH) and hypocotyl segments (HS)-derived explants, obtained from *in vitro* grown seedlings, and immature zygotic embryos were inoculated in MS-based medium supplemented with growth regulator concentrations and combinations for organogenesis and somatic embryogenesis, respectively. The best response for adventitious shoots induction in annatto was obtained using inverted hypocotyls as explants, 87.6 mM sucrose, 2.8 g dm⁻³ Phytigel®, and 4.56 µM

zeatin. The use of TDZ did not result in elongated adventitious shoots. TDZ induced intense mitotic division, resulting in several proliferation zones nearby epidermis and outer cortical tissues. The best shoot rooting response was obtained using 5 μ M IBA, although undesirable callus presence.

Somatic embryogenesis was obtained only when immature zygotic embryos were cultured onto an activated charcoal-supplemented medium, regardless the presence of growth regulators. Despite this, the presence of 2,4-D and/or kinetin accelerated embryo differentiation. Interestingly, the absence of activated charcoal determined indirect somatic embryogenesis. The primary direct somatic embryos preferably originated from outer cell layers of the explants, like protodermis and ground meristem. It was noticed that the protocol could be affected by genotype. Further work is going on in our laboratory focusing on the evaluation of factors involved in conversion to plants from somatic embryos. After that, this system may be beneficial for mass propagation of selected elite clones as well as for genetic transformation of annatto.

It was also verified the possibility of the utilization of mannose as selective agent for further use in genetic transformation studies based on phosphomannose isomerase gene (PMI). For this, HI and SH, and immature zygotic embryos were inoculated in MS-based medium supplemented with the optimized factors for organogenesis and embryogenesis somatic, respectively. Sucrose was partial or totally substituted by mannose, in order to establish conditions that led to regeneration inhibition. So, it was observed that annatto was incapable to regenerate shoots in the presence of mannose as only carbon source, or still to form somatic embryos when down to 25% of mannose was substituted by sucrose. Thus, mannose is a reliable carbon source that may replace conventionally used selective agents (herbicides and antibiotics) for genetic transformation of annatto.

In order to evaluate the effect of ethylene upon rhizogenesis of annatto, shoot apex excised from seedlings derived from *in vitro* germinated seeds were inoculated in MS-based medium (control), or supplemented with 5 μ M AIB or ANA, isolated or in combination with an inhibitor (AVG) or promoter (ACC) of ethylene biosynthesis. The results showed that use of auxins IBA or NAA increased rooting frequency and adventitious root number per shoot, and at the

same time increased ethylene biosynthesis and undesirable callusing from epidermal and cortical tissues at proximal extremity of annatto shoots. Histology analysis revealed adventitious origin of roots from xylem parenchyma or secondary phloem. AVG added to the rooting medium controlled ethylene biosynthesis and callus induction in annatto shoots, remaining unaltered the epidermis, cortex and inner tissues. However it caused reduction in root number and elongation. On the other hand, ACC increased rooting frequency, retarded rooting appearance and enhanced callusing when compared to control, resulting in intense cell proliferation predominantly in the cortical and vascular tissues, whilst epidermis became mostly altered.

Finally, after a vast literature search, and bearing in mind the well known importance of carbohydrate sources on morphogenic processes and the increasing use of novel selection genes based on carbohydrate sources, it was concluded that the standardization of molar concentration as a reference to compare different carbon sources is more adequate than the use of percentages. This standardization, together with a critical reading of the data found in the surveyed literature, will positively contribute to avoid the perpetuation of mistakes when designing treatments involving different carbohydrate supplementation to the culture media.