

DANIELE VIDAL FARIA

**OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE ORGANOGÊNESE IN VITRO EM
EXPLANTES HIPOCOTILEDONARES DE URUCUM (*Bixa orellana* L.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL

2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

F224o
2014 Faria, Daniele Vidal, 1990-
Otimização do protocolo de organogênese in vitro em
explantes hipocotiledonares de urucum (*Bixa orellana* L.) /
Daniele Vidal Faria. – Viçosa, MG, 2014.
viii, 61f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Marcelo Rogalski.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.52-61.

1. Urucum - corantes. 2. *Bixa orellana*. 3. Urucum -
propagação in vitro. 4. Urucum - Cultura e meios de cultura.
5. Urucum - Melhoramento genético . I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa de
Pós-graduação em Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22. ed. 660.6

DANIELE VIDAL FARIA

**OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE ORGANOGÊNESE IN VITRO EM
EXPLANTES HIPOCOTILEDONARES DE URUCUM (*Bixa orellana* L.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de Magister Scientiae.

APROVADA: 24 de Novembro de 2014

Elyabe Monteiro Matos

Edgard Augusto de Toledo Picoli

Wagner Campos Otoni

Marcelo Rogalski
(Orientador)

Ao meu pai José Virgílio de Faria
A minha mãe Marilda de Sousa Vidal de Faria
Ao meu irmão Leonardo Vidal Faria

Dedico.

“Alguns traziam uns ouriços verdes, de árvores, que, na cor, queriam parecer de castanheiros, embora mais pequenos. E eram cheios duns grãos vermelhos pequenos, que, esmagando-os entre os dedos, faziam tintura muito vermelha, de que eles andavam tintos. E quanto mais se molhavam, tanto mais vermelhos ficavam” (A Carta de Pero Vaz de Caminha, 1500).

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e demais familiares, pelo exemplo de vida, amor, e apoio.

À Universidade Federal de Viçosa e o programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, pela oportunidade e realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo apoio e concessão da bolsa.

Ao Laboratório de Fisiologia Molecular de vegetal, Laboratório Anatomia Vegetal, localizados no Centro de Ciências Biológicas II (CCBII) e ao Laboratório de Cultura de tecidos II (LCTII) localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) pelo apoio e suporte na condução deste trabalho.

Ao Prof. Marcelo Rogalski pela amizade, orientação, confiança em mim depositada, ensinamentos, apoio e paciência durante todos os momentos.

Ao Prof. Wagner Campos Otoni, pela amizade, confiança em mim depositada e pelo apoio, disponibilizando a estrutura do seu laboratório para desenvolvimento de boa parte deste trabalho.

Aos professores do ensino fundamental, médio, graduação e os professores do departamento de Biologia Vegetal, pelos ensinamentos, formação e exemplos de vida.

À empresa Christian Hansen de Valinhos, São Paulo, pela doação das sementes e urucum da variedade piave vermelha utilizadas nesse trabalho.

Aos técnicos: Maria Mercês, Carlos Raimundo, Antônio Cordeiro, Elisonete Garcia e Aurora Sato, pelo suporte disponibilizado durante todo o desenvolvimento do meu trabalho.

À amiga e Prof.^a Andreia Barcelos Passos Lima Gontijo da Universidade Federal do Espírito Santo por me iniciar na pesquisa e realizar todo esforço possível para que eu pudesse dispor de oportunidades de crescimento científico e profissional.

A todos os amigos e integrante do Laboratório de Fisiologia Molecular Vegetal, pelo apoio, amizade, ajuda, conhecimento, concedidos durante esses dois anos de mestrado, em especial Karla Gasparini por me auxiliar nos experimentos da biologia molecular.

A todos os integrantes da grande família do Laboratório de Cultura de Tecidos II, pela amizade, conhecimento, apoio, confraternizações, ajuda durante o desenvolvimento de todo o meu trabalho. Em especial gostaria de agradecer ao Elyabe Matos pelo conhecimento e auxílio disponibilizados durante o desenvolvimento de todo experimento, à Ana Claudia Ferreira, pelo auxílio com todas as análises histológicas, ao Diego Batista pela ajuda com as análises estatísticas.

A todos os amigos que fiz aqui em Viçosa durante esses dois anos, muito obrigada pela cumplicidade, apoio e grande ajuda nos momentos de felicidade e dificuldades.

A todos os meus queridos amigos de graduação que mesmo longe ou perto, sempre permanecerão no meu coração, muito obrigada.

A todos que de alguma forma direta ou indireta contribuíram para que eu chegasse até aqui, ajudando na realização desse trabalho, e fazendo parte dessa etapa da minha vida, mesmo que eu tenha me esquecido de citar “falha na memória”, mas nem por isso foi menos importante para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1.Introdução.....	1
Objetivos	6
2. Material e métodos	7
2.1. Experimento I: Influência do meio de cultura e camada fina de explantes hipocotiledonares na eficiência da resposta organogênica em urucum.....	9
2.2. Experimento II: Influência do meio de cultura, secção e posição de explantes hipocotiledonares na eficiência da resposta organogênica em urucum.....	10
2.3 Experimento III: Influência do pré-tratamento com citocininas na eficiência da resposta organogênica de explantes hipocotiledonares de urucum	11
3. Resultados	13
3.1 Influência do meio de cultura e camada fina de explantes hipocotiledonares na eficiência da resposta organogênica em urucum.....	13
3.2 Influência do meio de cultura, secção e posição de explantes hipocotiledonares na eficiência da resposta organogênica em urucum.....	22
3.3 Influência pré-tratamento com citocininas na eficiência da resposta organogênica de explantes hipocotiledonares de urucum.....	30
Enraizamento dos brotos e Aclimatização	42
4. Discussão.....	43
Diferentes meios de cultura e sua influência na regeneração de brotos de urucum em explantes hipocotiledonares	43
Pré-tratamento de explante com citocininas.....	46
Secção e posição do explante hipocotiledonar no meio de cultura	47
Conclusões	51
Referências	52

RESUMO

FARIA, Daniele Vidal M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2014. **Otimização do protocolo de organogênese in vitro em explantes hipocotiledonares de urucum (*Bixa orellana* L.)**. Orientador: Marcelo Rogalski.

Com a substituição dos corantes sintéticos pelos naturais, o urucum (*Bixa orellana* L.) tem alcançado crescente importância no mercado internacional, por ser a principal fonte do apocarotenoide bixina, utilizada para vários fins na indústria, sendo o único responsável por suprir a demanda do comércio mundial. Neste cenário busca-se a compreensão da via e a clonagem dos genes envolvidos na via de biossíntese da bixina, visando principalmente à obtenção de plantas melhoradas, bem como para inserção de genes da própria via em outras espécies comerciais de cultivo amplo e mecanizado. Atualmente trabalhos relacionados à transformação genética em *B. orellana* são escassos e há a necessidade de otimizar métodos de regeneração in vitro que viabilizem a obtenção de plantas transgênicas com desempenho superior em nível de produção de bixina. Dessa forma o objetivo desse trabalho foi testar diferentes explantes hipocotiledonares de urucum, citocininas e diferentes meios de cultura na organogênese, desenvolvimento e enraizamento de brotos de *B. orellana*. Foi observado que explantes hipocotiledonares contendo tamanho de 6,0; 8,0; e 10,0 mm de comprimento apresentaram eficientes respostas organogênicas, sendo observada a formação de até 10 brotos por explante quando cultivados no meio JADS suplementado com zeatina. Em explantes hipocotiledonares de urucum seccionado longitudinalmente e posicionados com a secção em contato com o meio de cultura JADS acrescido de zeatina foi observado a formação de 17,11 brotos por explante. Explantes hipocotiledonares pré-tratados com Zeatina, BAP e TDZ (0,1 e 0,5 mg L⁻¹) não diferiram significativamente na indução de brotos em comparação com explantes não tratados com citocininas. O meio de cultura JADS se mostrou mais eficiente em comparação ao MS, induzindo maior número de brotos. Os brotos apresentaram-se mais alongados, vigorosos e totalmente não hiperhídricos. Os brotos induzidos em meio JADS apresentaram também maior número e maior desenvolvimento de raízes em comparação com brotos induzidos em meio MS de urucum, conseqüentemente, devido ao desenvolvimento superior, brotos induzidos no meio JADS, apresentaram 100% de sobrevivência durante a fase de aclimatização ex vitro. O presente trabalho possibilitou otimizar as respostas organogênicas em diferentes explantes hipocotiledonares de urucum, concentrações de

fitorreguladores e meios de cultura, os quais podem ser utilizados para estudos futuros de transformação genética de urucum.

ABSTRACT

FARIA, Daniele Vidal, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2014. **Optimization of in vitro organogenesis of annatto (*Bixa orellana* L.) by using hypocotyl-derived explants.** Adviser: Marcelo Rogalski.

With the substitution of synthetic dyes to natural, annatto seeds (*Bixa orellana* L.) industry is increasing the international market importance, given that this species is the main natural and commercial source of the apocarotenoid bixin. This plant pigment is used for various industrial purposes, and it is the main pigment that has been commercialized worldwide. In this scenario, it is necessary to understand the metabolic pathway and the cloning of the genes involved in the bixin biosynthesis, aiming to obtain improved plants or even to add genes of interest related to bixin biosynthesis to other commercial crop species of broad and mechanized cultivation. Currently, there are few publications related to genetic transformation in *B. orellana*, being necessary to optimize in vitro protocols that will allow the obtaining of transgenic plants with higher level of bixin production. Thus, the aim of this work was to test different hypocotyl explants of annatto, the cytokinin effect and different media on in vitro organogenesis and rooting of *B. orellana* adventitious shoots. It was observed that hypocotyl explants with 6.0, 8.0 and 10 mm longer showed the best organogenic responses inducing up to 10 shoots per explant when cultured in JADS medium supplemented with zeatin. Hypocotyl explants of annatto induced more shoots when they were sectioned longitudinally and positioned with the section in contact with the JADS medium in presence of zeatin, which stimulated the induction of 17.11 shoots per explant. The hypocotyl explants pre-treated with zeatin, BAP and TDZ (0.1 and 0.5 mg L⁻¹) did not differ significantly on shoot induction from control explants which were not treated with cytokinins. The JADS medium was more appropriate for shoot induction in comparison with MS medium. The shoots induced on JADS medium were more vigorous, longer and non-hyperhydric. The JADS medium affected positively the rooting, given that the shoots displayed more roots and well developed roots in comparison with shoots induced on MS medium. Consequently, due to the best development on JADS medium, the shoots supported the ex vitro acclimatization phase with 100% of survival. This work enabled the optimization of organogenesis from different hypocotyl explants, plant growth regulator concentrations and culture media, which can be used in further studies of annatto genetic transformation.

1.Introdução

A *Bixa orellana* L. (urucum) é uma espécie arbustiva perene pertencente à família Bixaceae, originária da América Tropical (Aparnathi et al.,1990). Dessa espécie obtêm-se corantes de diversas tonalidades, que vão do amarelo ao castanho, passando pelo vermelho. Por este motivo, é usado desde os tempos pré-colombianos como corante têxtil, corporal e alimentar (Giuliano et al., 2003). Atualmente, é amplamente utilizado como corante, em vários ramos da indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética (Marcolino et al., 2011).

Além dos vários isoprenoides encontrados no urucum e comuns em outras espécies vegetais como o geranilgeraniol, a farnesilacetona, o octadecanoato de geranilgeraniol, o formato de geranilgeraniol e o δ -tocotrienol (Lancaster e Lawrence, 1996; Mercadante et al., 1996; Jondiko e Pattenden, 1989), o isoprenoide mais abundante nessa espécie é a bixina, um éster dicarboxílico monometil, responsável pela coloração vermelha das sementes que se acumula no arilo, tecido este que pode armazenar mais de 80% deste pigmento (Preston e Rickard, 1980; Giuliano et al., 2003).

A biossíntese de bixina também foi relatada em *Costus pictus*, uva e açafrão, porém em baixas concentrações se comparado aos níveis encontrados no urucum (Ramamoorthy et al., 2010; Annadurai et al., 2012). O urucum vem alcançando crescente importância no mercado internacional, principalmente nos Estados Unidos, Japão e alguns países da Europa (Lauro, 1991; Filho, 2004), por ser a maior fonte utilizada para suprir a demanda do comércio mundial de corantes naturais, que vem crescendo desde que os corantes sintéticos passaram a ser substituídos pelos naturais, em virtude da crescente proibição do uso de aditivos sintéticos, considerados tóxicos e carcinogênicos (Guesmi et al., 2013).

Estima-se que em 2008 foram produzidas 17.500 toneladas de sementes de urucum, sendo que deste montante, cerca de 12 mil toneladas foram produzidas pelo Brasil (ANVISA, 2009). No Brasil as principais variedades do urucuzeiro cultivadas são: Peruana, Paulista, Bico-de-Pato e Piave Vermelha. Dentre as variedades de urucum mais cultivadas no Brasil a Piave Vermelha destaca-se pela boa produtividade, associada a elevados teores de bixina, que variam entre 3,5 a 5,0%, fato este que impulsiona maior aceitação no mercado destas sementes (Rebouças e São José, 1996; Lemos et al. 2011).

A via de biossíntese de bixina foi elucidada (Jako et al., 2002; Giuliano et al., 2003; Bouvier et al., 2003) utilizando usando um sistema de expressão heterólogo em *Escherichia coli* (Bouvier et al., 2003). Foram descritos três genes que codificam as enzimas necessárias para a síntese de derivados de bixina a partir do licopeno, sendo elas: a licopeno dioxigenase (BoLCD), a bixina aldeído desidrogenase (BoBADH) e a norbixina

metiltransferase (BonBMT). Soares et al. (2011) caracterizou dois genes candidatos envolvidos na biossíntese de bixina, são eles: BuCCD da família carotenoide clivagem dioxigenase 4 (CCD4) e BoOMT da família do ácido caféico O-metiltransferase (COMT), a expressão de ambos genes correlaciona-se com o aumento concomitante na pigmentação da semente e no diâmetro e comprimento do fruto.

Entretanto, novos trabalhos utilizando o mesmo conjunto enzimático de Bouvier et al. (2003) visando ao aumento da via de biossíntese de bixina em outras espécies de plantas não tem sido obtidos com sucesso e relatados na literatura. Além disso, trabalhos recentes têm revelado ausência (não detecção) do licopeno nas folhas de plantas de urucum até então conhecido como precursor da via da bixina (Rodríguez-Ávila et al., 2011; Rivera-Madrid et al., 2013).

Assim, sugere-se que a bixina pode ser sintetizada a partir de outros precursores ainda desconhecidos, mesmo em urucum (Rivera-Madrid et al., 2013). Esse mesmo resultado foi sugerido para *C. pictus*, onde não foi observada a expressão da primeira enzima envolvida na rota de biossíntese, responsável pela clivagem do licopeno, sugerindo também nesta espécie que a bixina é produzida a partir de outro precursor, ainda não caracterizado (Annadurai et al., 2012).

Dessa forma, há necessidade de estudos que visem à caracterização da via metabólica e dos genes envolvidos na mesma e, ainda, estudos visando o aumento da produção de bixina em plantas através da transformação genética. Para tanto, é necessário o desenvolvimento de protocolos eficientes de regeneração *in vitro*, para obtenção de plantas de urucum transgênicas (Anami et al., 2013).

A via de desenvolvimento, organogênese ou embriogênese somática, depende de processos complexos, endógenos e exógenos ao tecido vegetal, entre eles a composição do meio de cultura, a totipotência das células do explante, o fitormônio, luz e condições de cultivo (D'Onofrio e Morini, 2006; Dettmer et al., 2009; MacArthur et al., 2009; Komatsu et al., 2011).

A utilização de um meio de cultura contendo a concentração de sais, vitaminas e compostos orgânicos adequados é imprescindível para o cultivo *in vitro* (Niedz et al., 2014), tornando-se um fator limitante para o estabelecimento de um protocolo eficiente de organogênese. Os meios de cultura para tecidos vegetais apresentam compostos necessários para suprir as necessidades metabólicas, energéticas e estruturais das células (Caldas et al., 1998; Gonçalves et al., 2005). Dessa forma, os meios de cultura são constituídos basicamente por macronutrientes (N, P, Ca, K, Mg e S), micronutrientes (Fe,

Mn, Zn, B, Cu, Cl e Mo), sacarose (como principal fonte de carbono), vitaminas e compostos orgânicos (fonte de nitrogênio) e ainda reguladores de crescimento, hormônios naturais e sintéticos, que controlam as rotas de desenvolvimento in vitro (Caldas et al., 1998; Almeida et al., 1996; Carvalho et al., 2005; Paiva-Neto et al., 2003 b; Parimalan et al., 2008, 2009; Joseph et al., 2011, 2013).

Na literatura os meios de cultura mais utilizados para espécies lenhosas como o urucum são o meio MS (Murashige e Skoog, 1962), o QLP (Quoirin e Lepoivre, 1977), WPM (Lloyd e McCown, 1981), DKW (McGranahan e Driver e Tulecke, 1987) e o JADS (Correia et al., 1995). O meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) foi estabelecido inicialmente para tabaco e apresenta concentração iônica total de macronutrientes elevada, sendo as concentrações de nitrogênio, potássio, zinco mais elevados se comparados aos demais meios de cultura. O meio JADS (Correia et al., 1995) foi estabelecido para *Eucalyptus grandis* e apresenta eficiência comprovada no cultivo in vitro de eucalipto (Correia et al., 1995; Freitag et al. 2012). O meio JADS apresenta concentração iônica total menor e maior concentração de fosfato quando comparado ao meio MS (Tabela 1).

Além do meio de cultura, o explante é outro fator significativo na padronização de um eficiente protocolo de regeneração in vitro. Na literatura existem trabalhos utilizando diferentes explantes de urucum como: raiz (Cruz et al., 2014), segmentos nodais (Parimalan et al., 2008, 2009; Joseph et al., 2011), segmentos foliares (Almeida et al., 1996; Joseph e Siril, 2013), segmentos hipocotiledonares (Paiva-Neto et al., 2003 b; Carvalho et al., 2005), embriões imaturos (Paiva-Neto et al., 2003 a; Parimalan et al., 2011) e cotilédones (Joseph e Siril, 2013).

Dentre os explantes já testados para a embriogênese somática de acordo com a literatura, o uso de embriões zigóticos permitiu a obtenção de plantas transgênicas de urucum (Parimalan et al., 2010), demonstrando a potencialidade de embriões zigóticos imaturos como fonte de explante para transformação nuclear e plastidial. Além de embriões zigóticos imaturos explantes hipocotiledonares apresentaram respostas organogênicas promissoras (Paiva-Neto et al., 2003 b; Parimalan et al., 2007) podendo produzir um elevado número de brotos por explante.

Na literatura existem vários protocolos para a organogênese (Almeida et al., 1996; Carvalho et al., 2005; Paiva-Neto et al., 2003 b; Parimalan et al., 2008, 2009; Joseph et al., 2011, 2013) e embriogênese somática (Paiva-Neto et al., 2003a; Parimalan et al., 2011) de urucum. Em meio MS (Murashige e Skoog, 1962) acrescido de 0,25 % de água de coco e 2 mg L⁻¹ de thidiazuron (TDZ), foi obtida uma taxa de regeneração de 70 % em explantes

hipocotiledonares com a formação de 22 brotos por explantes (Parimalan et al., 2007). Da mesma forma, em explantes hipocotiledonares cultivados em meio MS suplementado com vitaminas do meio B5 e 4,56 μM de zeatina, Paiva-Neto et al. (2003 b) obtiveram uma taxa de regeneração de 78 % e uma média de 1,8 brotos por explante, respectivamente. Assim como, Carvalho et al. (2005) que observaram 100% de regeneração a partir de explantes hipocotiledonares cultivados no meio MS suplementado com vitaminas B5, 2,28 μM de zeatina e 6 μM de ácido indolacético (AIA) e uma média de 3,35 brotos por explante.

Com o propósito de potencializar as respostas morfogênicas dos tecidos vegetais além do meio de cultura e da seleção de explantes competentes, o pré-tratamento de explantes foliares ou fonte dos explantes (mudas, brotos ou sementes) com reguladores de crescimento, são conhecidos por induzirem máxima eficiência de regeneração dos explantes, aumentando a competência celular para o desenvolvimento de novos órgãos e a taxa de formação brotos por explante (Kucharska e Orlikowska, 2009; Kumar et al., 2010; Hartmann et al. 2011; Bakshi et al., 2012; Tang et al., 2012; Srivastava, 2012; Tie et al., 2013).

Como descrito na literatura o pré-tratamento com o TDZ tem se mostrado eficiente (Bakshi et al., 2012; Srivastava, 2012), podendo induzir aumento de 1,5 a 2 vezes no número de brotos em explantes de *Vigna unguiculata* (Bakshi et al., 2012) e *Curculigo orchioides* (Thomas, 2007) e otimizar as respostas organogênicas em explantes foliares (Malik et al., 2010), nodais de *Nyctanthes arbor-tristis* (Jahan et al., 2011) e folhas de framboesa (*Rubus*) e maçã (*Malus*) (Swartz et al., 1990).

É conhecido que o elevado nível endógeno do regulador altera a competência das células do tecido às respostas organogênicas e embriogênicas (Kucharska e Orlikowska 2009; Kumar et al., 2010; Hartmann et al., 2011; Bakshi et al., 2012; Tang et al., 2012; Srivastava, 2012; Tie et al., 2013).

As citocininas como o BAP agem estimulando a divisão celular, ocasionando o aumento do número de células meristemáticas no tecido (Bakshi et al., 2012); já o TDZ age promovendo a porosidade da parede celular, maior densidade do citoplasma e vacúolo, induz aumento da divisão celular e é conhecido por auxiliar também no aumento das taxas de transformação genética de diferentes espécies lenhosas (Sriskandarajah e Goodwin, 1998). Desta forma o pré-tratamento com citocininas e o estabelecimento de um eficiente protocolo de organogênese in vitro podem facilitar o processo de transformação tanto nuclear quanto plastidial de plantas de urucum. Parimalan et al. (2010), após o

estabelecimento de um protocolo de embriogênese somática, obtiveram, por meio de transformação nuclear mediada por *Agrobacterium*, plantas de urucum transgênicas.

O protocolo desenvolvido nesse trabalho não só abrange a otimização do processo de organogênese para a transformação nuclear, mas também para a transformação plastidial. A transformação plastidial tem se tornado uma alternativa à transformação nuclear, devido, principalmente, as suas vantagens como: contenção gênica pela ausência de transmissão do genoma plastidial por meio do pólen; integração precisa do transgene ocorre exclusivamente por recombinação homóloga; expressão de vários genes através da construção de operons (transcrição de mRNAs policistrônicos); produção de altos níveis de proteínas podendo alcançar valores próximos a 70% das proteínas solúveis na célula e ausência de efeitos epigenéticos e mecanismos de silenciamento gênico (Oey et al., 2009; Apel e Bock, 2009; Lu et al., 2013; Bock, 2013, 2014).

Em vista das informações supracitadas existem poucos estudos sobre a regulação gênica da via de biossíntese de bixina, além da ausência de relatos de clonagem dos genes envolvidos e da transformação genética de urucum utilizando esses genes, bem como estratégias visando análise funcional desses genes como RNAi e microRNAs artificiais. Mostrando-se necessário trabalhos visando avanços nos estudos funcionais de genes relacionados a via de biossíntese de bixina e a transformação genética de plantas de urucum. Para tanto, são necessários protocolos eficientes de regeneração de plantas via cultura de tecidos vegetais e a otimização destes visando à transformação genética nuclear e plastidial.

Considerando que um dos fatores determinantes para o sucesso da transformação é a capacidade de regeneração do tecido após o processo de transformação genética, induzindo uma máxima formação de embriões e/ou brotações ou raízes via organogênese (Anami, 2013). Dessa forma o presente trabalho servirá como ferramenta para subsidiar avanços nos estudos da rota de biossíntese de bixina, por meio da genética funcional via transformação nuclear, bem como inserção de genes da via no genoma plastidial visando o aumento da produção de bixina.

Objetivos

Este trabalho visa a otimização dos métodos de regeneração in vitro via organogênese, utilizando como explantes segmentos de hipocótilos de plântulas urucum germinadas in vitro.

Objetivos específicos:

- Avaliar a influência de diferentes tamanhos de explantes hipocotiledonares nas respostas organogênicas de urucum cultivados em meio MS e JADS;
- Verificar o efeito da secção e posição no meio de cultura de explantes hipocotiledonares de urucum cultivados em meio MS e JADS;
- Analisar a ação do pré-tratamento de explantes hipocotiledonares de urucum com diferentes citocininas cultivados em meio MS e JADS;
- Analisar a eficiência dos meios MS e JADS na regeneração e crescimento das brotações e indução de raízes nos brotos regenerados.

2. Material e métodos

Todos os experimentos da cultura de tecidos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO).

Material Vegetal e condições de cultivo

Sementes de urucum da variedade Piave Vermelha, doadas gentilmente pela empresa Christian Hansen de Valinhos – SP foram escarificadas manualmente com auxílio de bisturi, através da realização de pequenos cortes na região oposta a micrópila. Após a escarificação, as sementes foram desinfestadas em álcool etílico 70% (v/v), por 10 min, e em uma solução de hipoclorito de sódio 1,5% (v/v) acrescida de Tween 20 a 0,1% (v/v), por 20 minutos e enxaguadas cinco vezes em água destilada e autoclavada para remoção do excesso das soluções utilizadas durante o processo de desinfestação.

Sementes assépticas foram inoculadas ou cultivadas ou germinadas em meio MS com metade da constituição salina, macronutriente e micronutrientes, suplementado com o complexo vitamínico do meio B5 (Tabela 1). O pH do meio de cultura foi ajustado em $5,7 \pm 0,1$ e autoclavado a 121°C , 1,1 atm por 20 minutos. As sementes foram mantidas em sala de crescimento à temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, no escuro, durante 15 dias após a indução da germinação e, posteriormente, foram transferidas para a luz, com fotoperíodo de 16 h e irradiância de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante sete dias, após esse período hipocótilos estiolados e enverdecidos foram utilizados como fonte de explantes.

Todos os explantes hipocotiledonares foram cultivados no meio MS e JADS (Tabela 1) sem reguladores de crescimento e meio MS e JADS suplementados com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de zeatina (MS – Zea e JADS – Zea, respectivamente). O pH dos meios de cultura foram ajustados para em $5,7 \pm 0,1$ e autoclavado a 121°C , 1,1 atm por 20 minutos. Todas as culturas foram mantidas em sala de crescimento à temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 16 h e irradiância de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Tabela 1. Composição do meio de cultura JADS (Correia, 1995) e MS (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com vitaminas do meio B5 (Gamborg et al., 1968), utilizados para o cultivo in vitro de *B. orellana*.

Composição	Concentração	
	JADS	MS
Macronutrientes		
CaCl ₂ .2H ₂ O	–	3,00 mM
Ca (NO ₃) ₂ .4 H ₂ O	5,00 mM	–
KH ₂ PO ₄	3,00 mM	1,25 mM
KNO ₃	8,00 mM	18,8 mM
MgSO ₄ .7H ₂ O	3,00 mM	1,5 mM
NH ₄ NO ₃	4,00 mM	20,6 mM
Micronutrientes		
CoCl ₂ .6H ₂ O	1,00 µM	0,10 µM
CuSO ₄ .5H ₂ O	5,00 µM	0,10 µM
FeSO ₄ .7H ₂ O	200,00 µM	100,00 µM
H ₃ BO ₃	50,10 µM	100,00 µM
MnSO ₄ .4H ₂ O	75,60 µM	100,00 µM
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,62 µM	1,00 µM
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	200,00 µM	100,00 µM
ZnSO ₄ .7H ₂ O	14,90 µM	30,00 µM
KI	–	5,00 µM
Orgânicos		
Ácido Nicotínico	4,00 µM	4,06 µM
L-glutamina	992,30 µM	–
L-cisteína	20,60 µM	–
Mio Inositol	555,06 µM	555,06 µM
Pantotenato de Cálcio	5,00 µM	–
Piridoxina HCl	2,43 µM	2,43 µM
Tiamina-HCl	14,80 µM	0,2964 µM
Sacarose	87,64 mM	87,64 mM
Ágar (Merck)	6,5 g. L ⁻¹	6,5 g. L ⁻¹
pH	5,7 – 5,8	5,7 – 5,8

2.1. Experimento I: Influência do meio de cultura e camada fina de explantes hipocotiledonares na eficiência da resposta organogênica em urucum

Com o objetivo de verificar a resposta organogênica de tecidos hipocotiledonares seccionados em camadas finas (thin-layer). Explantes hipocotiledonares estiolados e enverdecidos obtidos de plantas pré-estabelecidas in vitro segundo a metodologia descrita acima, foram seccionados em diferentes tamanhos (1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 mm) e dispostos horizontalmente no meio de cultura MS e JADS ambos suplementados com zeatina 0,0 e 1,0 mg L⁻¹. (Figura 1).

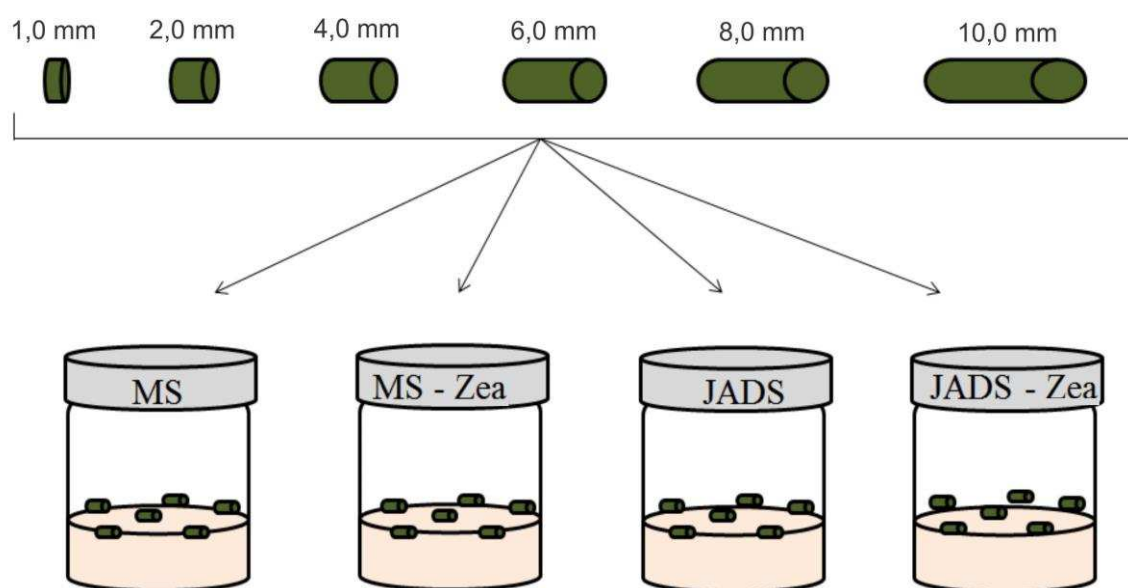


Figura 1. Desenho esquemático da metodologia adotada para verificar a influência do meio de cultura e camada fina de explantes hipocotiledonares na eficiência da resposta organogênica em urucum.

Enraizamento

Brotações maiores ou iguais a 20 mm, obtidas a partir dos tratamentos que apresentaram melhores resultados para organogênese, foram enraizadas em meio de cultura segunda formulação utilizada por Carvalho et al. (2005). As plantas foram acondicionadas nas mesmas condições de cultivo citadas acima. Após 15 dias foi avaliada a frequência de enraizamento (%) e tamanho médio das raízes.

Aclimatização

Para aclimatização foram utilizadas somente brotações enraizadas. Os brotos tiveram suas raízes lavadas em água corrente para remoção do excesso de meio de cultura.

Em seguida foram transplantados para recipientes plásticos (300 mL) contendo substrato Tropstrato HT Hortaliças[®] e envolvidas por um saco plástico. As plantas foram mantidas sob condições ambientais. Orifícios foram feitos no saco plástico a cada sete dias, após 21 dias as plantas tiveram os sacos plásticos retirados e foram mantidas em condições ambientais. Após 30 dias da aclimatização foi avaliado o índice de sobrevivência das plantas.

2.2. Experimento II: Influência do meio de cultura, secção e posição de explantes hipocotiledonares na eficiência da resposta organogênica em urucum

Hipocótilos estiolados e enverdecidos obtidos a partir de plantas de urucum pré-estabelecidas *in vitro* segundo a metodologia citada acima, foram seccionados (10 mm de comprimento) de diferentes formas: transversalmente, transversalmente com pequenos ferimentos (cortes) realizados com auxílio de bisturi ao longo de seu comprimento (lado externo do explante) e longitudinalmente. Explantes seccionados longitudinalmente foram dispostos no meio de cultura com a secção em contato ou em posição oposta ao meio de cultura MS e JADS ambos suplementados com zeatina 0,0 e 1,0 mg L⁻¹ (Figura 2).

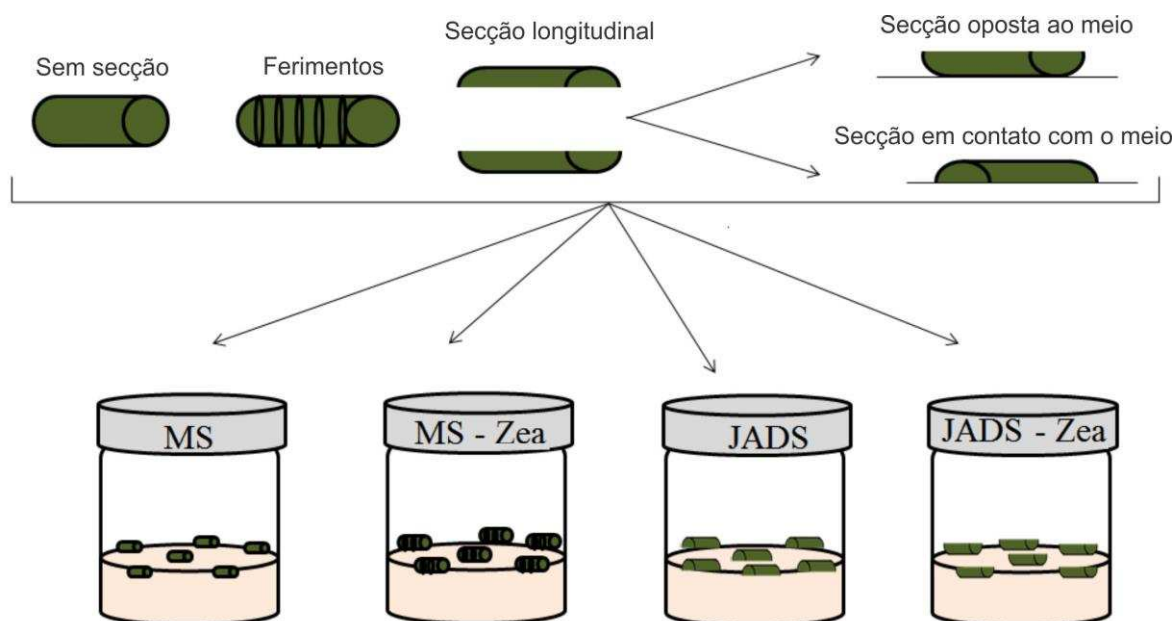


Figura 2. Desenho esquemático da metodologia adotada para verificar a influência do meio de cultura, secção e posição de explantes hipocotiledonares na eficiência da resposta organogênica em urucum.

2.3 Experimento III: Influência do pré-tratamento com citocininas na eficiência da resposta organogênica de explantes hipocotiledonares de urucum

Sementes de urucum foram desinfestadas segundo a metodologia citada anteriormente e inoculadas no meio de cultura MS (Tabela 1), suplementado com diferentes concentrações de zeatina (0,0; 0,1 e 0,5 mg L⁻¹), BAB (0,0; 0,1 e 0,5 mg L⁻¹) e TDZ (0,0; 0,1 e 0,5 mg L⁻¹) e posteriormente germinadas segundo a metodologia descrita acima. O Tecido vegetal foi submetido a 22 dias de pré-tratamento com citocininas. As plântulas estioladas e enverdecidas germinadas em meio sem e com pré-tratamento com citocininas foram utilizadas para a obtenção explantes hipocotiledonares (10 mm de comprimento). Os explantes foram inoculados em meio MS e JADS ambos suplementas com zeatina 0,0 e 1,0 mg L⁻¹ (Figura 3).

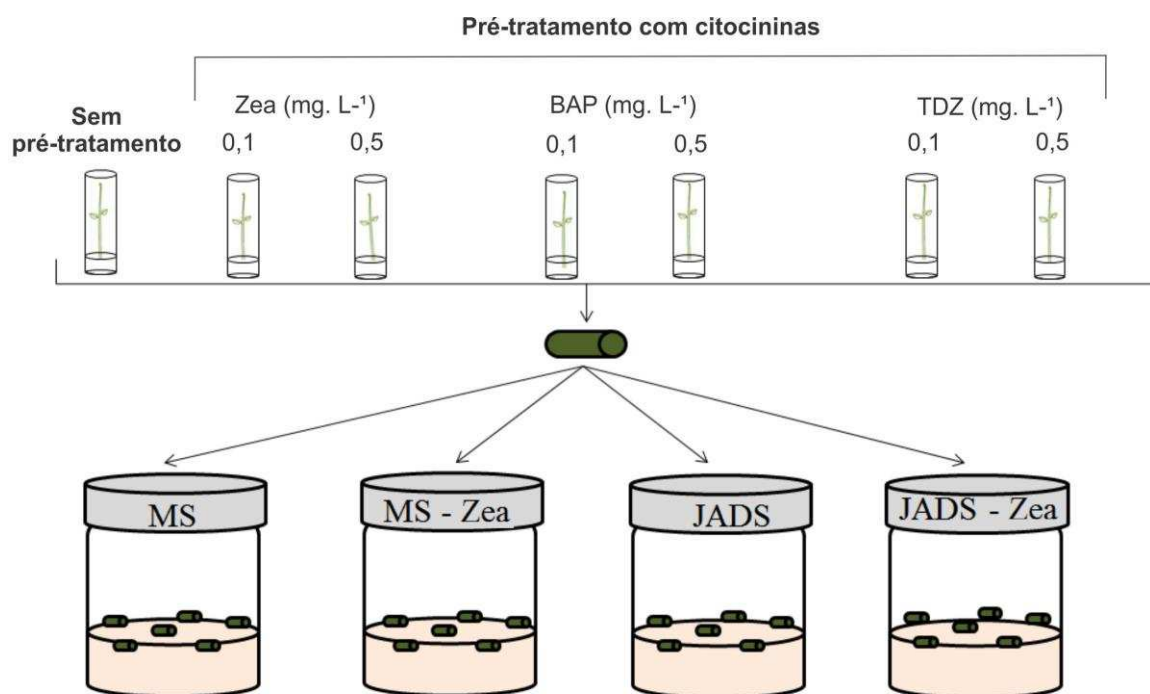


Figura 3. Desenho esquemático da metodologia adotada para verificar a influência do pré-tratamento com citocininas na eficiência da resposta organogênica de explantes hipocotiledonares de urucum

Análise histológica

Para estudos de anatomia, segmentos de hipocótilos estioladas e enverdecidos foram coletados após 22 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura MS sem e com pré-tratamento com citocininas. As amostras foram fixadas em solução de Karnovsky (1965), modificado, por 24 horas, desidratada em série etílica e incluídas em metacrilato (Histo

resin, Leica). Para a obtenção de cortes longitudinais com 5 μm foi utilizado micrótomo rotativo de avanço automático (RM 2255 – Leica) equipado com navalha de vidro.

Os cortes foram corados com azul de toluidina em pH 4,4 (O'Brien e McCully, 1981) por 10 minutos, e as lâminas foram montadas com resina sintética (Permout). A análise e documentação fotográfica foram realizadas em microscópio de luz (Olympus-AX 70), conectado a um sistema de fotomicrografia (Olympus U-Photo), do laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da UFV.

Aclimatização

Brotos maiores ou iguais a 20 mm, regenerados a partir dos meios de cultura MS e JADS foram enraizados em meio de cultura segundo a formulação descrita por Carvalho et al. (2005). Após 15 dias foram avaliados os seguintes parâmetros: frequência de enraizamento (%), tamanho médio das raízes e o número médio de raízes.

Para a aclimatização, brotos enraizados tiveram sua base lavada em água corrente para remoção do excesso de meio de cultura. Em seguida foram transplantados para recipientes plásticos (300 mL) contendo substrato Tropstrato HT Hortaliças[®]. A parte aérea das brotações foi envolvida por um saco plástico para evitar a transpiração excessiva. As plantas foram mantidas sob condições ambientais. Orifícios foram feitos no saco plástico a cada sete dias, após 21 dias as plantas tiveram os sacos plásticos removidos e foram mantidas em condições ambientais. O índice de sobrevivência das plantas (%) foi avaliado após 30 dias em condições ex vitro.

Delineamento experimental

O delineamento experimental adotado em todos os experimentos foi inteiramente casualizado em esquema fatorial duplo, com cinco repetições, sendo cada unidade experimental constituída de um frasco contendo seis explantes. Após 30 e 60 dias de cultura in vitro foram analisados os seguintes parâmetros: frequência de organogênese (%), número médio de brotos por explante (considerando brotos ≥ 1 mm), comprimento médio dos brotos por explante e aos 60 dias foi avaliado também o número médio de brotos por explante ≥ 20 mm.

Análise estatística

Em todos os experimentos as variáveis em porcentagem foram transformadas para arco seno de $x^{0,5}$, para as demais variáveis foi feita a transformação de $X + 0,01$. Os dados

foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste F e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ambos a 5% de probabilidade, utilizando o programa Assistat versão 7,7 beta (Silva e Azevedo 2009). Os gráficos foram desenhados utilizando o programa Sigma Plot 11.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA).

3. Resultados

Nos explantes hipocotiledonares foi observada a formação de brotações adventícias, calos e a ocorrência de hiperhidricidade apenas quando os explantes hipocotiledonares foram cultivados no meio MS suplementado ou não com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de zeatina. Tal desequilíbrio fisiológico não foi observado quando os explantes foram cultivados em meio JADS com ou sem zeatina. Da mesma maneira, maior ocorrência de necrose apical das brotações foi observada, após 60 dias de cultura in vitro no meio MS. Fato este que pode ser verificado nas figuras 4, 6 e 9.

3.1 Influência do meio de cultura e camada fina de explantes hipocotiledonares na eficiência da resposta organogênica em urucum

Todas as variáveis após 30 e 60 dias de cultura in vitro apresentaram melhores resultados nos meios de cultura suplementados com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de Zeatina. Esse resultado demonstra que a adição de citocininas ao meio de cultura é necessária para otimizar a indução de brotos adventícios em explantes hipocotiledonares de urucum. Foi observada a expansão radial das extremidades dos explantes hipocotiledonares, devido a intensa divisão celular (Figura 4). Em seguida foi possível observar a formação de brotos e calos. A calogênese acontece em maior proporção na extremidade apical do explante (direcionada ao ápice da planta) enquanto a maior indução de brotos é observada na extremidade basal dos explantes (Figura 4).

Avaliando a frequência de organogênese após 30 dias de cultura in vitro, independente do tamanho do explante, foi observada maior organogênese no meio de cultura JADS - Zea, se mostrando mais eficiente na indução de brotos adventícios que o meio de cultura MS - Zea (Tabela 2 e Figura 4). Após 30 dias de cultura in vitro os explantes com 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 mm cultivados nos meios MS - Zea e JADS - Zea, demonstram maior capacidade organogênica se comparado a explantes com 1,0 e 2,0 mm de comprimento (Tabela 2).

Tabela 2 Frequência de organogênese (%) em explantes hipocotiledonares de *B. orellana* de diferentes tamanhos após 30 dias de cultivo in vitro em diferentes meios de cultura.

Comprimento do explante (mm)	Meio de cultura				Média
	MS	JADS	MS - Zea	JADS - Zea	
1	0,00 Ba	0,00 Bb	0,00 Bc	73,33 Ac	18,33
2	0,00 Ca	0,00 Cb	60,00 Bb	86,67 Abc	36,67
4	0,00 Ba	0,00 Bb	86,67 Aa	93,33 Aab	45,00
6	0,00 Ba	0,00 Bb	96,67 Aa	100,00 Aa	49,17
8	0,00 Ca	0,00 Cb	86,67 Ba	100,00 Aa	46,67
10	0,00 Ca	43,33 Ba	93,33 Aa	100,00 Aa	59,17
Média	0,0000	7,22	70,56	92,22	
CV (%)					16,63
F (Comprimento do Explante (CE))					82,00 **
F (Meio de Cultura (MC))					1214,74 **
F (CE x MC)					35,64 **

* $P \leq 0,05$ e ** $P \leq 0,01$ pelo teste F.

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal (fator meio de cultura) e minúsculas na vertical (fator comprimento dos explantes) não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A frequência de organogênese após 60 dias de cultivo no meio JADS - Zea independente do tamanho do explante foi significativamente maior se comparados aos demais meios de cultura (Figura 4), alcançando 100% de organogênese, entretanto não diferindo do meio MS - Zea, quando explantes com 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 mm de tamanho foram utilizados (Tabela 3).

Exceto explantes com 1,0 mm todos os tamanhos de explantes testados apresentaram 100% de organogênese após 60 dias de cultura in vitro em meio JADS - Zea (Tabela 3). Explantes contendo 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 mm de comprimento, quando cultivados em meio MS - Zea, apresentaram menos eficiência na indução de organogênese, sendo observadas porcentagens de regeneração entre 90 a 100% nesses explantes (Tabela 3). Mesmo nos explantes cultivados em meio de cultura livre de citocininas foi possível observar a ocorrência de organogênese principalmente (Figura 4) após 60 dias de cultivo in vitro, independentemente do meio de cultura utilizado (Tabela 3).

Tabela 3 Frequência de organogênese (%) de diferentes tamanhos de explantes hipocotiledonares de *B. orellana* após 60 dias de cultivo in vitro em diferentes meios de cultura.

Comprimento do explante (mm)	Meio de cultura				Média
	MS	JADS	MS - Zea	JADS - Zea	
1	0,00 Cc	0,00 Cc	66,67 Bbc	96,67 Aa	40,83
2	73,33 Ba	16,67 Cb	60,00 Bc	100,00 Aa	62,50
4	23,33 Bb	53,33 Ba	90,00 Aabc	100,00 Aa	66,67
6	33,33 Bb	40,00 Bab	100,00 Aa	100,00 Aa	68,33
8	36,67 Bab	43,33 Bab	93,33 Aab	100,00 Aa	68,33
10	40,00 Bab	63,33 Ba	96,67 Aa	100,00 Aa	75,00
Média	34,44	36,11	84,44	99,44	
CV (%)					19,53
F (Comprimento do Explante (CE))					20,60 **
F (Meio de Cultura (MC))					151,06 **
F (CE x MC)					6,32 **

* $P \leq 0,05$ e ** $P \leq 0,01$ pelo teste F.

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal (fator meio de cultura) e minúsculas na vertical (fator comprimento dos explantes) não diferem entre si pela a 5% de probabilidade e teste de Tukey.

Analisando a indução de brotos por explantes após 30 dias de cultura, o meio JADS - Zea e MS - Zea, apresentaram resultados significativamente superiores, independente dos tamanhos de explantes testados (Figura 4). Aos 30 dias de cultivo no meio MS - Zea foi observado em explantes com 6,0 mm de comprimento a formação de 7,8 brotos, sendo este valor significativamente maior se comparado aos explantes com 6,0 mm cultivados no meio JADS - Zea (Tabela 4).

O maior número de brotos após 30 dias de cultura in vitro foi significativamente observado nos explantes contendo 6,0 e 10,0 mm de comprimento tanto para o meio MS - Zea com 7,80 e 7,03 brotos, respectivamente, quanto para o meio JADS - Zea, com 6,64 e 7,40 brotos, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4. Número médio de brotos regenerados de explantes hipocotiledonares de *B. orellana* a partir de diferentes tamanhos após 30 dias de cultivo in vitro em diferentes meios de cultura.

Comprimento do explante (mm)	Meio de cultura				Média
	MS	JADS	MS - Zea	JADS - Zea	
1	0,00 Ba	0,00 Ba	0,33 Be	2,60 Ae	0,73
2	0,00 Ba	0,00 Ba	2,93 Ad	3,33 Ade	1,56
4	0,00 Ba	0,00 Ba	4,67 Ac	4,57 Acd	2,31
6	0,10 Ca	0,00 Ca	7,80 Aa	6,64 Bab	3,63
8	0,07 Ba	0,00 Ba	6,33 Ab	5,57 Abc	2,99
10	0,07 Ba	0,53 Ba	7,03 Aab	7,40 Aa	3,75
Média	0,04	0,09	4,85	5,02	
CV (%)					27,44
F (Comprimento do Explante (CE))					60,3 **
F (Meio de Cultura (MC))					500,82 **
F (CE x MC)					20,36 **

*P ≤ 0,05 e **P ≤ 0,01 pelo teste F.

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal (fator meio de cultura) e minúsculas na vertical (fator comprimento dos explantes) não diferem entre si a 5% de probabilidade e teste de Tukey.

O meio JADS - Zea induziu aos 60 dias de cultura, independente do tamanho do explante, maior número de brotos se comparado ao meio MS - Zea (Figura 4). Os tratamentos JADS - Zea e MS - Zea, se mostram semelhantes quando se utilizou explantes com 6,0 mm de tamanho (Tabela 5).

Explantes contendo 8,0 e 10,0 mm de comprimento apresentaram a formação de 10,03 e 9,35 brotos por explante, respectivamente, quando cultivados em meio JADS - Zea, após 60 dias. Para o meio MS - Zea após 60 dias de cultura, explantes contendo 6,0 e 10,0 mm foi observado 8,47 e 7,7 brotos por explante, respectivamente (Tabela 5). Meios de cultura livres de zeatina após 30 e 60 dias de cultura apresentaram menor indução de brotos se comparados aos meios suplementados com zeatina (Tabela 4 e 5).

Tabela 5. Número médio de brotos regenerados de explantes hipocotiledonares de *B. orellana* a partir de diferentes tamanhos após 60 dias de cultivo in vitro em diferentes meios de cultura.

Comprimento do explante (mm)	Meio de cultura				Média
	MS	JADS	MS - Zea	JADS - Zea	
1	0,00 Cb	0,00 Ca	2,40 Bd	5,70 Ad	2,02
2	1,50 Ca	0,30 Da	4,20 Bc	7,63 Ac	3,41
4	0,40 Cab	1,13 Ca	6,40 Bb	7,70 Ac	3,91
6	0,83 Bab	0,77 Ba	8,47 Aa	8,69 Abc	4,69
8	1,17 Cab	0,97 Ca	6,60 Bb	10,03 Aa	4,69
10	1,10 Cab	0,53 Ca	7,70 Bab	9,35 Aab	4,67
Média	0,83	0,62	5,96	8,18	
CV (%)					18,49
F (Comprimento do Explante (CE))					42,89 **
F (Meio de Cultura (MC))					819,36 **
F (CE x MC)					11,13 **

* $P \leq 0,05$ e ** $P \leq 0,01$ pelo teste F.

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal (fator meio de cultura) e minúsculas na vertical (fator comprimento dos explantes) não diferem entre si pela a 5% de probabilidade e teste de Tukey.

Analisando o comprimento médio das brotações por explante após 30 dias, foi observado no meio JADS - Zea independente do tamanho do explante, significativamente o maior comprimento médio dos brotos se comparado aos demais meios de cultura, não diferindo do meio MS - Zea se utilizados explantes com 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 mm de comprimento (Tabela 6 e Figura 4). Explantes contendo 6,0; 8,0 e 10,0 mm de comprimento foram mais eficientes, promovendo maior comprimento dos brotos por explante, em meio JADS - Zea após 30 dias de cultura, sendo os explante com 2,0; 4,0 e 8,0 mm de comprimento significativamente ao de 10,0 mm após 30 dias de cultivo in vitro também no meio JADS (Tabela 6).

Tabela 6. Comprimento médio dos brotos por explante (mm) regenerados a partir de diferentes tamanhos do explantes hipocotiledonares de *B. orellana* após 30 dias de cultivo in vitro em diferentes meios de cultura

Comprimento do explante (mm)	Meio de cultura				Média
	MS	JADS	MS - Zea	JADS - Zea	
1	0,00 Ba	0,00 Bb	0,11 Be	1,44 Ac	0,39
2	0,00 Ca	0,00 Cb	1,15 Bd	2,10 Ab	0,81
4	0,00 Ba	0,00 Bb	1,61 Acd	2,07 Ab	0,92
6	0,07 Ba	0,00 Bb	2,61 Aab	2,76 Aa	1,36
8	0,05 Ba	0,00 Bb	2,11 Abc	2,20 Ab	1,09
10	0,10 Ca	0,65 Ba	2,66 Aa	2,46 Aab	1,47
Média	0,04	0,11	1,71	2,17	
CV (%)					28,3
F (Comprimento do Explante (CE))					37,27 **
F (Meio de Cultura (MC))					434,96 **
F (CE x MC)					434,96 **

*P ≤ 0,05 e **P ≤ 0,01 pelo teste F.

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal (fator meio de cultura) e minúsculas na vertical (fator comprimento dos explantes) não diferem entre si a 5% de probabilidade e teste de Tukey.

Quanto ao comprimento médio das brotações por explante após 60 dias foi a presença de zeatina se mostrou essencial para o crescimento das brotações, sendo observada no meio JADS - Zea o maior comprimento dos brotos não diferindo do meio MS - Zea se utilizado explantes com 6,0; 8,0 e 10,0 mm de comprimento (Tabela 7 e Figura 4). Explantes contendo 6,0; 8,0 e 10,0 mm de comprimento e apresentaram brotos com tamanho médio de 3,57; 3,53 e 4,24 mm em meio JADS – Zea e 3,12; 3,18 e 2,66 no meio MS – Zea, respectivamente (Tabela 7). Explantes contendo 1,0; 2,0 e 4,0 mm de comprimento não demonstraram a mesma eficiência para o crescimento de brotos (Tabela 7).

Tabela 7. Comprimento médio dos brotos por explante (mm) regenerados a partir de diferentes tamanhos do explantes hipocotiledonares de *B. orellana* após 60 dias de cultivo in vitro em diferentes meios de cultura

Comprimento do explante (mm)	Meio de cultura				Média
	MS	JADS	JADS - Zea	MS - Zea	
1	0,00 Bb	0,00 Ba	2,52 Ab	0,97 Bc	0,87
2	1,51 Ba	0,17 Ca	3,24 Aab	1,15 BCc	1,51
4	0,47 Bab	0,57 Ba	4,05 Aa	1,69 Bbc	1,69
6	0,48 Bab	1,15 Ba	3,57 Aab	3,12 Aa	2,08
8	0,61 Bab	0,71 Ba	3,53 Aab	3,81 Aa	2,16
10	1,07 Cab	1,22 Ca	4,24 Aa	2,66 Bab	2,30
Média	0,69	0,64	3,52	2,23	
CV (%)					42,88
F (Comprimento do Explante (CE))					9,65 **
F (Meio de Cultura (MC))					98,53 **
F (CE x MC)					3,08 **

* $P \leq 0,05$ e ** $P \leq 0,01$ pelo teste F.

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal (fator meio de cultura) e minúsculas na vertical (fator comprimento dos explantes) não diferem entre si a 5% de probabilidade e teste de Tukey.

Para o número médio de brotos igual ou superior a 2,0 mm após 60 dias de cultura in vitro, o meio de cultura foi o único fator que interferiu nessa variável. Onde foi observado no meio JADS+ Zea independente do tamanho do explante utilizado até 0,40 brotos por explante com tamanho igual ou superior a 20 mm de comprimento (Tabela 8).

Tabela 8. Número médio de brotos por explante com tamanho \geq a 20 mm regenerados a partir de diferentes tamanhos do explantes hipocotiledonares de *B. orellana* após 60 dias de cultivo in vitro em diferentes meios de cultura.

Comprimento do explante (mm)	Meio de cultura				Média
	MS	JADS	MS - Zea	JADS - Zea	
1	0,00	0,00	0, 00	0,03	0,00 a
2	0,00	0,00	0, 00	0,13	0,03 a
4	0,00	0,00	0, 00	0,23	0,05 a
6	0,00	0,00	0,07	0,23	0,07 a
8	0,00	0,00	0,10	0,30	0,10 a
10	0,00	0,00	0,03	0,40	0,11 a
Média	0,00 B	0,00 B	0,03 B	0,22 A	
CV (%)					199,57
F (Comprimento do Explante (CE))					1,85 ^{ns}
F (Meio de Cultura (MC))					21,05 ^{**}
F (CE x MC)					0,79 ^{ns}

* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$ e ^{ns} não significativo pelo teste F.

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal (fator meio de cultura) e minúsculas na vertical (fator comprimento dos explantes) não diferem entre si a 5% de probabilidade e teste de Tukey.

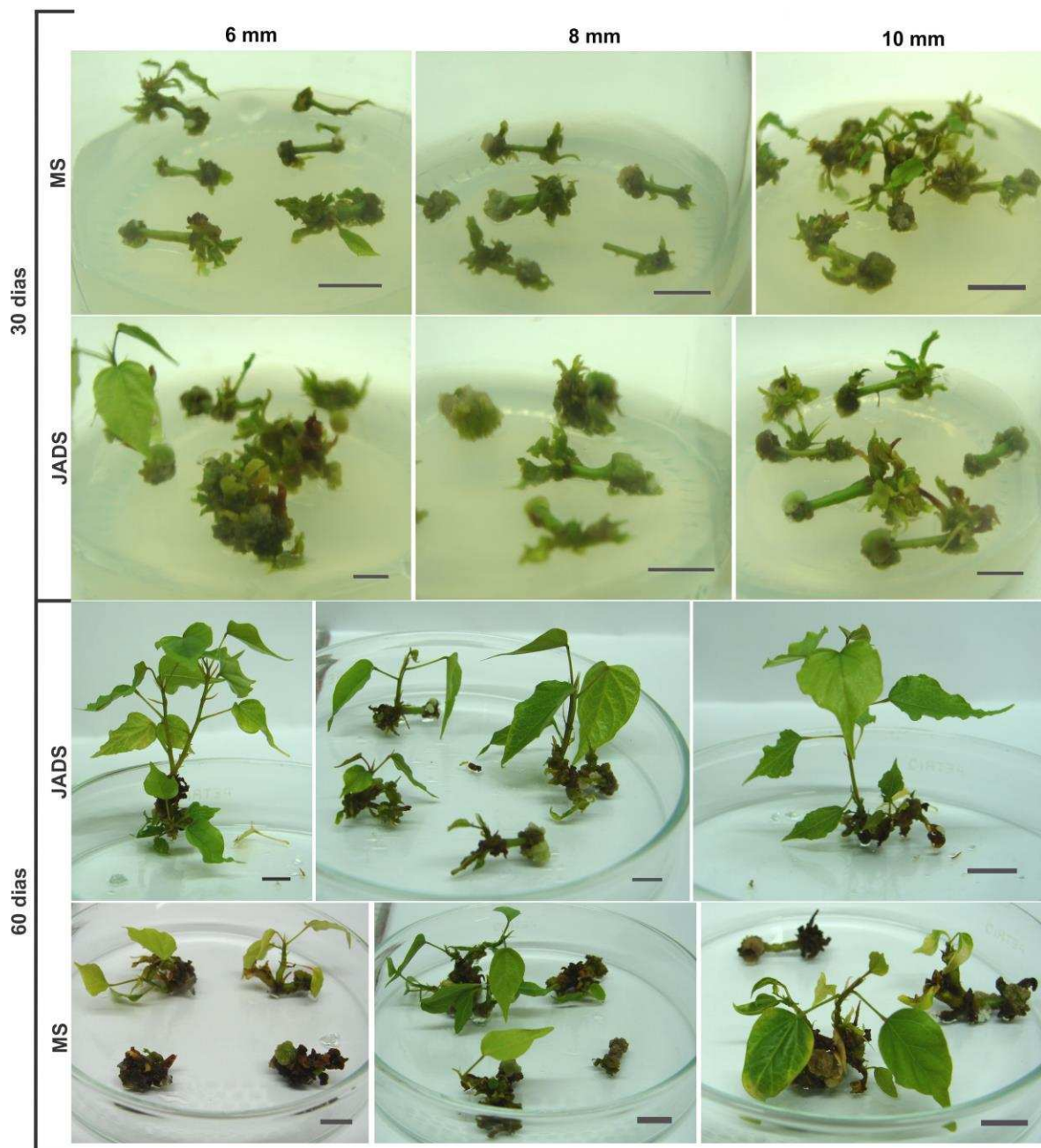


Figura 4 Propagação in vitro de *B. orellana* a partir de diferentes tamanhos de explante hipocotiledonar cultivados no meio de cultura JADS e MS ambos com 1 mg L^{-1} de zeatina Barra = 1 cm.

Enraizamento dos Brotos

Para o enraizamento foram utilizadas brotações maiores ou iguais a 20 mm originadas a partir de explantes hipocotiledonares após 30 e 60 dias de cultivo in vitro, as quais se desenvolveram a partir de explantes contendo 6,0; 8,0 e 10,0 mm de comprimento cultivado em meio JADS – Zea.

Para todos os parâmetros avaliados, não foi observada diferença significativa entre brotos originados a partir de explantes 6,0; 8,0 e 10,0 mm, (Figura 5 A, B e C). Avaliando

a frequência de enraizamento dos brotos com 6,0; 8,0 e 10,0 mm de comprimento foram observados 52,0; 44,0 e 60,0 % dos brotos enraizados, respectivamente (Figura 5 A). Para o comprimento médio das raízes foi observado para explantes contendo 6,0; 8,0 e 10,0 mm de comprimento, 2,92; 4,44 e 3,91 mm, respectivamente (Figura 5 B). Quanto ao número médio de raízes os brotos regenerados a partir de explantes contendo 6,0; 8,0 e 10,0 mm de comprimento apresentaram 2,7; 3,5 e 4,2 raízes por broto (Figura 5 C).

Os brotos enraizados (Figura 5 D) foram aclimatizados em substrato e após 30 dias à aclimatização foi obtida com sucesso de 100% de sobrevivência das plântulas. As plântulas aclimatizadas foram mantidas em condições ambientais por quatro meses (Figura 5 E) e o seu desenvolvimento analisado.

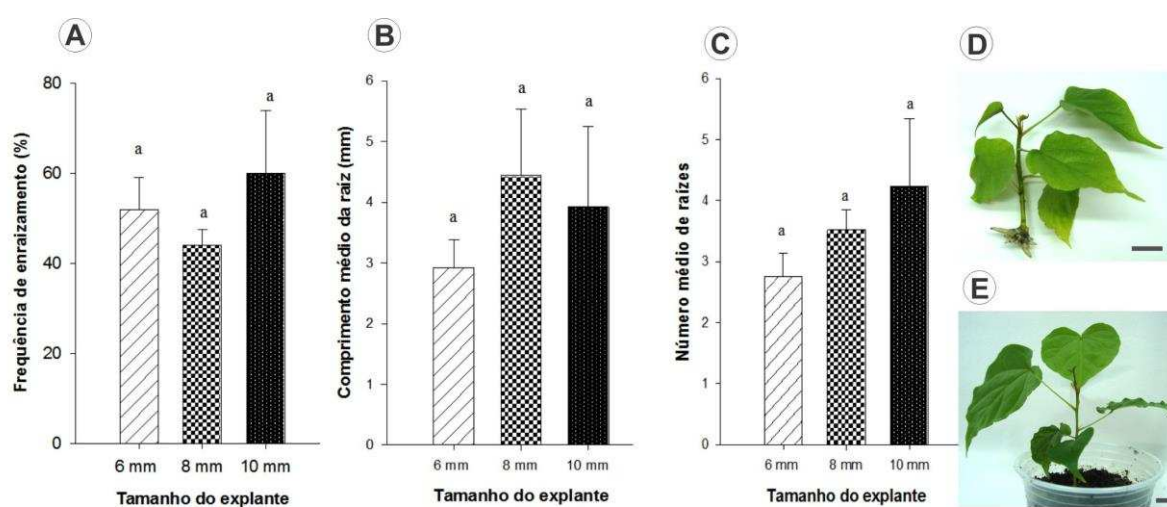


Figura 5. Eficiência do enraizamento de brotos de *B. orellana* obtidos de explantes hipocotiledonares de diferentes tamanhos em meio de cultura MS após 22 dias. (A) Frequência de enraizamento (%); (B) Comprimento médio das raízes (mm); (C) Número médio de raízes. (D) Brotos enraizados; (E) Planta após quatro meses de aclimatização. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Barra = 1 cm.

3.2 Influência do meio de cultura, secção e posição de explantes hipocotiledonares na eficiência da resposta organogênica em urucum

De acordo com a forma de secção do explante foi observado diferentes padrões de formação de brotos adventícios. Em explantes sem secção (controle) foi observado a expansão radial das extremidades, devido à intensa divisão celular e posterior formação de brotos. Quando realizado ferimentos ao longo dos explantes, verificou-se a formação de múltiplas brotações adventíceas em menor número de regiões e diminuição da expansão

radial das extremidades dos explantes. Já em explantes seccionados longitudinalmente, foi observada expansão radial de todo o explante, e posterior formação de brotos adventíceos distribuídos ao longo de todo o explante. Em todas as formas de secção dos explantes analisadas foi possível observar a formação de brotos e calos.

A formação de calos nos explantes controle aconteceu em maior proporção na extremidade proximal enquanto a maior indução de brotos foi observada na extremidade basal dos explantes. Quando realizado ferimentos e secção longitudinal dos explantes, a formação de calos ocorre ao longo do explante.

Avaliando a frequência de organogênese após 30 dias de cultivo foi observado influencia significativa pela ANOVA a 5% de probabilidade do meio e secção do explante (Tabela 11). Os meios de cultura MS e JADS acrescidos de zeatina induziram aumento da organogênese nos explantes após 30 dias de cultivo, indicando a necessidade do uso de reguladores de crescimento para aumentos das respostas organogênicas (Tabela 11).

A realização de ferimentos e secções independente da posição do explante no meio levou ao aumento da organogênese após 30 dias de cultura quando comparado ao controle (Tabela 11). Em explantes seccionados em contato foi observado 80,83% de organogênese após 30 dias de cultivo, enquanto no controle apenas 56,67% dos explantes apresentaram respostas organogênicas(Tabela 11).

Tabela 9. Frequência de organogênese (%) de explantes hipocotiledonares de *B. orellana* seccionados de diferentes formas após 30 dias de cultivo in vitro em diferentes meios de cultura.

Secção do explante	Meio de cultura				Média
	MS	JADS	MS - Zea	JADS - Zea	
Sem secção	33,33	20,00	86,67	86,67	56,67 b
Ferimentos	63,33	20,00	86,67	90,00	65,00 ab
Secção oposta ao meio	43,33	53,33	90,00	90,00	69,16 ab
Secção em contato com meio	56,67	73,33	93,33	100,00	80,83 a
Média	49,1 B	41,66 B	89,17 A	91,67 A	
CV (%)					24,69
F (Secção do explante (Sec))					4,69 **
F (Meio de Cultura (MC))					30,86 **
F (Sec x MC)					1,97 ns

*P ≤ 0,05; **P ≤ 0,01 e ^{ns} = não significativo pelo teste Fteste F.

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal (fator meio de cultura) e minúsculas na vertical (fator secção dos explantes) não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Avaliando a frequência de organogênese após 60 dias de cultivo, o meio de cultura e as formas de secção do explante hipocotiledonar testadas afetaram a indução de organogênese, não havendo interação significativa entre os fatores meios de cultura e formas de secção do explante (Tabela 12).

Quando os explantes hipocotiledonares foram cultivados após 60 dias em meios suplementados com zeatina foi observado um aumento das respostas organogênicas (Tabela 12). Quando realizado ferimentos ou secção dos explantes foi observado aumento da resposta organogênica após 60 dias de cultivo (Tabela 12). Aos 60 dias de cultivo foi observado em explantes seccionados em contato com o meio 94,17% dos explantes com respostas organogênicas e quando os mesmos explantes foram cultivados em meios de cultura JADS acrescidos de zeatina, 98,33 % dos explantes apresentaram respostas organogênicas (Tabela 12).

Tabela 10. Frequência de organogênese (%) de explantes hipocotiledonares de *B. orellana* seccionados de diferentes formas após 60 dias de cultivo in vitro em diferentes meios de cultura.

Secção do explante	Meio de cultura				Média
	MS	JADS	MS - Zea	JADS - Zea	
Sem secção	70,00	50,00	100,00	93,33	78,33 b
Ferimentos	70,00	63,33	83,33	100,00	79,16 ab
Secção oposta ao meio	60,00	73,33	96,67	100,00	82,50 ab
Secção em contato com meio	90,00	90,00	96,67	100,00	94,17 a
Média	72,50 B	69,16 B	94,17 A	98,33 A	
CV (%)					18,02
F (Secção do explante (Sec))					3,21 *
F (Meio de Cultura (MC))					17,91 **
F (Sec x MC)					1,56 ns

* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$ e ^{ns} não significativo pelo teste F.

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal (fator meio de cultura) e minúsculas na vertical (fator secção dos explantes) não diferem entre si a 5% de probabilidade e teste de Tukey.

Para o parâmetro número médio de brotos após 30 dias de cultivo foi observada interação entre o meio de cultura e a forma de secção do explante (Tabela 13). Maior número de brotos foi observado nos explantes quando cultivados após 30 dias em meio MS e JADS suplementado com zeatina (Tabela 13). Explantes com ferimentos e seccionados em contato com o meio, cultivados no meio MS – Zea após 30 dias de cultivo foram igualmente eficientes para a regeneração de brotos (Tabela 13). Utilizando o meio JADS – Zea apenas explantes seccionados em contato com o meio foram eficientes, induzindo maior número de brotos por explante após 30 dias de cultivo in vitro (Tabela 13).

Tabela 11. Número médio de brotos regenerados a partir de explante hipocotiledonares de *B. orellana* seccionados de diferentes formas após 30 dias de cultivo in vitro em diferentes meios de cultura.

Secção do explante	Meio de Cultura				Média
	MS	JADS	MS - Zea	JADS - Zea	
Sem secção	0,50 Ba	0,43 Ba	4,70 Ab	4,73 Ab	2,59
Ferimentos	1,90 BCa	0,43 Ca	9,63 Aa	4,37 Bb	4,08
Secção oposta ao meio	1,00 Ba	0,90 Ba	5,80 Ab	5,33 Ab	3,26
Secção em contato com meio	2,07 Ba	2,10 Ba	10,67 Aa	9,90 Aa	6,18
Média	1,37	0,96	7,70	6,08	
CV (%)					54,22
F (Secção do explante (Sec))					10,15 **
F (Meio de Cultura (MC))					47,49 **
F (Sec x MC)					2,24 *

* $P \leq 0,05$ e ** $P \leq 0,01$ pelo teste F.

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal (fator meio de cultura) e minúsculas na vertical (fator secção dos explantes) não diferem entre si a 5% de probabilidade e teste de Tukey.

Aos 60 dias o número médio de brotos também foi influenciado pela interação entre o meio de cultura e a forma de secção do explante (Tabela 13). Explantes seccionados e posicionados em contato com os meios de cultura suplementados com zeatina levaram a um grande aumento do número de brotos adventícios após 60 dias de cultivo. Explantes seccionados e posicionados em contato com o meio JADS – Zea levaram a formação de até 17,10 brotos por explante após 60 dias de cultivo in vitro.

Tabela 12. Número médio de brotos regenerados a partir de explante hipocotiledonar de *B. orellana* seccionados de diferentes formas após 60 dias de cultivo in vitro em diferentes meios de cultura.

Secção do explante	Meio de Cultura				Média
	MS	JADS	MS - Zea	JADS - Zea	
Sem secção	1,40 Ba	1,13 Ba	6,43 Ab	7,13 Ab	4,02
Ferimentos	3,30 BCa	1,90 Ca	6,97 ABb	8,50 Ab	5,17
Secção oposta ao meio	2,47 aBa	1,83 Ba	7,80 Ab	7,73 Ab	4,96
Secção em contato com meio	3,50 Ca	4,43 Ca	11,83 Ba	17,10 Aa	9,21
Média	2,67	2,32	8,25	10,11	
CV (%)					41,15
F (Secção do explante (Sec))					18,31 **
F (Meio de Cultura (MC))					53,53 **
F (Sec x MC)					2,80 **

* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$ e ^{ns} não significativo pelo teste F.

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal (fator meio de cultura) e minúsculas na vertical (fator secção dos explantes) não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A interação entre o meio de cultura e a forma de secção do explante afetou o comprimento médio dos brotos após 30 dias de cultivo (Tabela 15). No meio MS – Zea as formas de secção do explante induziram maior comprimento dos brotos após 60 dias de cultivo (Tabela 15). Explantes seccionados em posição oposta ou em contato com o meio de cultura JADS – Zea induziram brotos adventícios com tamanho médio de 3,12 e 3,40 mm de comprimento após 30 dias de cultivo in vitro, respectivamente.

Tabela 13. Comprimento médio (mm) dos brotos regenerados a partir de explante hipocotiledonares de *B. orellana* seccionados de diferentes formas após 30 dias de cultivo in vitro em diferentes meios de cultura.

Secção do explante	Meio de cultura				Média
	MS	JADS	MS - Zea	JADS - Zea	
Sem secção	0,60 BCa	0,40 Ca	2,51 Ab	1,75 ABb	1,31
Ferimentos	0,97 BCa	0,27 Ca	3,08 Aab	1,58 Bb	1,47
Secção oposta ao meio	0,63 Ba	0,87 Ba	2,54 Aa	3,12 Aa	1,79
Secção em contato com meio	0,63 Ba	0,77 Ba	2,41 Aab	3,40 Aa	1,80
Média	0,71	0,57	2,63	2,46	
CV (%)					39,62
F (Secção do explante (Sec))					7,73 **
F (Meio de Cultura (MC))					73,47 **
F (Sec x MC)					2,24**

* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$ e ^{ns} não significativo pelo teste F.

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal (fator meio de cultura) e minúsculas na vertical (fator secção dos explantes) não diferem entre si a 5% de probabilidade e teste de Tukey.

Após 60 dias de cultivo in vitro o comprimento médio dos brotos regenerados foi afetado apenas pelos meios de cultura (Tabela 16). Sendo observado nos meios MS e JADS acrescidos de zeatina maior comprimento das brotações aos 60 dias (Tabela 15). Foi observado em explantes seccionados em contato com o meio JADS – Zea brotos com tamanho médio de 4,00 mm de comprimento.

Tabela 14. Comprimento médio (mm) dos brotos regenerados a partir de explante hipocotiledonares de *B. orellana* seccionados de diferentes formas após 60 dias de cultivo in vitro em diferentes meios de cultura.

Secção do explante	Meio de cultura				Média
	MS	JADS	MS - Zea	JADS - Zea	
Sem secção	2,64	1,25	3,40	2,78	2,52 a
Ferimentos	1,72	1,65	3,58	3,03	2,49 a
Secção oposta ao meio	1,43	2,49	4,07	4,50	3,12 a
Secção em contato com meio	1,96	1,63	3,67	4,00	2,81 a
Média	1,94 B	1,75 B	3,68 A	3,58 A	
CV (%)					80,84
F (Secção do explante (Sec))					0,06 *
F (Meio de Cultura (MC))					3,46 *
F (Sec x MC)					0,57 ns

* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$ e ^{ns} não significativo pelo teste F.

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal (fator meio de cultura) e minúsculas na vertical (fator secção dos explantes) não diferem entre si a 5% de probabilidade e teste de Tukey.

O meio de cultura afetou significativamente o comprimento médio dos brotos maiores ou iguais a 20 mm após 60 dias de cultivo (Tabela 17). Foi observado que meios acrescidos de zeatina induziram maior número de brotos com tamanho igual ou superior a 20 mm (Tabela 17).

Tabela 15. Número médio de brotos por explante \geq a 20 mm de comprimento, regenerados a partir de explantes hipocotiledonares de *B. orellana* seccionados de diferentes formas e cultivados em diferentes meios de cultura.

Secção do explante	Meio de Cultura				Média
	MS	JADS	MS - Zea	JADS - Zea	
Sem secção	0,00	0,00	0,24	0,07	0,07 a
Ferimentos	0,00	0,00	0,07	0,13	0,05 a
Secção oposta ao meio	0,00	0,03	0,23	0,20	0,11 a
Secção em contato com meio	0,00	0,03	0,20	0,20	0,11 a
Média	0,00 B	0,015 B	0,18 A	0,15 AB	
CV (%)					185,33
F (Secção do explante (Sec))					0,57 ns
F (Meio de Cultura (MC))					5,28**
F (Sec x MC)					0,36 ns

* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$ e ^{ns} não significativo pelo teste F.

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal (fator meio de cultura) e minúsculas na vertical (fator secção dos explantes) não diferem entre si a 5% de probabilidade e teste de Tukey.

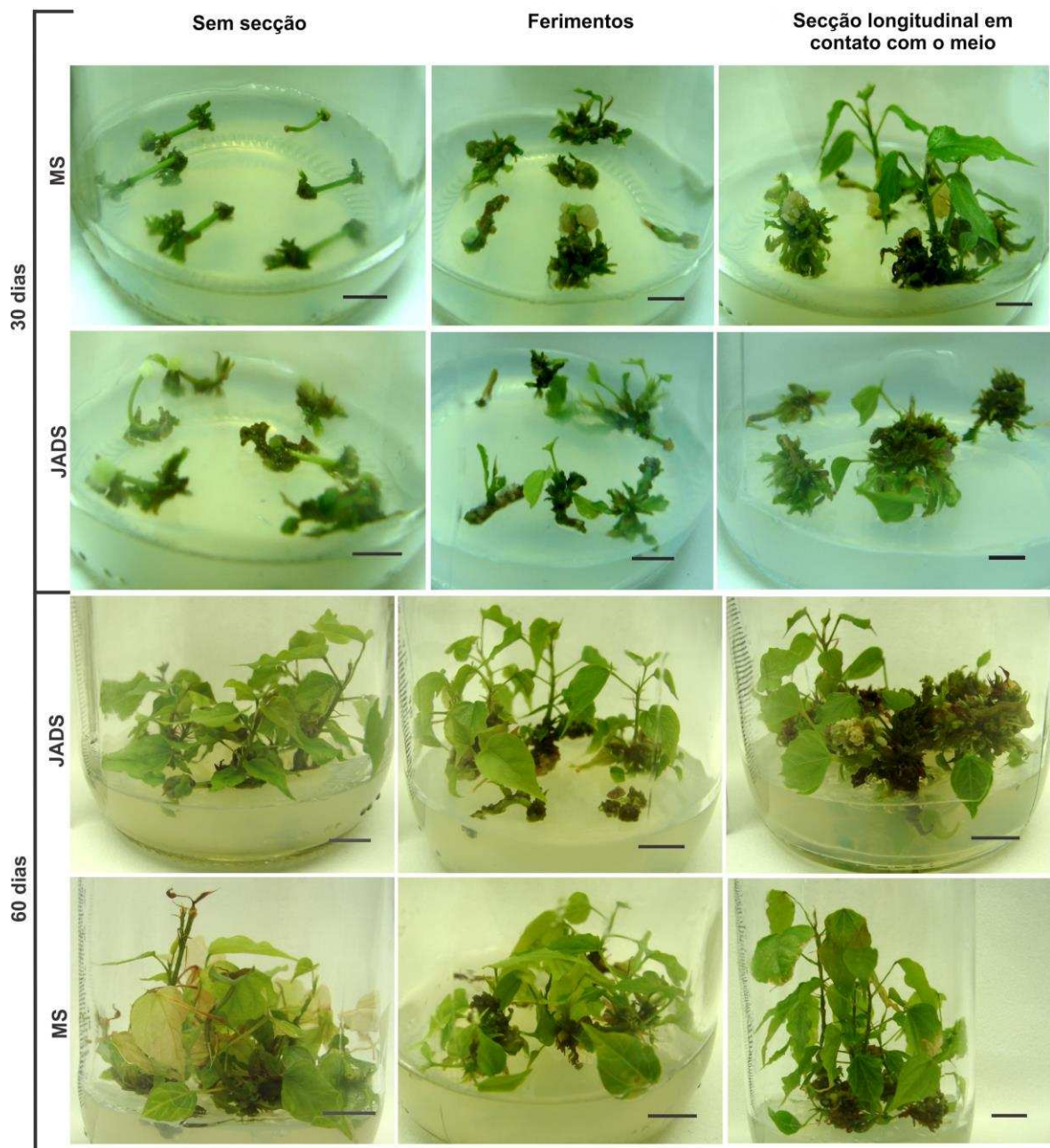


Figura 6. Propagação in vitro de *B. orellana* a partir de diferentes formas de secção e posição da secção longitudinal no meio de cultura JADS e MS suplementado com vitaminas do meio B5 (MS) ambos com 1 mg L⁻¹ de zeatina. Barra = 1 cm

3.3 Influência pré-tratamento com citocininas na eficiência da resposta organogênica de explantes hipocotiledonares de urucum

Pré-tratamento

Plântulas de urucum germinadas em meio MS suplementado com vitaminas do meio B5 e diferentes concentrações de citocininas apresentaram desenvolvimento anormal, se comparado ao controle germinado em meio livre de citocininas (Figura 7). Para

plântulas germinadas em meio contendo citocininas, foi observado menor estiolamento do hipocótilo durante a germinação por 15 dias no escuro (Figura 7).

Quando sementes de urucum foram germinadas em meio contendo 0,1 e 0,5 mg L⁻¹ de zeatina, foram observadas, raízes curtas e redução na formação de raízes secundárias (Figura 7). Plântulas obtidas a partir da germinação em meio contendo 0,1 mg L⁻¹ de BAP se mostraram semelhantes ao controle (Figura7), porém quando germinadas em 0,5 mg L⁻¹ de BAP, foram verificados cotilédones atrofiados, hipocótilos espessos, e inibição do sistema radicular com a presença de raízes curtas (Figura 7).

Avaliando plântulas obtidas a partir da germinação em meio suplementado com 0,1 e 0,5 mg L⁻¹ de TDZ, não foi observada a expansão da folha cotiledonar, os hipocótilos se apresentaram espessos e foi verificada inibição do sistema radicular, com a presença de raízes grossas e curtas (Figura7).

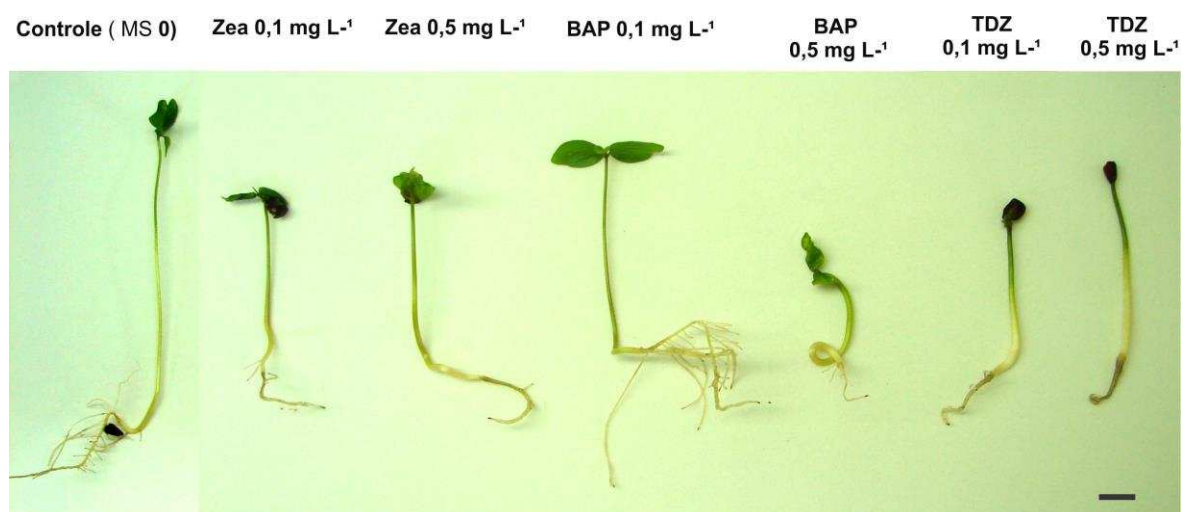


Figura 7. Plântulas de *B. orellana* com pré-tratamento de citocininas durante a germinação in vitro após 22 dias de cultura em meio MS + vitaminas do meio B5 suplementado com diferentes concentrações de citocininas. Barra = 1 cm.

Análise histológica

As análises histológicas dos explantes obtidos a partir de plântulas germinadas e cultivadas por 22 dias em meio contendo diferentes concentrações de citocininas demonstraram diferenças apenas quando as sementes foram germinadas em meio com 0,5 mg L⁻¹ de TDZ (Figura 8). Quando analisado a fotomicrografia de explantes obtidos a partir do meio acrescido de 0,5 mg L⁻¹ de TDZ, foi observada desdiferenciação das células da região do periciclo e próximo aos tecidos vasculares associados. Além de intensa divisão celular sendo possível observar divisões periclinais indicadas pela seta na figura 8

G e células com formato isodiamétrico característico de células indiferenciadas destacadas com estrelas também indicado na figura 8.

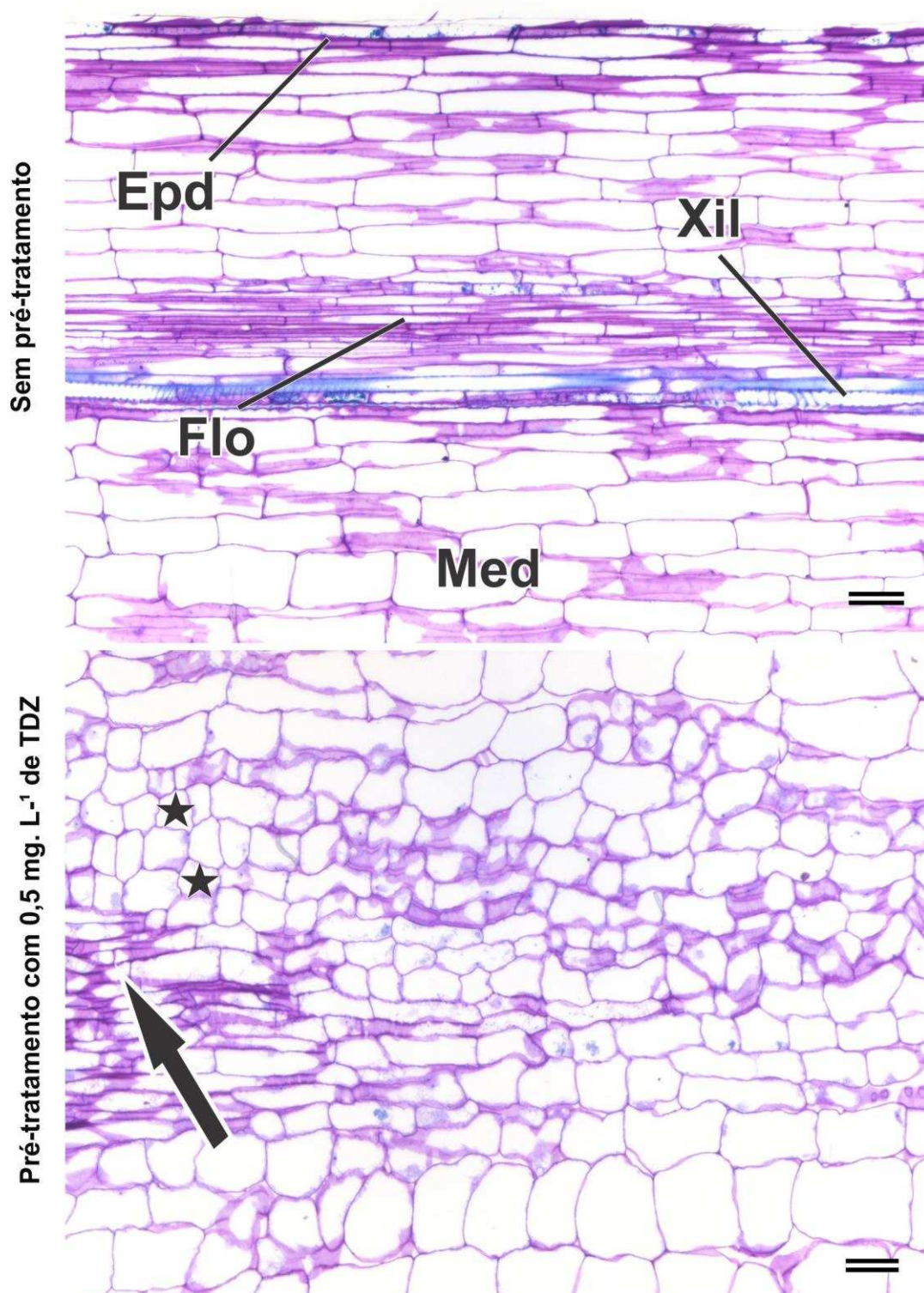


Figura 8 Fotomicrografia de corte longitudinal de hipocótilo de *B. orellana* obtidos de plantas germinadas em meio MS acrescido de citocininas. Setas indicam divisões periclinais e estrelas indicam a presença de células indiferenciadas. Epd – epiderme, Flo – floema, Xil – xilema, Med – medula. Barra = 100 μm .

Regeneração de brotos

Explantes hipocotiledonares obtidos a partir de plantas germinadas em meio acrescido de diferentes concentrações de citocininas, foram inoculados em meio JADS e MS suplementado com vitaminas do meio B5, livres e acrescidos de 1 mg L^{-1} de zeatina. Após 30 dias de cultivo, independente do pré-tratamento condicionados aos explantes de urucum, os meios JADS - Zea e MS - Zea induziram significativamente maior frequência de organogênese, exceto para explantes pré-tratados com $0,1$ e $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de TDZ. Explantes pré-tratados com $0,1$ e $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de TDZ apresentaram menores porcentagens para a frequência de organogênese após 30 dias de cultura in vitro em meio MS - Zea (Tabela 29).

Avaliando a ação dos pré-tratamentos com citocininas, testados em explantes cultivados em meio JADS - Zea após 30 dias de cultura, não foi observada diferença entre eles (Tabela 29). Explantes sem pré-tratamento e pré-tratados com $0,1$ e $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de zeatina e BAP cultivados no meio MS - Zea se demonstraram semelhantes para a indução de organogênese, diferindo apenas de explantes pré-tratados com $0,1$ e $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de TDZ. O pré-tratamento com $0,1$ e $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ TDZ levou a diminuição da frequência de organogênese quando cultivados após 30 dias em meio MS - Zea (Tabela 29).

Quando avaliada a ação do pré-tratamento em meios JADS e MS livres de zeatina foram observados menores porcentagens de organogênese, não havendo diferença entre as citocininas utilizadas no pré-tratamento quando os explantes foram transferidos para o meio de regeneração desprovido de zeatina (Tabela 29). O uso de pré-tratamento com $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de TDZ influenciou negativamente a regeneração em meio MS desprovido de zeatina e em meio JADS suplementado com zeatina (Tabela 29).

Tabela 16. Frequência de organogênese (%) de explantes hipocotiledonares de *B. orellana* pré-tratados com diferentes citocininas após 30 dias de cultivo in vitro em diferentes meios de cultura.

Pré-tratamento (mg L ⁻¹)	Meio de cultura				Média
	MS	JADS	MS - Zea	JADS - Zea	
0,00	50,00 Ba	56,67 Ba	76,67 ABab	96,67 Aa	70,00
Zea 0,10	53,33 Bca	46,67 Ca	83,33 ABab	96,67 Aa	70,00
Zea 0,50	23,33 Bab	40,00 Ba	86,67 Aab	90,00 Aa	60,00
BAP 0,10	40,00 Bab	36,67 Ba	96,67 Aa	100,00 Aa	68,33
BAP 0,50	46,67 Ba	53,33 Ba	93,33 Aab	100,00 Aba	73,33
TDZ 0,10	36,67 Bab	30,00 Ba	63,33 Bb	96,67 Aa	56,67
TDZ 0,50	13,33 Cb	40,00 Ba	56,67 Cc	80,00 Aa	47,50
Média	37,62	43,33	79,52	94,29	
CV (%)					18,17
F (Pré-tratamento (Pre))					9,14 **
F (Meio de Cultura (MC))					106,38 **
F (Pre x MC)					2,54 **

*P ≤ 0,05 e **P ≤ 0,01 pelo teste F.

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal (fator meio de cultura) e minúsculas na vertical (fator pré-tratamento dos explantes) não diferem entre si a 5% de probabilidade e teste de Tukey.

Analisando os explantes após 60 dias de cultivo in vitro independente dos pré-tratamentos condicionados, os meios JADS, JADS - Zea e MS - Zea induziram maior frequência de organogênese, exceto para explantes pré-tratados com 0,1 e 0,5 mg L⁻¹ de TDZ quando cultivados em meio JADS e MS - Zea, e 0,1 mg L⁻¹ de BAP quando cultivados em meio JADS (Tabela 30).

Explantes pré-tratados com 0,1 e 0,5 mg L⁻¹ de TDZ apresentaram menores porcentagens para a frequência de organogênese após 60 dias de cultura in vitro em meio MS - Zea (Tabela 30). Explantes pré-tratados com 0,1 mg L⁻¹ de BAP e TDZ, quando cultivados em meio JADS apresentaram menor frequência de organogênese se comparados ao meio JADS - Zea e MS -Zea (Tabela 30). O meio de cultura MS apresentou resultado semelhante ao MS - Zea e JADS -Zea, apenas se utilizado explantes pré-tratados com 0,5 mg L⁻¹ de BAP. Esse resultado mostra que a concentração de citocininas utilizado no pré-tratamento auxilia na regeneração de brotos em meio de livre de citocininas.

Tabela 17. Frequência de organogênese (%) de explantes hipocotiledonares de *B. orellana* pré-tratados com diferente citocininas após 60 dias de cultivo in vitro em diferentes meios de cultura.

Pré-tratamento (mg L ⁻¹)	Meio de Cultura				Média
	MS	JADS	MS - Zea	JADS - Zea	
0,00	66,67 Bab	83,33 ABab	83,33 ABab	100,00 Aa	83,33
Zea 0,10	73,33 Bab	83,33 Abab	96,67 Abab	100,00 Aa	88,33
Zea 0,50	70,00 Bab	80,00 Abab	100,00 Aa	96,67 Aa	86,67
BAP 0,10	70,00 Bab	73,33 Bab	100,00 Aa	100,00 Aa	85,83
BAP 0,50	86,67 Aa	86,67 Aab	93,33 Aab	100,00 Aa	91,67
TDZ 0,10	70,00 Bab	50,00 Bb	66,67 Bb	96,67 Aa	70,83
TDZ 0,50	46,67 Bb	90,00 Aa	56,67 Cc	93,33 Aa	71,67
Média	69,05	78,09	85,24	98,09	
CV (%)					14,68
F (Pré-tratamento (Pre))					7,31 **
F (Meio de Cultura (MC))					29,22 **
F (Pre x MC)					2,70 **

*P ≤ 0,05 e **P ≤ 0,01 pelo teste F.

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal (fator meio de cultura) e minúsculas na vertical (fator pré-tratamento dos explantes) não diferem entre si a 5% de probabilidade e teste de Tukey.

Para o parâmetro, número médio de brotos por explante, após 30 dias de cultura in vitro, o meio JADS - Zea induziu em todos os pré-tratamentos testados, maior número de brotos (Figura 9), não diferindo do meio MS - Zea se utilizado explante pré-tratados com 0,1 e 0,5 mg L⁻¹ zeatina, BAP e 0,1 mg L⁻¹ de TDZ (Tabela 31).

No Meio de cultura JADS - Zea o maior número de brotos foi observado em explantes sem pré-tratamento com citocininas (controle), com a formação de 8,47 brotos (Tabela 31 e Figura 9). O pré-tratamento dos brotos com citocininas, independente das diferentes concentrações testadas, induziu diminuição do número de brotos se comparado ao controle, quando estes foram cultivados após 30 dias em meio JADS - Zea (Tabela 31). Já explantes pré-tratados com concentrações de 0,1 e 0,5 mg L⁻¹ de zeatina, BAP e 0,1 mg L⁻¹ de TDZ se mostraram semelhantes ao controle (Figura 9) quando cultivados após 30 dias em meio MS - Zea (Tabela 31).

Nos meios JADS e MS livres de citocininas foi observado a formação de brotos, porém, o pré-tratamento dos explantes com citocininas não interferiu na indução de brotos por explante após 30 dias de cultivo in vitro (Tabela 31).

Tabela 18. Número médio de brotos regenerados em explantes hipocotiledonares de *B. orellana* pré-tratados com diferente citocininas após 30 dias de cultivo in vitro em diferentes meios de cultura.

Pré-tratamento (mg L ⁻¹)	Meio de Cultura				Média
	MS	JADS	MS - Zea	JADS - Zea	
0,00	0,63 Ca	0,63 Ca	3,87 Ba	8,47 Aa	3,40
Zea 0,10	0,47 Ba	0,90 Ba	4,10 Aa	5,30 Ab	2,69
Zea 0,50	0,37 Ba	0,73 Ba	3,13 Aa	4,03 Ab	2,06
BAP 0,10	0,70 Ba	0,67 Ba	5,30 Aa	5,26 Ab	2,98
BAP 0,50	0,63 Ba	0,80 Ba	4,70 Aa	5,03 Ab	2,79
TDZ 0,10	0,67 Ba	0,37 Ba	3,17 Aa	3,57 Ab	1,94
TDZ 0,50	0,17 Ba	0,43 Ba	1,93 Bb	3,40 Ab	1,48
Média	0,52	0,65	3,74	5,00	
CV (%)					47,52
F (Pré-tratamento (Pre))					6,47 **
F (Meio de Cultura (MC))					127,68**
F (Pre x MC)					2,97 **

*P ≤ 0,05 e **P ≤ 0,01 pelo teste F.

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal (fator meio de cultura) e minúsculas na vertical (fator pré-tratamento dos explantes) não diferem entre si a 5% de probabilidade e teste de Tukey.

Quando brotos de urucum foram cultivados por 60 dias em meio JADS - Zea foi observado efeito significativo para os pré-tratamentos testados nos explantes (Figura 9), não diferindo do meio MS - Zea se utilizado explante pré-tratados com zeatina, BAP e 0,1 mg L⁻¹ de TDZ (Tabela 32).

Para o meio de cultura JADS - Zea após 60 dias de cultura in vitro, o maior número de brotos foi observado em explantes sem pré-tratamento com citocininas (Figura 9) ou pré-tratados com 0,1 mg L⁻¹ de zeatina, com a formação de 8,95 e 8,97 brotos, respectivamente, não diferindo de explantes pré-tratados com 0,5 mg L⁻¹ zeatina e 0,1 mg L⁻¹ de BAP (Tabela 32). O pré-tratamento dos brotos com 0,5 mg L⁻¹ de BAP (Figura 9) e

concentrações de 0,1 e 0,5 mg L⁻¹ de TDZ, induziu diminuição significativa do número de brotos se comparado aos demais tratamentos, quando estes foram cultivados após 60 dias em meio JADS - Zea (Tabela 32).

Já explantes pré-tratados com 0,1 mg L⁻¹ de zeatina (Figura 9) e concentrações de 0,1 e 0,5 mg L⁻¹ de BAP, se mostraram mais responsivos, induzindo a formação de 8,47; 6,77 e 6,79 brotos por explante, respectivamente, quando cultivados após 60 dias em meio MS - Zea (Tabela 32). O pré-tratamento dos explantes com TDZ após 60 dias reduziu o número médio de brotos quando cultivados em meio MS - Zea (Tabela 32 e Figura 9). Nos meios JADS e MS livres de citocininas foi observada a formação de brotos, porém, o pré-tratamento dos explantes com citocininas não interferiu na indução de brotos por explante após 60 dias de cultivo in vitro (Tabela 32).

Tabela 19. Número médio de brotos regenerados em explantes hipocotiledonares de *B. orellana* pré-tratados com diferente citocininas após 60 dias de cultivo in vitro em diferentes meios de cultura.

Pré-tratamento (mg L ⁻¹)	Meio de Cultura				Média
	MS	JADS	MS - Zea	JADS - Zea	
0,00	1,16 Ca	1,45 Ca	3,93 Bd	8,95 Aa	3,87
Zea 0,10	1,67 Ba	1,27 Ba	8,47 Aa	8,97 Aa	5,09
Zea 0,50	1,47 Ba	1,07 Ba	5,98 Abcd	7,24 Aab	3,94
BAP 0,10	1,13 Ba	1,57 Ba	6,77 Aabc	7,33 Aab	4,2
BAP 0,50	1,87 Ba	2,05 Ba	6,79 Aab	7,39 Abc	4,52
TDZ 0,10	1,37 Ca	1,25 Ca	3,97 Bcd	6,70 Ab	3,32
TDZ 0,50	0,58 BCa	2,37 Aba	2,81 Cc	4,20 Ac	2,49
Média	1,32	1,57	5,53	7,25	
CV (%)					24,69
F (Pré-tratamento (Pre))					15,06 **
F (Meio de Cultura (MC))					323,53 **
F (Pre x MC)					7,51 **

*P ≤ 0,05 e **P ≤ 0,01 pelo teste F.

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal (fator meio de cultura) e minúsculas na vertical (fator pré-tratamento dos explantes) não diferem entre si a 5% de probabilidade e teste de Tukey.

O comprimento médio dos brotos foi afetado pelo meio de cultura e pela interação entre meio de regeneração e pré-tratamento do explante após 30 dias de cultivo (Tabela 33).

Analisando o comprimento médio dos brotos por explante, após 30 dias de cultura in vitro independente do pré-tratamento testado o meio JADS - Zea induziu o maior comprimento médio dos brotos por explante (Figura 9), não diferindo significativamente do meio MS - Zea se utilizado 0,1 e 0,5 mg L⁻¹ de zeatina, BAP e 0,1 mg L⁻¹ de TDZ (Tabela 33 e Figura 9).

Quando os explantes foram cultivados em meio JADS - Zea, o pré-tratamento com diferentes concentrações de citocininas não interferiu no comprimento médio dos brotos por explante (Tabela 33).

Explantes pré-tratados com 0,1 e 0,5 mg L⁻¹ de zeatina, BAP e 0,1 mg L⁻¹ de TDZ, induziram brotos com comprimento médio de 2,37; 2,64; 3,02; 2,30; 2,01 mm de comprimento, respectivamente, quando cultivados após 30 dias em meio MS - Zea (Tabela 33). Nos meios JADS e MS livres de citocininas o pré-tratamento dos explantes com citocininas não interferiu no comprimento médio dos brotos por explante após 30 dias de cultivo in vitro (Tabela 33).

Tabela 20. Comprimento médio dos brotos (mm) regenerados em explantes hipocotiledonares de *B. orellana* pré-tratados com diferente citocininas após 30 dias de cultivo in vitro em diferentes meios de cultura.

Pré-tratamento (mg L ⁻¹)	Meio de Cultura				Média
	MS	JADS	MS - Zea	JADS - Zea	
0,00	0,60 Ca	0,80 Ca	1,69 Bb	2,60 Aa	1,42
Zea 0,10	0,40 Ba	1,02 Ba	2,37 Aab	2,36 Aa	1,54
Zea 0,50	0,70 Ba	0,86 Ba	2,64 Aab	1,84 Aa	1,51
BAP 0,10	0,46 Ba	0,70 Ba	3,02 Aa	2,67 Aa	1,71
BAP 0,50	0,47 Ca	1,03 Bca	2,30 Aab	2,52 Aba	1,58
TDZ 0,10	0,77 Ba	0,53 Ba	2,01 Aab	2,12 Aa	1,35
TDZ 0,50	0,33 Ba	1,03 Ba	1,42 Bc	2,38 Aa	1,29
Média	0,53	0,85	2,21	2,35	
CV (%)					32,9
F (Pré-tratamento (Pre))					1,70 ns
F (Meio de Cultura (MC))					126,13 **
F (Pre x MC)					3,93 **

*P ≤ 0,05 e **P ≤ 0,01 pelo teste F.

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal (fator meio de cultura) e minúsculas na vertical (fator pré-tratamento dos explantes) não diferem entre si a 5% de probabilidade e teste de Tukey.

O comprimento médio das brotações após 60 dias decultivo foi afetado pelo pré-tratamento, pelo meio de regeneração e pela interação entre meio de regeneração e pré-tratamento (Tabela 34).

Após 60 dias de cultura *in vitro* foi observado que independente do pré-tratamento testado nos explantes hipocotiledonares de urucum o meio JADS - Zea induziu o maior comprimento médio dos brotos por explante (Figura 9), não diferindo do meio MS - Zea se utilizado 0,1 e 0,5 mg L⁻¹ de zeatina, BAP e 0,1 mg L⁻¹ de TDZ (Tabela 34).

Em explantes cultivados em meio JADS - Zea, o pré-tratamento com diferentes concentrações de citocininas não interferiu no comprimento médio dos brotos, demonstrando também afetar positivamente a indução de brotos maiores após 60 dias de cultivo *in vitro*, sendo possível observar brotos com tamanho médio de até 4,24 mm de comprimento (Tabela 34). Explantes pré-tratados com 0,1 e 0,5 mg L⁻¹ de zeatina e BAP induziram brotos com comprimento médio de 3,45; 3,68; 3,32; 3,28 mm de comprimento, respectivamente, quando cultivados após 60 dias em meio MS -Zea (Tabela 34). No meio de cultura JADS o pré-tratamento com 0,1 mg L⁻¹ de TDZ induziu menor número de brotos, não diferindo de explantes pré-tratados com 0,1 e 0,5 mg L⁻¹ de BAP e 0,5 mg L⁻¹ de TDZ (Figura 9).

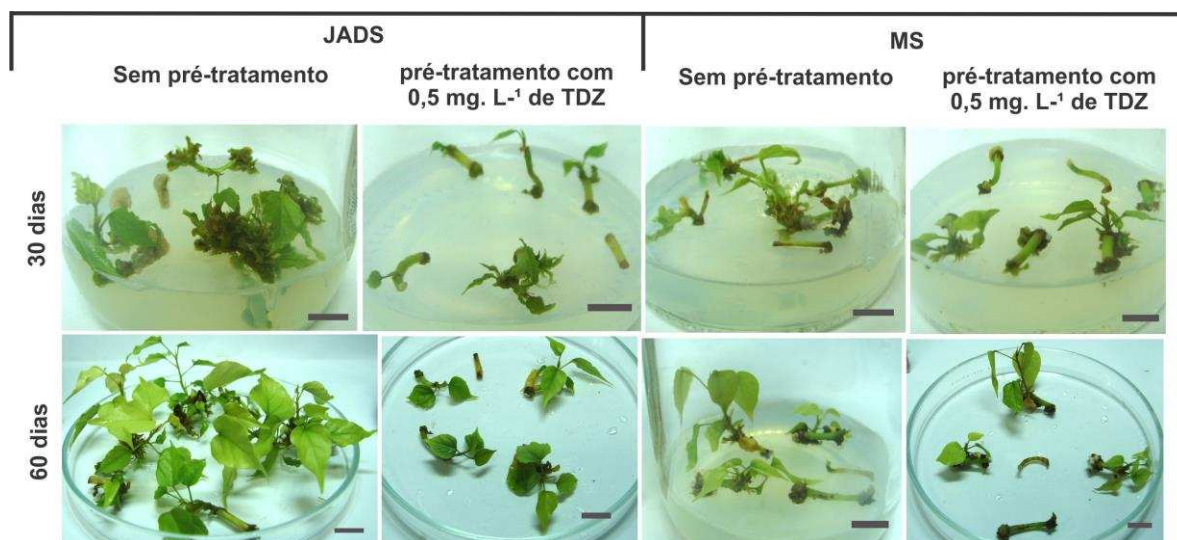


Figura 9. Organogênese de *B. orellana* obtida a partir de explantes hipocotiledonares pré-tratados com citocininas durante a germinação *in vitro* por 22 dias de cultura em meio MS e regenerados em meio JADS e MS acrescidos de 1,0 mg L⁻¹ de zeatina. Barra = 1 cm.

Já o pré-tratamento dos explantes com citocininas não interferiu de no comprimento médio dos brotos por explante após 60 dias de cultivo in vitro no meio MS livre de citocininas (Tabela 34).

Tabela 21. Comprimento médio dos brotos (mm) regenerados em explantes hipocotiledonares de *B. orellana* pré-tratados com diferente citocininas após 60 dias de cultivo in vitro em diferentes meios de cultura.

Pré-tratamento (mg L ⁻¹)	Meio de Cultura				Média
	MS	JADS	MS - Zea	JADS - Zea	
0,00	1,45 Ba	2,48 Bab	2,12 Bab	4,24 Aa	2,57
Zea 0,10	1,34 Ba	2,98 Aa	3,45 Aab	3,52 Aa	2,82
Zea 0,50	1,83 Ba	2,78 Aba	3,68 Aa	3,37 Aa	2,91
BAP 0,10	1,31 Ba	1,70 Bab	3,32 Aab	3,53 Aa	2,46
BAP 0,50	1,93 Aa	2,30 Aab	2,22 Aab	3,71 Aa	2,54
TDZ 0,10	2,37 Aba	1,15 Bb	2,07 ABb	3,35 Aa	2,23
TDZ 0,50	1,41 Bca	2,46 Abab	1,45 Cc	3,11 Aa	2,11
Média	1,69	2,23	2,70	3,43	
CV (%)					31,44
F (Pré-tratamento (Pre))					2,69 **
F (Meio de Cultura (MC))					34,57 **
F (Pre x MC)					2,85 **

*P ≤ 0,05 e **P ≤ 0,01 pelo teste F.

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal (fator meio de cultura) e minúsculas na vertical (fator pré-tratamento dos explantes) não diferem entre si a 5% de probabilidade e teste de Tukey.

Avaliando o número médio de brotos maiores ou iguais a 20 mm após 60 dias de cultivo in vitro, foi observado que independente do pré-tratamento dos explantes com citocininas, o meio JADS - Zea induziu maior número de brotos, não diferindo do meio MS - Zea se utilizado explantes pré-tratados com 0,1 mg L⁻¹ de BAP (Tabela 35). O número médio de brotações maiores ou iguais a 20 mm foi influenciado pelo pré-tratamento e meio de cultura (Tabela 35).

No meio de cultura JADS - Zea o pré-tratamento de brotos com diferentes concentrações de citocininas se demonstrou semelhante para a obtenção de brotos maiores

ou iguais a 20 mm de comprimento, podendo chegar a induzir 0,44 mm de comprimento nos brotos, exceto se utilizado explantes pré-tratados com 0,5 mg L⁻¹ de TDZ (Tabela 35). A concentração de 0,5 mg L⁻¹ de TDZ levou a diminuição do número de brotos maiores ou iguais a 20 mm, quando os explantes foram cultivados no meio JADS - Zea (Tabela 35). Nos meios JADS e MS o pré-tratamento dos explantes com e sem citocininas não interferiu na indução de brotos por explante maiores ou iguais a 20 mm, após 60 dias de cultivo in vitro (Tabela 35).

Tabela 22. Número médio de brotos \geq a 20 mm de comprimento regenerado em explantes hipocotiledonares de *B. orellana* pré-tratados com diferente citocininas após 60 dias de cultivo in vitro em diferentes meios de cultura.

Pré-tratamento (mg. L ⁻¹)	Meio de Cultura				Média
	MS	JADS	MS - Zea	JADS - Zea	
0,00	0,00	0,00	0,03	0,44	0,11 a
Zea 0,10	0,00	0,00	0,07	0,35	0,10 a
Zea 0,50	0,00	0,03	0,07	0,21	0,08 a
BAP 0,10	0,00	0,00	0,17	0,23	0,10 a
BAP 0,50	0,03	0,03	0,00	0,31	0,09 a
TDZ 0,10	0,03	0,00	0,03	0,34	0,10 a
TDZ 0,50	0,00	0,00	0,03	0,17	0,05 a
Média	0,01 B	0,01 B	0,06 B	0,29 A	
CV (%)					140,31
F (Pré-tratamento (Pre))					0,59 ^{ns}
F (Meio de Cultura (MC))					38,37 ^{**}
F (Pre x MC)					1,03 ^{ns}

*P \leq 0,05, **P \leq 0,01 e ^{ns} pelo teste F.

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal (fator meio de cultura) e minúsculas na vertical (fator pré-tratamento dos explantes) não diferem entre si a 5% de probabilidade e teste de Tukey.

Enraizamento dos brotos e Aclimatização

Após 15 dias de cultivo dos brotos em meio de enraizamento JADS $\frac{1}{2}$ e MS $\frac{1}{2}$, suplementado com 50 mg L⁻¹ de mio inositol e 1 mg L⁻¹ de AIB, não foram observados para ambos os meios de cultura, diferenças significativas para a frequência de enraizamento (Figura 10 A), sendo constatado no meio JADS $\frac{1}{2}$ 64,0 % dos brotos enraizados e para o meio MS 33,0 % dos brotos enraizados (Figura 10 A). Brotos de urucum após o enraizamento em meio MS $\frac{1}{2}$ também apresentaram a formação de calogênese, fato este que pode ser verificado na Figura 11.

Para os parâmetros comprimento médio das raízes e o número médio de raízes, o meio de enraizamento contendo a base salina JADS $\frac{1}{2}$ apresentou significativamente maiores raízes e o número maior de raízes se comparado ao meio MS $\frac{1}{2}$ (Figura 10 B e C). Sendo relatados para o meio JADS $\frac{1}{2}$ brotos contendo raízes com tamanho médio de 2,31 mm e 4,04 raízes por broto, respectivamente (Figura 10 B e C).

Avaliando a eficiência de aclimatização e sobrevivência das plântulas após 30 dias à aclimatização, foi verificado significativamente maior índice de sobrevivência de plantas quando estas foram regeneradas e enraizadas no meio JADS $\frac{1}{2}$ (Figura 10 D e 11), apresentando 100% de sobrevivência das plantas após 30 dias à aclimatização (Figura 10 D).

Avaliando brotos regenerados e enraizados no meio MS após 30 dias à aclimatização, apenas 36,67% dos brotos sobreviveram (Figura 10 D).

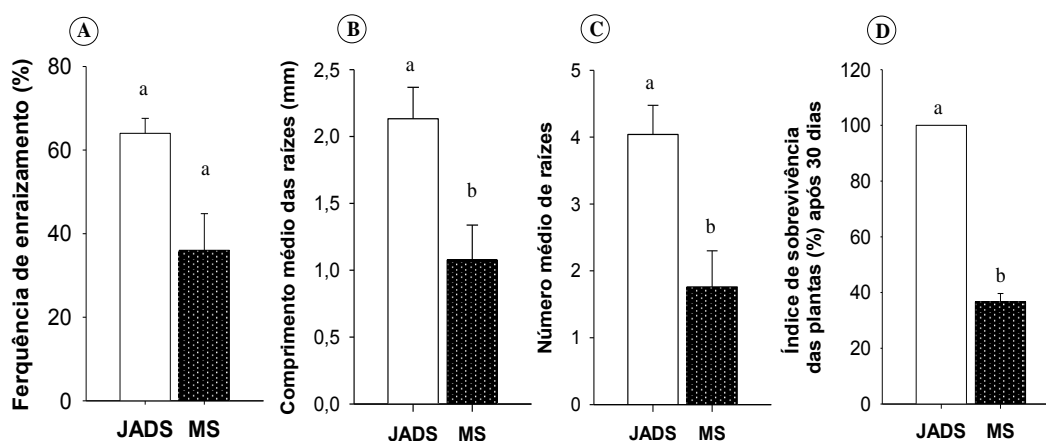


Figura 10 Eficiência do enraizamento de *B. orellana* em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ e JADS $\frac{1}{2}$ suplementado com vitaminas do meio B5 após 15 dias de cultura e aclimatização dos brotos após 30 dias. (A) Frequência de enraizamento (%); (B) Comprimento médio das raízes (mm); (C) Número médio de raízes; (D) Índice de sobrevivência das plantas após 30 dias à aclimatização. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si a 5 % pelo teste de Tukey.

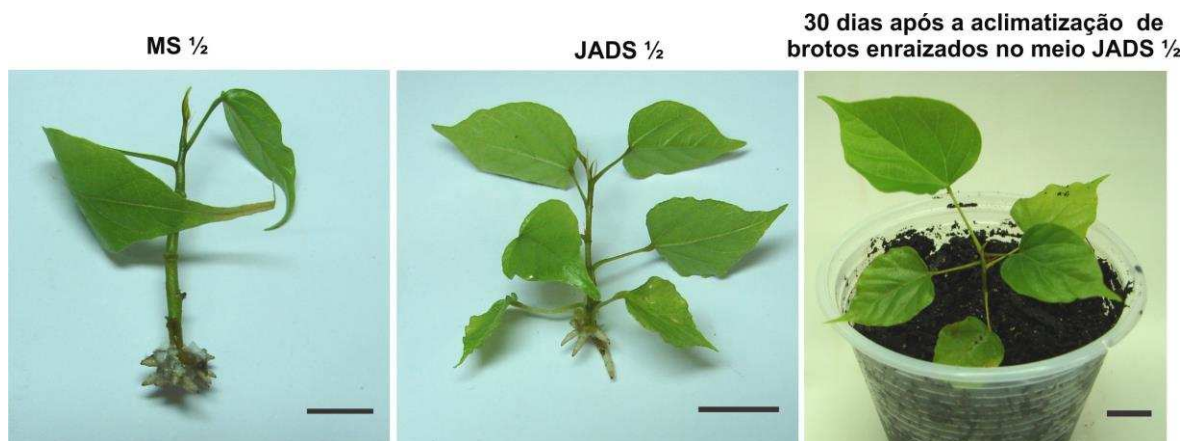


Figura 11. Enraizamento de brotos em meio MS $\frac{1}{2}$ e JADS $\frac{1}{2}$ e aclimatização de *B. orellana*. Barra = 1 cm.

Brotos regenerados e enraizados no meio MS $\frac{1}{2}$ após a aclimatização apresentaram-se com menores tamanhos e menos vigorosos quando comparados às plantas aclimatizadas provenientes de brotos regenerados e enraizados no meio JADS $\frac{1}{2}$.

4. Discussão

Diferentes meios de cultura e sua influência na regeneração de brotos de urucum em explantes hipocotiledonares

Nutrição mineral é de fundamental importância no crescimento e desenvolvimento de qualquer tecido vegetal. Adequadas concentrações dos nutrientes minerais, vitaminas, fontes de carbono, agente gelificante podem determinar o sucesso e qualidade do material vegetal nas condições de cultura in vitro. (Niedz et al., 2014).

No presente estudo foi verificado que o meio JADS se mostrou mais eficiente se comparado ao MS na indução de respostas organogênicas, em explantes hipocotiledonares de urucum, levando a formação de brotos mais alongados não hiperhídricos e mais vigorosos. Esses mesmos resultados também foram observados por Matos (2009) trabalhando com os meios de cultura MS, JADS (Correia et al., 1995); WPM (Lloyd e McCown, 1980) e DKW (Driver e Kuniyuki, 1984), onde foi verificado para no meio JADS as melhores respostas organogênicas em explantes hipocotiledonares para a variedade de urucum Piave Vermelha.

O meio JADS foi desenvolvido para *Eucalyptus*, além de eficiente para o cultivo in vitro de eucalipto (Correia et al., 1995; Freitag et al. 2012) este meio tem se mostrado

eficiente no cultivo in vitro de outras espécies de plantas lenhosas como o urucum da variedade Piave Vermelha (Matos, 2009).

Na literatura o meio de cultura MS tem sido mais utilizado para indução de respostas organogênicas em urucum (Almeida et al., 1996; Carvalho et al., 2005; Paiva-Neto et al., 2003 a, 2003 b; Parimalan et al., 2007, 2008, 2009; 2010, 2011; Joseph et al., 2011, Sharan et al., 2012; Joseph et al., 2013). O meio de cultura MS apresenta maior concentração salina se comparado ao meio de cultura JADS (Tabela 23).

Tabela 23. Concentração de macro e micronutrientes que compõem os meios de cultura JADS e MS.

Concentração de macro e micronutrientes encontrados (mM)		
Íons	MS	JADS
NO ₃ ⁻	40,00000	22,00000
H ₂ PO ₄ ⁻	1,25000	3,00000
SO ₄ ²⁻	1,62000	0,30000
Cl ⁻	5,98020	0,00022
K ⁺	19,95500	11,00000
Ca ²⁺	2,99900	5,00000
Na ⁺	0,10200	0,40124
Mg ²⁺	1,50000	3,00000
NH ₄ ⁴⁺	20,00000	4,00000
N total	60,00000	26,00000

Fonte: Pinto et al. (2008), modificado.

O meio MS apresenta maior concentração de nitrogênio, disponibilizado em altas concentrações na forma de amônio e nitrato, diferente do meio JADS onde maior parte da fonte de nitrogênio é disponibilizada na forma de nitrato (Tabela 23). Altas concentrações de amônio podem levar a hiperhidricidade dos tecidos vegetais, ou mesmo ser tóxicas às plantas, o que acarreta a diminuição das respostas organogênicas e o desenvolvimento dos brotos (George et al., 2008). Segundo Ramage et al. (2002) a redução da concentração da fonte de nitrogênio, principalmente na forma amoniacal, tem sido utilizada para diminuir a formação de hiperhidricidade nos tecidos. O mesmo foi relatado para *Prunus* sp. onde Radmann et al. (2009) verificaram menor ocorrência de hiperhidricidade no meio suplementado com menores concentrações de nitrogênio.

Além das fontes inorgânicas de nitrogênio o meio JADS disponibiliza formas de nitrogênio orgânico. A disponibilidade de formas orgânicas de nitrogênio potencializam as

respostas organogênicas (George et al., 2008). Dessa forma a constituição salina e orgânica do meio JADS podem ter contribuído para melhores respostas organogênicas em urucum se comparada ao meio MS.

As concentrações de macronutrientes como o potássio e cálcio no meio MS se comparado ao meio JADS são menores. Reduzida concentração de potássio pode levar a diminuição das respostas organogênicas e formação de brotos hiperhídricos. Já menores concentrações de cálcio levam a escurecimento e enrolamento das margens das folhas apicais, muitas vezes seguido da parada do crescimento e necrose apical das brotações (George et al., 2008; Reed et al., 2013). Estes resultados foram observados no presente trabalho onde o meio MS levou a formação de menor número de brotos, brotos hiperhídricos, com menor tamanho e vigor, além da presença de necrose nos ápices dos brotos quando cultivados no meio MS após 60 dias de cultivo *in vitro*.

Mantovani (2007) trabalhando com segmentos hipocotiledonares de plantas de urucum denominada genótipo 6, provenientes do cruzamento entre as variedades de urucum fruto verde piloso e fruto vermelho liso, quando cultivados em meio de cultura MS e WPM, verificou que explantes cultivados no meio WPM apresentaram estatisticamente maior número de brotos adventícios se comparado aos explantes cultivados no meio MS, porém dos 86,2% dos explantes hipocotiledonares de urucum que regeneraram brotos, 31,9 % apresentaram sintomas de hiperhidricidade. O meio de cultura WPM apresenta menor quantidade de nitrogênio total se comparado ao meio MS, entretanto, apresenta maior parte do nitrogênio disponibilizado em forma de amônio e menores quantidade de potássio e cálcio se comparados ao meio JADS.

Como observado no presente trabalho Matos (2009) trabalhando com explantes hipocotiledonares em meios de cultura MS, JADS, WPM e DKW, verificou para o meio JADS, a indução maiores respostas organogênicas, com brotos não hiperhídricos, maiores e mais vigorosos se comparado aos demais meios testados. Demonstrando a eficiência do meio JADS na indução de brotos maiores e mais vigorosos, o que possibilita a obtenção de plantas sem a necessidade de realizar a etapa de alongamento dos brotos. Levando a diminuição do tempo, para a obtenção de plantas de urucum a partir da cultura de tecidos vegetais, pois estas brotações podem ser levadas diretamente para a fase de enraizamento. Além aumentar o índice de sobrevivência das plantas durante o processo de aclimatização, fato este também foi observado no presente trabalho.

Dessa forma, com base nos resultados da literatura e os obtidos no presente trabalho, a otimização da regeneração e desenvolvimento de brotos em urucum parece

necessitar de menor quantidade de nitrogênio inorgânico no meio, e este deve ser disponibilizado em sua maioria na forma de nitrato. Além de necessitar maiores concentrações de cálcio e potássio. Sendo então indicado o uso do meio JADS para organogênese do urucum Piave Vermelha.

Pré-tratamento de explante com citocininas

No presente trabalho, a adição de zeatina no meio de regeneração promoveu o aumento do número de brotações adventícias dos explantes quando comparado com o controle, indicando que existe a necessidade do uso de citocininas para a indução de organogênese direta em explantes hipocotiledonares de urucum. Além da suplementação do meio de cultivo com regulador de crescimento, na literatura o pré-tratamento de explantes com citocininas é conhecido por induzir aumento nas respostas organogênicas (Kucharska e Orlikowska 2009; Kumar et al., 2010; Hartmann et al., 2011; Bakshi et al., 2012; Srivastava, 2012; Tang et al., 2012; Tie et al., 2013), podendo induzir de 1,5 a 2 vezes maior número de brotos em explantes de *Vigna unguiculata* (Bakshi et al., 2012), *Curculigo orchioides* (Thomas, 2007), e otimizar as respostas organogênicas em explantes foliares (Malik et al., 2010) e nodais de *Nyctanthes arbor-tristis* (Jahan et al., 2011), sendo eficiente também em espécies lenhosas como framboesa, maçã (Swartz et al., 1990) e *Prunus* (Antonelli e Druart 1989).

A capacidade de TDZ em induzir eficiência de regeneração em tecidos de plantas lenhosas tem sido relatada com sucesso (Swartz et al., 1990; Antonelli e Druart, 1989). Porém, no presente trabalho, o pré-tratamento com TDZ induziu respostas negativas na indução de brotos em urucum meio MS e JADS. A utilização de TDZ em urucum leva a indução de brotos, contudo, os brotos não alongam e apresentaram anormalidades (Paiva-Neto et al. 2003 b; Parimalan 2007; Cruz et al., 2014).

O meio de cultura suplementado com 0,5 mg L⁻¹ de TDZ foi o que apresentou maiores variações fenotípicas e anatômicas dos tecidos vegetais de urucum utilizados como fonte de explante, porém aparentemente a proliferação das células em zonas próximas ao tecido vascular nos explantes de urucum teve ação negativa na indução de brotos, quando estes foram inoculados em meio com 1,0mg L⁻¹ de zeatina. Paiva – Neto et al., (2003 b) verificaram resultados semelhantes em meio suplementado com TDZ ocorreu a proliferação de vários meristemóides em zonas próximas a epiderme e os tecidos corticais exteriores, mas sem a formação de gemas individual e formação de brotos.

Para os demais pré-tratamentos com Zeatina e BAP, no meio JADS não foi observada diferença significativa para a indução de brotos e demais parâmetros analisados, porém no meio MS o pré-tratamento dos explantes com $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de zeatina foi benéfico levando ao aumento da indução de brotos se comparado ao controle, apesar de não ser possível observar modificações anatômicas nos tecidos pré-tratados os com $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de zeatina. O pré-tratamento com zeatina parece ter agido de forma sinérgica com o meio de cultura MS. É conhecida a existência uma relação entre reguladores de crescimento a base salina disponíveis no meio de cultura, porém não se sabe ao certo porque e nem como isso ocorre (George et al., 2008). Sargent e Rei (1974) descobriram que as células de soja foram dependentes da suplementação do meio com citocinina quando cultivadas num meio contendo nitrato, mas independente de citocinina quando o meio foi suplementado também com amônia.

Swartz et al. (1990) verificaram aumento significativo das respostas organogênicas quando utilizado pré-tratamento de explantes foliares com $5,0 \text{ }\mu\text{M}$ de TDZ para framboesa e $5,0 \text{ }\mu\text{M}$ de BAP para maçã. Dessa forma, talvez seja necessária a utilização de concentrações mais elevadas de citocininas no pré-tratamento de explantes de urucum a fim de que estes possam induzir maiores respostas organogênicas.

Secção e posição do explante hipocotiledonar no meio de cultura

Na literatura tem-se relatado eficientes respostas organogênicas a partir de explantes hipocotiledonares, sendo observada a formação de organogênese direta (Paiva-Neto et al., 2003 b; Carvalho et al., 2005; Mantovani et al., 2007; Matos, 2009; Parimalan et al., 2009; Joseph et al., 2011). Carvalho et al. (2005) verificaram alta frequência e formação de brotos quando os explantes hipocotiledonares com 10 mm de comprimento cultivados em meio MS com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de zeatina, levando a 82,0 % dos explantes com brotos e formação de 1,89 brotos, com comprimento de 0,37 cm, após 30 dias de cultivo in vitro. Enquanto Matos (2009) trabalhando com explante hipocotiledonar de urucum da variedade Piave Vermelha com 10 mm de comprimento, cultivados em meio JADS com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de zeatina, levou a formação 68% dos explantes com brotações. Quando explantes hipocotiledonares com 10 mm da variedade Piave Vermelha foram inoculados em meio MS com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ foi observado apenas 23 % dos explantes hipocotiledonares com brotações (Matos 2009).

O transporte basípeto polar de auxina leva formação de um gradiente diferente de auxina no explante, o que leva a diferentes respostas deste explante quando em meio de organogênese (Cline, 1991). Porém, Carvalho et al. (2005) verificaram que explantes hipocotiledonares de urucum contendo 10 mm de comprimento provenientes de diferentes regiões do hipocótilo, basal, sub-basal mediano subapical e apical não apresentaram diferença significativa na indução de brotos quando cultivados em meio com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de zeatina. Neste trabalho foi possível verificar que explantes hipocotiledonares menores que 6 mm de comprimento tiveram reduzida capacidade de respostas organogênicas, possivelmente pelo balanço hormonal endógeno do tecido e a relação com o seu comprimento. Isso indica que pode ser necessário utilizar menores concentrações de zeatina em explantes menores, a fim de manter um balanço hormonal favorável as respostas organogênicas.

No presente trabalho foi possível obter 100% da frequência de organogênese dos explantes, principalmente quando estes foram seccionados longitudinalmente e dispostos em contato com o meio JADS - Zea, podendo chegar a induzir 17,10 brotos. Demonstrando a eficiência da secção e posição do explante em contato com o meio JADS - Zea nas respostas organogênicas de urucum.

Na literatura não se têm relatos do uso de secção longitudinal dos explantes hipocotiledonares de urucum e nem mesmo de ferimentos, porém tem-se observado em explantes hipocotiledonares de urucum seccionados transversalmente que a formação de brotos ou calos ocorre apenas nas regiões onde foi realizada a secção dos explantes (Matos, 2009; Cruz, 2007; Mantovani, 2007). Resultado este também observado no presente trabalho, onde em todas as regiões lesionadas foi possível verificar a formação de respostas organogênicas. Mantovani (2007) observou em explantes hipocotiledonares seccionados transversalmente maior formação de brotos na extremidade proximal do explante, enquanto na extremidade distal, houve maior formação de calos. Resultados semelhantes também foram observados no presente trabalho para todos os explantes hipocotiledonares seccionados transversalmente.

Os resultados obtidos para frequência de organogênese e indução de brotos para a secção longitudinal do explante hipocotiledonar de urucum se mostrou superior aos relatados na literatura para a variedade Piave Vermelha (Matos 2009) e demais trabalhos com plantas provenientes do cruzamento entre Fruto Verde Piloso' X 'Fruto Vermelho Liso (Paiva-Neto et al., 2003 b; Carvalho et al., 2005; Cruz 2007) quando utilizados $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de zeatina no meio de cultura. Os diferentes resultados observados na literatura para as

respostas organogênicas a partir de explantes hipocotiledonares podem estar relacionados ao uso de diferentes genótipos de urucum, pois diferentes genótipos de urucum respondem de formas distintas as condições de cultivo *in vitro*, necessitando a padronização de protocolos genótipo específicas (Cruz 2007; Matos 2009).

Enraizamento dos brotos e aclimatização de plantas de urucum

Durante o processo de enraizamento dos brotos de urucum foi observado, tanto para o meio JADS quanto MS, resultados semelhantes quanto à frequência de enraizamento dos brotos, porém as raízes originadas no meio JADS apresentaram significativamente maior tamanho e número de raízes se comparado ao meio MS, sendo observado no meio JADS a formação de 4,04 raízes com 2,31 mm de comprimento.

O crescimento radicular é afetado por altas concentrações de amônio e beneficiado por maiores concentrações de cálcio (George et al., 2008). O meio MS apresenta maior concentração amoniacal e menores concentrações de cálcio. o que pode explicar a formação de menor número e tamanho das raízes no meio MS após 15 dias de cultivo *in vitro*. Carvalho et al. (2005) utilizando as mesmas condições do meio de cultura e concentração de AIB testadas no presente trabalho verificou 37 % dos brotos enraizados com 9,83 raízes. Paiva-Neto et al. (2003) obtiveram 70 % dos brotos enraizados em meio MS com 1,0 mg L⁻¹ de AIB, os brotos apresentaram 5,0 raízes com 8,8 mm de comprimento após 30 dias de cultura *in vitro*.

Já Parimalan et al. (2009) utilizando também meio MS com 1,0 mg L⁻¹ de AIB observaram a formação de 4,11 raízes com 4,8 cm de comprimento após 30 dias. Joseph et al. (2011) verificaram que brotos de urucum com 2-3 cm de comprimento apresentaram 83,6 % de enraizamento quando utilizaram 1,0 mg L⁻¹ de AIB. No presente trabalho foi possível obter brotos com 2 cm após 60 dias de cultivo *in vitro* no meio JADS - ZEA, demonstrando que é possível realizar de forma eficiente a aclimatização destes brotos sem passar pela etapa de alongamento, otimizando o tempo para a obtenção de mudas de urucum a partir da cultura de tecidos.

No presente trabalho quando os brotos foram enraizados em meio MS foi observada a formação de calos e raízes na base dos brotos. A formação de calos pode acarretar em desvantagens no processo de aclimatização e estabelecimento da planta nas condições de campo, pois a calogênese dificulta a conexão vascular entre o caule e a raiz (Ajitkumar e Seeni, 1998). Carvalho et al. (2005) trabalhando com as mesmas condições de meio e

concentração de AIB testadas no presente trabalho verificaram em todas as brotações cultivadas, na presença da auxina a formação de calos.

Verificou-se que brotos regenerados e enraizados em meio JADS apresentaram 100% de sobrevivência após 30 dias em condições *ex vitro*, enquanto brotos regenerados e enraizados no meio MS apresentaram 36,67% de sobrevivência após 30 dias de aclimatização. Brotos regenerados e enraizados no meio JADS apresentavam-se mais vigorosos, o que pode ter possibilitado maior sucesso durante a aclimatização.

A formação de calos na base dos brotos observados no meio MS pode ter afetado o processo de aclimatização dos brotos levando-os a morte, como relatado por Rogalski et al. (2003), onde verificaram que a formação de calo na base das estacas diminuiu o índice de sobrevivência das plantas de *Prunus sp.* As condições fisiológicas dos brotos condicionadas pelo cultivo no meio MS pode ter dificultado o estabelecimento dos brotos nas condições de campo. Paiva-Neto et al. (2003) trabalhando com brotos regenerados no meio MS, obteve 80% de sobrevivência das plantas após 30 dias a aclimatização em solo. Parimalan et al., (2007, 2008, 2009) também trabalhando com brotos regenerados no meio MS, obtiveram que 70 a 80% das plantas sobreviveram após 30 dias à aclimatização.

Eficientes protocolos de regeneração são de grande importância na obtenção de plantas com genoma nuclear modificado, porém para obtenção de plantas transplastômicas é necessário otimizar ao máximo os processos de organogênese, pois é preciso a regeneração e seleção de plantas transformadas (chamadas de transplastômicas heteroplásmicas, as quais contêm os genomas transgênicos e tipo selvagem) em meio seletivo, selecionando células transplastômicas e eliminando célula com plastídios tipo selvagem, visando à obtenção da homoplasma, estágio onde todos os plastídios possuem genomas transformados contendo o(s) transgene(s) (Bock, 2013; 2014). Para chegar ao estágio de homoplasma geralmente é necessário realizar quatro subcultivos consecutivos do material vegetal (Bock, 2013; 2014).

Os resultados obtidos no presente trabalho nos leva a acreditar que a utilização do meio de cultura JADS suplementado com zeatina durante a regeneração e enraizamento dos brotos, bem como, a utilização de segmentos hipocotiledonares com 6 mm de comprimento seccionados longitudinalmente posicionados em contato com o meio, podem ser utilizados de forma eficiente no desenvolvimento de protocolos de transformação tanto nuclear quanto plastidial.

Conclusões

Como proposto no presente trabalho foi possível otimizar os protocolos de organogênese a partir de explantes hipocotiledonares de *B. orellana*.

Foi observado que explantes hipocotiledonares contendo tamanho de 6,0; 8,0; e 10 mm de comprimento foram igualmente eficientes na indução de respostas organogênicas, quando cultivados no meio JADS com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de zeatina, sendo indicado o uso de explantes hipocotiledonares contendo 6 mm de comprimento para organogênese in vitro de urucum.

Explantes hipocotiledonares de urucum induziram maior número de brotos quando seccionados longitudinalmente e posicionados com a secção em contato com o meio de cultura JADS suplementado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ zeatina, levando à formação de 17,11 brotos por explante após 60 dias de cultivo in vitro.

O pré-tratamento de explantes hipocotiledonares com zeatina, BAP e TDZ não promoveu o aumento da indução de brotos, quando os explantes foram cultivados no meio JADS suplementado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ zeatina.

O meio de cultura JADS se mostrou superior ao MS, levando a indução de maior frequência, número de brotos, brotos mais alongados, vigorosos e não hiperhídricos.

Durante o processo de enraizamento e aclimatização, brotos regenerados e enraizados em meio JADS levaram à formação significativa de maior número e comprimentos de raízes em brotos de urucum, além de proporcionar maior índice de sobrevivência das plantas após 30 dias à aclimatização.

Referências

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (2009). **Aditivos e Contaminantes. Alimentos Alimentação**, 2,1-5.

Ajitkumar D, Seeni S (1998). Rapid clonal multiplication through in vitro axillary shoot proliferation of *Aegle marmelos* (L.) Corr., a medicinal tree. **Plant Cell Reports**, 17, 422-426.

Almeida J L, Almeida FCG, Nunes RP, Almeida FAG (1996). Indução de brotações em explantes de segmentos de folhas de plântulas de urucuzeiro em diferente citocininas. **Ciência Rural**, 26, 45-49.

Anami, S.; Njuguna, E.; Coussens, G.; Aesaert, S.; Lijsebettens, M.V. (2013). Higher plant transformation: principles and molecular tools. **The International Journal of Developmental Biology**, 57, 483-494.

Annadurai RS, Jayakumar V, Mugasimangalam RC, Katta MAVSK, Anand S, Gopinathan S, Sarma SP, Fernandes SJ, Mullapudi N, Murugesan S, Rao SN (2012). Next generation sequencing and de novo transcriptome analysis of *Costus pictus* D. Don, a non-model plant with potent anti-diabetic properties. **BMC Genomics**, 13, 1-15.

Antonelli M, Druart Ph. (1989). The use of a 2,4-D pretreatment to induce leaf regeneration on *Prunus canescens*. Abstract 20. International Symposium In Vitro Culture and Horticultural Breeding, Cesena, Italy. **International Society for Horticultural Science Publishers**.

Aparnathi K, Lata R, Sharma R (1990). Annatto (*Bixa orellana* L.): Its cultivation preparation and usage. **International Journal of Tropical Agriculture**, 8, 80-88.

Bakshi S, Roy NK, Sahoo L (2012). Seedling preconditioning in thidiazuron enhances axillary shoot proliferation and recovery of transgenic cowpea plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 110, 77-91.

Bock, R. (2013). Strategies for metabolic pathway engineering with multiple transgenes. **Plant Molecular Biology**, 83, 21–31

Bock, R. (2014). Genetic engineering of the chloroplast: novel tools and new applications. **Current Opinion in Biotechnology**, 26, 7–13.

Bouvier F, Dogbo O, Câmara B (2003). Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto). **Science**, 300, 2089-2091.

Caldas LS, Haridasan P, Ferreira ME (1998). Meios nutritivos. In: Torres AC, Caldas LS, Buso JA, **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI; Embrapa-CNPQ, 1, 87-132.

Carvalho JFRP, Carvalho CR, Otoni WC (2005). In vitro regeneration of annatto (*Bixa orellana* L.) from various explants. **Revista Árvore**, 29, 887-895.

Cline MG (1991). Apical dominance. **The Botanical Review**, 57, 318-358.

Correia D, Gonçalves A N, Couto H Y Z, Ribeiro M C (1995). Efeito do meio de cultura líquido e sólido no desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação in vitro. **Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF)**, n. 48/49, 107-116.

Cruz ACF (2007). **Propagação in vitro do urucuzeiro (*Bixa orellana* L.) a partir de explantes juvenis e adultos**. Tese (Mestrado em Botânica). Viçosa, UFV, MG. 85p.

Cruz ACF, Rocha DI, Iarema L, Ventrella MC, Costa MGC, Paiva-Neto VB, Wagner Campos Otoni WC (2014). In vitro organogenesis from root culture segments of *Bixa orellana* L. (Bixaceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, 50, 76-83.

D'Onofrio C, Morini S (2006). Somatic embryo, adventitious root and shoot regeneration in in vitro grown quince leaves as influenced by treatments of different length with growth regulators. **Scientia Horticulturae**, 107,194–199.

Deepika R, Veale A, Ma C, Strauss SH, Myburg AA (2011). Optimization of a plant regeneration and genetic transformation protocol for *Eucalyptus* clonal genotypes. **BMC Proceedings** 2011, 5:132.

Dettmer J, Elo A, Helariutta Y (2009). Hormone interactions during vascular development. **Plant Molecular Biology**, 69, 347–360.

Driver JA, Kuniyuki AH (1984). In vitro propagation of paradox walnut rootstock. **Horticultur Science**, 19, 507-509.

Filho MJC (2004). **O livro de ouro da Amazônia: mitos e verdades sobre a região mais cobiçada do planeta**. Rio de Janeiro: Ediouro, 398 p.

Freitag AS, Nery FU, Rossi FR, Gonçalves AN (2012). Estudo comparativo entre dois meios de cultura para *Corymbia citriodora* in vitro. **Floresta**, 42, 347 – 354.

Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, 50, 151-158.

George EF, de Klerk G-J (2008). The Components of Plant Tissue Culture Media I: Macro- and Micro-Nutrients. In George EF, Hall MA, de Klerk G-J, eds., **Plant Propagation by Tissue Culture**, 3. ed, Vol. 1. The Background. Springer-Verlag, Dordrecht, 65-113.

Giuliano G., Rosati C, Bramley PM (2003). To dye or not to dye: biochemistry of annatto unveiled. **Trends in Biotechnology**, 21, 513-516.

Gonçalves S, Correia PJ, Martins-Loução MA, Romano A (2005). A new medium formulation for in vitro rooting of carob tree based on leaf macronutrients concentration. **Biologia Plantarum**, 49, 277-280.

Grattapaglia D, Machado MA (1998). Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH, p. 183-260.

Guesmi A, Hamadi NB, Ladhari N, Sakli F (2013). Sonicator dyeing of modified acrylic fabrics with indicaxanthin natural dye. **Industrial Crops and Products**, 42, 63-69.

Hartmann HT, Kester DE, Davies JRFT, Geneve RL (2011). **Plant propagation: principles and practices**. 87th ed. New Jersey: Prentice-Hall. 915p.

Jahan AA, Anis M, Aref IM (2011). Preconditioning of Axillary Buds in Thidiazuron-Supplemented Liquid Media Improves In Vitro Shoot Multiplication in *Nyctanthes arbor-tristis* L. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 163, 851–859.

Jako C, Coutu C, Roewer I, Reed DW, Pelcher LE, Covello PS (2002). Probing carotenoid biosynthesis in developing seed coats of *Bixa orellana* (Bixaceae) through expressed sequence tag analysis. **Plant Science Journal**, 163, 141–145.

Jondiko I, Pattenden G (1989). Terpenoids and apocarotenoid from seeds of *Bixa orellana*. **Phytochemistry**, 28, 3159–3162.

Joseph N, Siril EA (2013). Multiplication of Annatto (*Bixa orellana* L.) using cotyledons and leaf explants. **Research in Plant Biology**, 3, 24-32.

Joseph N, Siril EA, Nair GM (2011). An efficient in vitro propagation methodology for Annatto (*Bixa orellana* L.). **Physiology and Molecular Biology of Plants**, 17, 263-270.

Karnovsky, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, v. 27, p. 137-138, 1965.

Komatsu YH, Batagin-Piotto KD, Brondani GE, Gonçalves AN, Almeida M (2011). In vitro morphogenic response of leaf sheath of *Phyllostachys bambusoides*. **Journal of Forestry Research**, 22, 209–215.

Kucharska D, Orlikowska T (2009). Enhancement of in vitro organogenetic capacity of rose by preculture of donor shoots on the medium with thidiazuron. **Acta Physiologiae Plantarum**, 31, 495-500.

Kumar N, Anand K, Reddy MP (2010). Shoot regeneration from cotyledonary leaf explants of *Jatropha curcas*: a biodiesel plant. **Acta Physiologiae Plantarum**, 32, 917-924.

Lancaster F, Lawrence J (1996). High performance liquid chromatographic separation of carminic acid and bixin, and norbixin, and the determination of carminic acid in foods. **Journal of Chromatography A**, 732, 394–398.

Lauro GJ (1991). A primer on natural colors. **Cereal Foods World**, 36, 949-953.

Lemos AR , Rêgo Júnior ON, São JoséAR , Pereira MLA , Silva MV (2011). Atividade antioxidante e correlação com fenólicos totais em genótipos de Urucum (*Bixa orellana* L.) **Revista Instituto Adolfo Lutz**, 70, 62-68.

Lloyd G, McCown B (1981). Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**, 30, 421-327.

MacArthur BD, Ma'ayan A, Lemischka IR (2009). Systems biology of stem cell fate and cellular reprogramming. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 10, 672–681.

Malik S, Sharma S. Sharma M, Ahuja PS (2010). Direct shoot regeneration from intact leaves of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnston using thidiazuron. **Cell Biology International**, 34, 537–542.

Mantovani NC (2007). **Propagação vegetativa e cultivo in vitro de Bixa orellana L. e Ginkgo biloba L.** Tese (Doutorado em Botânica). Viçosa, UFV, MG. 135 p.

Marcolino VA, Zanin GM, Durrant LR, Benassi MT, Matioli G (2011). Interaction of Curcumin and Bixin with β -Cyclodextrin: Complexation Methods, Stability, and Applications in Food. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 59, 3348–3357.

Matos EM (2009). **Morfogênese in vitro a partir de segmentos de hipocótilos e de raízes de urucum (Bixa orellana L.).** Tese (Mestrado em Botânica). Viçosa, UFV, MG. 68p.

McGranahan GH, Driver JA, Tulecke W (1987). Tissue culture of Juglans. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. (eds.). **Cell and tissue culture in forestry: Case histories: Gymnosperms, Angiosperms and Palms.** Dordrecht: Martinus Nijhoff, 3, 261-271.

Mercadante A, Steck A, Rodriguez-Amaya D, Pfander H, Britton G (1996). Isolation of methyl 9'Z-*apo*-6'-lycopenoate from Bixa orellana. **Phytochemistry**, 41, 1201–1203.

Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, 15, 473–497.

Niedz RP, Hyndman SE, Evens TJ, Weathersbee AA (2014). Mineral nutrition and in vitro growth of Gerbera hybrid (Asteraceae), **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 50,458–470.

O'Brien T P, Mc Cully ME (1981). **The study of plant structure principles and selected methods.** Melbourne – Australia: Termarcarphi Pty Ltd., 45 p.

Oey M, Lohse M, Kreikemeyer B, Bock R (2009). Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic. **The Plant Journal**, 57, 436–445.

Paiva-Neto VB, Mota TR, Otoni WC (2003) b. Direct organogenesis from hypocotyl-derived explants of annatto (*Bixa orellana* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 75, 159-167.

Paiva-Neto VBP, Botelho MN, Aguiar R, Silva EAM, Otoni WC (2003) a. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of annatto (*Bixa orellana* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, 39, 629–634.

Parimalan R, Venugopalan A, Giridhar P, Ravishankar GA (2011). Somatic embryogenesis and *Agrobacterium*-mediated transformation in *Bixa orellana* L. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, 105, 317–328.

Parimalan R, Giridhar P, Gururaj HB, Ravishankar G A (2009). Micropropagation of *Bixa orellana* using phytohormones and triacontanol. **Biologia Plantarum**, 53, 347-350.

Parimalan R, Giridhar P, Gururaj HB, Ravishankar GA (2007). Organogenesis from cotyledon and hypocotyl-derived explants of japhara (*Bixa orellana* L.). **Acta botanica Croatica**. 66, 153–160.

Parimalan R, Giridhar P, Ravishankar GA (2008). Mass multiplication of *Bixa orellana* L. through tissue culture for commercial propagation. **Industrial Crops and Products**, 28, 122-127.

Parimalan R, Giridhar P, Ravishankar GA (2010). Enhanced shoot organogenesis in *Bixa orellana* L. in the presence of putrescine and silver nitrate. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 105, 285-290.

Pinto G, Silva S, Park Y-S, Neves L, Araújo C, Santos C (2008). Factors influencing somatic embryogenesis induction in *Eucalyptus globulus* Labill.: basal medium and anti-browning agents. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, 95, 79-88.

Preston HDE, Rickard MD (1980). Extraction and chemistry of annatto. **Food Chemistry**, 5, 47-56.

Quoirin M, Lepoivre P (1977). Improved media for in vitro culture of Prunus sp. **Acta Horticulturae**, 78, 437-442.

Radmann EB, Bianchi VJ, Souza TM, Fachinello JC, Oliveira RP (2009). Influência da composição do meio de cultivo e do tipo de explante na micropropagação do porta-enxerto de Prunus sp. 'GXN-9'. **Scientia Agraria**, 10, 95-101.

Ramamoorthy S, Dossa FP, Kundua K, Satyanarayanab VSV, Kumarb V. (2010). Molecular characterization of bixin an important industrial product. **Industrial Crops and Products**, 32, 48–53.

Ramage CM, Williams RR (2002). Mineral nutrition and plant morphogenesis **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, 38,116–124.

Rebouças TNH, São José AR (1996). **A cultura do urucum: práticas de cultivo e comercialização**. Vitória da Conquista- BA, DFZ/UESB/SBCN, 42p.

Reed BM, Wada S, DeNoma J, Niedz RP (2013). Improving in vitro mineral nutrition for diverse pear germplasm. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**,49,343–355.

Rivera-Madrid R, Burnell J, Aguilar-Espinosa M, Rodríguez-Ávila NL X, Eugenia Lugo-Cervantes EL, Sáenz-Carbonell LA (2013). Control of Carotenoid Gene Expression in Bixa orellana L. Leaves Treated with Norflurazon. **Plant Molecular Biology Reporter**, 31,1422–1432.

Rodríguez-Ávila NL, Narváez-Zapata JA, Aguilar-Espinosa M, Rivera-Madrid R (2011). Regulation of pigment-related genes during flower and fruit development of Bixa orellana. **Plant Molecular Biology Reporter**, 29,43–50.

Rogalski M, Moraes LKA, Felisbino C, Crestani L, Guerra MP, Silva AL (2003). Aclimatização de porta-enxertos de Prunus sp. micropropagados. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 25: 279-281.

Sargent PA, King J (1974). Investigations of growthpromoting factors in conditioned soybean root cells and in the liquid medium in which they grow: cytokinin-like compounds. **Canadian Journal of Botany**, 52, 2459-2463.

Sharan M, Castello MC, Sharon M (2012). In Vitro Culture studies of *Bixa orellana* L: III Plant Regeneration from Roots through Direct and Indirect Somatic Embryogenesis. **European Journal of Experimental Biology**, 2, 156-162.

Silva FASE, Azevedo CAV (2009). Principal Components Analysis in the Software Assisat-Statistical Attendance. In: **World Congress On Computers Inagriculture**, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers.

Soares VLF, Rodrigues MS, Oliveira TM, Queiroz TO, Lima LS, Hora-Júnior BT, Gramacho KP, Micheli F, Cascardo JCM, Otoni WC, Gesteira AS, Costa MGC (2011). Unraveling new genes associated with seed development and metabolism in *Bixa orellana* L. by expressed sequence tag (EST) analysis. **Molecular Biology Reports**, 38,1329–1340.

Sriskandarajah S, Goodwin P (1998). Conditioning promotes regeneration and transformation in apple leaf explants. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, 53,1–11.

Srivastava J, Das A, Soren KR, Chaturvedi SK, Nadarajan N, Datta S (2012). Ontogeny of in vitro shoot organogenesis from axillary meristem explants in chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Journal of Crop Science and Biotechnology**, 15, 245-250.

Swartz HJ, Bors R, Mohamed F, Naess SK (1990). The effect of in vitro pretreatments on subsequent shoot organogenesis from excised *Rubus* and *Malus* leaves. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 21, 179-184.

Tang Y, Chen L, Li X M, Li J, Luo Q, Lai J, Li HX (2012). Effect of culture conditions on the plant regeneration via organogenesis from cotyledonary node of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). **African Journal of Biotechnology**, 11, 3270-3275.

Thomas TD (2007). Pretreatment in thidiazuron improves the in vitro shoot induction from leaves in *Curculigo orchioides* Gaertn., an endangered medicinal plant. **Acta Physiologiae Plantarum**, 29, 455-461.

Tie M, Qian Luo Q, Zhu Y, Li H (2013). Effect of 6-BA on the Plant Regeneration via Organogenesis from Cotyledonary Node of Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). **Journal of Agricultural Science**, 5,1-5.