

ANA CLAUDIA FERREIRA DA CRUZ

PROPAGAÇÃO *in vitro* DO URUCUZEIRO (*Bixa orellana* L.)
A PARTIR DE EXPLANTES JUVENIS E ADULTOS

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Botânica, para obtenção
do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

C957p
2007

Cruz, Ana Claudia Ferreira da, 1972-

Propagação *in vitro* do urucuzeiro (*Bixa orellana* L.) a partir de explantes juvenis e adultos / Ana Claudia Ferreira da Cruz. – Viçosa, MG , 2007.
v, 85f. : il. col. ; 29cm.

Orientador: Wagner Campos Otoni.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Morfogênese. 2. Urucum - Propagação in vitro.
3. Tecidos vegetais - Cultura e meios de cultura.
4. *Bixa orellana*. 5. Plantas - Reguladores. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 571.83323625

ANA CLAUDIA FERREIRA DA CRUZ

PROPAGAÇÃO *in vitro* DO URUCUZEIRO (*Bixa orellana* L.)
A PARTIR DE EXPLANTES JUVENIS E ADULTOS

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Botânica, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 28 de fevereiro de 2007

Prof^ª Marília Contin Ventrella
(Co-orientadora)

Prof. Carlos Roberto de Carvalho
(Co-orientador)

Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre

Prof. Edgard Augusto de Toledo Picoli

Prof. Wagner Campos Otoni
(Orientador)

Aos meus amados pais Alahyr e Diva (*in memoriam*)

Ao meu sogro Néri Gomide (*in memoriam*) e à minha sogra Maria Cornélia

Ao meu marido, companheiro de todos os momentos, Antônio de Pádua (Patch)

À minha vida Gabriela (Bibi),

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela Vida.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Botânica, pela oportunidade concedida para realização do curso.

Ao Departamento de Biologia Vegetal, ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), ao Laboratório de Anatomia Vegetal, ao Núcleo de Microscopia e à Unidade de Crescimento de Plantas (UCP) pelo apoio e suporte na condução deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo durante o curso de mestrado.

Aos professores do Departamento de Biologia Vegetal pela amizade e conhecimentos proporcionados.

Ao amigo Antônio Teixeira Cordeiro pela oportunidade ímpar de iniciar meus estudos científicos e constantes conselhos.

Ao amigo Marcelo Antoniol pelos “primeiros passos”, conselhos, incentivos e, principalmente pela amizade.

Aos professores Cosme Damião da Cruz e Luzimar Campos da Silva, pelas sugestões e esclarecimentos durante a realização do trabalho.

Aos amigos do LCTII pela agradável convivência durante a realização do trabalho, em especial à Lourdinha e Rogério pelos ensinamentos e conselhos dispensados a cada dia.

Ao professor e amigo Wagner Campos Otoni, a quem muito admiro pela competência profissional, pela oportunidade concedida para a realização deste curso, pela constante orientação, paciência, incentivo e, acima de tudo, pelo agradável convívio.

Aos professores integrantes da banca examinadora por se disponibilizarem em constante apoio e sugestões.

Ao Leandro e Clarinha, pela grande ajuda na obtenção das fotos apresentadas e constantes pré-leituras.

Aos amigos Juliano, Wellington, Jacqueline, Lourdinha, Rogério, Clarinha, Sissi, Marta, Faraó, Bebeto, Bareta, Moacyr, Anderson, Roberto, Marcelo, Cláudia, Marquinho, Betinho, Luizão, Kelly, Jaime, Lucinha, Túlio, Tiago, Leandro, Claudinha e tantos outros pelas confraternizações, convivência e alegrias compartilhadas tão necessárias em todos os momentos da vida.

Aos meus pais e irmãos que sempre me incentivaram na obtenção de novas conquistas.

Ao meu parceiro e amigo Patch, pela paciência, compreensão e apoio durante as ausências tão necessárias.

À minha amada filhinha Bibi por tentar entender a importância dos meus estudos, apesar de sua tão pequena idade.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, fazendo parte desta etapa de vida, e que por “negação do consciente”, não tenham sido aqui citados (as).

BIOGRAFIA

Ana Claudia Ferreira da Cruz, filha de Alahyr Ferreira da Cruz, e Diva Gemma Pigioni da Cruz, nasceu em 05 de janeiro de 1972, em São Paulo, SP.

Em 1992, concluiu o Curso Técnico em Administração no Colégio São José de Vila Zelina, em São Paulo, SP.

Em 2002 e 2003 foi bolsista do Programa Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – CBP&D-Café, onde esteve vinculada ao subprojeto “Embriogênese somática indireta via cultura líquida em genótipos de *Coffea arabica* e de *Coffea canephora*”.

Em 2003, diplomou-se no curso de Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa.

Em 2004 até fevereiro de 2005 atuou como bolsista do Programa Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento do Café onde se encontrava vinculada ao subprojeto “Embriogênese somática indireta em explantes foliares de híbrido F1 expressando características agronômicas desejáveis”.

Em março de 2005, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Botânica, como mestranda, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em fevereiro de 2007.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT.....	x
Introdução Geral	1
Referências Bibliográficas	5

Capítulo I

Avaliação de Respostas Morfogênicas de Hipocótilos de Tipos Cultivados de Urucum (<i>Bixa orellana</i> L.).....	10
Introdução.....	10
Material e Métodos.....	12
Resultados e Discussão	14
Responsividade morfogênica em relação ao regime luminoso de exposição das sementes durante o período de germinação	14
Respostas morfogênicas de hipocótilos de urucum submetidos à hipoxia em meio semi-sólido	16
Conclusão sobre gradientes de respostas morfogênicas <i>in vitro</i> de explantes de urucum	17
Respostas morfogênicas de hipocótilos invertidos de urucum	22
Referências Bibliográficas	26

Capítulo II

Avaliação do Efeito do Meio Líquido Sobre o Alongamento <i>in vitro</i> de Epicótilos de Tipos Cultivados de Urucum (<i>Bixa orellana</i> L.)	31
Introdução	31
Material e Métodos	33
Resultados e Discussão	35
Referências Bibliográficas	45

Capítulo III

Regeneração *in vitro* de Urucum (*Bixa orellana* L.) a Partir de Explantes

Radiculares	47
Introdução.....	47
Material e Métodos	49
Resultados e Discussão	52
Referências Bibliográficas	61

Capítulo IV

Estabelecimento *in vitro* e Respostas Morfogênicas de Explantes Nodais e Internodais Adultos de Urucum (*Bixa orellana* L.).....

Introdução	66
Material e Métodos	68
Resultados e Discussão	70
Utilização de segmentos internodais (SIN) como fonte de explantes	70
Utilização de segmentos nodais (SN) como fonte de explantes	77
Referências Bibliográficas	80
Conclusões Gerais	84

RESUMO

CRUZ, Ana Claudia Ferreira da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2007. **Propagação *in vitro* do urucuzeiro (*Bixa orellana* L.) a partir de explantes juvenis e adultos.** Orientador: Wagner Campos Otoni. Co-orientadores: Aloisio Xavier, Carlos Roberto de Carvalho e Marília Contin Ventrella.

O comportamento morfológico *in vitro* de explantes diversos (hipocótilos, epicótilos, raízes e segmentos internodais e nodais) de *B. orellana* L. foi estudado mediante a avaliação da resposta morfogênica em relação ao regime de exposição à luz das sementes durante o período de germinação; da resposta à hipoxia em meio semi-sólido; e dos gradientes de resposta dos explantes e hipocótilos invertidos comparados aos hipocótilos cultivados com polaridade fisiológica normal. A manutenção das culturas na ausência de luz por 30 dias durante o período de germinação, possibilitou maiores rendimentos na quantidade de explantes superiores. Hipocótilos dispostos na porção superficial do meio de cultura apresentaram organogênese direta, ao contrário dos demais que apresentaram respostas diferenciadas relacionadas à profundidade do explante depositado no meio de cultura. Quanto às diferenças no potencial morfogênico dos explantes hipocotiledonares, relacionado ao gradiente de responsividade, e em relação à ocorrência de genótipo-especificidade de respostas *in vitro*, foi observado que, no tratamento em que a cultura foi exposta à luz houve melhor resposta dos explantes. No entanto, houve diferenças nas regiões em que as respostas apareceram e estas foram específicas para cada genótipo. Para todos os híbridos estudados, a utilização de hipocótilos invertidos, quando comparados aos não invertidos, foi mais eficiente na indução de organogênese adventícia. Na cultura de raízes, a utilização do meio líquido sob agitação foi superior quando comparado à utilização de meio semi-sólido, no entanto houve necessidade do uso de fitorreguladores para indução de brotações nestes explantes. Após 45 dias de cultura brotações se diferenciaram das raízes; no geral em meio semi-sólido, na ausência de luz, as brotações apresentaram-se escassas e com certa

anormalidade, porém sem hiperidricidade. A utilização de meio líquido, tanto na ausência quanto na presença de luz, promoveu a regeneração de brotações com características de hiperidricidade. Quanto à utilização de explantes adultos, a formação de gemas ocorreu com maior frequência nas superfícies onde houve o seccionamento do explante e com menor frequência nas regiões centrais dos explantes. As brotações induzidas pelo efeito de BAP, apesar de em menor quantidade, apresentaram qualidade superior. As análises histológicas revelaram que o início da regeneração ocorreu a partir da intensa proliferação celular na região do periciclo e tecidos vasculares associados como o floema secundário do explante. Na utilização de segmentos internodais (SIN) como fonte de explantes, observou-se, aos 30 dias de cultura, nos tratamentos com fitorreguladores, a regeneração de brotações, no entanto para o controle (MS0) ocorreu apenas a calogênese. As brotações apresentaram, em média, de 0,1 cm de comprimento e, na maioria dos tratamentos, formaram-se em toda a superfície do explante. A maioria dos tratamentos apresentou resposta quanto à organogênese. A maior média dos explantes responsivos à organogênese foi com o tratamento BAP, entretanto com o 2iP ocorreu o inverso, caracterizando-se como o tratamento menos responsivo. A resposta morfogênica dos explantes ocorreu na maioria das vezes por via direta, havendo apenas uma exceção no tratamento com BAP. O início do processo da divisão celular, a qual culminou na morfogênese, foi observado a partir da intensa proliferação celular na região do câmbio, se estendendo até o floema secundário do explante. Observações efetuadas para utilização de segmentos nodais como fonte de explante evidenciaram o comprimento das brotações apresentando diferença em função do tratamento. Similarmente às brotações oriundas de SIN, aquelas regeneradas de SN apresentaram senescência foliar, no isolamento do explante original, necessitando da adição de STS no meio para alongamento e manutenção.

ABSTRACT

CRUZ, Ana Claudia Ferreira da, M.S., Universidade Federal de Viçosa, February, 2007.

***In vitro* propagation of annatto (*Bixa orellana* L.) from juvenile and adult explants.** Adviser: Wagner Campos Otoni. Co-Advisers: Aloisio Xavier, Carlos Roberto de Carvalho and Marília Contin Ventrella.

The morphological behavior of explants (hypocotyls, epicotyls, roots and node and internode segments) of annatto (*B. orellana* L.) was evaluated by means of *in vitro* morphogenic responses regarding the duration of exposition to light throughout germination period; the responses to hypoxia in semi-solid medium, and the response gradients of hypocotyls and inverted hypocotyls explants as compared to the normal physiological polarity cultured ones. The maintenance of the cultures for 30 days in the absence of light, throughout the germination period, enabled higher rates of morphogenic responses. Hypocotyls placed on the surface of the culture medium displayed direct organogenesis; unlike the others that presented varied responses dependent on the depth of culture in semi-solid medium. Regarding the morphogenic potential of hypocotyledonary explants, either related to the *in vitro* responsiveness or genotype-specificity, it was observed that treatments kept under light regime displayed satisfactory responses. However, different responses were observed along the explants, and these were specific for each genotype. For all hybrids, the use of inverted hypocotyl segments was more efficient in inducing adventitious organogenesis as compared to the normal oriented explants. For root cultures, the utilization of liquid medium under agitation was superior as compared to the semi-solid counterpart; however, the induction of adventitious organogenesis demanded the incorporation of growth regulators (GR). After 45 days, in cultured root explants in the semi-solid medium; in the absence of light, differentiation of shoot buds and elongated shoots were scarce and with certain abnormality, but non-hyperhydric. The use of liquid medium, regardless the light regime, led to differentiation of hyperhydric shoots. As for the use of adult

explants, the formation of shoot-buds occurred more frequently in the cut surfaces. BAP-induced shoot-buds, despite the lower number, were more vigorous. The histological analyses revealed that the initial regeneration responses started from an intense cellular proliferation in the pericycle and vascular tissues areas, mainly associated with the secondary phloem. At 30 days of culture in MS medium supplemented with GR, a regeneration of shoots was observed, when internode segments (INS) were used as explant source, whereas only callusing was obtained in the control treatment (MS0). The shoots presented, in average, 0,1 cm in length and, in most of the treatments, they were formed in the whole surface of the explant. The majority of treatments benefited organogenic responses, but greater averages of responsive explants were obtained in BAP-added media, whilst those with 2iP were less responsive. The morphogenic responses occurred generally by means of direct pathway, except for BAP-supplemented media. The initial cellular division processes that culminated with morphogenesis were coincident with an intense proliferation from cambium, extending to secondary phloem region. When NS were used as source of explants average shoot length varied among treatments. Similarly, to those shoots derived from SIN cultures, those from SN had leaf senescence, requiring the addition of STS to the elongation and maintenance media.

INTRODUÇÃO GERAL

Bixa orellana L. é uma espécie lenhosa nativa da América Tropical, com distribuição das Guianas ao Brasil, sendo bastante cultivada em todos os estados brasileiros, assim como em outros países, como Índia, Sri Lanka, Java e algumas partes do México (Franco et al., 2002).

O nome botânico desta planta é uma homenagem ao explorador espanhol do século XVI, Francisco de Orellana, lugar tenente de Francisco Pizarro e que foi o primeiro europeu a navegar no Rio Amazonas. Originária da América do Sul, sendo o Brasil o principal produtor e exportador, desenvolve-se também na América Central e nas Filipinas, onde foi introduzida pelos espanhóis (Araújo, 2005).

Devido seu cultivo em diferentes regiões do mundo, *B. orellana* é tratada popularmente por diferentes nomes: Arnoto, no Ceilão; Atole, Achioté, Bija, no Peru e em Cuba; Axiote, no México; Achioté, Achote, Anatto, Bija em Santo Domingo e Porto Rico; Ditaque e Kifasu, em Angola; Bixa, na Guiana; Orleans Laum, na Alemanha; Roucou, Rocouyer, na França; Analto, em Honduras; Guajachote, em El Salvador; Onotto e Onotillo, na Venezuela; Shambu, no Peru; Achioté e Urucu, na Bolívia; Anatto e Anatto-Tree, na Inglaterra; Urucu, na Argentina; Roucou, em Trindade; Roucou e Koessewee, no Suriname; e no Brasil como urucum, urucu, açafrão, açafroa e açafoeira da terra (Franco et al., 2002; Araújo, 2005).

Pertencente à família de um só gênero *Bixa*, único da família das Bixaceae, compreende 5 espécies sendo o urucum (*Bixa orellana*) como a única espécie cultivada e amplamente empregada como ornamental devido à beleza de suas flores e, em virtude de constituir um arbusto de forma esbelta, é utilizada para cercas vivas (Castro et al., 1994).

Seu grande atrativo, como produto natural, é como substituto de corantes artificiais considerados cancerígenos, e, por isso, proibidos por lei nos Estados Unidos, Japão e alguns países da Europa. Com isto, o urucuzeiro passou a ganhar mais importância nas regiões produtoras, devido a grande capacidade de expansão da cultura

(Baliane, 1982; Meirelles Filho, 2004). Desta forma, vem despertando grande interesse na indústria devido à particularidade de armazenar em suas sementes um corante natural composto essencialmente dos carotenóides bixina e norbixina.

A bixina é um apocarotenóide monometil éster carboxílico que confere a coloração vermelha em sementes de urucum, o qual é extraído e utilizado como corante aditivo solúvel em alimentos e cosméticos desde o período pré-Colombiano (Mercadante & Pfander, 1998).

Com a polpa das sementes, os silvícolas preparavam matéria tintorial para pintar seus objetos e a própria pele, tanto por vaidade como por repelente aos insetos e proteção aos raios solares (Castro et al., 1994), o que corroborou ao interesse, cada vez mais crescente, do seu uso nas indústrias alimentícia, farmacêutica, têxtil e de cosméticos. Os pigmentos extraídos das sementes de *B. orellana* estão entre os 13 produtos naturais permitidos para o consumo humano, e ocupam a segunda colocação dentre os corantes aditivos naturais mais utilizados pela indústria (Lauro, 1991; D'Souza & Sharon, 2001).

Os carotenóides são de grande importância na nutrição e na medicina, especialmente aqueles que contêm o anel β , pois podem ser convertidos a retinol, sendo assim precursores de vitamina A. Além destes, benefícios adicionais à saúde são atribuídos às suas atividades antioxidantes. O corante extraído do urucuzeiro possui várias propriedades e ações, tais como, adstringente, nutritiva, emoliente, antibactericida, antioxidante e expectorante. Alguns fitoquímicos são encontrados, como: bixeina, bixina, bixol, isolbixina, norbixina, fenilalanina, ácido salicílico, treonina, triptofano, dentre outros (Bartley & Scolnik, 1995; Kiokias & Gordon, 2003), onde podem atuar potencialmente contra o câncer (Cunningham & Grantt, 1998).

A bixina e norbina são pigmentos de ocorrência exclusiva em urucum o que tem estimulado a busca para fundamentação e estabelecimento das bases fisiológicas e moleculares da biossíntese desses pigmentos em urucum. O mecanismo de biossíntese de bixina permanece pouco conhecido, entretanto, recentemente foi sugerido que o carotenóide C_{40} , licopeno, é o precursor de bixina (Mercadante & Pfander, 1998; Britton, 1998; Jako et al., 2002; Bouvier et al., 2003). O isolamento e clonagem futura de genes-chave envolvidos na biossíntese desses pigmentos demandará protocolos de transformação genética para a avaliação da expressão e análise funcional dos genes clonados.

O corante bixina é largamente empregado para colorir alimentos, entrando no comércio em forma de colorau, sendo que, do total de sementes de urucum industrializadas no Brasil, 25% são utilizadas na preparação de extratos e o restante é empregado na fabricação do colorífico (Tocchini & Mercadante, 2001), sendo que o Brasil produz cerca de 10 mil t/ano de sementes, crescendo 5% ao ano (Meirelles Filho, 2004).

A espécie se reproduz principalmente por polinização cruzada, o que resulta em grande variabilidade genética das plantas propagadas via sementes, e gerando falta de sincronismo no período de floração e na quantidade de carotenóides produzidos, desta forma, dificultando a estimativa precisa da época e quantidade da produção, apresentando grande desuniformidade nos plantios, com variações em relação ao teor de bixina, a resistência às pragas, à produtividade, dentre outras (São José & Rebouças, 1990).

Devido a isto, a propagação vegetativa aparece como método viável para obtenção de lavouras produtivas e uniformes uma vez que possuem as mesmas características genéticas da planta matriz fornecedora do material propagativo (São José & Rebouças, 1990). Ademais, o conteúdo de bixina presente nas sementes está relacionado diretamente com as condições ambientais e genéticas, podendo variar entre 1,0 a 6,0% (Franco et al., 2002).

Pouco tem sido feito na área de obtenção de cultivares de urucum, à exceção da seleção de tipos locais e as avaliações tradicionais dos tipos que participam dos ensaios regionais e nacionais (Franco et al., 2002). Em consequência da pequena expressividade do melhoramento genético desta espécie, aliada à elevada heterogeneidade genética, tem-se optado denominar “tipos cultivados”, ao contrário de variedades, até que se possua um material genético com características genotípicas e fenotípicas devidamente fixadas. Os principais tipos cultivados do urucuzeiro são: Peruana Paulista (São Paulo), Bico-de-Pato (Bahia) e Piave Vermelha (Pará) (Rebouças & São José, 1996). Porém, mesmo para os plantios comerciais, as mudas utilizadas são provenientes de reprodução sexuada acarretando heterogeneidade genética.

Para diminuir a variabilidade genética nos plantios comerciais de urucum, alguns trabalhos visando à propagação vegetativa do urucuzeiro foram desenvolvidos, utilizando-se das técnicas de enraizamento de estacas (estaquia) (São José et al., 1992), enxertia por garfagem (São José et al., 1992) e alporquia (Lima, 1992). As primeiras tentativas de desenvolvimento de metodologias para propagação *in vitro* do urucuzeiro

iniciaram na década de 90 (Silva Neto et al., 1992). Sucedeu-se a esses, trabalhos utilizando explantes caulinares (Debata & Punk, 1996), foliares (Almeida et al., 1996), gemas axilares e explantes nodais (D'Souza & Sharon, 2001), calos obtidos de sementes (Sha Valli Khan et al., 2002), hipocótilos de plântulas germinadas *in vitro* (Paiva Neto, 2002; Paiva Neto et al., 2003b; Carvalho et al., 2005) e embriões zigóticos imaturos (Paiva Neto et al., 2003a).

No entanto, há baixa eficiência na taxa de brotação e conseqüente propagação em alta escala, tornando-se necessário o estabelecimento de protocolos eficientes e reproduzíveis de propagação *in vitro* para o urucuzeiro, de forma a evitar a típica heterogeneidade genética e ampliar os programas de melhoramento genético da espécie, visto que o melhoramento genético convencional é restringido pelo longo ciclo reprodutivo e pela limitada variabilidade genética nos germoplasmas disponíveis (Zaldívar-Cruz et al., 2003).

A exemplo de outras espécies lenhosas, o envelhecimento ontogenético dos tecidos e microrganismos endofíticos presentes em explantes adultos coletados de plantas em condições de campo, representam grandes desafios para os processos regenerativos. Alternativas para a reversão e controle destes processos, aumentando ou induzindo a competência celular e promovendo melhor controle fitossanitário dos explantes, são utilizadas com sucesso para algumas espécies lenhosas (Mantovani et al., 1999; Alfenas et al., 2004; Assis et al., 2004).

Nos últimos anos, o potencial do mercado internacional do urucuzeiro teve grande impulso. No Brasil, a expansão da demanda pelo urucum registra-se em função do crescimento vertical do consumo dos produtos industrializados que contêm a matéria-prima (MMA et al., 1998). Como o Brasil é um dos maiores produtores e exportadores mundiais de urucum, necessita com urgência dispor de materiais de qualidade superior, tanto em produtividade de grãos, como altos teores de bixina, visando competir com o mercado internacional (Franco et al., 2002).

Nesse sentido, a propagação clonal, alicerçada em técnicas de cultura *in vitro*, pode refletir positivamente no melhoramento genético com ganhos efetivos decorrentes da fixação de genótipos com atributos agrônômicos superiores, com a clonagem e propagação de indivíduos-elite adultos, estabelecimento de bancos de germoplasma mediante conservação de recursos genéticos *in vitro*, e domínio e otimização das rotas morfogênicas regenerativas para aplicação em protocolos eficientes de transformação genética.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J.L.; ALMEIDA, F.C.G.; NUNES, R. de P.; ALMEIDA, F.A.G. Bud initiation in leaf explants of annatto seedlings on different cytokinins. **Ciência Rural**, 26:45-49, 1996.

ARAÚJO, E.M.M. Corantes naturais para têxteis - da antiguidade aos tempos modernos. Curso de Mestrado em Química Aplicada ao Patrimônio Cultural. <http://www.dqp.fc.ul.pt/docentes/earaujo/.DQB>, 2005.

ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. Clonagem e doenças do eucalipto. Viçosa: UFV, 422 p., 2004.

ASSIS, T.F.; FETT-NETO, A.G.; ALFENAS, A.C. Current techniques and prospects for the clonal propagation of hardwoods with emphasis on *Eucalyptus*. In: CHRISTIAN, W.; CARSON, M. (Eds.). **Plantation Forest Biotechnology for the 21st Century**. Kerala: Research Signpost, p.303-333, 2004.

BALIANE, A. **A cultura do urucueiro**. Informe Técnico. Rio de Janeiro: Emater, 10 p., 1982.

BARTLEY, G.E. & SCOLNIK, P.A. Plant carotenoid: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. **Plant Cell**, 7:1027-1038, 1995.

BRITTON, G. History of carotenoid biosynthesis. In: BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. (Eds.). **Carotenoids**, v. 3, Biosynthesis. Basel: Birkhäuser Verlag, pp. 13-147, 1998.

BOUVIER, F.; DOGBO, O.; CAMARA, B. Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto). **Science**, **300**:2089-2091, 2003.

CARVALHO, J.F.R.P.; CARVALHO, C.R.; OTONI, W.C. Regeneração *in vitro* de urucum (*Bixa orellana* L.) a partir de diferentes tipos de explantes. **Revista Árvore**, **29**:887-895, 2005.

CASTRO, C.B.; MARTINS, C.S.; FALES, I.C.; NAZARÉ, R.F.R.; KATO, O.R.; STEIN, R.L.B.; VENTURIERI, M.N. **A cultura do urucum**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental, Brasília: EMBRAPA- SPI, p. 61, 1994.

CHRISTIAN, W. & CARSON, M. (Eds.). **Plantation Forest Biotechnology for the 21st Century**. Kerala: Research Signpost, p. 303-333, 2004.

CUNNINGHAM, Jr. F.X. & GRANTT, E. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, **49**:557-583, 1998.

DEBATA, B.K. & PUNK, F. Micropropagation of *Bixa orellana* L. In: Breeding research on medicinal and aromatics plants. Proceedings...Germany, v.2, p.334-337, 1996.

D'SOUZA, M.C. & SHARON, M. *In vitro* clonal propagation of annatto (*Bixa orellana* L.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, **37**:168-172, 2001.

FRANCO, C.F.O.; SILVA, F.C.P.; CAZÉ FILHO, J.; BARREIRO NETO, M.; SÃO JOSÉ, A.R.; REBOUÇAS, T.N.H.; FONTINÉLLI, I.S.C. **Urucuzeiro – Agronegócio de corantes naturais**. Emepa, SAIA, João Pessoa, 120p., 2002.

JAKO, C.; COUTU, C.; ROEWER, I.; REED, D.W.; PELCHER, L.E.; COVELLO, P.S. Probing carotenoid biosynthesis in developing seed coats of *Bixa orellana* (Bixaceae) through expressed sequence tag analysis. **Plant Science**, **163**:141-145, 2002.

KIOKIAS, S. & GORDON, M.H. Antioxidant properties of annatto carotenoids. **Food Chemistry**, **83**:523-529, 2003.

LAURO, G.J. A primer on natural colors. **Cereal Foods World**, **36**:949-953, 1991.

LIMA, L.C.F. Estudos com diferentes extratos em alporquia de urucunzeiros (*Bixa orellana* L.). **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, **1**: 114-116, 1992.

MANTOVANI, N.C.; FRANCO, E.T.H.; GUERRA, M.P. Micropropagação de caixeta *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. et Planch. **Ciência Florestal**, **9**:47-61, 1999.

MEIRELLES FILHO, J.C. **O livro de ouro da Amazônia: mitos e verdades sobre a região mais cobiçada do planeta**. Rio de Janeiro: Ediouro, 398 p., 2004.

MERCADANTE, A.Z. & PFANDER, H. Carotenoids from annatto: a review. **Recent Research Developments in Agricultural and Food Chemistry**, **2**:79-91, 1998.

MMA– SCA- GTA- SUFRAMA- SEBRAE. **Urucum, produtos potenciais da Amazônia: opções de investimentos na Amazônia legal e produtos florestais não-madeireiros e psicultura**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, Brasília,p. 43, 1998.

PAIVA NETO, V.B. **Morfogênese in vitro de urucum (*Bixa orellana* L.)**. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal). Viçosa, UFV, MG. 127 p., 2002.

PAIVA NETO, V.B.; BOTELHO, M.N.; AGUIAR, R.; SILVA, E.A.M.; OTONI, W.C. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of annatto (*Bixa orellana* L.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, **39**:629-634, 2003a.

PAIVA NETO, V.B.; MOTA, T.R.; OTONI, W.C. Direct organogenesis from hypocotyl-derived explants of annatto (*Bixa orellana*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **75**: 159-167, 2003b.

REBOUÇAS, T.N.H.; SÃO JOSÉ, A.R. **A cultura do urucum: práticas de cultivo e comercialização**. Vitória da Conquista- BA, DFZ/UESB/SBCN, p. 42, 1996.

RIVERA-MADRID, R.; ESCOBEDO-G.M., R.M.; BALAM-GALERA, E.; VERA-KU, M.; HARRIES, H. Preliminary studies toward genetic improvement of annatto (*Bixa orellana* L.). **Scientia Horticulturae**, **106**:165-172, 2006.

SÃO JOSÉ, A.R.; REBOUÇAS, T.N.H. **A cultura do urucum no Brasil**. Vitória da Conquista – BA, UESB, p. 109, 1990.

SÃO JOSÉ, A.R.; LIMA, E.M.; SOUZA, I.V.B.; VILARES, A.S.; REBOUÇAS, T.N.H. **Estudo da propagação vegetativa e sexuada do urucum (*Bixa orellana* L.) - Experimento I**. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, **1**:20-24, 1992.

SHA VALLI KHAN, P.S.; PRAKASH, E.; RAO, K.R. Callus induction and plantlet regeneration in *Bixa orellana* L., an annatto-yelding tree. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, **38**:186-190, 2002.

SILVA NETO, S.P.; MATSUMOTO, K.; SILVA, I.J. da. Efeito de benzilaminopurina, água de coco e carvão ativado na multiplicação *in vitro* de urucum (*Bixa orellana* L.). **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, **1**:40-45, 1992.

TOCCHINI, L. & MERCADANTE, A.Z. Extração e determinação, por CLAE, de bixina e norbixina em coloríficos. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, **21**:310-313, 2001.

ZALDÍVAR-CRUZ, J.M.; BALLINA-GÓMEZ, H.; GUERRERO-RODRÍGUEZ, C.; AVILES-BERZUNZA; E.; GODOY-HERNANDEZ, G.C. *Agrobacterium*-mediated transient transformation of annatto (*Bixa orellana*) hypocotyls with the gus reporter gene. **Plant Cell , Tissue and Organ Culture**, **73**:281–284, 2003.

CAPÍTULO I

Avaliação de Respostas Morfogênicas de Hipocótilos de Tipos Cultivados de Urucum (*Bixa orellana* L.)

Introdução

Bixa orellana L. (Bixaceae) é uma espécie lenhosa nativa da América Tropical, com distribuição das Guianas ao Brasil, sendo bastante cultivada em todos os estados brasileiros (Franco et al., 2002). É uma planta única pela exclusividade de biossíntese dos carotenóides bixina e norbixina e seu grande atrativo é como substituto de corantes artificiais. Esse fato tem alavancado crescente importância no mercado internacional, de modo particular Estados Unidos, Japão e alguns países da Europa, passando a receber estímulos nas regiões produtoras e devido à sua grande capacidade de expansão (Baliane, 1982; Meirelles Filho, 2004).

Sendo geralmente propagadas via sementes, as plantas de urucum apresentam grande desuniformidade nos plantios, com variações em relação ao teor de bixina, resistência às pragas, e produtividade (São José & Rebouças, 1990). No intuito de diminuir esta heterogeneidade genética, alguns trabalhos de propagação vegetativa da espécie foram desenvolvidos, como estaquia, enxertia por garfagem e alporquia (São José & Rebouças, 1990; Lima, 1992).

Na década de 90 iniciaram trabalhos visando o estabelecimento de protocolos para propagação *in vitro* da espécie com o uso de explantes caulinares (Silva Neto et al., 1992; Debata & Punk, 1996) e foliares (Almeida et al., 1996). Posteriormente, gemas axilares e segmentos nodais (D'Souza & Sharon, 2001; Paiva Neto, 2002; Paiva Neto et al., 2003b), sementes (Sha Valli Khan et al., 2002), segmentos de hipocótilos de plantas

germinadas *in vitro* (Paiva Neto, 2002; Paiva Neto et al, 2003b; Carvalho et al., 2005) e embriões zigóticos imaturos (Paiva Neto et al., 2003a), foram utilizados como explantes. Notadamente, todos os explantes utilizados nesses trabalhos eram juvenis.

As respostas da planta *in vitro* são dependentes de vários fatores, quer intrínsecos ou extrínsecos aos explantes. Nesse particular, a influência de fatores como o ambiente na cultura *in vitro* tem sido crescentemente explorado, no sentido de melhorar o desempenho das culturas tanto *in vitro* quando *ex vitro*. Dentre os fatores que influenciam as respostas morfogênicas *in vitro*, destacam-se a luz (intensidade, duração e qualidade), o meio nutritivo e sua composição e consistência, a umidade, a temperatura, trocas gasosas, o tipo de recipiente de cultivo e seu material de construção, dentre outros (Hughes, 1981; Tran Thanh Van, 1981; Thorpe 1994; Piqueras & Debergh, 1999).

Some-se a esses, além de fatores intrínsecos à planta-matriz ou aos explantes: o genótipo, a idade fisiológica, o estágio de desenvolvimento e vigor do material de partida, o órgão de procedência do explante, a posição do órgão na planta do qual se extrai o explante, e a orientação e a polaridade fisiológica dos explantes no meio (García-Luis et al., 1999; Newell et al., 2006). A genótipo-dependência tem sido relatada para muitas espécies, reforçando a necessidade de adoção da avaliação de germoplasmas para que as respostas morfogênicas sejam mais bem caracterizadas, estendendo protocolos de regeneração *in vitro* para maior número de “tipos cultivados”, possibilitando que os protocolos sejam reproduzíveis e a aplicação de técnicas de transformação genética, para a incorporação de genes de interesse agro-silvicultural. Porém, até o momento, não há relatos da avaliação de respostas morfogênicas em materiais de diferentes genótipos e, pouca atenção tem sido dada às possíveis diferenças relacionadas ao gradiente de resposta dos explantes hipocotiledonares.

O objetivo deste trabalho foi avaliar, em plantas de urucum *in vitro*, as respostas morfogênicas a partir de hipocótilos como fonte de explantes e, então, estabelecer um banco de germoplasma para subsidiar futuros trabalhos de melhoramento genético. Para tal, foi estudada a resposta morfogênica em relação à exposição da luz das sementes durante o período de germinação, resposta à hipoxia em meio semi-sólido, gradientes de resposta dos explantes e hipocótilos invertidos comparados aos hipocótilos cuja polaridade fisiológica foi mantida.

Material e Métodos

Foram estudados dez híbridos de urucum (*Bixa orellana* L.), denominados de genótipos 1 a 10, com aproximadamente 15 anos de idade, cultivados no horto botânico da Universidade Federal de Viçosa – UFV, MG. Estas plantas foram obtidas do cruzamento artificial entre as variedades dos tipos “Fruto Verde Piloso” X “Fruto Vermelho Liso” (Pinheiro & Almeida, 1992).

Todos os experimentos foram realizados em condições *in vitro* no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária-BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa.

Com vistas à produção de material axênico, sementes dos dez híbridos foram submetidas ao desponte (pequeno corte na região oposta à micrópila e, portanto, distal ao embrião) manualmente com auxílio de bisturi e pinça. Em seguida, foram imersas em álcool etílico 70% (v/v), durante 1 minuto. Após este período, foram imersas em solução de hipoclorito de sódio comercial (Super Globo, Brasil) a 2,5% (v/v) acrescida de Tween 20 a 0,1% (v/v), por 20 minutos. Após este processo, as sementes foram enxaguadas cinco vezes em água destilada e autoclavada. Então, foram colocadas para germinar em tubos de ensaio (150 X 25 mm; Vidrolabor, Brasil) contendo 10 mL de meio MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de 3% (p/v) de sacarose (Vetec, Brasil), complexo vitamínico B5 (Gamborg et al., 1968), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol (Sigma Chem. Co., USA) e 0,8% (p/v) de ágar granulado (Merck, Alemanha). Após a autoclavagem (121°C, 1,1 atm e 15 minutos) o pH do meio foi ajustado em 5,7 ± 0, 1. As culturas foram mantidas em sala de crescimento sob temperatura de 25 ± 2°C e fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro).

Para estudo da responsividade morfogênica, as sementes foram submetidas durante a fase de germinação e alongamento das plântulas a um período de condicionamento na qual, sementes foram colocadas para germinar no escuro por 30 dias e sob irradiância de 50 μmol m⁻² s⁻¹, durante 30 e 15 dias.

Para os estudos subseqüentes, procedeu-se a semeadura como descrito anteriormente, porém o processo germinativo ocorreu no escuro. Desta forma, obtiveram-se plântulas com aproximadamente 12 cm de comprimento, contados a partir da emissão radicular, as quais foram utilizadas como fonte de explantes. As plântulas foram retiradas assepticamente, no qual o hipocótilo foi segmentado e depositado em meio de cultura.

O meio de cultura foi constituído de sais MS, acrescidos de 3% de sacarose, vitaminas B5, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 0,8% (p/v) de ágar (Agargel Brasileiro, Brasil) e o regulador de crescimento zeatina (ZEA; Sigma Chem. Co., USA) a 4,56 µM. Sendo o pH ajustado em 5,7 ± 0,1, anterior a autoclavagem. As culturas foram mantidas em sala de crescimento sob temperatura de 25±2°C, fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro) e irradiância de 50 µmol m⁻² s⁻¹.

Os hipocótilos foram segmentados em aproximadamente 1,0 cm de comprimento e dispostos, horizontalmente, em tubos de ensaio (150 X 25 mm), contendo cada 10 ml de meio de cultura, em três diferentes profundidades (superficial, a 1 e a 2 cm do meio de cultura), ou em placas de Petri de poliestireno cristal estéreis (90 X 15mm; J. Prolab, Brasil), contendo 30 ml de meio de cultura, com orientação da região proximal até a distal, assemelhando-se à planta matriz, com o intuito de verificar possíveis gradientes de respostas morfogênicas a partir de diferentes regiões do hipocótilo (gradiente de responsividade), ou de forma aleatória para avaliação de brotações dada a origem distinta da germinação, ou dispostos verticalmente em tubos de ensaio (150 X 25 mm) com a polaridade invertida ou com a polaridade fisiológica mantida.

Cada tratamento constou de 10 repetições por híbrido, sendo: germinação diferenciada contendo duas sementes em cada tubo de ensaio; hipocótilos invertido e com a polaridade fisiológica mantida contendo dois segmentos em cada tubo de ensaio; hipocótilos dispostos em três diferentes profundidades do tubo de ensaio, contendo os três respectivos segmentos em cada tubo de ensaio; e, gradiente de resposta morfogênica contendo duas plântulas, excisadas a partir da região radicular até a cotiledonar, por placa de Petri.

Os experimentos foram instalados seguindo-se o delineamento inteiramente casualizado, e repetidos duas vezes. Foram aplicados testes para verificação da homogeneidade de variância e da distribuição normal dos dados. Quando apropriado, os dados experimentais foram submetidos à análise de variância (ANOVA), a 5% de significância, sendo aplicado o teste de Tukey para comparação entre médias. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico Genes (Cruz, 2006).

Resultados e Discussão

Responsividade morfogênica em relação ao regime luminoso de exposição das sementes durante o período de germinação

A análise estatística neste experimento demonstrou não haver diferença significativa, a 5% de probabilidade, entre os tratamentos, porém hipocótilos providos de sementes germinadas no escuro apresentaram maior média de brotações (Figuras 1 e 2). A permanência durante 30 dias na ausência de luz promoveu maior alongamento do hipocótilo culminando em maior rendimento na quantidade de explantes por plântula em relação aos demais tratamentos.

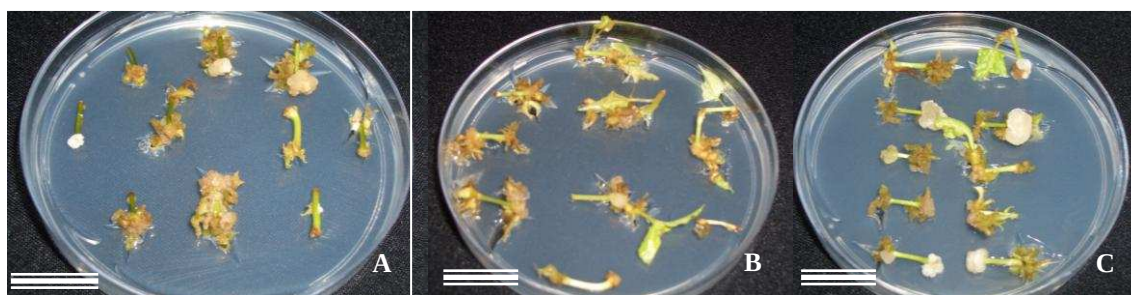


Figura 1: Respostas morfogênicas *in vitro* de segmentos de hipocótilos juvenis de urucum (*Bixa orellana*), aos 25 dias de cultivo, derivados de plântulas cultivadas sob diferentes condições de luz. **A** - Culturas iniciadas de hipocótilos provenientes de sementes germinadas à luz, durante 30 dias; **B** - Culturas iniciadas de hipocótilos provenientes de sementes germinadas na ausência de luz; e **C** – Segmentos hipocotiledonares derivados de plântulas mantidas sob escuro, por 15 dias, e transferidas para a luz durante 15 dias adicionais, para o enverdecimento. Barra = 2 mm.

A luz influencia as respostas morfogênicas tanto pela sua duração, intensidade e qualidade espectral, podendo o seu requerimento ser diferenciado, a partir da planta matriz doadora dos explantes, e em cada fase da cultura *in vitro*, como no estabelecimento, proliferação, alongamento, enraizamento, até a fase de aclimatização (Murashige, 1974; Piqueras & Debergh, 1999; Moreira-Dias et al., 2000; Hunter & Burritt, 2004).

Paiva Neto et al. (2003b) e Zaldívar-Cruz et al. (2003) utilizaram hipocótilos de plântulas de urucum provenientes de sementes germinadas na luz, porém D'Souza & Sharon (2001) utilizaram segmentos nodais a partir de sementes de urucum germinadas

na ausência de luz na metade do período (enverdecidos), Sha Valli Khan et al. (2002) também utilizaram sementes de urucum germinadas na ausência luz, no entanto, a finalidade desses autores era a obtenção de calogênese.

A condição de luz pode afetar os graus de deposição de espessamento secundário de paredes e de lignificação, a maior ou menor propensão à produção e exudação de compostos fenólicos no meio, a quantidade de reservas presentes nos tecidos, notadamente amido, podendo assim alterar a condição de sensibilidade das células e conseguinte aquisição de competência para as vias morfogênicas *in vitro* (Joy Iv & Thorpe, 1999; Hunter & Burritt, 2004).

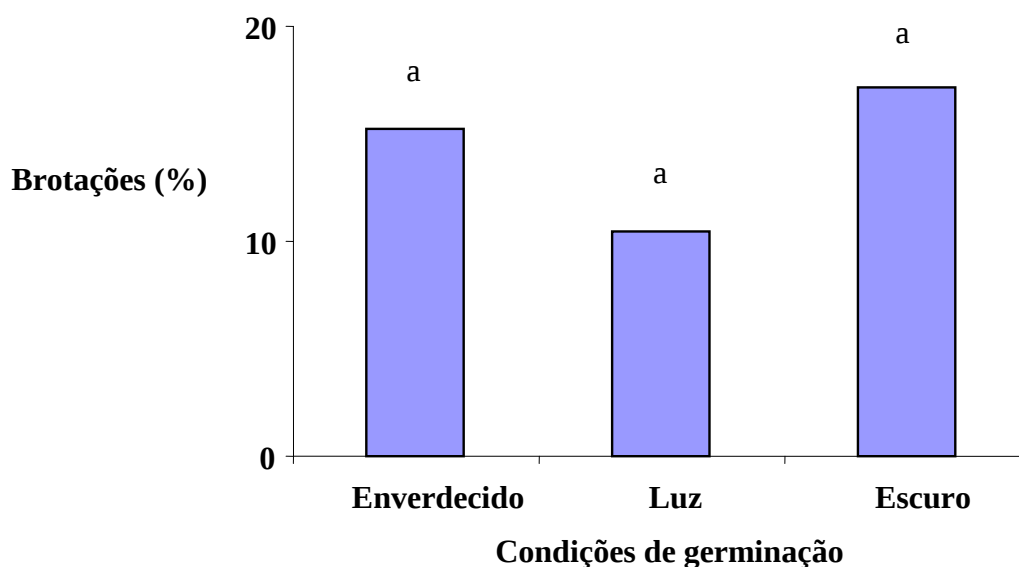


Figura 2: Porcentagem de brotações de segmentos hipocotiledonares de urucum (*Bixa orellana*) oriundos de plântulas submetidas ao pré-condicionamento de ausência total ou parcial de luz na fase de germinação, sendo: enverdecido- sementes que germinaram 15 dias sob ausência de luz; luz- sementes germinadas na presença de luz durante 30 dias; e, escuro- sementes germinadas na ausência de luz durante 30 dias. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Comparativamente, plântulas estioladas (escuro) em relação àquelas enverdecidas (luz) tiveram conseqüências positivas sobre o potencial regenerativo de explantes internodais de macieira e feijoeiro (Mohamed et al., 1992), bem como sobre a expressão do gene *gus* quando da exposição dos explantes à *Agrobacterium tumefaciens* em macieira (Liu et al., 1998).

Respostas morfogênicas de hipocótilos de urucum submetidos à hipoxia em meio semi-sólido

A análise estatística neste experimento demonstrou haver diferença significativa entre os tratamentos, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Hipocótilos dispostos na posição C (superfície do meio de cultura) apresentaram organogênese direta, ao contrário dos demais que, ainda assim, apresentaram respostas diferenciadas relacionadas à profundidade do explante no meio de cultura (Figura 3). Segmentos hipocotiledonares, nas posições A e B (a 2 e 1 cm, respectivamente), apresentaram maior calejamento com características semi-friáveis.

Em lentilha, a aeração foi o fator mais importante do que a polaridade dos ramos inoculados no meio. A condição de hipoxia em meio solidificado com ágar, independente da polaridade, reduziu significativamente a frequência e número de raízes, comparativamente ao substrato à base de perlita (Newell et al., 2006).

As plantas, em condições naturais ou experimentais, podem ser submetidas à disponibilidade de O_2 que varia desde os teores normais (normoxia), passando pela deficiência (hipoxia) ou até mesmo pela ausência (anoxia). Vários processos metabólicos são afetados pela deficiência de O_2 (Sousa & Sodek, 2002). A taxa de crescimento das plantas pode ser diminuída pela suplementação limitada de O_2 , desta forma a tensão de O_2 no meio de cultura pode ser um fator determinante da organogênese e subsequente alongamento das brotações (George, 1993).

Quando plantas jovens estão completamente submersas, elas transitoriamente aumentam a respiração metabólica e então limitam o catabolismo de carboidrato. Isto está correlacionado com a proteção das regiões meristemáticas que reiniciam o crescimento assim que a submersão diminui (Fukao & Bailey-Serres, 2004)

Estes dados reforçam a hipótese de que explantes hipocotiledonares são pouco responsivos à organogênese, sob hipoxia em meio semi-sólido. Então, a responsividade será mais intensa se o explante estiver disposto em posição superficial do meio de cultura.

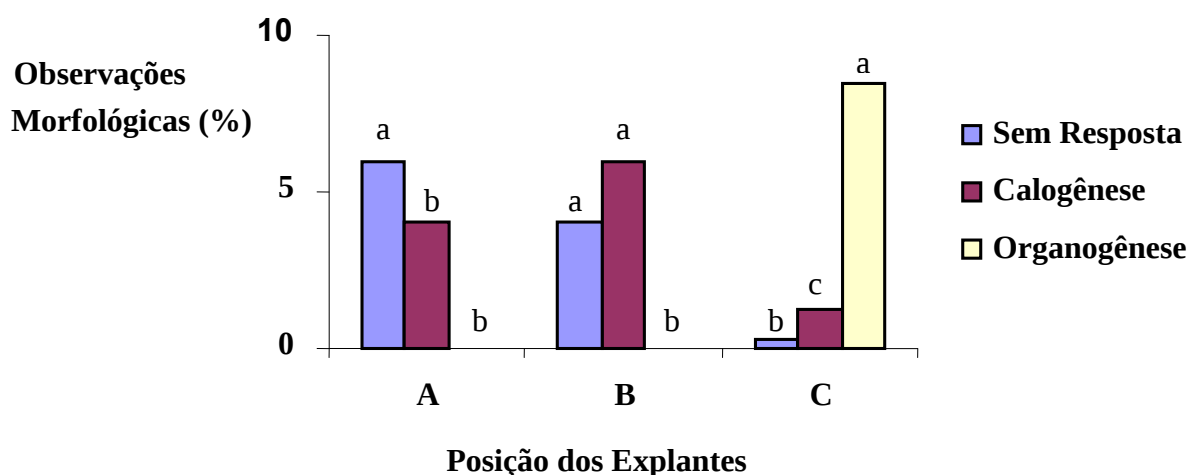


Figura 3: Morfogênese em hipocótilos de urucum cultivados em três profundidades distintas: a posição A refere-se ao explante disposto a 2 cm do meio de cultura; a posição B refere-se ao explante disposto a 1 cm no meio de cultura; e a posição C refere-se ao explante disposto na porção superficial do meio de cultura. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Conclusão sobre gradientes de respostas morfogênicas *in vitro* de explantes de urucum

No presente trabalho foi observado que o gradiente de resposta relativo ao número de brotações, foi influenciado pelo genótipo e pelas condições de luz a que as plântulas, fontes de explantes, foram expostas (Figura 4). No entanto, houve exceção quando avaliado o comprimento das brotações, cuja análise estatística, pelo teste Tukey ($p < 0,05$), indicou não haver diferença entre os tratamentos. Apesar disto, ambas as análises indicaram haver interação significativa entre os tratamentos (na luz, ausência desta e metade do período em ambos) e os híbridos (Figuras 4 e 5).

De forma geral, em relação à média do número de brotações, à exceção dos híbridos 4 e 8, todos os híbridos estudados apresentaram maior responsividade à organogênese quando submetidos à condição de luz, tanto por todo o período de indução quanto quando a cultura foi exposta a ambos (ausência/presença de luz), ocorrendo decréscimo respectivo na resposta em relação aos tratamentos. Carvalho et al. (2005) observaram que a percentagem de regeneração em hipocótilos de urucum atingiu 60%, sendo maior na região sub-basal e menor na apical.

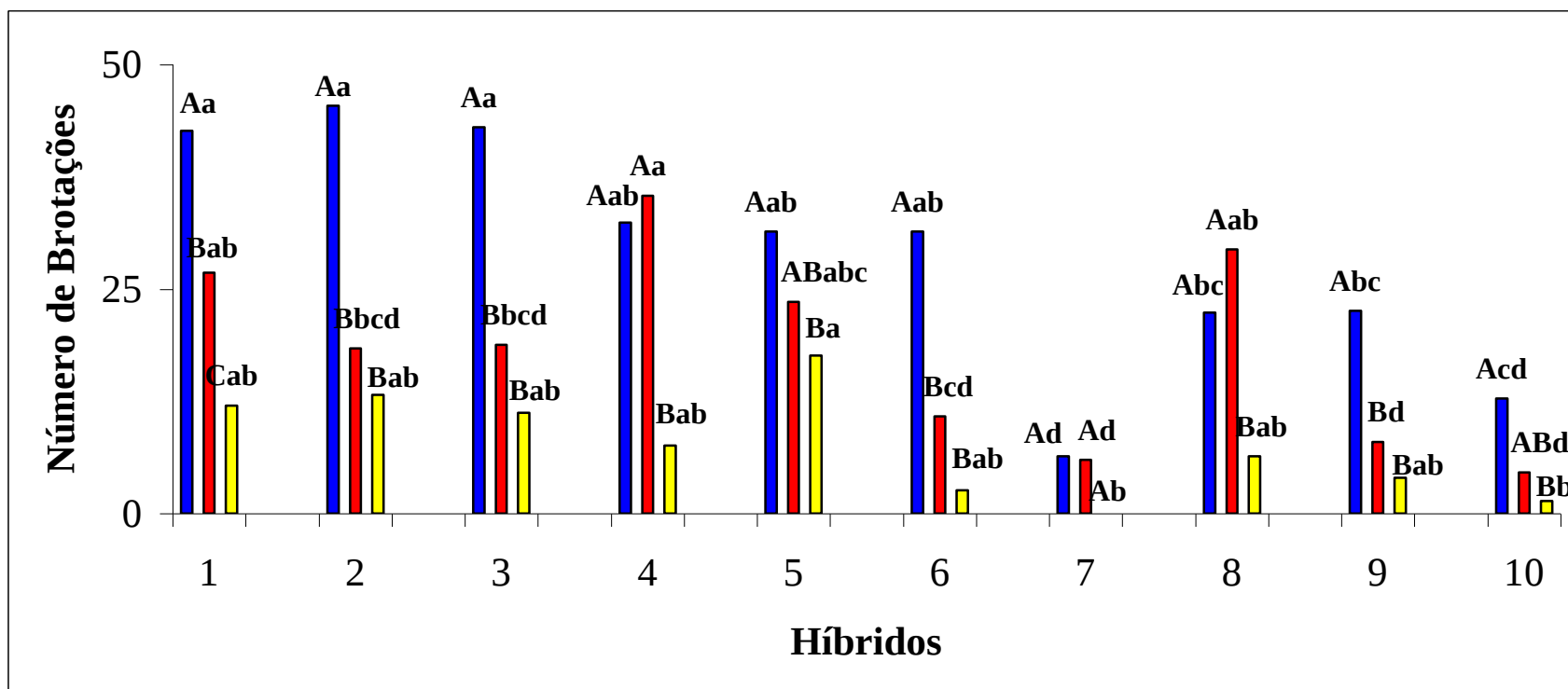


Figura 4: Número de brotações nos diferentes tratamentos, em todos os híbridos, sendo, Azul: os resultados observados quando a cultura foi exposta a luz no período de 30 dias; Vermelho: quando a cultura foi exposta metade do tempo na ausência de luz e a outra metade na luz, e Amarelo: quando a cultura permaneceu 30 dias na ausência de luz. As médias seguidas pelas mesmas letras maiúscula nos diferentes tratamentos dentro de cada híbrido e minúscula entre os híbridos não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

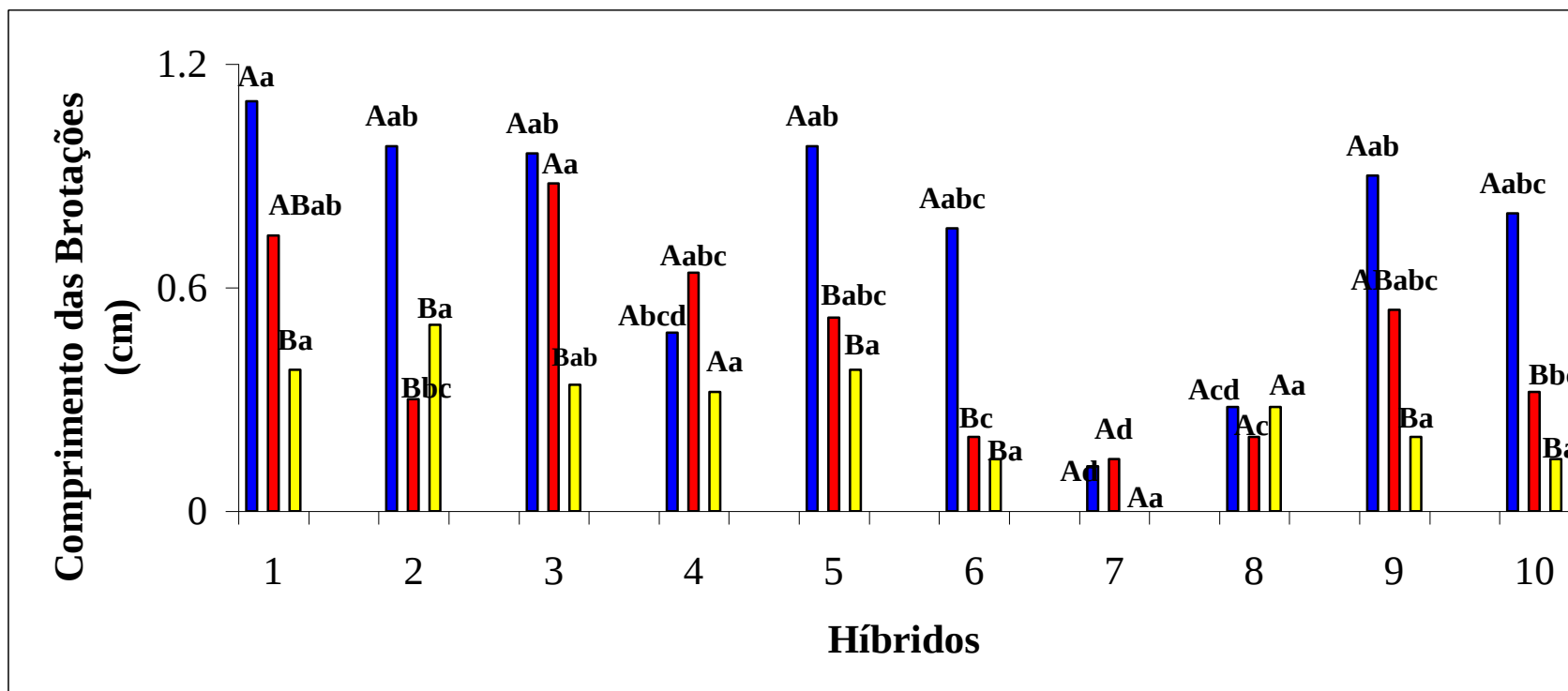


Figura 5: Comprimento das brotações (cm) nos diferentes tratamentos, em todos os híbridos, sendo, Azul: os resultados observados quando a cultura foi exposta a luz no período de 30 dias; Vermelho: quando a cultura foi exposta metade do tempo na ausência de luz e a outra metade na luz, e Amarelo: quando a cultura permaneceu 30 dias na ausência de luz. As médias seguidas pelas mesmas letras maiúscula nos diferentes tratamentos dentro de cada híbrido e minúscula entre os híbridos não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Resultados similares ocorreram, à exceção dos híbridos 2, 4 e 8, em relação ao comprimento das brotações. Estes resultados demonstram que para estes híbridos, a melhor resposta para a organogênese ocorre quando os explantes são expostos à luz por todo o período de indução (Figura 6).

Os resultados concordam com aqueles descritos por García-Luis et al. (1999), Moreira-Dias et al. (2000), Costa et al. (2004), em estudos envolvendo a orientação, polaridade e presença de luz em segmentos epicotiledonares de plântulas de citros obtidas da germinação *in vitro*.

Foi observado que no tratamento em que a cultura foi exposta à luz, de forma geral, houve maior responsividade dos explantes, no entanto, houve diferenças nas regiões em que as respostas apareceram e estas se apresentaram específicas para cada híbrido (Figura 6). Nos híbridos 1, 2, 4, 6, 7, 9 e 10 a porção basal dos explantes apresentaram tendência significativa à formação de calo, de coloração branca e semi-friável, à exceção do híbrido 9 que apresentou calogênese de coloração avermelhada, talvez caracterizando a presença de bixina. O híbrido 6 apresentou maior responsividade à organogênese na porção mediana da plântula, sendo que os explantes excisados próximos à raiz obtiveram menor resposta. O híbrido 3, demonstrou que na porção apical dos explantes ocorreu calejamento mais intenso; já para o híbrido 5 a porção basal do explante respondeu melhor à organogênese, sendo que os explantes excisados próximos à raiz e ao ápice não apresentaram resposta. O híbrido 8 apresentou maior intensidade à calogênese em ambos os lados dos explantes, seguidos por toda a plântula, no entanto houve duas repetições em que a calogênese foi maior, resultando em organogênese indireta mais intensa. Estas observações divergem daquelas feitas por Carvalho et al. (2005), os quais não observaram a existência de organogênese indireta em urucum.

De forma geral, os tratamentos com metade do tempo em ausência de luz seguida pela presença desta, e ausência completa de luz, obtiveram resultados similares, porém, com decréscimo de organogênese, respectivamente, e menor qualidade. No tratamento com ausência de luz, observou-se ainda, hiperidricidade nos híbridos 1, 2 e 8. Segundo Kevers et al. (2004), o processo de hiperidricidade envolve problemas na diferenciação, sendo que um dos fatores que podem influenciar é a variação na luz, pois ocorrem mudanças bioquímicas que se distinguem daquelas causadas pela diferenciação e suas conseqüências.

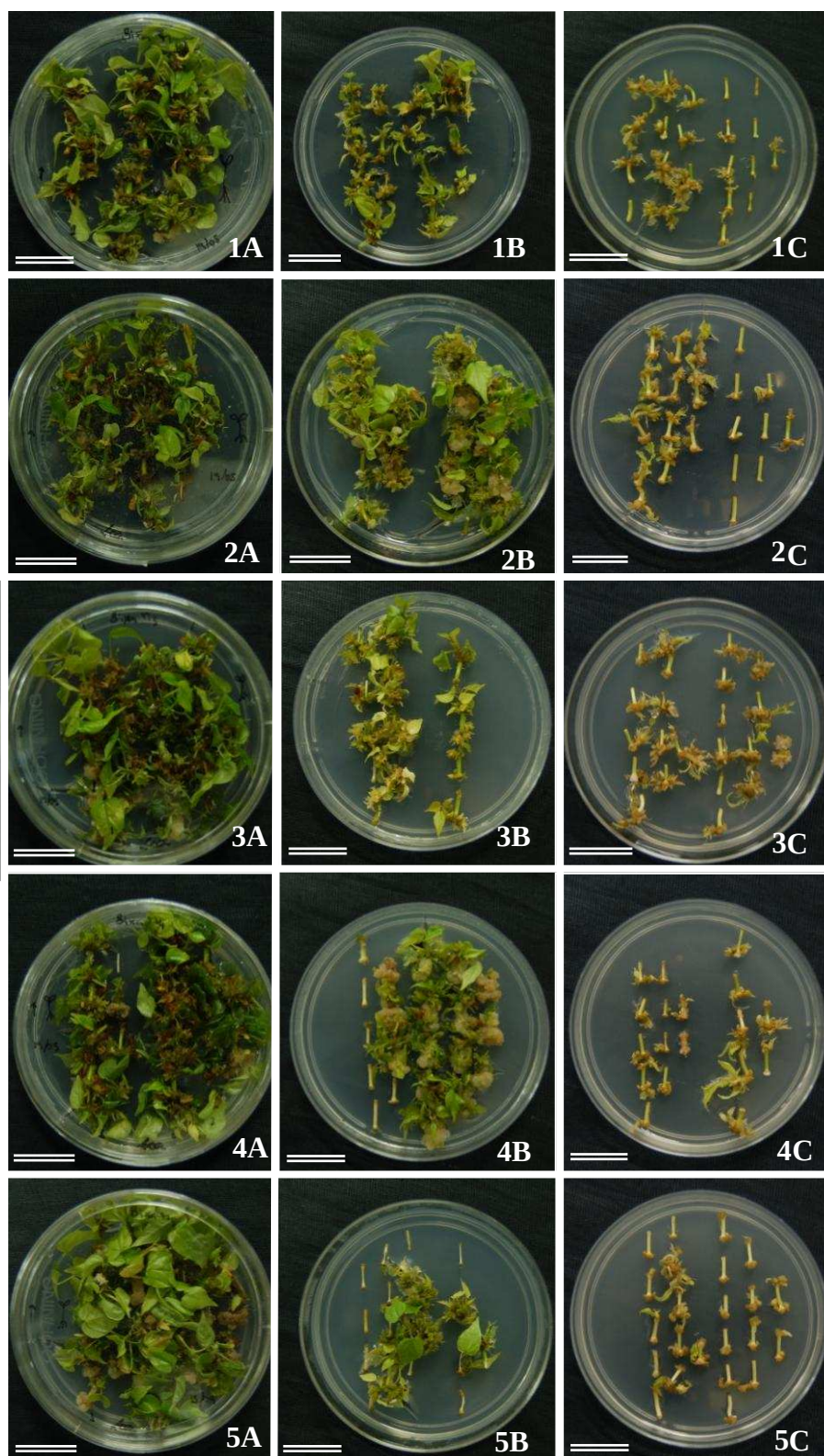


Figura 6: Detalhe das culturas *in vitro* de urucum (evidenciando resposta diferenciada de organogênese adventícia em cinco híbridos (1-5) de urucum (*Bixa orellana*). As letras (A-C) representam os tratamentos utilizados: **A** – As culturas foram mantidas sob luz por todo o período de indução à organogênese; **B** – As cultura foram mantidas metade do tempo na ausência de luz (15 dias) e a outra metade sob luz; e **C** – As culturas foram mantidas durante 30 dias na ausência de luz. Barra = 2mm.

Respostas morfogênicas de hipocótilos invertidos de urucum

Utilizou-se dois tratamentos, o primeiro no qual explantes hipocotiledonares tiveram sua polaridade invertida (hipocótilo invertido) e o segundo no qual a posição foi mantida.

As respostas da planta *in vitro* também dependem de características intrínsecas do explante utilizado, principalmente quando se trata de plantas lenhosas, como é o presente caso. Após a primeira semana de cultivo, em meio de indução de gemas, ocorreu de médio a intenso calejamento na superfície de corte do hipocótilo que ficou em contato com meio de cultura em todos os híbridos analisados. Os calos foram de consistência semi-friável, com coloração variando de branco para verde. Abaixo da região de calejamento ocorreu organogênese direta. As gemas adventícias apresentaram em média 0,1 cm de comprimento e, na maioria dos híbridos, formou-se em toda a extensão da superfície de corte, em formato de anel. Essas respostas estão em conformidade conforme descrito por Paiva Neto (2002) e Paiva Neto et al. (2003b). Paiva Neto (2002) estudou a morfogênese de hipocótilos invertidos em urucum, utilizando os reguladores de crescimento ZEA, TDZ e BAP, e encontrou maior número de brotações, em termos de organogênese, quando da utilização de ZEA a 4,56 μ M.

Após a fase de indução, os explantes retornaram à posição normal. O número de brotações iniciais (gemas, com 5 mm de comprimento) foi superior ao número de brotações finais (ramos, com 1,0 cm de comprimento) em todos os híbridos estudados, e em ambos os tratamentos (explantes hipocotiledonares invertidos e com a polaridade mantida) (Figura 7). Neste trabalho ocorreu o alongamento, em média, de apenas um ramo por explante e este pareceu restringir o alongamento de outros ramos (Figura 7 B - D).

Neste trabalho, análises estatísticas demonstraram não haver diferença entre os híbridos, a 5% de probabilidade, pelo teste Tukey, porém demonstrou haver diferenças entre os tratamentos hipocótilo invertido e com a polaridade mantida, além de haver interação significativa nas variáveis analisadas (número de brotações iniciais e finais) em ambos os híbridos e tratamentos. As interações indicam que apesar de não haver diferença entre os híbridos, dentro de cada tratamento há diferenças, considerando o mesmo híbrido para os diferentes tratamentos.

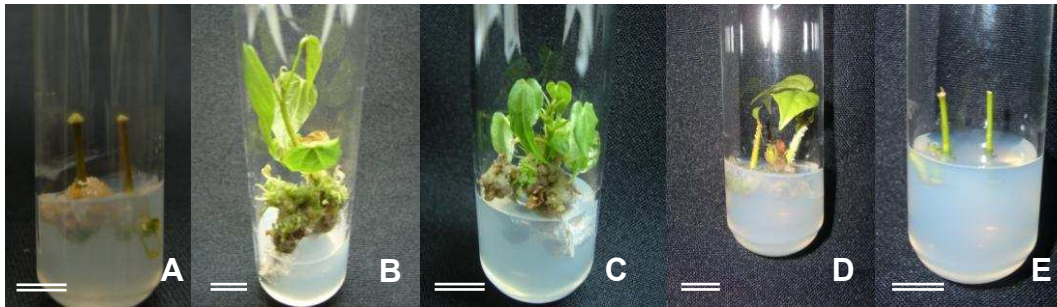


Figura 7: Detalhes dos segmentos hipocotiledonares de urucum (*Bixa orellana*) na posição vertical. **A:** hipocótilo invertido durante o período de indução de gemas; **B e C:** hipocótilos dispostos na posição normal, nos genótipos 1 e 2, respectivamente; **D e E:** hipocótilos com polaridade fisiológica mantida. Barra = 1 mm.

Para a variável NBI (número de brotações iniciais), apenas os híbridos 7 e 9 não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos e, para a variável NBF (número de brotações finais), somente os híbridos 7, 8 e 9 não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos.

No entanto, para todos os híbridos estudados, a utilização de hipocótilos invertidos, quando comparados aos não invertidos, foi mais eficiente quanto ao processo de organogênese, e, embora os testes para análise de variância não demonstrarem a genótipo-especificidade da cultura, foi observado haver diferenças relacionadas ao nível de resposta às brotações em todos os híbridos (Figura 8).

Originalmente a técnica de cultivo de hipocótilos invertidos foi proposta por Valera-Montero & Ochoa-Alejo (1982) para a regeneração *in vitro* de pimentão (*Capsicum* sp.). Posteriormente, utilizada com sucesso em urucum (Paiva Neto, 2002; Paiva Neto et al., 2003b; Carvalho et al., 2005) e na avaliação da capacidade regenerativa de acessos de um banco de germoplasma de pimentão (Fontes, 1998). Essa capacidade regenerativa marcante da extremidade distal dos explantes cultivados em polaridade invertida e imersa no meio de cultivo levou à avaliação de diferentes alturas de submersão dos segmentos, a partir da superfície do meio semi-sólido.

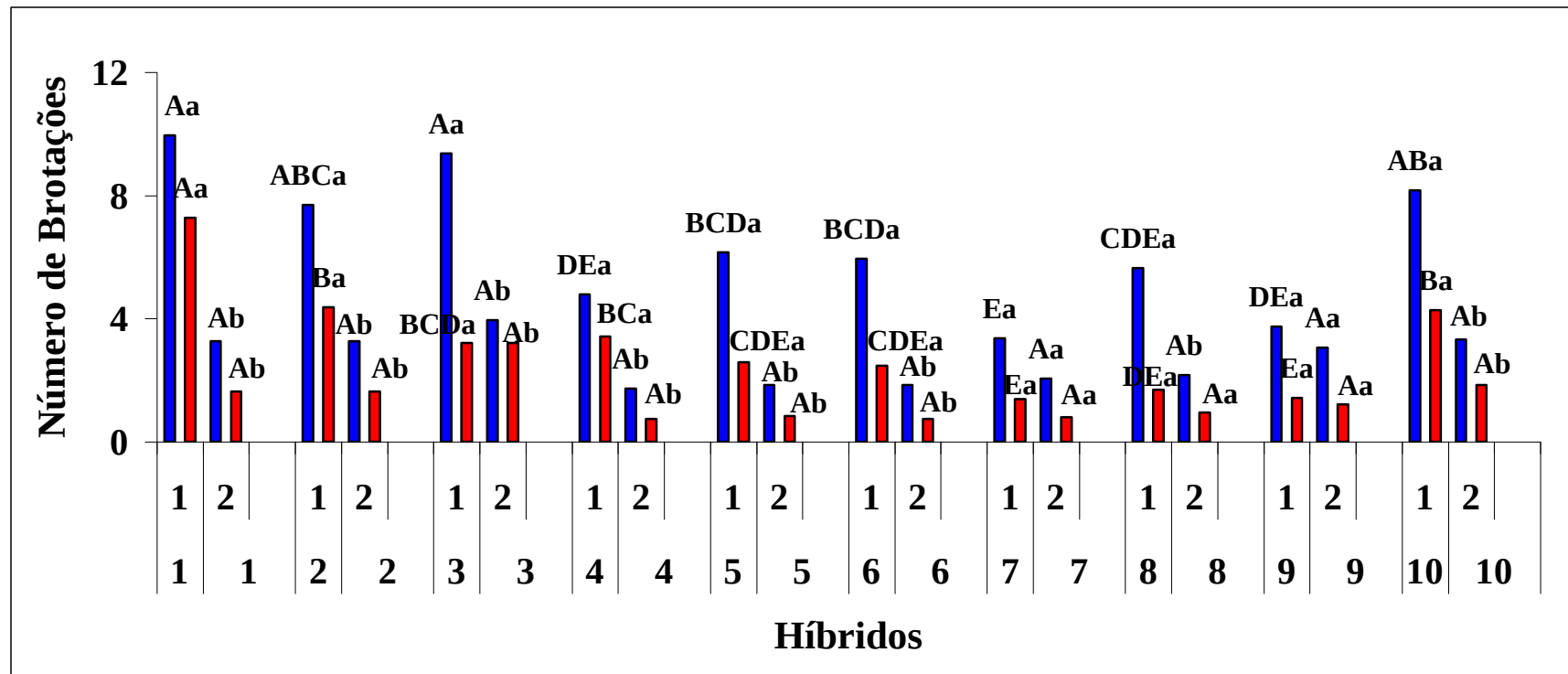


Figura 8: Número de brotações inicial (azul) e final (vermelho) nos 10 híbridos de urucum (*Bixa orellana*) avaliados. As médias seguidas pelas mesmas letras maiúscula nos diferentes tratamentos (1- hipocótilo invertido, e, 2- com polaridade mantida) e minúscula entre os híbridos não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Estes estudos indicaram que a propagação *in vitro* do urucum pela organogênese direta, utilizando hipocótilos como fonte de explante, é mais eficiente quando estes são dispostos horizontalmente, em placa de Petri, cujo contato com o meio de cultura equivale a posição superficial. Estes resultados contrariam os observados por Paiva Neto (2002), o qual notou que brotações advindas de segmentos de hipocótilos foram menos freqüentes e mais difíceis de alongar do que aquelas derivadas de hipocótilos invertidos.

A exposição da cultura à condição de luz e a origem dos explantes, são fatores decisivos para o sucesso da propagação *in vitro*. Desta forma, estabeleceu-se um banco de germoplasma *in vitro* dos dez híbridos aqui relatados, para estudos posteriores de melhoramento genético.

A procedência deste banco foi de organogênese a partir de segmentos de hipocótilos advindos de sementes germinadas e estioladas (ausência de luz), cujas brotações foram induzidas como descritas anteriormente, tendo como período de repicagem ideal 8 semanas e a utilização de ZEA na metade da concentração utilizada para indução à organogênese (Figura 9).

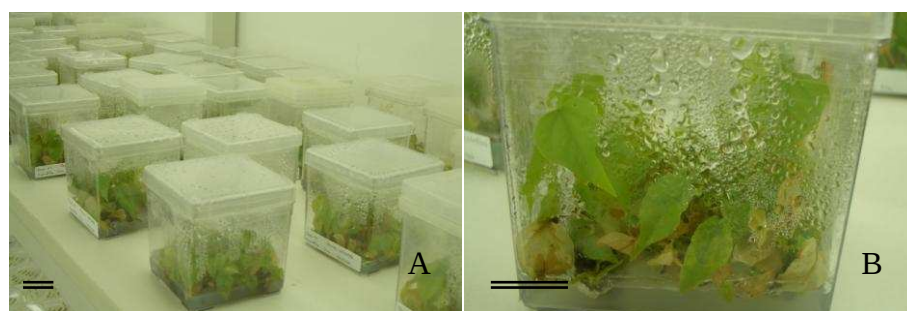


Figura 9: Banco de germoplasma de urucum estabelecido *in vitro*. **A:** vista geral de parte do banco; **B:** detalhe de uma das culturas em fase de manutenção. Barra = 2 mm.

Referências Bibliográficas

- ALMEIDA, J.L.; ALMEIDA, F.C.G.; NUNES, R. de P.; ALMEIDA, F.A.G. Bud initiation in leaf explants of annatto seedlings on different cytokinins. **Ciência Rural**, **26**:45-49, 1996.
- BALIANE, A. **A cultura do urucueiro**. Informe Técnico. Rio de Janeiro: Emater, 10 p., 1982.
- CARVALHO, J.F.R.P.; CARVALHO, C.R.; OTONI, W.C. Regeneração *in vitro* de urucum (*Bixa orellana* L.) a partir de diferentes tipos de explantes. **Revista Árvore**, **29**: 887-895, 2005.
- COSTA, M.G.C., ALVES, V.S., LANI, E.R.G., MOSQUIM, P.R., CARVALHO, C.R., OTONI, W.C. Morphogenic gradients of adventitious bud and shoot regeneration in epicotyl explants of *Citrus*. **Scientia Horticulturae**, **100**:63-74, 2004.
- CRUZ, C.D. **Programa Genes: Análise multivariada e simulação**. Editora UFV. Viçosa, 175p., 2006.
- DEBATA, B.K. & PUNK, F. Micropropagation of *Bixa orellana* L. In: Breeding research on medicinal and aromatics plants. **Proceedings...**Germany, v.2, p.334-337, 1996.
- D'SOUZA, M.C. & SHARON, M. *In vitro* clonal propagation of annatto (*Bixa orellana* L.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant**, **37**:168-172, 2001.
- FONTES, M. A. **Morfogênese *in vitro*, isolamento e cultivo de protoplastos e transformação genética de pimentão (*Capsicum* sp.)**. Dissertação (Mestrado em Botânica), Universidade Federal de Viçosa, 175 p., 1998.
- FRANCO, C.F.O.; SILVA, F.C.P.; CAZÉ FILHO, J.; BARREIRO NETO, M.; SÃO JOSÉ, A.R.; REBOUÇAS, T.N.H.; FONTINÉLLI, I.S.C. **Urucuzeiro – Agronegócio de corantes naturais**. Emepa, SAIA, João Pessoa, 120p., 2002.

FUKAO, T. & BAILEY-SERRES, J. Plant responses to hypoxia – is survival a balancing act? **Trends in Plant Science**, **9**: 449-456, 2004.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, **50**:151-158, 1968.

GARCÍA-LUIS, A.; BORDÓN, Y.; MOREIRA-DIAS, J.M.; MOLINA, R.V.; GUARDIOLA, J.L. Explant orientation and polarity determine the morphogenic response of epicotyl segments of Troyer citrange. **Annals of Botany**, **84**: 715-723, 1999.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. 2nd Edition, 574 p., 1993.

HUGHES, K.W. *In vitro* ecology: exogenous factors affecting growth and morphogenesis in plant culture systems. **Environmental and Experimental Botany**, **21** (3/4): 281-288, 1981.

HUNTER, D.C. & BURRITT, D.J. Light quality influences adventitious shoot production from cotyledon explants of lettuce (*Lactuca sativa* L.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant**, **40**:215-220, 2004.

JOY IV, W. & THORPE, T.A. Shoot morphogenesis: structure, physiology, biochemistry and molecular biology. In: SOH, W.-Y. & BHOJWANI, S.S. (eds.). **Morphogenesis in Plant Tissue Cultures**. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, p.171-214, 1999.

KEVERS, C.; FRANCK, T.; STRASSER, R.J.; DOMMES, J.; GASPAR, T. Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **77**: 181–191, 2004.

LIMA, L.C.F. Estudos com diferentes extratos em alporquia de urucunzeiros (*Bixa orellana* L.). **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, **1**:114-116, 1992.

LIU, O.; SALIH, S.; HAMMERSCHLAG, F. Etiolation of 'Royal Gala' apple (*Malus x domestica* Borkh.) shoots promotes high-frequency shoot organogenesis and enhanced β -glucuronidase expression from stem internodes. **Plant Cell Reports**, **18**:32-36, 1998.

MEIRELLES FILHO, J.C. **O livro de ouro da Amazônia: mitos e verdades sobre a região mais cobiçada do planeta**. Rio de Janeiro: Ediouro, 398 p., 2004.

MOHAMED, M.F.; READ, P.E.; COYNE, D.P. Dark preconditioning, CPPU and thidiazuron promote shoot organogenesis on seedling node explants of common and faba beans. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, **117**:668-672, 1992.

MOREIRA-DIAS, J.M.; MOLINA, R.V.; BORDÓN, Y.; GUARDIOLA, J.L.; GARCÍA-LUIS, A. Direct and indirect shoot organogenic pathways in epicotyl cuttings of Troyer citrange differ in hormone requirements and in their response to light. **Annals of Botany**, **85**: 103–110, 2000.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, **78**:135-166, 1974.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, **15**: 473 – 497, 1962.

NEWELL, C.; GROWNS, D.; McCOMB, J. Aeration is more important than shoot orientation when rooting lentil (*Lens culinaris*) cv. 'Digger' microcuttings *in vitro*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant**, **42**:197-200, 2006.

PAIVA NETO, V.B. **Morfogênese *in vitro* de urucum (*Bixa orellana* L.)**. Dissertação de Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal). Viçosa, UFV, MG. 127 p, 2002.

PAIVA NETO, V.B.; BOTELHO, M.N.; AGUIAR, R.; SILVA, E.A.M.; OTONI, W.C. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of annatto (*Bixa orellana* L.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant**, **39**:629-634, 2003a.

PAIVA NETO, V.B.; MOTA, T.R.; OTONI, W.C. Direct organogenesis from hypocotyl-derived explants of annatto (*Bixa orellana* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 75:159-167, 2003b.

PINHEIRO, A.L. & ALMEIDA, E.C. de. Avaliação de um híbrido artificial obtido entre duas variedades de urucum (*Bixa orellana* L.) em Viçosa – Minas Gerais. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**. 1:31-35, 1992.

PIQUERAS, A. & DEBERGH, P.C. Morphogenesis in micropropagation. In: SOH, W.-Y. & BHOJWANI, S.S. (eds.). **Morphogenesis in Plant Tissue Cultures**. Kluwer Academic Pub.:Dordrecht, p.443-462, 1999.

SÃO JOSÉ, A.R. & REBOUÇAS, T.N.H. **A cultura do urucum no Brasil**. Vitória da Conquista – BA, UESB, p. 109, 1990.

SHA VALLI KHAN, P.S.; PRAKASH, E.; RAO, K.R. Callus induction and plantlet regeneration in *Bixa orellana* L., an annatto-yielding tree. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, 38:186-190, 2002.

SILVA NETO, S.P.; MATSUMOTO, K.; SILVA, I.J. da. Efeito de benzilaminopurina, água de coco e carvão ativado na multiplicação *in vitro* de urucum (*Bixa orellana* L.). **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, 1:40-45, 1992.

SOUSA, C.A.F. & SODEK, L. The metabolic response of plants to oxygen deficiency. **Brazilian Journal of Plant Physiology**. 14:83-94, 2002.

THORPE, T.A. Morphogenesis and regeneration. In: VASIL, I.K. & THORPE, T.A. (eds.). **Plant Cell and Tissue Culture**. Totowa:Humana Press, p.1-12, 1994.

TISSERAT, B. Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration. In: DIXON, R.A. (ed.). **Plant Cell Culture: a Practical Approach**. Oxford: IRL Press, p.79-105, 1985.

TRAN THANH VAN, K.M. Control of Morphogenesis in *in Vitro* Cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, **32**:291-311, 1981.

VALERO-MONTERO, L.L. & OCHOA-ALEJO, N. A novel approach for chili pepper (*Capsicum annuum* L.) plant regeneration: shoot induction in rooted hypocotyls. **Plant Science**, **84**:215-219, 1992.

ZALDÍVAR-CRUZ, J.M.; BALLINA-GÓMEZ, H.; GUERRERO-RODRÍGUEZ, C.; AVILES-BERZUNZA; E.; GODOY-HERNANDEZ, G.C. *Agrobacterium*-mediated transient transformation of annatto (*Bixa orellana*) hypocotyls with the gus reporter gene. **Plant Cell , Tissue and Organ Culture**, **73**: 281–284, 2003.

CAPÍTULO II

Avaliação do Efeito do Meio Líquido Sobre o Alongamento *in vitro* de Epicótilos de Tipos Cultivados de Urucum (*Bixa orellana* L.)

Introdução

Protocolos para propagação *in vitro* de urucum (*Bixa orellana* L.) foram desenvolvidos em 1996, com o uso de explantes caulinares (Debata & Punk, 1996), gemas axilares e segmentos nodais (D'Souza & Sharon, 2001), por indução de calos a partir de sementes (Sha Valli Khan et al., 2002), hipocótilos de plântulas crescidas *in vitro* (Paiva Neto, 2002; Carvalho et al., 2005) e embriões zigóticos imaturos (Paiva Neto et al., 2003a). Apesar do eficiente sistema de indução de brotações adventícias via organogênese em alguns genótipos do urucum, a fase de alongamento das brotações ainda tem sido uma etapa limitante ao processo.

O desempenho favorável de explantes constituídos de segmentos de hipocótilos invertidos de urucum cultivados com a porção distal imersa no meio nutritivo (Paiva Neto et al., 2003b; Carvalho et al., 2005), sugere certa tolerância e conseguinte favorecimento da condição de hipoxia sobre o processo morfogênico dessa espécie.

Em condições naturais algumas plantas estão sujeitas à submersão, tal como é o caso de plantas aquáticas e plantas que se desenvolvem em solos inundáveis, podendo esta submersão ser temporária ou permanente. Estas espécies apresentam adaptações que possibilitam sua sobrevivência sob estas condições que são estressantes para as demais. Uma das adaptações é o alongamento do caule, que faz com que as plântulas consigam ultrapassar a lâmina d'água, possibilitando a realização da fotossíntese e normalizando as trocas gasosas (Mauchamp et al., 2001; Parolin, 2002).

Com a hipótese de que a submersão possa vir a influenciar o alongamento de epicótilos, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do meio líquido sobre o alongamento *in vitro* de epicótilos, em dez híbridos de tipos cultivados de urucum (*B. orellana*), como forma de estabelecer maior eficiência no alongamento de brotações oriundas de organogênese. Para tal, os meios líquido estacionário e meio semi-sólido, na ausência de reguladores de crescimento, foram comparados quanto ao alongamento de epicótilos e de brotações adventícias de origem *in vitro* de urucum.

Material e Métodos

Foram estudados dez híbridos de urucum (*Bixa orellana* L.), denominados de 1 a 10, com aproximadamente 15 anos de idade, cultivadas no horto botânico da Universidade Federal de Viçosa – UFV, MG. Estas plantas foram obtidas do cruzamento artificial entre as variedades os tipos “Fruto Verde Piloso” X “Fruto Vermelho Liso” (Pinheiro & Almeida, 1992).

Todos os experimentos foram realizados em condições *in vitro* no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária-BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa.

Sementes de urucum, dos dez híbridos distintos, foram submetidas ao desponte (pequeno corte na região oposta à micrópila e, portanto, distal ao embrião) manualmente com auxílio de bisturi e pinça. Em câmara de fluxo laminar, procedeu-se o processo de desinfestação pela imersão das sementes em álcool etílico a 70% (v/v), durante 1 minuto, seguida da imersão em solução de hipoclorito de sódio comercial a 2,5% (v/v) acrescida de Tween 20 a 0,1% (v/v), por 20 minutos. Findo esse tempo, as sementes foram enxaguadas por cinco vezes consecutivas (aproximadamente 2 minutos cada), em água destilada e autoclavada. Então, foram colocadas para germinar em tubos de ensaio (150 X 25 mm; Vidrolabor, Brasil) contendo meio MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescidos de 3% (p/v) de sacarose (Vetec, Brasil), vitaminas B5 (Gamborg et al., 1968), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e 0,8% (p/v) de ágar (Merck, Alemanha). O pH foi ajustado em 5,7±0,1 e o volume de meio de cultura utilizado foi de 10 ml por tubo de ensaio. As culturas foram mantidas em sala de crescimento sob temperatura de 25 ± 2°C, sob condições de ausência de luz, durante 30 dias.

Após a germinação, as plântulas foram retiradas assepticamente, no qual os epicótilos foram excisados em segmentos de aproximadamente 1,0 cm de comprimento, e dispostos verticalmente em tubos de ensaio (150 X 25 mm) contendo 2 ml de meio de cultura líquido ou 10 ml de meio de cultura semi-sólido (controle).

O meio de cultura foi constituído de sais MS, acrescidos de 3% de sacarose, vitaminas B5, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e, quando solidificado, 0,8% (p/v) de ágar (Brasileiro, Brasil). O pH ajustado em 5,7 ± 0,1. As culturas foram mantidas em sala de crescimento sob temperatura de 25 ± 2°C e fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro) e irradiância de 50 μmol m⁻² s⁻¹.

Ao final do experimento, as variáveis analisadas, foram o número de nós, o comprimento da parte aérea (cm), o número de folhas e área foliar (cm²), e o número e comprimento das raízes (cm), sendo cada tratamento constituído de 10 repetições.

Os tratamentos constaram de segmentos do epicótilo imersos em meio líquido (T1), brotações de origem organogênica em meio líquido (T2) e segmentos de epicótilos inoculados em meio semi-sólido (T3).

Para análise da área foliar, os limbos foram fixados em papel branco com fita transparente (Figura 1A) e digitalizados na resolução de 600 dpi ajustando-se brilho e contraste de forma a obter uma melhor diferença na tonalidade entre o limbo e o papel (Figura 1B). Para o processamento das imagens utilizou-se o programa Adobe® Photoshop® CS, aplicando-se o filtro “Mediana” para a redução de pixels isolados e, na sequência, o filtro “Limiar” para converter os valores de pixel das imagens em valores de preto ou branco (imagens binárias). Posteriormente, foi utilizada a sequência de comandos imagem - ajustes - inverter para que as folhas ficassem na cor branca e o fundo na cor preta (Figura 1C).



Figura 1 - Sequência adotada para o processamento das imagens. **(A)** Preparo do material para digitalização; **(B)** imagem digitalizada com ajuste de brilho e contraste; **(C)** imagem binária para processamento. Barra = 1 mm.

Com as imagens processadas, utilizou-se o programa QUANTIPORO (Fernandes Filho & Viana, 2001) para a geração do atributo morfométrico área, que é definida como o número de pixels, na cor branca, do polígono formado, convertida automaticamente em cm² pelo programa em função da resolução adotada.

O experimento foi instalado seguindo-se o delineamento inteiramente casualizado, sendo repetido duas vezes. Foram aplicados testes para verificação da homogeneidade de variância e da distribuição normal dos dados. Quando apropriado, os dados experimentais foram submetidos à análise de variância (ANOVA), a 5% de significância, sendo aplicado o teste de Tukey para comparação entre médias. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico Genes (Cruz, 2006).

Resultados e Discussão

As análises estatísticas deste experimento demonstraram que houve significância pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) nas seguintes variáveis: número de folhas, número de nós, altura das plantas, comprimento e número de raízes e para área foliar houve somente interação significativa.

Entretanto, apesar de não haver demonstrado a genótipo-especificidade da cultura, os resultados sugerem interação significativa entre os tratamentos e os híbridos aqui estudados. Esta interação denota que apesar de não haver diferença entre os híbridos estudados dentro de cada tratamento, há diferença considerando o mesmo híbrido para os diferentes tratamentos.

Em relação à variável número de folhas, somente os híbridos 7, 8, 9 e 10 não apresentaram diferença entre os tratamentos 2 e 3 (brotações de origem *in vitro* em meio líquido e epicótilos em meio semi-sólido, respectivamente). Entretanto, apresentaram média superior no tratamento 1 (epicótilos em meio líquido) no qual se diferenciou dos demais tratamentos. Para os híbridos 3, 4 e 5 houve diferença estatística entre os três tratamentos e, para os híbridos 1, 2 e 6, os tratamentos 1 e 2 não apresentaram diferença estatística. Porém, quando comparado todos os tratamentos, houve média superior do tratamento 1 (Figura 1). Estes resultados indicam que a utilização do meio líquido, mesmo sem a presença de reguladores de crescimento, influencia na emergência foliar.

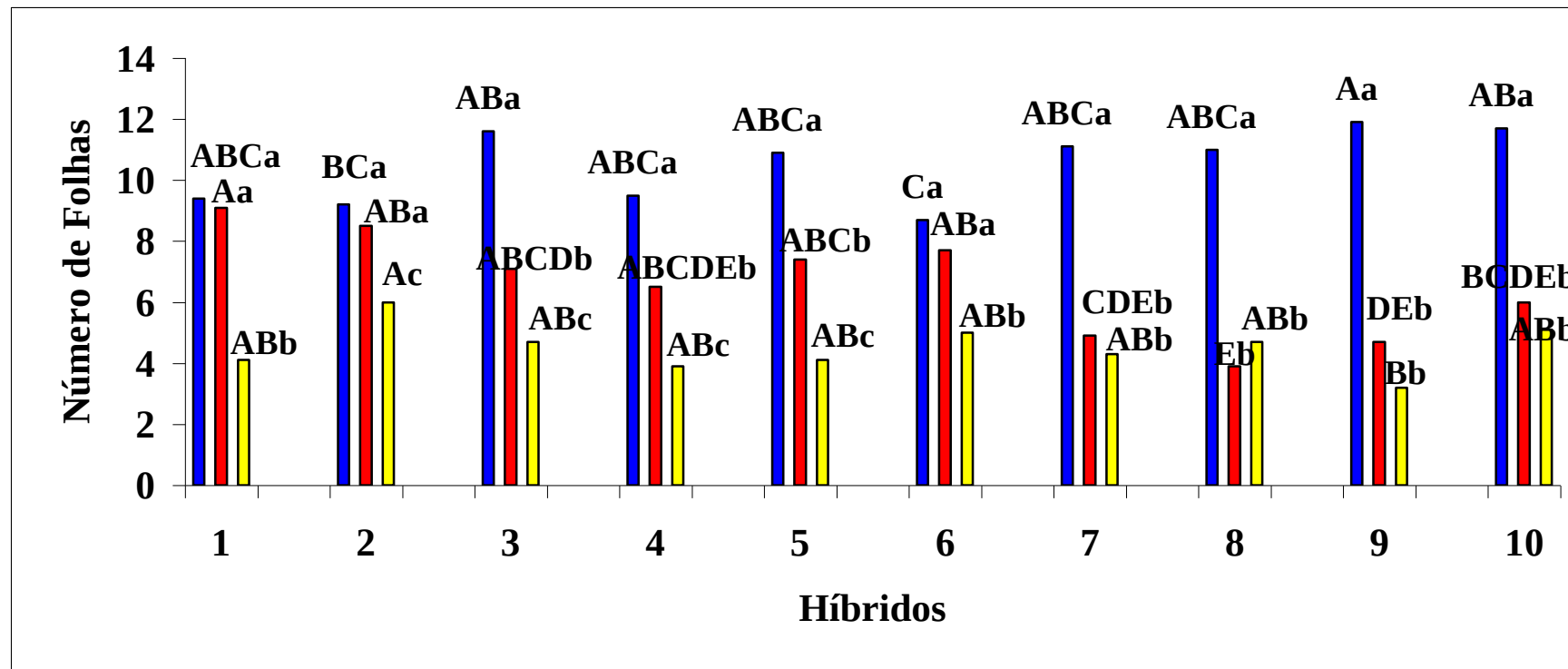


Figura 1: Número de folhas observadas nos 10 híbridos estudados, sendo Azul: tratamento 1; Vermelho: tratamento 2, e Amarelo: tratamento 3. As médias seguidas pelas mesmas letras maiúscula nos diferentes tratamentos dentro de cada híbrido e minúscula entre os híbridos não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Quanto a variável número de nós, somente os híbridos 1, 2 e 3 demonstraram não haver diferença estatística entre os tratamentos. Apesar disto, a média do número de nós para os tratamentos com meio líquido, foi superior ao meio semi-sólido, indicando que o uso do meio líquido também influencia no número de nós (Figura 2). O tratamento 3 demonstrou a existência da expansão no número de nós, porém com internós curtos, o que foi mais uma diferença entre os tratamentos, uma vez que, a utilização do meio líquido proporcionou a formação de internós maiores.

De forma geral, segmentos epicotiledonares mantidos no meio semi-sólido apresentaram crescimento reduzido, com entrenós curtos, ocasionando alongamento pouco significativo. Inicialmente as folhas presentes senesceram, dando origem a novas folhas menores e cloróticas, sendo que muitas vezes ocorreu a formação de calos na base dos explantes. Os explantes mantidos em meio líquido, por sua vez, apresentaram alongamento muito maior quando comparado àqueles em meio semi-sólido.

É possível que as concentrações ótimas de sais, num meio semi-sólido, sejam mais elevadas do que as concentrações ótimas para o crescimento em meio líquido devido a restrições na velocidade de difusão de nutrientes impostas pelo meio semi-sólido (Caldas et al., 1998), no entanto, microelementos e fosfato podem ser retidos na matriz gélida do ágar, tornando-se menos disponíveis para as culturas (George, 1993).

Os meios líquidos têm como vantagens a rapidez de preparo e menor custo, somados a melhor homogeneidade dos nutrientes pelo não estabelecimento de um gradiente nutricional com o crescimento dos tecidos (Caldas et al., 1998).

Quando estudado o alongamento das plantas, apenas os híbridos 5 e 7 demonstraram haver similaridade entre os tratamentos 1 e 2, mas da mesma forma que os demais, o meio líquido foi o que mais favoreceu o crescimento da planta, se comparado à utilização de meio semi-sólido (Figura 3).

Ao se analisar a variável área foliar, observou-se que apenas os híbridos 7 e 10 demonstraram haver diferença estatística entre os três tratamentos. Apesar disto, a média da área foliar para o híbrido 7, no tratamento 1, foi surpreendentemente superior às demais. Ademais, nos híbridos 3, 4, 5 e 6 a média para esta variável se foi maior no tratamento 2 (Figura 4).

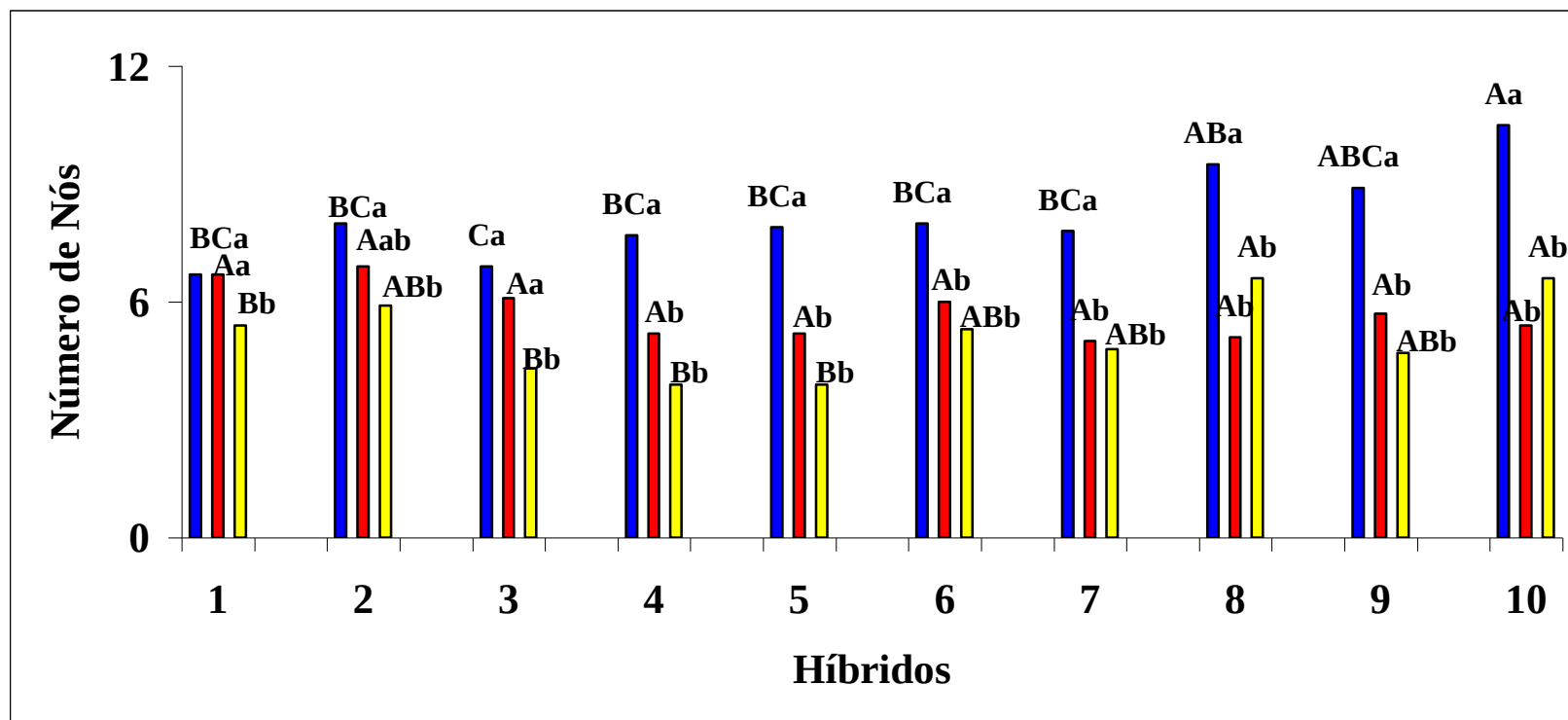


Figura 2: Números de nós observados nos 10 híbridos, sendo Azul: tratamento 1; Vermelho: tratamento 2, e Amarelo: tratamento 3. As médias seguidas pelas mesmas letras maiúscula nos diferentes tratamentos dentro de cada híbrido e minúscula entre os híbridos não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

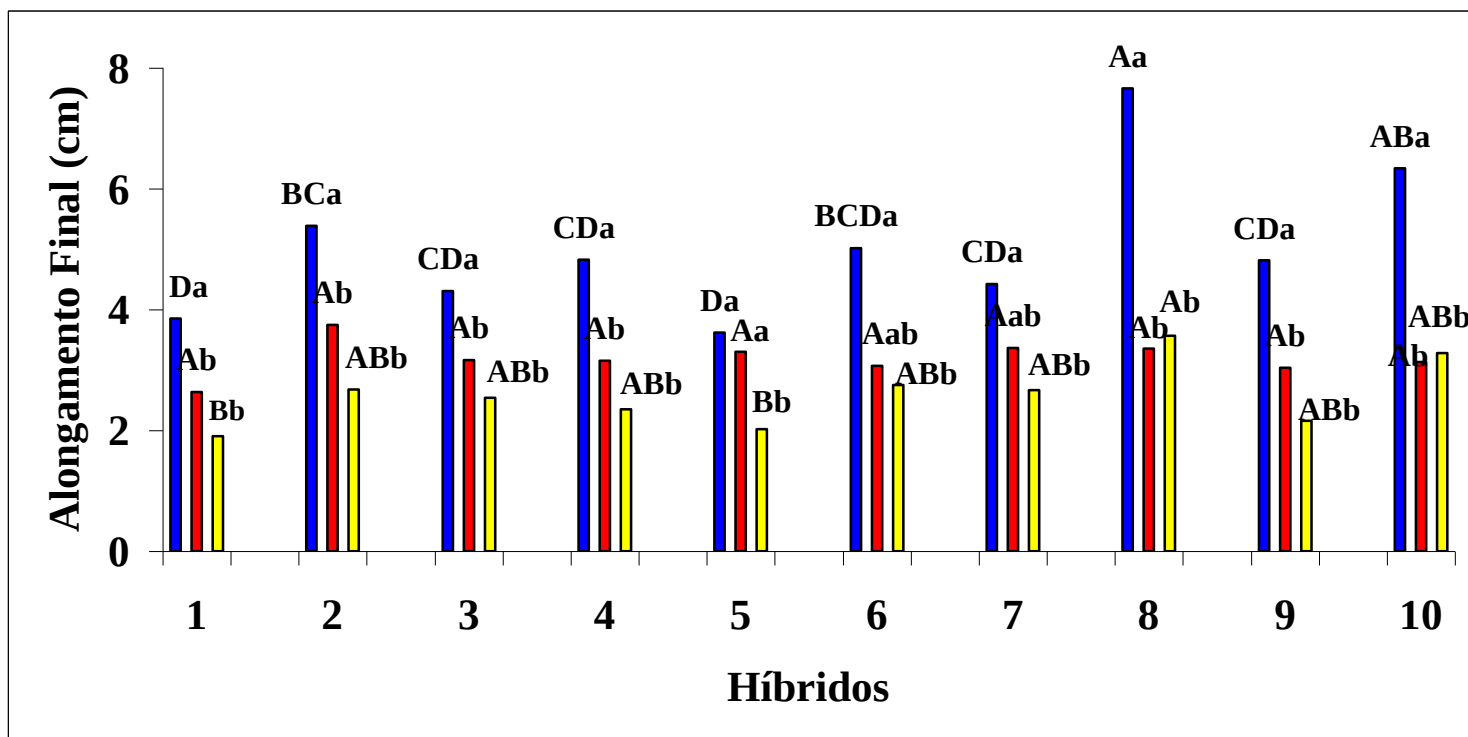


Figura 3: Alongamentos finais (cm) observados nos 10 híbridos, sendo Azul: tratamento 1; Vermelho: tratamento 2, e Amarelo: tratamento 3. As médias seguidas pelas mesmas letras maiúscula nos diferentes tratamentos dentro de cada híbrido e minúscula entre os híbridos não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

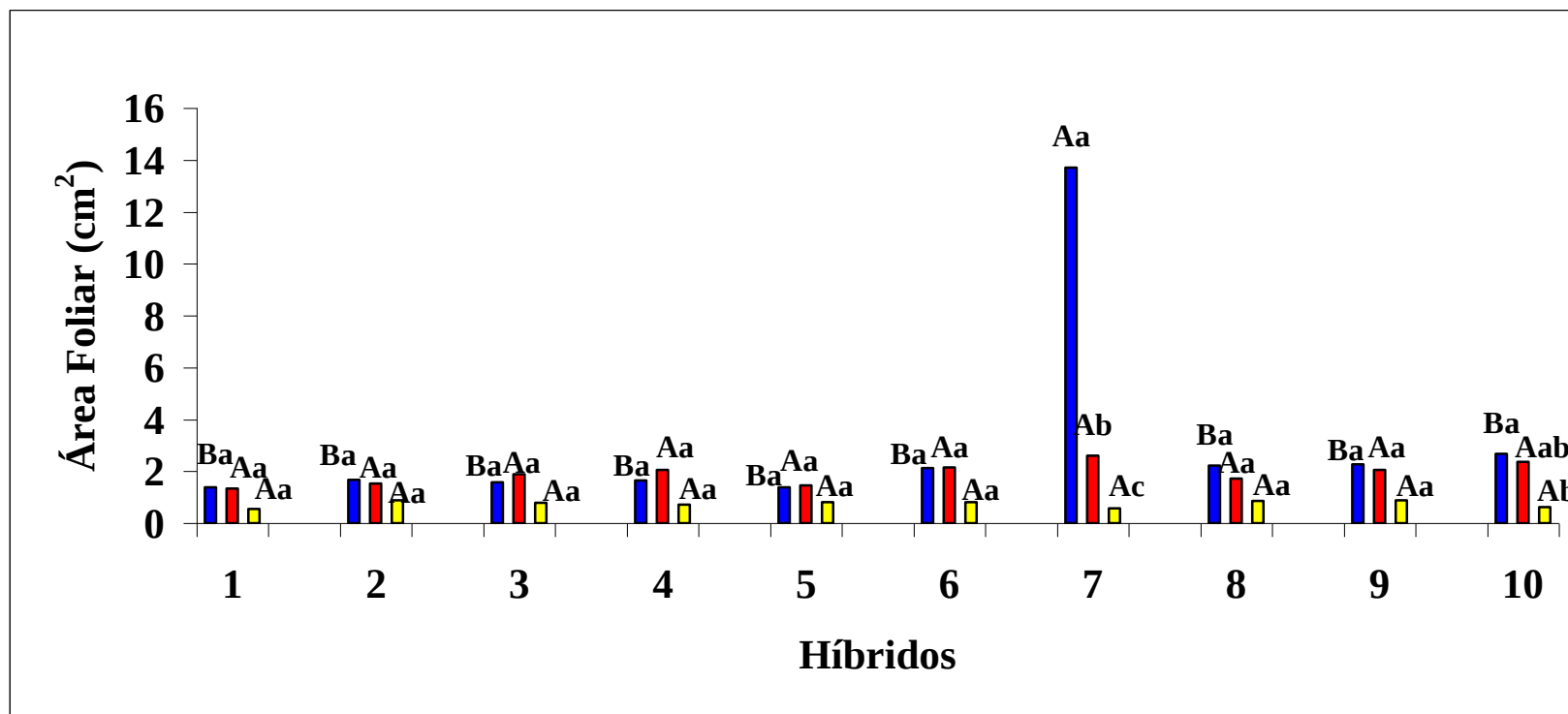


Figura 4: Áreas foliares (cm²) finais observadas nos 10 híbridos, sendo Azul: tratamento 1; Vermelho: tratamento 2, e Amarelo: tratamento 3. As médias seguidas pelas mesmas letras maiúscula nos diferentes tratamentos dentro de cada híbrido e minúscula entre os híbridos não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Ao comparar a coloração das folhas observou-se um verde mais intenso naquelas obtidas em meio líquido (Figura 5A). As folhas do tratamento 3 (meio semi-sólido) apresentaram clorose e, em muitos casos, pequena necrose na borda foliar (Figura 5C), podendo-se relacionar estes fatos com possível deficiência nutricional para o urucum, já que alguns nutrientes podem estar menos disponíveis para a planta devido a sua adsorção pelo agente gelificante que constitui uma matriz coloidal (George, 1993).

Ao se analisar o enraizamento nos diferentes híbridos, observa-se maior tendência ao enraizamento no tratamento 1 em relação aos demais. Epicótilos imersos em meio líquido apresentaram alto índice de enraizamento, ao passo que as brotações *in vitro* demonstraram certa recalcitrância à rizogênese (Figura 5B). Todavia, os epicótilos dispostos em meio semi-sólido apresentaram pequena taxa de enraizamento, ocorrendo ainda, calogênese na base dos explantes (Figura 5C). Estes calos formados na base dos explantes, de coloração clara e característica friável, também foram observados por Sha Valli Khan (2002), porém Carvalho et al. (2005) relataram a presença destes apenas na base de brotações cultivadas em meio sem reguladores de crescimento, corroborando com os resultados deste trabalho.

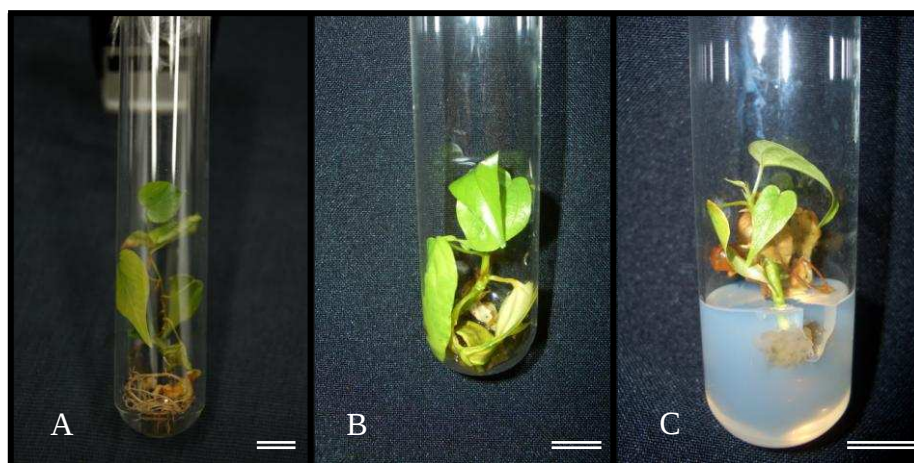


Figura 5: Detalhes de explantes do genótipo 1 cultivados nos tratamentos 1 (A), 2 (B) e 3 (C). Notar as diferenças obtidas entre os tratamentos quanto à formação de raízes, alongamento dos epicótilos e brotações, área foliar com a respectiva diferença na coloração, e formação de calo na extremidade proximal. Barra = 1 mm.

Carvalho et al. (2005) recomendaram a incorporação de fitorreguladores no meio de cultura para esta espécie, visto que na ausência destes houve brotações pouco desenvolvidas. Porém, estes autores verificaram esta necessidade quando da utilização de hipocótilos como explantes em meio semi-sólido.

A análise estatística demonstrou que não houve diferença significativa, ao nível de 5% de probabilidade, para as variáveis número e comprimento de raízes entre os híbridos, porém houve diferença entre os tratamentos. Apesar disto, alguns híbridos apresentaram ausência ou redução no enraizamento. O híbrido 5, por exemplo, não enraizou em todos os tratamentos testados (Figuras 6-7) porém, ainda assim apresentou alongamento (Figura 7).

Apesar dos resultados do tratamento 1 demonstrarem-se melhor ao tratamento 3, atendendo ao objetivo inicial deste trabalho, os resultados do tratamento 2 indicaram a necessidade do uso de reguladores para induzir a rizogênese nas brotações, para então, daí perpetrar maior eficiência no alongamento destas e atender aos objetivos da propagação da espécie. Ao adicionar AIB ao meio de cultivo Paiva Neto et al. (2003b) e Carvalho et al. (2005) observaram aumento crescente no número de raízes por explante e redução do número de dias requeridos para esta indução.

Em conclusão, a utilização de meio líquido estacionário, na ausência de fitorreguladores, promove o alongamento satisfatório de brotações, portanto com grande potencial de uso na fase de alongamento de brotações axilares ou adventícias na cultura *in vitro* de urucum.

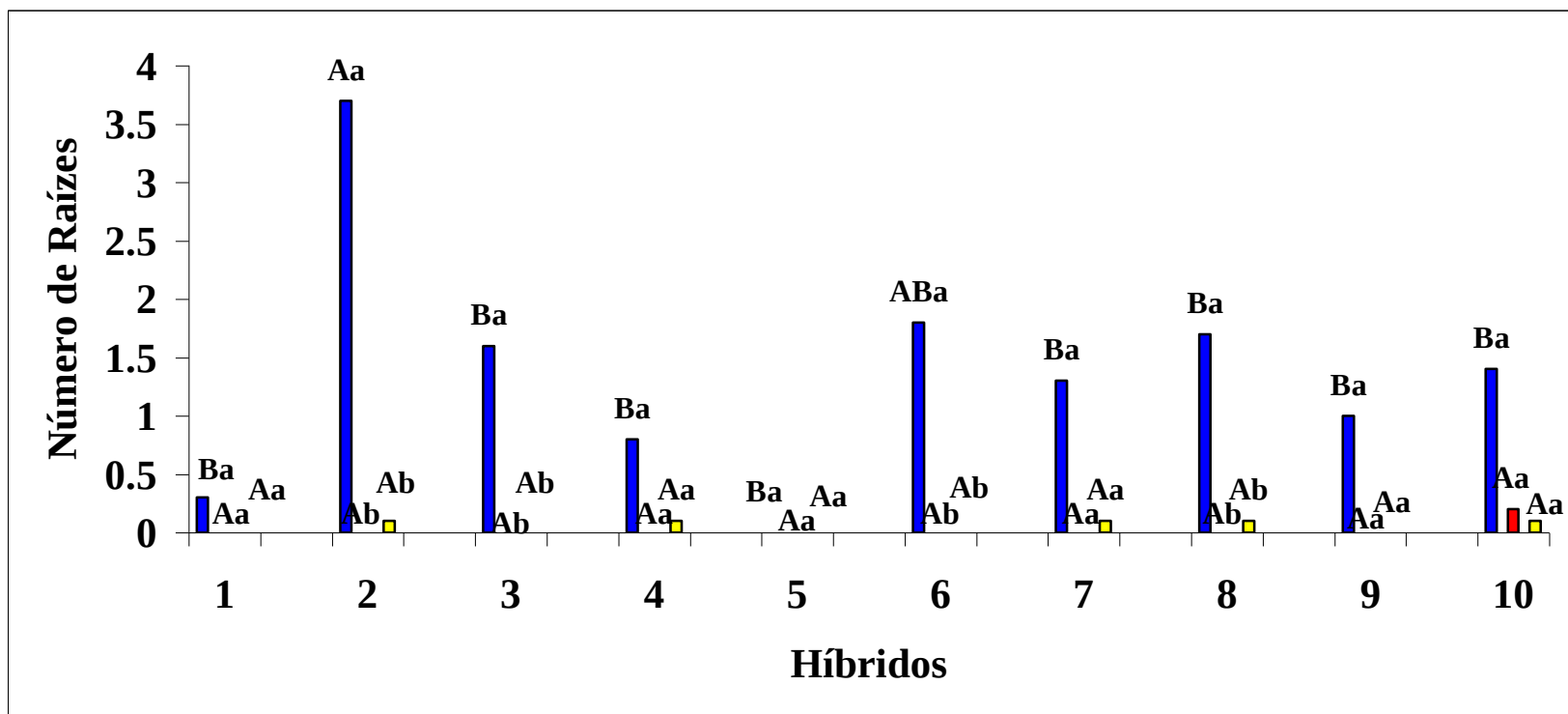


Figura 6: Números de raízes finais observadas nos 10 híbridos, sendo Azul: tratamento 1; Vermelho: tratamento 2, e Amarelo: tratamento 3. As médias seguidas pelas mesmas letras maiúscula nos diferentes tratamentos dentro de cada híbrido e minúscula entre os híbridos não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

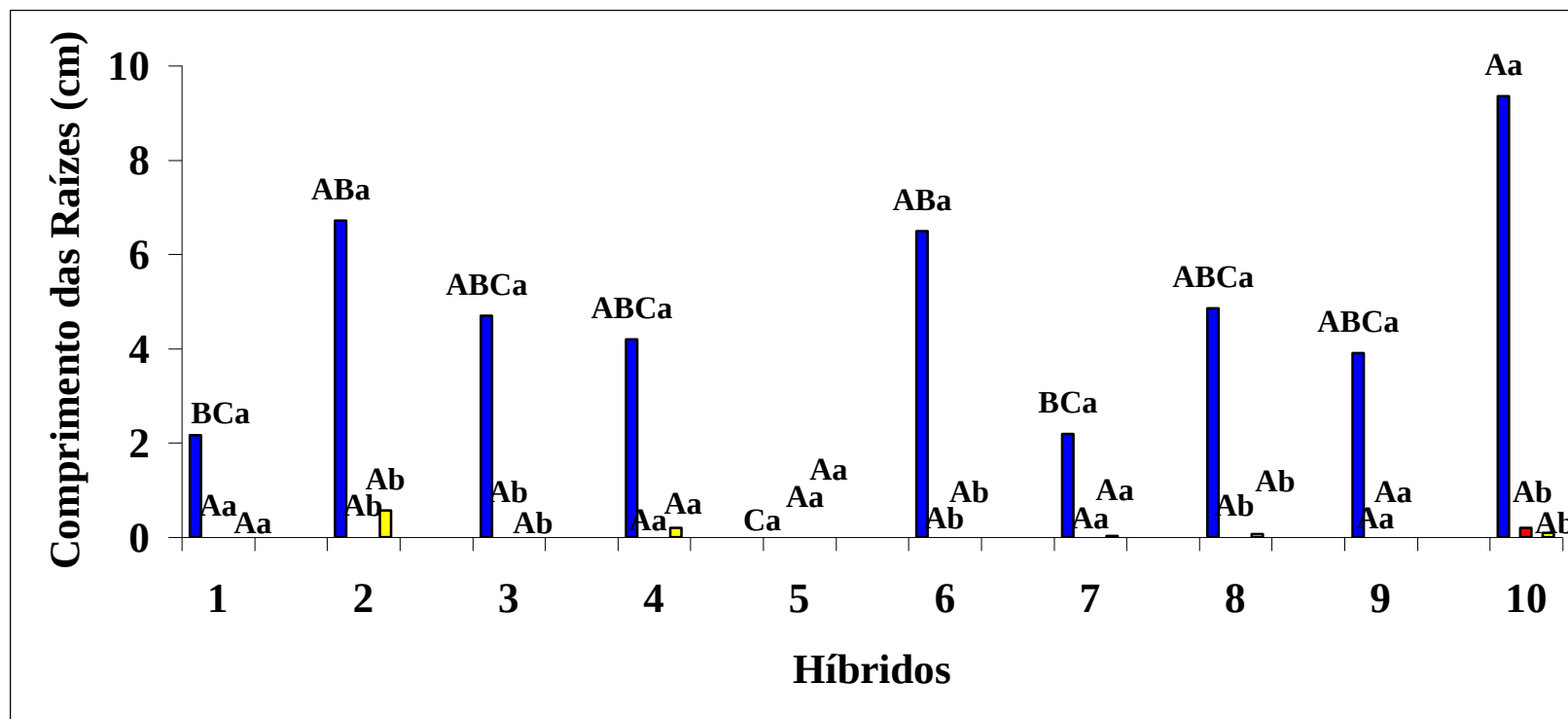


Figura 7: Comprimentos de raízes (cm) finais observadas nos 10 híbridos, sendo Azul: tratamento 1; Vermelho: tratamento 2, e Amarelo: tratamento 3. As médias seguidas pelas mesmas letras maiúscula nos diferentes tratamentos dentro de cada híbrido e minúscula entre os híbridos não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Referências Bibliográficas

CALDAS, L.S.; PADMAJA, H.; FERREIRA, M.E. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.A. (eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI/ Embrapa-CNPq, v.1, p.87-132. 1998.

CARVALHO, J.F.R.P.; CARVALHO, C. R.; OTONI, W.C. Regeneração *in vitro* de urucum (*Bixa orellana* L.) a partir de diferentes tipos de explantes. **Revista Árvore**, 29:887-895, 2005.

CRUZ, C.D. **Programa Genes: Análise multivariada e simulação**. Editora UFV:Viçosa, 175p., 2006.

DEBATA, B.K. & PUNK, F. Micropropagation of *Bixa orellana* L. In: Breeding research on medicinal and aromatics plants. **Proceedings...**Germany, v.2, p.334-337, 1996.

D'SOUZA, M.C. & SHARON, M. *In vitro* clonal propagation of annatto (*Bixa orellana* L.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, 37:168-172, 2001.

FERNANDES FILHO, E.I. & VIANA, J.H.M. QUANTIPORO: um novo programa para tratamento e quantificação de imagens digitais para aplicações em ciência do solo. In: Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, 28. Londrina, 2001. **Resumos....** Londrina, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.224, 2001.

FRANCO, C.F.O.; SILVA, F.C.P.; CAZÉ FILHO, J.; BARREIRO NETO, M.; SÃO JOSÉ, A.R.; REBOUÇAS, T.N.H.; FONTINÉLLI, I.S.C. **Urucuzeiro** – Agronegócio de corantes naturais. Emepa, SAIA, João Pessoa, 120p., 2002.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, 50:151-158, 1968.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. 2nd Edition, 574 p.,1993.

MAUCHAMP, A.; BLANCH, S.; GRILLAS, P. Effects of submergence on the growth of *Phragmites australis* seedlings. **Aquatic Botany**, **69**:147-164, 2001.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, **15**:473–497, 1962.

PAIVA NETO, V.B. **Morfogênese in vitro de urucum** (*Bixa orellana* L.). Tese de Doutorado em Fisiologia Vegetal. Viçosa, UFV, MG. 127 p., 2002.

PAIVA NETO, V.B.; BOTELHO, M.N.; AGUIAR, R.; SILVA, E.A.M.; OTONI, W.C. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of annatto (*Bixa orellana* L.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, **39**:629-634, 2003a.

PAIVA NETO, V.B.; MOTA, T.R.; OTONI, W.C. Direct organogenesis from hypocotyl-derived explants of annatto (*Bixa orellana*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **75**:159-167, 2003b.

PAROLIN, P. Submergence tolerance vs. escape from submergence: two strategies of seedlings establishment in Amazonian floodplains. **Environmental and Experimental Botany**, **48**:177-186, 2002.

PINHEIRO, A.L. & ALMEIDA, E.C. de. Avaliação de um híbrido artificial obtido entre duas variedades de urucum (*Bixa orellana* L.) em Viçosa – Minas Gerais. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**. **1**:31-35, 1992.

SHA VALLI KHAN, P.S.; PRAKASH, E.; RAO, K.R. Callus induction and plantlet regeneration in *Bixa orellana* L., an annatto-yelding tree. **In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant**, **38**:186-190, 2002.

CAPÍTULO III

Regeneração *in vitro* de Urucum (*Bixa orellana* L.) a Partir de Explantes Radiculares

Introdução

O urucum (*Bixa orellana* L.) é uma espécie lenhosa nativa da América Tropical, amplamente distribuída em várias partes do mundo (Franco et al., 2002). Seu grande atrativo, como produto natural, é substituir corantes artificiais (Meirelles Filho, 2004). Com isto, o urucuzeiro passou a ganhar mais importância nas regiões produtoras, devido à grande capacidade de expansão da cultura (Baliane, 1982; Meirelles Filho, 2004).

Segundo Rivera-Madrid (2006), a propagação em alta escala de urucum é problemática por causa da sua polinização cruzada, alta heterozigose, e conteúdo de bixina heterogêneo. Porém, a ocorrência de organogênese ou embriogênese é determinada pela fonte do explante, podendo, os processos, também serem dirigidos por alguma etapa, pela manipulação do meio de cultura (George, 1993).

A cultura de tecidos de urucum iniciou-se na década de 90, com os trabalhos de Debata & Punk (1996) e Almeida et al. (1996). Sucederam-se trabalhos de propagação *in vitro* baseados na organogênese, com o emprego de gemas axilares e explantes nodais (D'Souza & Sharon, 2001), por indução de calogênese a partir de sementes e regeneração de plantas (Sha Valli Khan et al., 2002), e a partir de segmentos de hipocótilos de plântulas crescidas *in vitro* (Paiva Neto, 2002; Paiva Neto et al., 2003b; Carvalho et al., 2005), ou na embriogênese somática a partir de embriões zigóticos imaturos (Paiva Neto et al., 2003a). Todavia, não há relatos sobre a utilização de raízes como explantes para estabelecimento de cultivo *in vitro* para a espécie.

Na natureza, as raízes podem desempenhar atividades geralmente atribuídas à parte aérea, como a propagação vegetativa, onde as raízes de algumas plantas superiores têm a capacidade de formar gemas vegetativas sob condições naturais, ou apenas esporadicamente, como consequência de injúrias mecânicas ou de podas drásticas da parte aérea (Kerbaudy, 1998). Em algumas dicotiledôneas, a ocorrência de raízes gemíferas representa importante estratégia de sobrevivência (Baird et al., 1992; Silva, 2003).

Já na cultura de tecidos a utilização de explantes radiculares, ainda que restrita a pequeno número de espécies, tem sido notadamente relatada com sucesso na regeneração de plantas como orquídeas (Kerbaudy, 1998; Park et al., 2003, 2005), além de berinjela (Franklin et al., 2004), linho (Xiang-Can et al., 1989), maracujá (Lombardi, 2004), caqui (Tetsumura & Yukinaga, 1996; Carvalho & Biasi, 2004), *Aeschynomene sensitive* (Nef-Campa et al., 1996), dentre outras.

Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi induzir a regeneração *in vitro* em dois híbridos de urucum, mediante a avaliação da capacidade morfogênica de explantes radiculares em relação à exposição à luz, à consistência do meio nutritivo (meio semi-sólido *versus* líquido sob agitação), a reguladores de crescimento, além da caracterização anatômica da regeneração.

Material e Métodos

Foram estudados dez híbridos de urucum (*Bixa orellana* L.), denominados de híbridos M1 a M10 com aproximadamente 15 anos de idade, cultivados no horto botânico da Universidade Federal de Viçosa – UFV, MG. Estas plantas foram obtidas do cruzamento artificial entre as variedades os tipos “Fruto Verde Piloso” X “Fruto Vermelho Liso” (Pinheiro & Almeida, 1992).

Todos os experimentos foram realizados em condições *in vitro* no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária-BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa.

Com vistas à produção de material axênico, sementes dos dois híbridos foram submetidas ao desponte (pequeno corte na região oposta à micrópila e, portanto, distal ao embrião) manualmente com auxílio de bisturi e pinça. Em seguida, foram imersas em álcool etílico 70% (v/v), durante 1 minuto. Após este período, foram imersas em solução de hipoclorito de sódio comercial (Super Globo, Brasil) a 2,5% (v/v) acrescida de Tween 20 a 0,1% (v/v), por 20 minutos. Após este processo, as sementes foram enxaguadas cinco vezes em água destilada e autoclavada. Então, foram colocadas para germinar em tubos de ensaio (150 X 25 mm; Vidrolabor, Brasil) contendo 10 mL de meio MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de 3% (p/v) de sacarose (Vetec, Brasil), complexo vitamínico B5 (Gamborg et al., 1968), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol (Sigma Chem. Co., USA) e 0,8% (p/v) de ágar granulado (Merck, Alemanha). O pH do meio foi ajustado em 5,7 ± 0,1, anteriormente à autoclavagem (121°C, 1,1 atm e 15 minutos). As culturas foram mantidas em sala de crescimento sob temperatura de 25 ± 2°C, na ausência de luz.

Após o processo de germinação, as plântulas foram retiradas assepticamente, no qual as raízes foram removidas e, então, segmentadas em aproximadamente 1,0 cm de comprimento a partir da região do coleto, e cultivados 0,1 g de massa fresca destas (aproximadamente raízes de 2 plântulas) em meio nutritivo semi-sólido ou líquido.

As culturas líquidas foram estabelecidas em Erlenmeyers (Vidrolabor, Brasil) de volume 125 ml contendo 30 ml de meio, e mantidos em mesa agitadora orbital (Tecnal, Brasil) a 110 rpm, ou em placas de Petri (90 X 15mm) contendo 30 ml de meio de cultura. Todas as culturas foram mantidas em sala de crescimento sob temperatura de 25±2°C, fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro) e irradiância de 30 µmol m⁻² s⁻¹ (provida por lâmpadas fluorescentes de 20 W, OSRAM®, Luz do Dia, Brasil).

O meio de cultura utilizado para induzir regeneração foi constituído de sais de MS, acrescido de 3% de sacarose, complexo vitamínico B5, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, pH 5,7 $\pm$ 0,1, sendo que para os meio semi-sólido empregou-se 0,8% (p/v) de Agargel (Agar Brasileiro Ind. Com. Ltda, João Pessoa, Brasil), e respectivos tratamentos.

Foram utilizados 32 tratamentos, considerando cada híbrido isoladamente. Os tratamentos consistiram: híbridos (M2 e M6) X tipos de meio (líquido ou semi-sólido) X irradiância (presença ou ausência) X composição do meio (presença de diferentes fitorreguladores ou ausência destes). Sendo 8 tratamentos sem a adição de reguladores de crescimento (controle) e outros 24 com a adição das citocininas assim distribuídas proporcionalmente: Zeatina (ZEA; 4,56 μ M; Sigma Chem. Co., USA), 6-benzilaminopurina (BAP; 4,44 μ M; Sigma Chem. Co., USA) e Tidiazuron (TDZ; 4,54 μ M; Sigma-Aldrich Chemical Co., USA). Os tratamentos dispuseram de 5 repetições cada, sendo o experimento repetido por duas vezes.

Após a regeneração, as brotações foram individualizadas e transferidas para tubos de ensaio (150 X 25 mm) contendo 10 ml de meio de cultura semi-sólido de constituição similar à anteriormente descrita, à exceção do acréscimo de 2,89 μ M de ácido giberélico (GA₃; Sigma Chem. Co., USA).

Para estudos de anatomia procedeu-se à fixação de amostras em solução de glutaraldeído (Karnovsky, 1965, modificado – 2,5% glutaraldeído, 4% paraformaldeído, 3% sacarose, CaCl₂ 5 μ M em tampão cacodilato 0,1 M pH 6,8), por 24 horas, desidratadas em série etílica e incluídas em metacrilato (Historesin[®], Leica). Para a obtenção de cortes transversais e longitudinais com 8 μ m utilizou-se micrótomo rotativo de avanço automático (RM 2155 – Leica), equipado com navalha de aço descartável.

Os cortes foram corados com azul de toluidina a pH 4,0 (O'Brien & McCully, 1981) por 15 minutos, e as lâminas 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.

Para caracterização da superfície do material estudado, amostras foram fixadas em Karnovsky (1965, modificado), durante 48 horas, a 4°C, e pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% (Silveira, 1989), por 4 horas. Posteriormente, desidratadas em série etílica até o álcool absoluto, secas em ponto crítico com CO₂ líquido (Bozzola & Russel, 1992), utilizando o equipamento Balzers (Modelo CPD 020), fixadas em “stubs”, e submetidas à deposição metálica com ouro, pelo processo de pulverização catódica, em

equipamento Balzers (Modelo SCA 010). As análises e documentação fotográfica foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura LEO (Modelo 1430VP), no Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

Os experimentos foram instalados seguindo-se a análise em esquema fatorial, sendo repetidos duas vezes. Foram aplicados testes para verificação da homogeneidade de variância e da distribuição normal dos dados. Quando apropriado, os dados experimentais foram submetidos à análise de variância (ANOVA), a 5% de significância, sendo aplicado o teste de Tukey para comparação entre médias. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico Genes (Cruz, 2006).

Resultados e Discussão

Aos 30 dias de cultivo em meio de indução de organogênese pode-se observar o início de pontos de regeneração adventícia, em que as brotações eram identificadas como diminutas pontuações verdes.

Todas as citocininas testadas induziram organogênese, porém quando da ausência destas (controle) não houve a formação de brotações em nenhum tipo de meio utilizado, concluindo-se que para os híbridos estudados há necessidade do uso de citocininas para a indução de competência cauligênica em explantes radiculares. A necessidade de suprimento exógeno de fitorreguladores também foi verificada em nosso laboratório para outros híbridos de urucum (dados não mostrados).

Alguns pesquisadores observaram a necessidade de suplementação exógena de reguladores de crescimento, para resposta morfogênica, em outras espécies como caqui (Tetsumura & Yukinaga, 1996; Carvalho & Biasi, 2004), tomate, *Lycopersicon peruvianum*, *L. chilense* e *L. hirsutum* (Peres et al., 2001) e em orquídea (Park et al., 2003). Porém, Park et al. (2005) observaram que a utilização de explantes radiculares de *Eleutherococcus koreanum* em meio líquido, livre de reguladores de crescimento e sob ausência de luz, originaram embriões somáticos.

Todas as brotações originadas apresentaram comprimento similar, aproximadamente 0,5 cm cada, à exceção daquelas oriundas de meio líquido sob ausência de luz, as quais apresentaram estiolamento, porém todas provenientes da organogênese direta. O cultivo de explantes radiculares de *Aeschynomene sensitiva* SW. (Nef-Campa et al., 1996) e de *Curcuma zeadoria* (Melo et al., 2001) em meio contendo BAP e ANA promoveu apenas a organogênese indireta. Em explantes radiculares de *Passiflora cincinnata* Mast., cultivados por 45 dias em meio MS suplementado com BAP, as brotações se diferenciaram direta ou indiretamente e, em ambos os casos, puderam ser individualizadas e convertidas em ramos na fase de alongamento (Lombardi, 2004).

Quanto aos tipos de meios utilizados, foi observada para o meio líquido, sob luz, a ocorrência superior de diferenciação de brotações adventícias em relação aos demais tratamentos. Porém, considerando-se somente a utilização de meio semi-sólido, a ausência de luz proporcionou resultados ligeiramente melhores, apesar de ainda muito inferiores aos obtidos no meio líquido sob agitação.

Talvez a melhor explicação para a obtenção destes resultados seja pela hipoxia provocada pelo meio líquido, pois a escassez de oxigênio em raízes pode estimular a produção de ácido abscísico (ABA) e o seu movimento para as folhas (Taiz & Zeiger, 2004). Em cultura de tecidos o ABA pode promover a morfogênese ou o crescimento (George, 1993).

Quando aplicado o teste de hipótese observou-se que não houve diferença estatística para os híbridos avaliados, entretanto houve significância ($p < 0,05$) para os tratamentos e não houve interação entre híbridos e tratamentos. Estes resultados demonstram que não há especificidade entre os híbridos estudados, porém há diferenças entre os tratamentos.

Algumas espécies podem apresentar diferenças na regeneração influenciadas pelo genótipo estudado, como ocorre em *Linum usitatissimum* L. (linho), cujo sucesso na regeneração de explantes radiculares é influenciado pelo genótipo utilizado (Xiang-Can et al., 1989).

O número de brotações dos híbridos não apresentarem diferença estatística significativa, nota-se pelas médias pequena superioridade para o genótipo 2 (frutos avermelhados), comparado ao genótipo 6 (frutos totalmente verdes).

Como os resultados preliminares informaram não haver diferença estatística entre os híbridos e nem interação tratamento X híbrido, as médias apresentadas se referem aos resultados obtidos por ambos os híbridos, considerando as diferenças observadas entre os tratamentos. Os resultados apresentados não incluem o controle, visto que para todos os testes realizados a ausência de fitorreguladores não apresentou resposta morfogênica (Figura1).

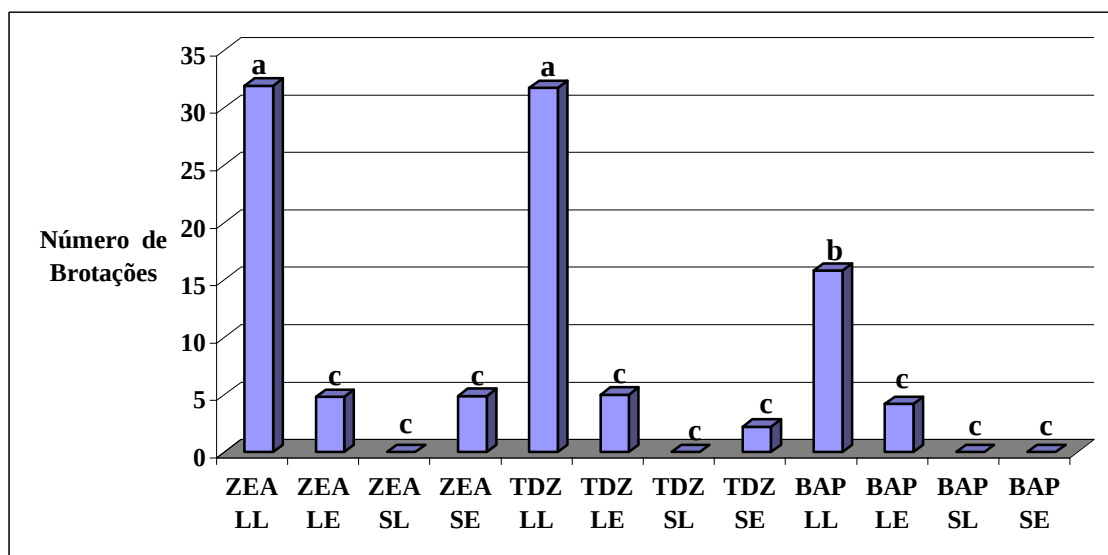


Figura 1: Número de brotações adventícias em explantes radiculares de urucum (*Bixa orellana*), originadas dos diferentes tratamentos: LL (meio líquido sob luz); LE (meio líquido no escuro); SL (meio semi-sólido sob luz); e SE (meio semi-sólido no escuro), e as respectivas citocininas utilizadas [ZEA (zeatina); TDZ (tidiazuron) e BAP (6-benzilaminopurina)].

Vários fatores inerentes aos explantes radiculares interferem na capacidade regenerativa desses órgãos. Dentre esses, pode-se destacar a importância do tamanho do explante na capacidade organogenética (Kerbaudy, 1998). Segundo Bonnett & Torrey (1965), citados por Kerbaudy (1998), com o aumento do comprimento dos explantes radiculares de *Convolvulus arvensis* aumentava-se também o número de gemas endógenas por segmento, cujo comportamento regenerativo contrastante nas extremidades dos explantes foi atribuído à ocorrência de diferentes regimes hormonais nos sítios formadores dos órgãos ao longo do segmento radicular.

Plantas de *Passiflora cincinnata* Mast., foram obtidas *in vitro* a partir da atividade morfogênica de segmentos radiculares (1 a 2 cm de comprimento), oriundos da germinação de sementes *in vitro* e cultivados em meio semi-sólido com 1,61 μ M de BAP (Lombardi, 2004).

Desta forma, foram realizados ensaios nos quais se utilizou explantes de tamanhos inferiores (0,5 cm) e ou, superiores (1,5 cm), e estes apresentaram resultados similares ao aqui observados (dados não apresentados), concluindo-se que o tipo de meio, a condição em que a cultura é exposta e a citocinina utilizada, são os fatores decisivos no sucesso ao utilizar explantes radiculares de urucum.

Ao se analisar qualitativamente as brotações induzidas observaram-se diferenças significativas quanto ao tipo de meio e a presença ou ausência de luz (Figura 2). De forma geral, em meio semi-sólido sob ausência de luz, as brotações apresentaram-se escassas e com anormalidade, porém não apresentaram hiperidricidade. Quando submetidas à presença de luz, o número de brotações foi insignificante, apresentando as mesmas características das brotações oriundas de meios sob ausência de luz. A utilização de meio líquido, tanto na ausência quanto em presença de luz, promoveu a regeneração de brotações com características de hiperidricidade. As culturas mantidas sob ausência de luz apresentaram, além da hiperidricidade, estiolamento e escurecimento do meio de cultura, pela maior calogênese, os quais sob agitação constante, se soltaram dos explantes.

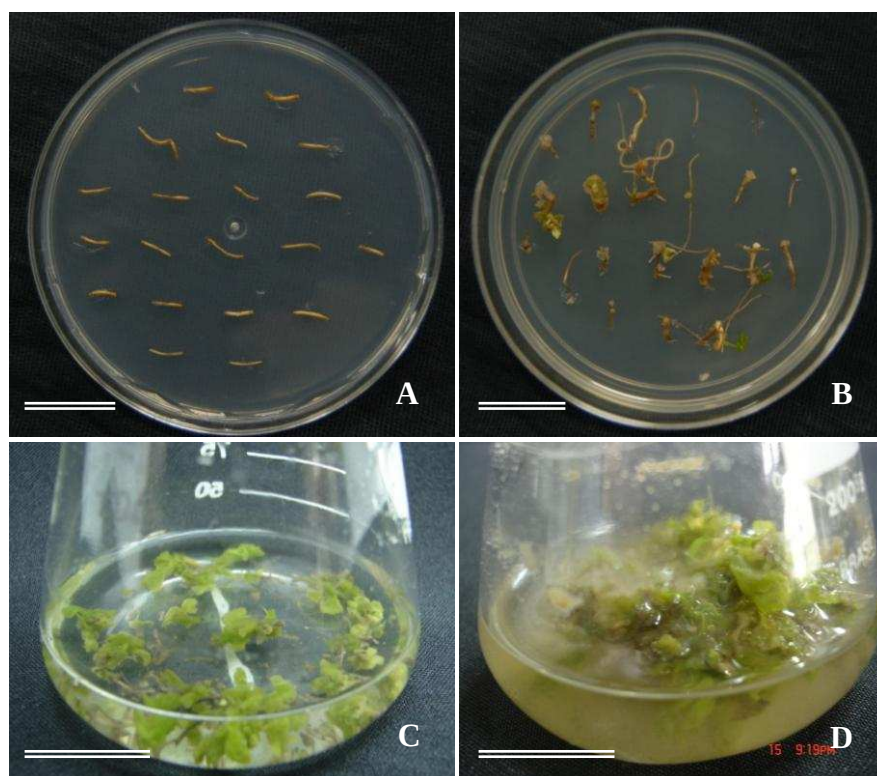


Figura 2: Explantes radiculares de urucum (*Bixa orellana*) em diferentes meios para indução de organogênese adicionados de ZEA. **A** - meio semi-sólido, sob luz; **B** - semi-sólido sob ausência de luz; **C** - líquido sob luz; e **D** - líquido sob ausência de luz. Barra = 1 mm.

A maior formação de gemas ocorreu com maior frequência nas superfícies onde houve o seccionamento do explante e com menor frequência nas regiões centrais dos explantes. Esta mesma resposta foi relatada em *P. cincinnata* (Lombardi, 2004).

Quanto à resposta induzida pelos fitorreguladores, a utilização de ZEA mostrou-se a mais efetiva quanto ao número de brotações, seguida pelo TDZ, e após o BAP. Entretanto, brotações induzidas com ZEA apresentaram anormalidade, e as brotações induzidas com TDZ apresentaram calogênese, alta hiperidricidade, anormalidade e oxidação no local da excisão dos explantes, o que tornou esta citocinina imprópria para a indução de organogênese em explantes radiculares de urucum. Esses resultados estão coerentes com o anteriormente relatado por Paiva Neto et al. (2003b) em que, ao utilizar explantes hipocotiledonares, o TDZ, apesar de induzir eficiente proliferação adventícia de ramos em urucum, esses eram hiperídricos, o que comprometia as fases de alongamento e enraizamento, e conseguinte aclimatização.

Apesar deste fato, Park et al. (2003) obtiveram sucesso na regeneração de ápices radiculares de *Doritaenopsis* (Orchidaceae) quando utilizaram TDZ, assim como Peres et al. (2001) quando utilizaram ZEA em *L. peruvianum*, *L. chilense* e *L. hirsutum*.

As brotações induzidas pelo efeito de BAP apesar de ocorrerem em menor quantidade apresentaram melhor qualidade. Este fato foi comprovado quando estas foram isoladas e transferidas para meio de alongamento (Figura 3).

As citocininas produzidas nas raízes geralmente são transportadas via xilema para outras regiões, porém as citocininas produzidas por brotações possuem apenas uma pequena proporção daquela formada nas raízes, sendo insuficientes para prolongar o crescimento *in vitro* (George, 1993). As giberelinas estimulam o alongamento e a divisão celular (Taiz & Zeiger, 2004), o que justifica a adição de GA₃ no meio de cultura para alongamento.

Em meio de alongamento as culturas sob efeito do TDZ continuaram a apresentar características de hiperidricidade e anormalidade (Figura 3C), no entanto, as culturas sob efeito da ZEA apresentaram novas brotações as quais não demonstraram hiperidricidade (Figura 3B), porém houve oxidação nas brotações primárias.

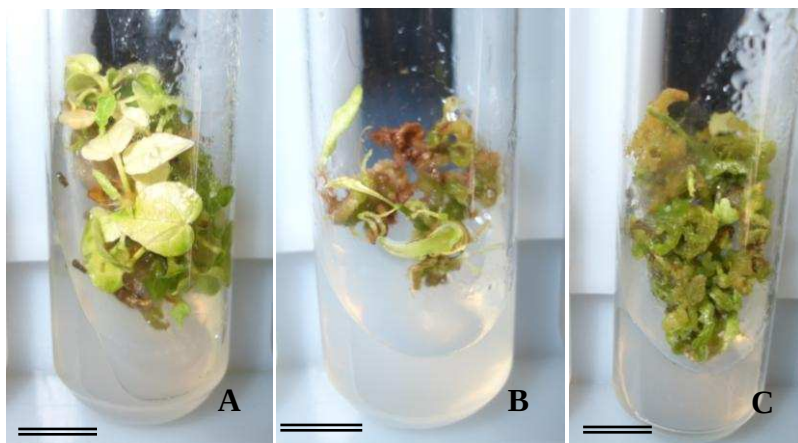


Figura 3: Detalhe da regeneração de brotações adventícias de urucum (*Bixa orellana*) originadas de explantes radiculares em meio contendo BAP (A), ZEA (B) e TDZ (C). Barra = 1 mm.

As culturas sob o efeito do BAP demonstraram ter maior média de regeneração não apresentando sintomas de hiperhidricidade e nem de oxidação (Figura 3A), concluindo-se que apesar das análises quantitativas, a qualidade final quando do uso de BAP se tornou melhor para a regeneração de explantes radiculares de urucum.

Segundo Van Standen & Smith (1978), citados por Lombardi (2004), o isolamento da raiz pode ter alterado o balanço endógeno citocinina/auxina, favorecendo a citocinina, visto que as raízes são os principais centros produtores de citocinina na planta.

A baixa razão endógena auxina/citocinina leva à formação da parte aérea, porém a superexpressão de citocinina na planta gera atrofiamento e entrenós curtos (Taiz & Zeiger, 2004). Então, a concentração endógena de citocinina pode ter influenciado na resposta dos tratamentos gerando redução no número de brotações com o uso de BAP e anormalidade ao usar ZEA e TDZ.

A raiz utilizada como explante demonstrou no estudo anatômico um córtex desorganizado, cilindro vascular nem sempre apresentando a organização usual e a endoderme não definida (Figura 4A), características estas comuns às plantas mantidas sob condições *in vitro*. As exigências para a multiplicação *in vitro* como a alta umidade, fatores nutricionais, fitorreguladores, baixa intensidade luminosa e alta disponibilidade de água, são fatores que levam à hiperhidratação e, ou, desenvolvimento anatômico incipiente nas plantas (Majada et al., 2000).

As análises histológicas realizadas revelaram que o início da regeneração ocorreu a partir da intensa proliferação celular na região do periciclo e tecidos

vasculares associados, como floema do explante (Figura 4B-D). Nessa região observou-se o início do processo da divisão celular a qual resultou na morfogênese (Figura 4E). Todas as brotações formadas apresentaram o sistema vascular conectado com o tecido vascular do explante que lhe deu origem, confirmando desta forma que a ontogenia ocorreu por via organogênica.

As respostas morfogênicas observadas nos regenerantes demonstraram organização anatômica de caráter semelhante às plantas controle. A parte aérea de *B. orellana* regenerada apresentou, aos 45 dias, folhas totalmente desenvolvidas (Figura 5A). No entanto, com aproximadamente 30 dias de cultivo já foi possível observar a presença de primórdios foliares (Figura 5B) com epiderme bem definida, tricomas peltados (Figura 5 C-D) e estômatos bem desenvolvidos (Figura 5E-F).

Vários tecidos podem participar do processo de regeneração, sendo o câmbio, o felogênio e os tecidos corticais os mais constantemente envolvidos no estabelecimento da cultura, sendo que o comportamento *in vitro* dos tecidos parenquimáticos das raízes parece não diferir dos mesmos tecidos dos órgãos aéreos (Kerbaudy, 1998).

A condução de análises histológicas é importante para a caracterização da via regenerativa, uma vez que se pode estabelecer melhores condições de cultivo, e assim favorecer o estabelecimento de protocolos eficientes para a indução e obtenção de plantas, permitindo caracterizar alterações celulares e regiões dos explantes potencialmente morfogênicos (Appezato-da-Glória et al., 2005).

Em *Passiflora cincinnata*, nos segmentos das raízes, a organogênese direta apresentou duas origens: a partir do periciclo nas raízes com início de estrutura secundária, e a partir do câmbio vascular nas raízes com estrutura secundária já estabelecida. Quando houve organogênese indireta, a ocorrência se deu a partir do periciclo (Lombardi, 2004; Appezato-da-Glória et al., 2005), assim como a resposta obtida em *B. orellana*. Melo et al. (2001), utilizando segmentos radiculares de *Curcuma zedoaria* como fontes de explantes, obtiveram regeneração por via indireta com características histológicas típicas, porém, a partir de divisões celulares para a formação do calo proveniente do parênquima cortical.

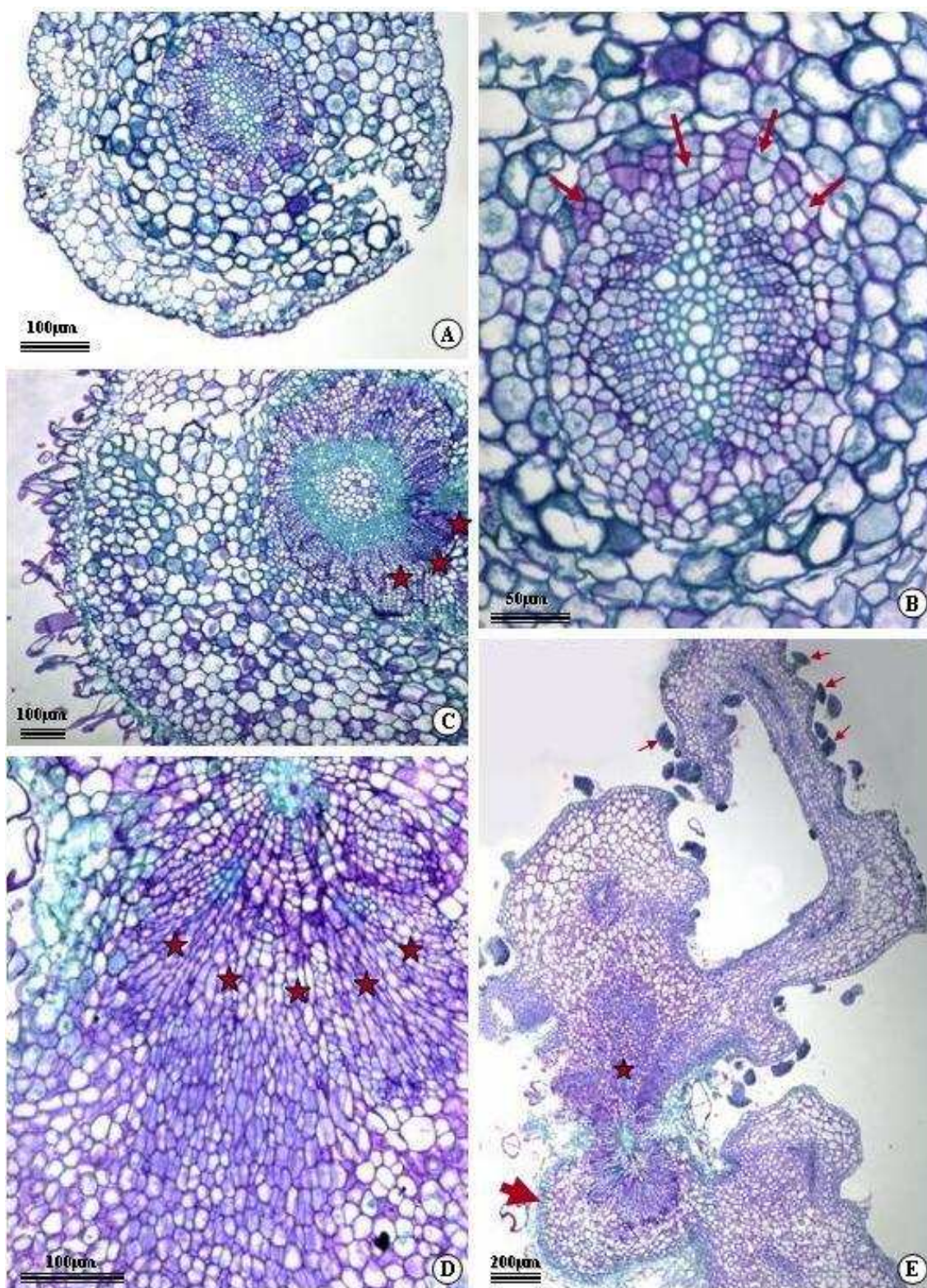


Figura 4: Fotomicrografias de seções transversais de raiz de urucum em meio suplementado com BAP. **A** - explante original; **B**- região do cilindro central com células do periciclo (setas) em divisão celular; **C** - explante com proliferação de células (estrelas) na região do cilindro central próxima ao periciclo; **D** - detalhe do cilindro central onde já ocorre grande proliferação de células (estrelas); **E** - explante (seta larga) com regeneração de parte aérea, onde podem ser observados tricomas peltados (setas estreitas) e a região onde a proliferação celular teve início (estrela).

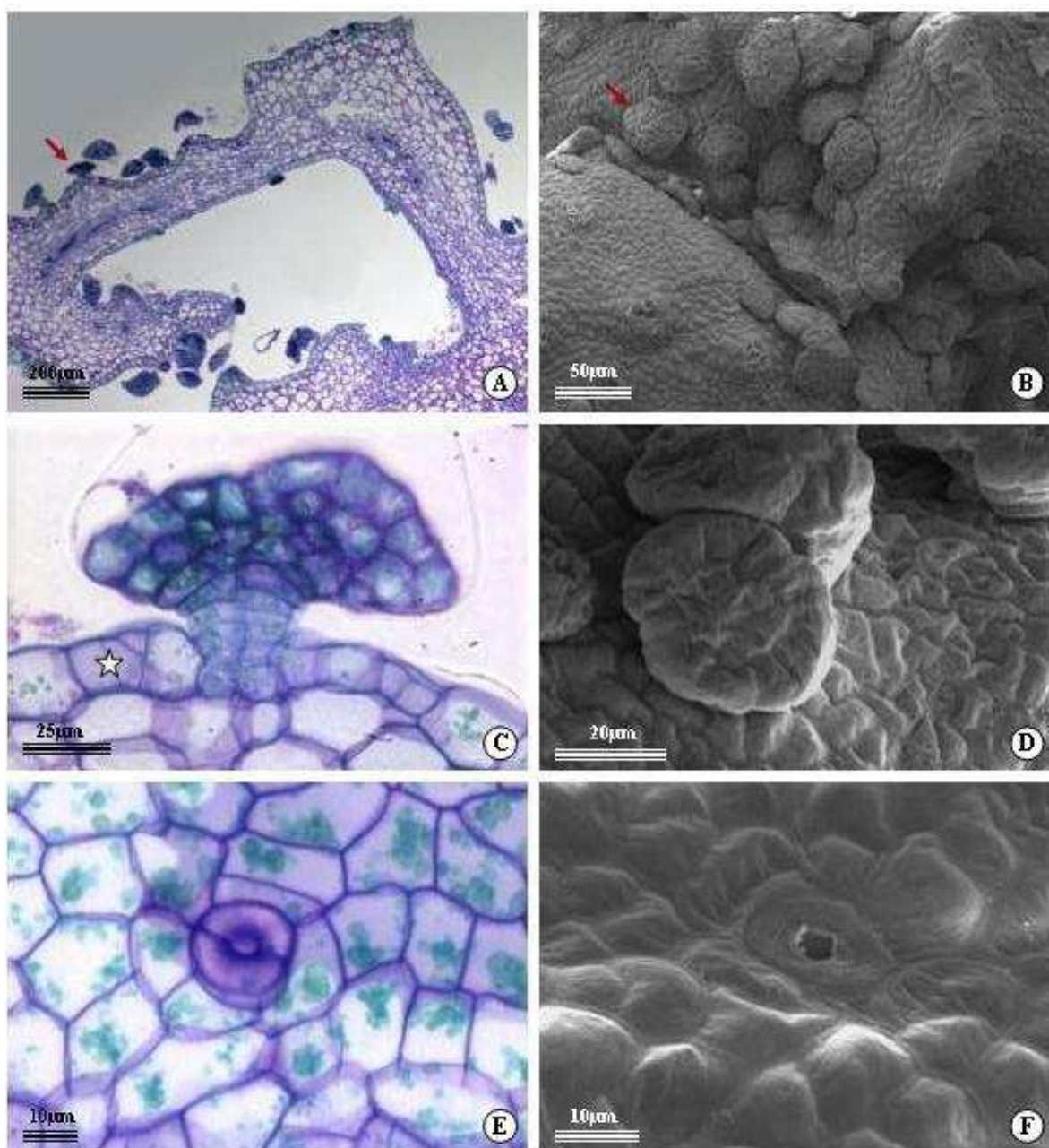


Figura 5: Fotomicrografias (A, C, E) e eletromicrografias de varredura (B, D, F) da parte aérea de urucum regenerada a partir de explantes radiculares. **A-B**, primórdio foliar com tricomas peltados (setas); **C-D**, detalhe de tricomas peltados. Em C, pode ser observada a epiderme já bem definida (estrela); **E-F**, detalhe de estômatos.

Os presentes resultados constatarem a competência organogênica de explantes radiculares, que contribuem para a continuidade de estudos básicos de diferenciação em explantes radiculares, estudos fisiológicos da biossíntese diferencial de bixina em órgãos crescidos sob condições *in vitro*, como alternativas de explantes para a propagação *in vitro* e transformação genética da espécie.

Referências Bibliográficas

ALMEIDA, J.L.; ALMEIDA, F.C.G.; NUNES, R. de P.; ALMEIDA, F.A.G. Bud initiation in leaf explants of annatto seedlings on different cytokinins. **Ciência Rural**, 26:45-49, 1996.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; FERNANDO, J.A.; MACHADO, S.R.; VIEIRA, M.L.C. Morphological, anatomical, histochemical and ultrastructural studies of *in vitro* organogenesis of passionfruit. IN: FALEIRO, F.G., JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (eds.). **Passionfruit: germplasm and breeding**. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, Brazil. pp. 387-407, 2005.

BALIANE, A. **A cultura do urucueiro**. Informe Técnico. Rio de Janeiro: Emater, 10 p., 1982.

BAIRD, J.H.; DUTE, R.R.; DICKENS, R. Ontogeny, anatomy, and reproductive biology of vegetative reproductive organs of *Diodia virginiana* L. (Rubiaceae). **International Journal of Plant Sciences**, 153:320-328, 1992.

BOZZOLA, J. J. & RUSSEL, L.D. **Electron microscopy**. Boston: Jones and Bartlett Publishers, 542 p., 1992.

CARVALHO, D.C. & BIASI, L.A. Organogênese do caquizeiro a partir de segmentos radiculares. **Ciência Rural**, 34:1401-1406, 2004.

CARVALHO, J. F. R. P.; CARVALHO, C. R.; OTONI, W. C. Regeneração *in vitro* de urucum (*Bixa orellana* L.) a partir de diferentes tipos de explantes. **Revista Árvore**. 29:887-895, 2005.

CRUZ, C.D. **Programa Genes: Análise multivariada e simulação**. Editora UFV: Viçosa. 175p., 2006.

DEBATA, B.K. & PUNK, F. Micropropagation of *Bixa orellana* L. In: Breeding research on medicinal and aromatics plants. **Proceedings...**Germany: 30 June-4 July, **2**: 334-337, 1996.

D'SOUZA, M.C. & SHARON, M. *In vitro* clonal propagation of annatto (*Bixa orellana* L.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant**, **37**:168-172, 2001.

FRANCO, C.F.O.; SILVA, F.C.P.; CAZÉ FILHO, J.; BARREIRO NETO, M.; SÃO JOSÉ, A.R.; REBOUÇAS, T.N.H. ; FONTINÉLLI, I.S.C. **Urucuzeiro – Agronegócio de corantes naturais**. Emepa, SAIA, João Pessoa, 120p., 2002.

FRANKLIN, G.; SHEEBA, C.J.; LAKSHMI SITA, G. Regeneration of eggplant (*Solanum melongena* L.) from root explants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant**, **40**:188-191, 2004.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, **50**:151-158, 1968.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. 2nd Edition, 574 p.,1993.

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

KERBAUY, G.B. Cultura de raízes e regeneração de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI/ Embrapa-CNPH, v.1, p.161-181, 1998.

LOMBARDI, S.P. **Estudos anatômicos e fisiológicos da organogênese *in vitro* em *Passiflora cincinnata* Mast.** Dissertação de Mestrado (Fisiologia e Bioquímica de Plantas). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz:Piracicaba, 60p., 2004.

MAJADA, J.P.; TADEO, F.; FAL, M.A.; SÁNCHEZ-TAMÉS, R. Impact of culture vessel ventilation on the anatomy and morphology of micropropagated carnation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **63**:207-214, 2000.

MEIRELLES FILHO, J.C. **O livro de ouro da Amazônia: mitos e verdades sobre a região mais cobiçada do planeta**. Rio de Janeiro: Ediouro, 398 p., 2004.

MELO, M.O.; MELO, M.; APEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Histological of the callogenesis and organogenesis from root segments of *Curcuma zeadoria* Roscoe. **Brazilian Archives of Biology and Tecnology**, **44**:197-203, 2001.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, **15**: 473– 497, 1962.

NEF-CAMPA, C.; CHAINTREUIL-DONGMO, C.; DREYFUS, B.L. Regeneration of the tropical legume *Aeschynomene sensitive* Sw. from root explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **44**: 149-154, 1996.

O'BRIEN, T. P. & McCULLY, M.E. **The study of plant structure: principles and selected methods**. Melbourne – Australia: Termarcarphi Pty Ltd., 45 p., 1981.

PAIVA NETO, V.B. **Morfogênese in vitro de urucum (*Bixa orellana* L.)**. Tese de Doutorado em Fisiologia Vegetal. Viçosa, UFV, MG. 127 p., 2002.

PAIVA NETO, V.B.; BOTELHO, M.N.; AGUIAR, R.; SILVA, E.A.M.; OTONI, W.C. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of annatto (*Bixa orellana* L.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant**, **39**:629-634, 2003a.

PAIVA NETO, V.B.; MOTA, T.R.; OTONI, W.C. Direct organogenesis from hypocotyl-derived explants of annatto (*Bixa orellana*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **75**:159-167, 2003b.

PARK, S.Y.; MURTHY, H.N; PAEK, K.Y. Protocorm-like body induction and subsequent plant regeneration from root tip cultures of *Doritaenopsis*. **Plant Science**, **164**:919-923, 2003.

PARK, S.; AHN, J.; LEE, W.; MURTHY, H.N.; PAEK, K.Y. Mass production of *Eleutherococcus koreanum* plantlets via somatic embryogenesis from root cultures and accumulation of eleutherosides in regenerants. **Plant Science**, **168**:1221-1225, 2005.

PERES, L.E.P.; MORGANTE, P.G.; VECCHI, C.A.; KRANS, J.E.; VAN SLUYS, M.A. Shoot regeneration capacity from roots and transgenic hairy roots of different tomato cultivars and wild related species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **65**:37-44, 2001.

PINHEIRO, A.L. & ALMEIDA, E.C. de. Avaliação de um híbrido artificial obtido entre duas variedades de urucum (*Bixa orellana* L.) em Viçosa – Minas Gerais. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**. **1**:31-35, 1992.

RIVERA-MADRID, R.; ESCOBEDO-G.M., R.M.; BALAM-GALERA, E.; VERA-KU, M.; HARRIES, H. Preliminary studies toward genetic improvement of annatto (*Bixa orellana* L.). **Scientia Horticulturae**, **106**:165-172, 2006.

SHA VALLI KHAN, P.S.; PRAKASH, E.; RAO, K.R. Callus induction and plantlet regeneration in *Bixa orellana* L., an annatto-yielding tree. **In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant**, **38**:186-190, 2002.

SILVA, M.L. **Germinação in vitro, ontogenia de gemas radiculares e brotos adventícios de *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes – Rubiaceae**. Dissertação (Mestrado em Botânica). Viçosa, UFV, MG. 62 p., 2003.

SILVEIRA, M. O preparo das amostras biológicas para microscopia eletrônica de varredura. In: SOUZA, W. (ed.). **Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica de varredura**. Técnicas Básicas. Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, **1**:71-82, 1989.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 693 p., 2004.

TETSUMURA, T. & YUKINAGA, H. High-frequency shoot regeneration from roots of Japanese persimmon. **HortScience**, **31**:463-464. 1996.

XIANG-CAN, Z.; JONES, D.A.; KERR, A. Regeneration of shoots on roots explants of flax. **Annals of Botany**, **63**:297-299, 1989.

CAPÍTULO IV

Estabelecimento *in vitro* e Respostas Morfogênicas de Explantes Nodais e Internodais Adultos de Urucum (*Bixa orellana* L.)

Introdução

Bixa orellana L. (Bixaceae) é uma espécie lenhosa conhecida como urucum, nativa da América Tropical com ampla distribuição e que, recentemente, tem despertado o interesse da indústria cosmética e alimentícia por acumular em suas sementes um corante natural, constituído basicamente pelos carotenóides bixina e norbixina (Franco et al., 2001; Bouvier et al., 2003).

O urucum possui elevada taxa de polinização cruzada, e sendo propagado basicamente pela via seminífera, os plantios comerciais apresentam marcante heterozigose (Baliane, 1982; Meirelles Filho, 2004; Rivera-Madrid et al., 2006).

Na propagação *in vitro* da espécie diversos protocolos com diferentes explantes foram utilizados, podendo destacar o uso de explantes caulinares (Debata & Punk, 1996), foliares (Almeida et al., 1996), gemas axilares e explantes nodais (D'Souza & Sharon, 2001), por indução de calos a partir de sementes (Sha Valli Khan et al., 2002), hipocótilos de plantas germinadas *in vitro* (Paiva Neto, 2002; Paiva Neto et al., 2003b; Carvalho et al., 2005) e embriões zigóticos imaturos (Paiva Neto et al., 2003a).

Até o momento não há relatos de cultura *in vitro*, quer propagação via proliferação axilar ou adventícia empregando-se explantes provenientes de material adulto. O estabelecimento de um sistema eficiente de propagação *in vitro*, a partir de explantes adultos, poderá representar em ganhos significativos na multiplicação de 'tipos elite', em especial aqueles com elevado teor de carotenóides, ainda que as

dificuldades inerentes à cultura de tecidos alicerçada em material lenhoso e adulto sejam esperadas. Além disso, é de fundamental importância para o desenvolvimento de protocolo de transformação genética visando maior acúmulo dos carotenóides nas sementes mediante a superexpressão de enzimas relacionadas à rota biossintética desses compostos.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial de respostas morfogênicas de explantes nodais e internodais adultos provenientes de matrizes de urucum (*Bixa orellana*), além da caracterização anatômica do processo de regeneração.

Material e Métodos

Plantas de urucum, obtidas a partir de alporquia de matrizes de 15 anos de idade, foram mantidas em casa de vegetação e utilizadas como fonte de explantes. As plantas oriundas de alporques foram mantidas por podas sistemáticas, para emissão de brotações novas, sendo pulverizadas quinzenalmente com o fungicida Amistar® (0,1 g L⁻¹) acrescido de Assist® (100 mL L⁻¹). Dois dias após a pulverização foram retirados ramos com aproximadamente 30 cm de comprimento e separados em segmentos nodais e internodais.

Em laboratório, os explantes foram lavados com Detertec Faixa Neutra (Vetec) por 10 minutos e mantidos em água corrente por 24 horas. Após este período os explantes foram colocados sob agitação em solução contendo Agrimicina (2 g L⁻¹), Mancozeb (2 g L⁻¹) e Nistatina (10 mg L⁻¹), por 2 horas. Em câmara de fluxo laminar foram lavados com água deionizada e autoclavada, adicionado peróxido de hidrogênio 1:1 (volume 30) por cinco minutos, lavados novamente e, então, adicionados álcool etílico 70% (v/v) durante 1 minuto, em seguida adicionada uma solução de hipoclorito de sódio 2,5% (v/v) acrescida de Tween 20 a 0,1% (v/v) por 30 minutos. Após este processo, os explantes foram lavados cinco vezes em água deionizada e autoclavada.

Os explantes foram seccionados em aproximadamente 1,5 cm e embebidos em uma solução contendo Timentin (500 mg L⁻¹), Augmentin (250 mg L⁻¹) e Nistatina (10 mg L⁻¹).

Os explantes foram inoculados em meio para regeneração, sendo este constituído de sais MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, vitamina B5 (Gamborg et al., 1968), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e 0,8% (p/v) de ágar (Brasileiro, Brasil), na ausência de fitorreguladores (MS0) ou suplementado com Zeatina (ZEA- 4,56 µM); Tidiazuron (TDZ - 4,54 µM); 6-benzilaminopurina (BAP- 4,44 µM); 6-γ,γ - Dimetilalilamino purina (2iP; - 4,92 µM); Cinetina (KIN - 4,65 µM); ou meio de Drew (Drew, 1991) constituído de sais de MS e adicionado de BAP - 18,42 µM; KIN -10 µM e AIA - 5 µM.

O pH dos meios foi ajustado em 5,7 ± 0,1, antes da autoclavagem (121°C, 1,1 atm e 15 minutos).

Os segmentos internodais foram cultivados em placas de Petri (90 X 15mm, J. Prolab, Brasil) contendo 30 mL de meio de cultura, ao passo que os segmentos nodais que foram inoculados em tubos de ensaio (150 X 25 mm, Vidrolabor, Brasil) contendo 10 mL de meio de cultura e dispostos verticalmente.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento sob temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16/8 horas(luz/escuro) sob irradiância de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Após a regeneração, as brotações foram isoladas assepticamente e transferidas para meio semi-sólido de constituição similar à anteriormente descrita, no entanto com o acréscimo de tiosulfato de prata (STS - $1 \mu\text{M}$, Sigma Chem. Co., USA), em tubos de ensaio.

O experimento seguiu o delineamento inteiramente casualizado e consistiu de sete tratamentos com 10 repetições cada, sendo cada experimento repetido por duas vezes.

Para estudos anatômicos procedeu-se à fixação de amostras em solução de glutaraldeído (Karnovsky, 1965, modificado – 2,5% glutaraldeído, 4% paraformaldeído, 3% sacarose, CaCl_2 $5 \mu\text{M}$ em tampão cacodilato $0,1 \text{ M}$ pH 6,8), por 24 horas, desidratadas em série etílica e incluídas em metacrilato (Historesin, Leica). Para a obtenção de cortes transversais e longitudinais com $8\mu\text{m}$ utilizou-se micrótomo rotativo de avanço automático (RM 2155 – Leica), equipado com navalha de aço descartável.

Os cortes foram corados com azul de toluidina a pH 4,0 (O'Brien & McCully, 1981) por 15 minutos, e as lâminas 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.

Para caracterização da superfície do material estudado, amostras foram fixadas em Karnovsky (1965, modificado), durante 48 horas, a 4°C , e pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% (Silveira, 1989), por 4 horas. Posteriormente, desidratadas em série etílica até o álcool absoluto, secas em ponto crítico com CO_2 líquido (Bozzolla & Russel, 1992), utilizando o equipamento Balzers (Modelo CPD 020), fixadas em “stubs”, e submetidas à deposição metálica com ouro, pelo processo de pulverização catódica, em equipamento Balzers (Modelo SCA 010). As análises e documentação fotográfica foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura LEO (Modelo 1430VP), no Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

Resultado e Discussão

Utilização de segmentos internodais (SIN) como fonte de explantes

Aos 30 dias de cultura pode-se observar nos tratamentos Drew, 2iP, ZEA, TDZ e BAP a regeneração de brotações, no entanto para o controle (MS0) ocorreu apenas a calogênese (Figura 1).

As brotações apresentaram, em média, 0,1 cm de comprimento e na maioria dos tratamentos formaram-se em toda a extensão da superfície do explante.

Na maioria dos tratamentos houve responsividade quanto à organogênese. O tratamento BAP proporcionou a maior média (47,61%) dos explantes responsivos à organogênese, apresentando apenas 1,39% sem resposta, entretanto para o 2iP ocorreu o inverso, somente 15% dos explantes apresentaram organogênese e 60% sem resposta, caracterizando este como o tratamento menos responsivo (Figura 1).

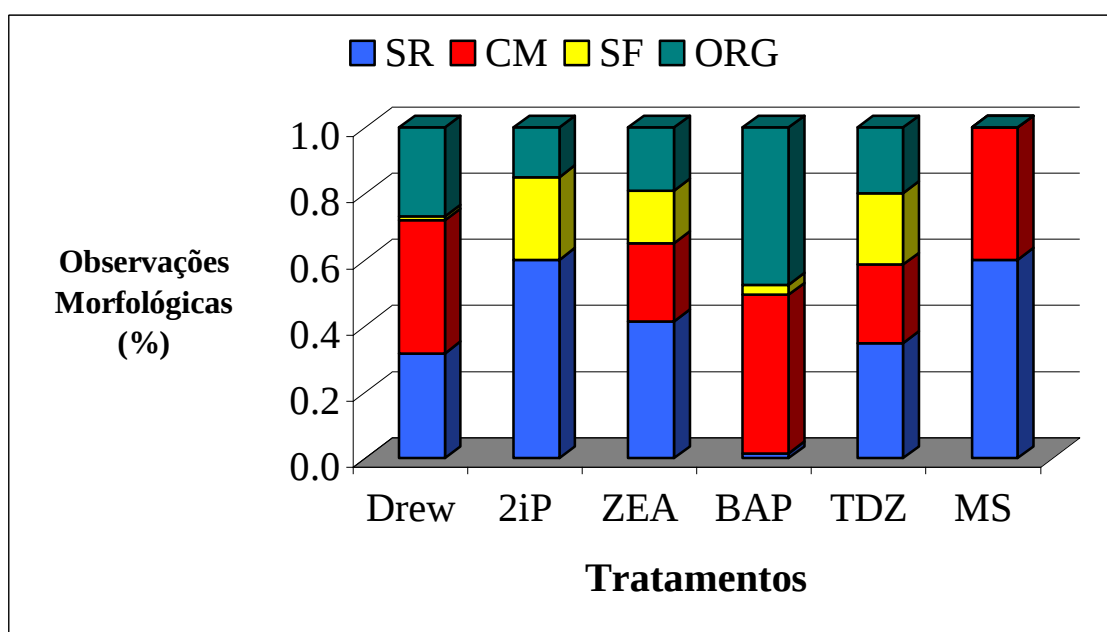


Figura 1: Observações morfológicas em explantes caulinares (segmento internodal – SIN) de *Bixa orellana*, aos trinta dias de cultivo. SR: sem resposta; CM: calo misto; SF: calo semi-friável; ORG: organogênese.

Apesar da ocorrência de responsividade para a maioria dos tratamentos, houve disparidade quanto a origem e ao desenvolvimento das brotações (Figura 2). As brotações advindas dos tratamentos ZEA, TDZ e 2iP apresentaram pouco ou nenhum desenvolvimento; as brotações oriundas do tratamento BAP apresentaram organogênese indireta, no qual os explantes passaram a produzir calos de coloração verde e a partir destes emergiram brotações, apresentando crescimento superior aos demais tratamentos (Figura 2D); e as brotações providas do tratamento com Drew apresentaram oxidação e baixo desenvolvimento inicial.

As brotações de todos os tratamentos foram excisadas e dispostas em um novo meio idêntico ao de origem, no entanto, aquelas cujo comprimento atingiu cerca de 0,1 cm oxidaram quando isoladas. Desta forma, constatou-se que há necessidade de alongamento destas antes de se promover o isolamento do explante de origem.

No entanto, não houve desenvolvimento das brotações oriundas dos tratamentos TDZ e 2iP. Segundo Mundhara & Rashid (2005), o TDZ apresenta um modo de ação similar à do etileno resultando na produção de estresse ao etileno, porém, quando adicionaram nitrato de prata (AgNO_3), para minimizar o estresse produzido, observaram a diminuição da expressão da organogênese em *Linum usitatissimum*.

Ao utilizar explantes nodais de *B. orellana*, D'Souza & Sharon (2001) observaram que a utilização de 2iP no meio de indução promoveu os melhores resultados, diferindo das respostas obtidas neste trabalho. O estágio de desenvolvimento do explante talvez possa explicar esta divergência nos resultados, uma vez que estes autores trabalharam com explantes oriundos de material juvenil.

Os tratamentos com meio Drew, ZEA e BAP induziram o alongamento de apenas uma brotação por explante, em média, e esta parece ter restringido o alongamento de outras brotações (Figura 2B, C e D). Resultados semelhantes foram observados por Fontes (1998), o qual estudou explantes similares em *Capsicum* sp. e por Carvalho et al. (2005) em urucum, utilizando ZEA e BAP, o que demonstra que a resposta obtida é característica para a espécie em estudo, no entanto, não se restringe a mesma.

As brotações, quando isoladas, apresentaram senescência das folhas primárias, cujo alongamento só foi possível quando adicionado ao meio de origem STS (tiossulfato de prata). Segundo Taiz & Zeiger (2004) a maioria dos efeitos do etileno pode ser antagonizada por inibidores específicos, tais como nitrato de prata ou tiossulfato de prata. No entanto, quando adicionado o nitrato de prata este não

demonstrou eficiência (dados não apresentados), dessa forma, o inibidor específico para *B. orellana* pode ser o STS.

As plantas obtidas com a adição do STS foram mantidas *in vitro* para manutenção de germoplasma e fonte de explante.

Os calos formados apresentaram, de forma geral, coloração verde, quando misto (CM), e branca a bege, quando semi-friável (SF). A responsividade morfogênica dos explantes ocorreu na maioria das vezes por via direta, havendo apenas uma exceção, no tratamento com BAP, o qual apresentou inicialmente calogênese e posterior organogênese (Figura 2D). Estes calos foram caracterizados como CM, inicialmente ocorreu o desenvolvimento de calos brancos, porém não demonstrando friabilidade característica, após a segunda semana de cultivo os calos passaram a apresentar coloração esverdeada.

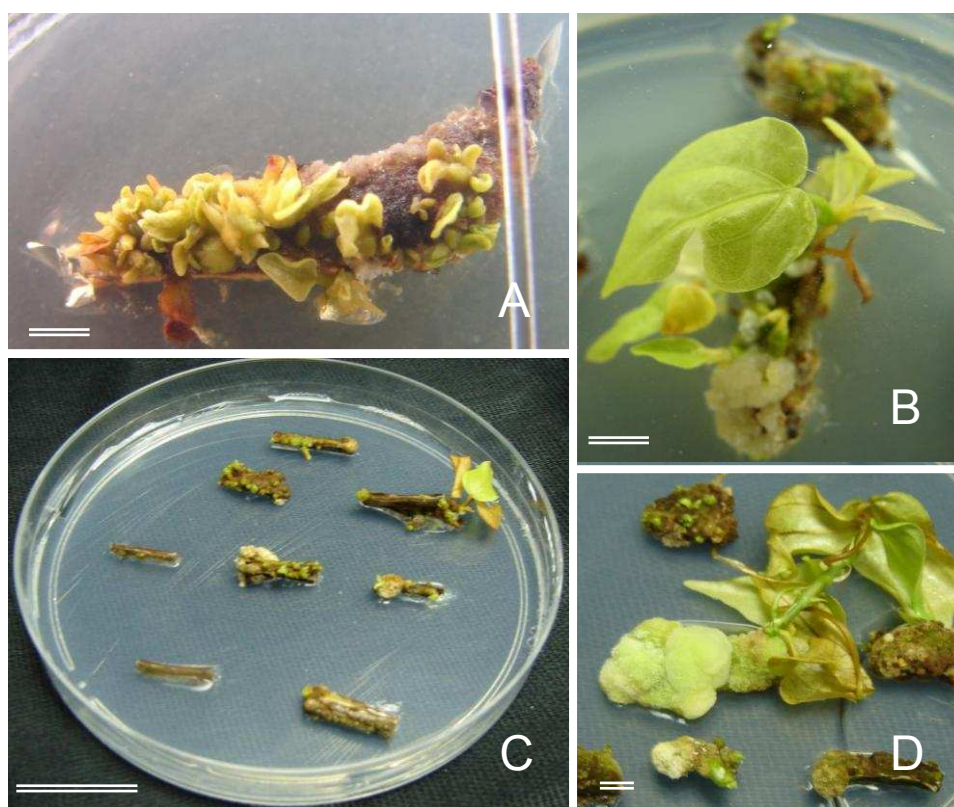


Figura 2: Cultura *in vitro* de *Bixa orellana* utilizando segmentos internodais (SIN) como fonte de explantes. TDZ (A); Drew (B); ZEA (C) e BAP (D). Barra = 2 mm.

Sha Valli Khan et al. (2002), estudando a calogênese a partir de sementes de *B. orellana* observaram calos friáveis brancos que se diferenciaram em dois tipos morfológicos distintos, predominando os calos brancos compactos com estruturas globulares verdes. Os calos friáveis brancos tornaram-se marrom e perderam o potencial de proliferação e regeneração, em contraste, os calos apresentando estruturas globulares verdes se diferenciaram em brotações completas em 20 dias em meio contendo NAA e BA.

Sugere-se que o potencial de regeneração presente no calo, com coloração esverdeada, associado ao balanço de citocinina no meio, resulta na diferenciação e desenvolvimento dos brotos, em ambos os casos. George (1993) destaca que as citocininas são efetivas na promoção da iniciação na organogênese direta ou indireta, e um balanço de auxina e citocinina geralmente resulta em maior eficácia na organogênese.

O segmento internodal apresentou organização anatômica característica de caule em crescimento secundário, onde já ocorre formação de quantidade considerável de xilema e floema secundários, mas apenas com início de formação de periderme (Figura 3A). As análises histológicas revelaram que todas as brotações formadas apresentaram o sistema vascular conectado com o tecido vascular do explante que lhe deu origem, confirmando desta forma que a ontogenia ocorreu por via organogênica.

O início do processo da divisão celular, a qual culminou na morfogênese, foi observado a partir da intensa proliferação celular na região do câmbio, se estendendo até as regiões mais jovens de floema secundário do explante (Figura 3B-E). As respostas obtidas nos regenerantes demonstraram organização anatômica de caráter semelhante às plantas controle (Figura 4).

Em *Citrus sinensis*, observou-se que as alterações estruturais iniciaram principalmente no câmbio, com intensa proliferação celular e aumento da região cambial, com conseguinte diferenciação de gemas com os primórdios foliares bem desenvolvidos; no entanto, a organogênese formada ocorreu via indireta (Almeida et al. 2003).

As análises histológicas sugeriram a ocorrência de rizogênese no material regenerado (Figura 3F), sendo esta estrutura caracterizada pela organização concêntrica de células, com presença do xilema na região central, típica de cilindro central de raízes

cultivadas *in vitro*. Embora nos cortes anatômicos verificou-se a ocorrência dessas estruturas, deve-se ressaltar que esta não foi constatada na análise macroscópica.

A parte aérea de *B. orellana* regenerada apresentou aos 30 dias folhas totalmente desenvolvidas, provenientes do meristema apical, circundados por células parenquimáticas constituintes do calo (Figura 4B); primórdios foliares (Figura 4B-C) com epiderme bem definida; tricomas peltados (Figura 4D) e estômatos bem desenvolvidos (Figura 4F).

Segundo Majada et al. (2005), as exigências para a multiplicação *in vitro* como a alta umidade, fatores nutricionais, fitorreguladores, baixa intensidade luminosa e alta disponibilidade de água, são fatores que levam a hiperhidratação e/ou desenvolvimento anatômico incipiente nas plantas, fato este que não foi observado nos explantes de *B. orellana* estudados.

Diferentemente das observações morfológicas em *B. orellana*, a origem organogênica de explantes caulinares de tabaco ocorreu com contínuas divisões celulares principiadas nas células epidérmicas, resultando em centros meristemáticos os quais dividiram e desenvolveram o primórdio foliar (Creemers-Molenaar et al., 1994).

As observações em urucum constataram a capacidade organogênica dos explantes caulinares adultos corroborando para o sucesso na clonagem desta espécie.

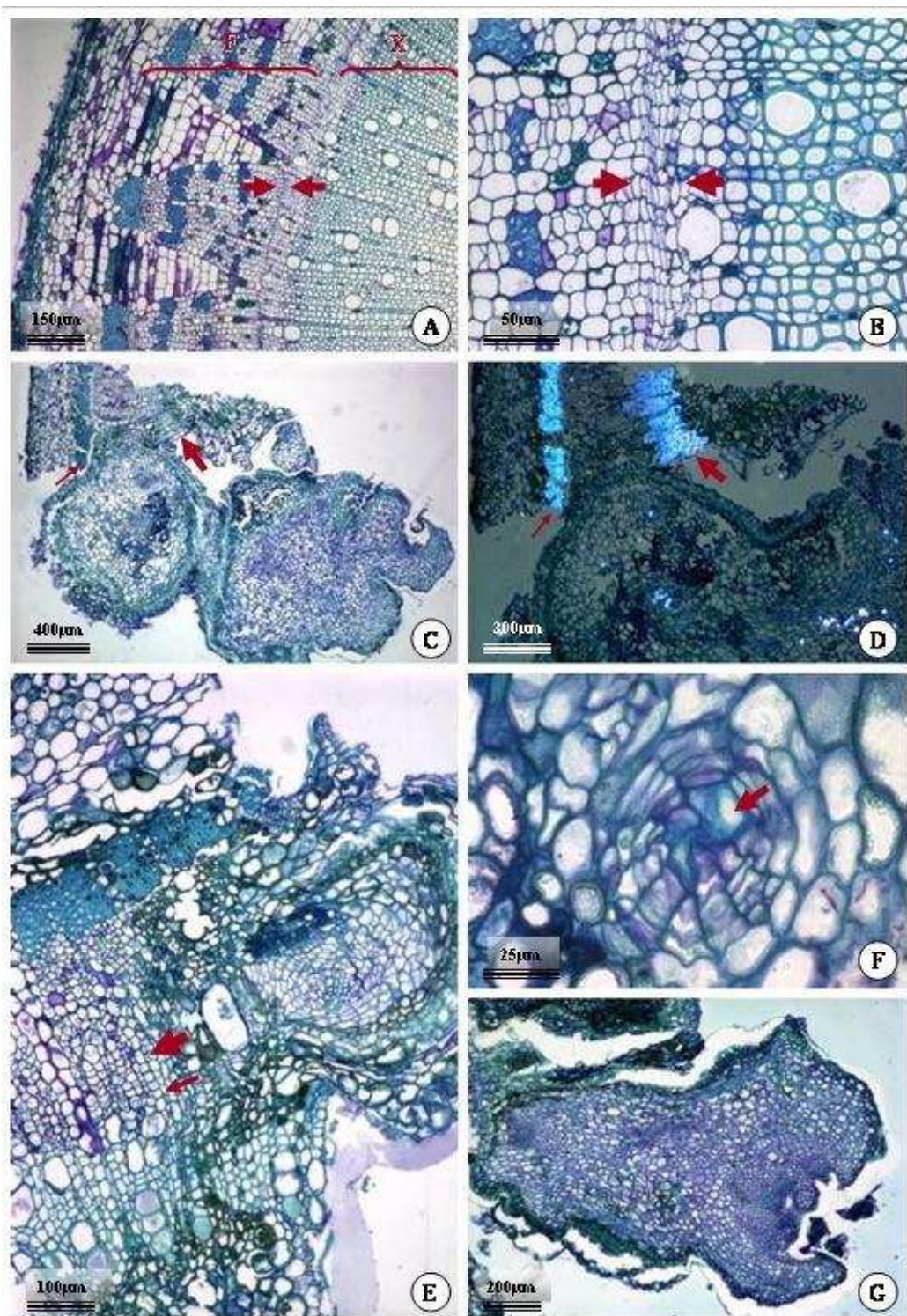


Figura 3: Fotomicrografias de seções transversais (A-F) e longitudinais (G) de caule de urucum cultivado *in vitro*. **A** - explante obtido de material *ex vitro* com floema secundário (F) - faixa cambial (setas) e xilema secundário (X); **B** - detalhe da faixa cambial (setas) presente no explante; **C** e **D** - material regenerado do explante entre cordão de fibras do floema (setas estreitas) e xilema secundário (setas largas); em D, sob luz polarizada; **E** - detalhe do material em regeneração a partir da faixa cambial e da região mais jovem do floema secundário; **F** - organização concêntrica de células produzidas em material regenerado, semelhante a primórdio radicular; **G** - parte aérea regenerada, com primórdios foliares.

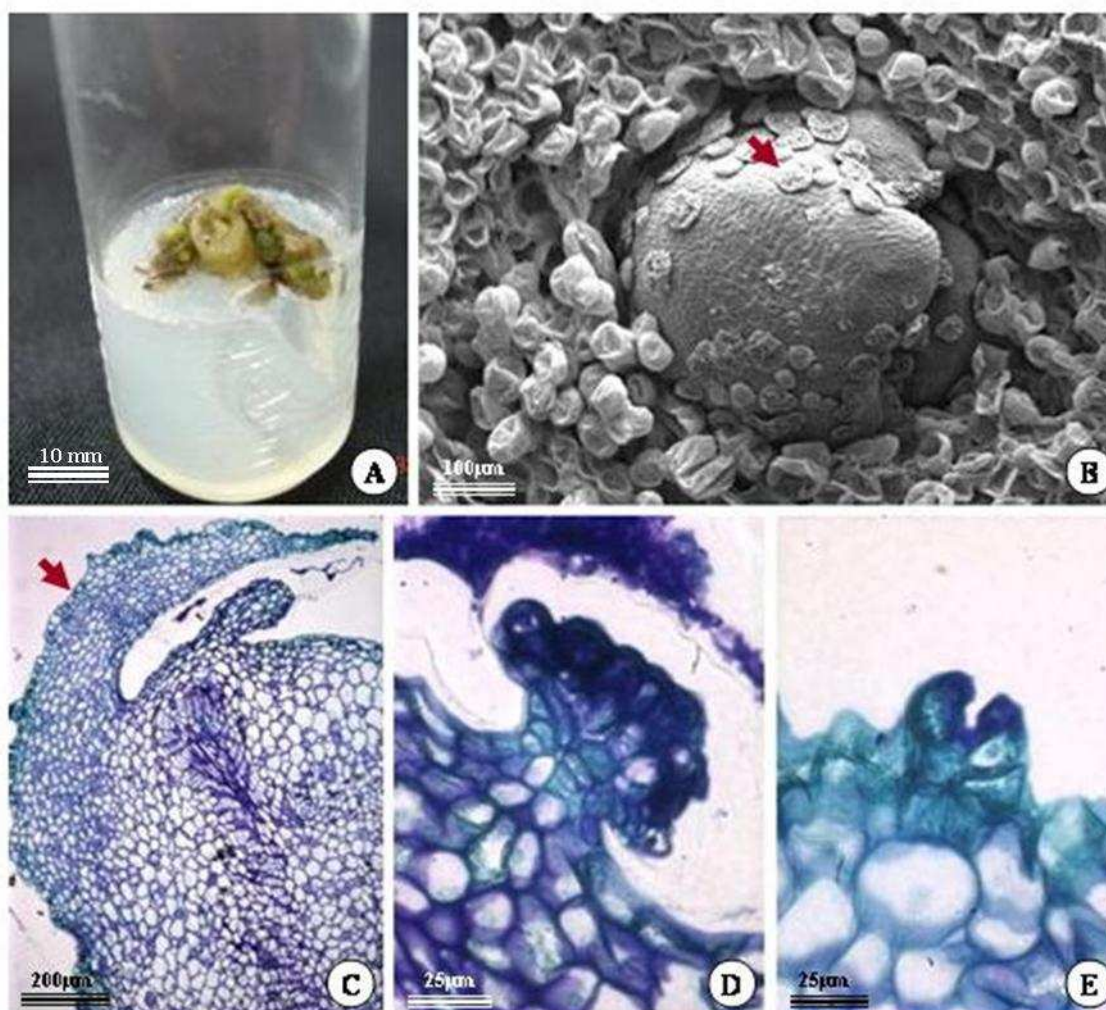


Figura 4: Segmento caulinar internodal de urucum cultivado *in vitro*. **A** - material regenerado em tubo de ensaio; **B**, fotoeletromicrografia de varredura de primórdio foliar entre células de calo. Note a presença de tricomas peltados (seta); **C** - fotomicrografia de seção longitudinal de primórdio foliar (seta); **D** - detalhe de tricoma peltado; **E** - detalhe de estômato.

Utilização de segmentos nodais (SN) como fonte de explantes

Aos 15 dias de cultura foi possível observar brotações em todos os tratamentos, oriundos das gemas axilares presentes nos explantes. Não ocorrendo, desta forma, a organogênese indireta, uma vez que as brotações surgiram de gemas pré-existentes.

Os melhores resultados foram observados nos tratamentos: BAP, o qual apresentou média de 40,17% de regeneração; KIN, cuja média foi de 30,86%; e 2iP, com média de 27,52%. No entanto, o uso de TDZ, ZEA e MS0 promoveram baixa regeneração. Estes resultados diferem dos alcançados com o uso de SIN como fonte de explantes nos tratamentos com TDZ, ZEA e 2iP, no entanto, ambos a presença do BAP demonstraram maior eficiência (Figura 5).

D'Souza & Sharon (2001), trabalhando com explantes nodais juvenis de *B. orellana*, observaram que o melhor regulador de crescimento para regeneração foi o 2iP comparado à BA, KIN e 2,4-D, os quais promoveram apenas calogênese.

Khan et al. (2002) analisaram a influência de diferentes reguladores de crescimento, dentre eles KIN, BAP e 2iP, no desenvolvimento de brotações oriundos de segmentos nodais de *Olea europaea*, e constataram que as menores concentrações (1 e 2 μ M) resultaram no melhor desenvolvimento. Os resultados com *B. orellana*, obtidos com concentrações superiores destes reguladores, apresentam semelhança quanto ao desenvolvimento.

Todavia, a média de explantes que não apresentaram responsividade (SR) continuou elevada em todos os tratamentos testados e inversamente proporcional àquela obtida com regeneração (Figura 5).

À exceção do tratamento suplementado com TDZ, todos os outros apresentaram apenas uma única brotação por explante, sendo esta muito vigorosa.

Entretanto outros autores descreveram a maior eficiência, com a utilização dos mesmos fitorreguladores utilizados em urucum, em outras culturas; como em erva-mate com três brotações por explante cultivado em meio contendo BAP (Zaniolo & Zanete, 2001), em paricá (*Schizolobium amazonicum*) a qual desenvolveu duas brotações axilares com a adição de BAP, porém apenas uma com adição de KIN (Cordeiro et al., 2002), e em Peroba-rosa (*Aspidosperma polyneuron*) a qual desenvolveu quatro a cinco

brotações por explante com adição de BAP e ZEA no meio de cultura (Ribas et al., 2005).

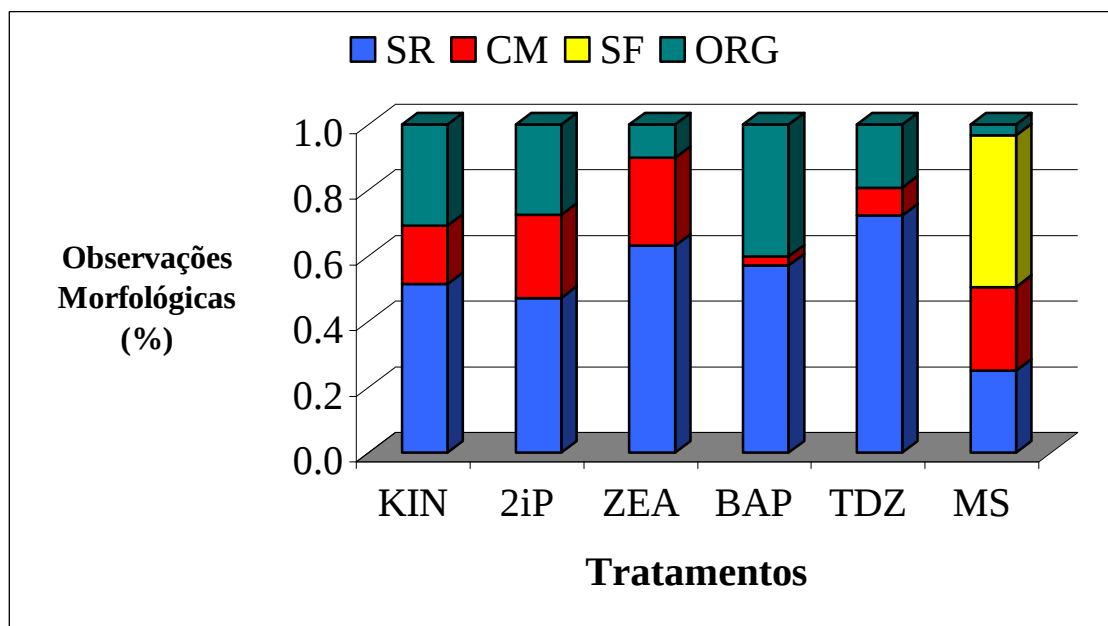


Figura 5: Observações morfológicas em explantes caulinares (segmento nodal – SN) de *B. orellana*, aos trinta dias de cultivo. SR: sem resposta; CM: calo misto; SF: calo semi-friável; ORG: organogênese.

O comprimento das brotações apresentou certa diferença em função do tratamento; as brotações oriundas do tratamento BAP apresentaram 2,0 cm de comprimento; brotações advindas do 2iP apresentaram 1,5 cm; nos tratamentos KIN e ZEA o comprimento das brotações foi de 1,0 cm, e, nos tratamentos TDZ e MS0 as brotações apresentaram 0,5 cm. Os explantes submetidos ao tratamento TDZ apresentaram multibrotações, nas regiões onde houve a excisão, e estas não se desenvolveram (Figura 6).

Na propagação por segmento nodal em *Holarrhena antidysenterica* os melhores resultados foram obtidos com a utilização de BAP quando comparado com KIN e 2iP (Kumar et al., 2005). Em *Acacia sinuata* todas as citocininas utilizadas (KIN, ZEA, TDZ e BAP) promoveram brotações, no entanto, BAP foi a melhor citocinina e apresentando um número de brotações superiores quando comparada com as demais (Vencadesan et al., 2003), dados semelhantes aos obtidos com urucum na utilização de BAP.

Similarmente às brotações incididas de SIN, as regeneradas de SN de *B. orellana* apresentaram senescência foliar, quando do isolamento do explante original, necessitando da adição de STS no meio para alongamento e manutenção.

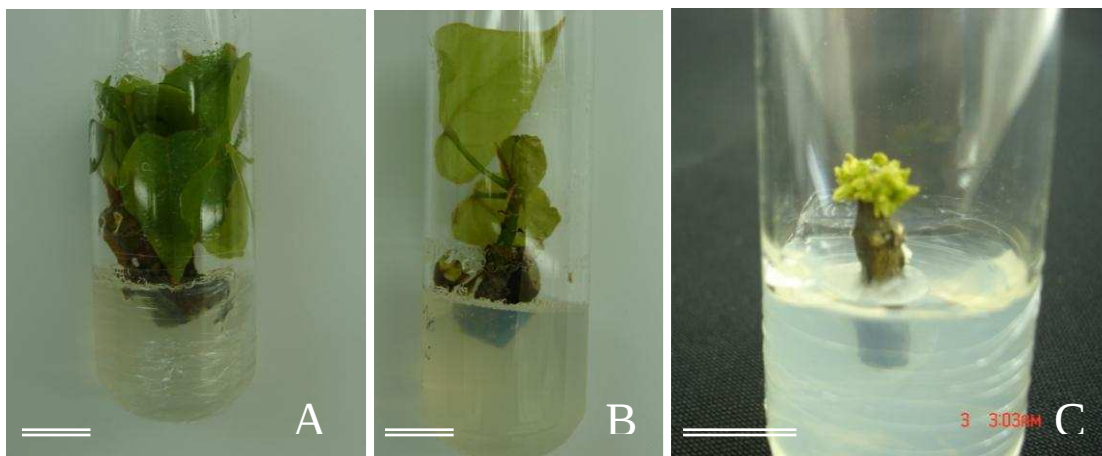


Figura 6: Respostas morfogênicas em culturas de *Bixa orellana* utilizando segmentos nodais (SN) como fonte de explantes. (A) KIN resposta similar com ZEA; (B) 2iP resposta similar com BAP; e (C) TDZ como reguladores de crescimento. Barra = 1 mm.

Em resumo, os resultados permitem concluir que a morfogênese *in vitro* a partir de tecidos adultos de urucum é possível e requer maiores estudos no sentido de otimizar as respostas, ampliando-as em termos de eficiência para que subsidie protocolos de propagação clonal de matrizes-elite, em especial aqueles com elevado teor de carotenóides ou com tolerância, e, ou, resistência a doenças. Ademais, denotam a importância e potencial de sua aplicação em protocolos de regeneração e transformação genética visando à manipulação genética do acúmulo dos carotenóides nas sementes mediante a superexpressão de enzimas relacionadas à rota biossintética desses compostos.

Referências Bibliográficas

ALMEIDA, J.L.; ALMEIDA, F.C.G.; NUNES, R. de P.; ALMEIDA, F.A.G. Bud initiation in leaf explants of annatto seedlings on different cytokinins. **Ciência Rural**, **26**:45-49, 1996.

ASSIS, T.F.; FETT-NETO, A.G.; ALFENAS, A.C. Current techniques and prospects for the clonal propagation of hardwoods with emphasis on *Eucalyptus*. In: CHRISTIAN, W.; CARSON, M. (eds.). **Plantation Forest Biotechnology for the 21st Century**. Kerala: Research Signpost, p.303-333, 2004.

ALMEIDA, W. A. B; MOURÃO FILHO, F.A.A; PINO, L. E.; BOSCARIOL, R.L.; RODRIGUEZ, A.P.M.; MENDES, B.M.J. Genetic transformation and plant recovery from mature tissues of *Citrus sinensis* L. Osbeck. **Plant Science**, **164**:203-211, 2003.

BALIANE, A. **A cultura do urucueiro**. Informe Técnico. Rio de Janeiro: Emater, 10 p., 1982.

BOUVIER, F.; DOGBO, O.; CAMARA, B. Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto). **Science**, **300**:2089-2091, 2003.

BOZZOLA, J. J.; RUSSEL, L.D. **Electron microscopy**. Boston: Jones and Bartlett Publishers, 542 p., 1992.

CARVALHO, J.FR.P.; CARVALHO, C.R.; OTONI, W.C. Regeneração *in vitro* de urucum (*Bixa orellana* L.) a partir de diferentes tipos de explantes. **Revista Árvore**, **29**:887-895, 2005.

CASTRO, C.B.; MARTINS, C.S.; FALES, I.C.; NAZARÉ, R.F.R.; KATO, O.R.; STEIN, R.L.B.; VENTURIERI, M.M. **A cultura do urucum**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental.- Brasília: EMBRAPA – SPI, Coleção Plantar; 61p.1994.

CORDEIRO, I.M.C.C.; LAMEIRA, O.A., TEREZO, E.F.M.; BARROS, P.L.C; OHASHI, S.T. Micropropagação de Paricá (*Schzolobium amazonicum* Huber Ex Ducke). **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, **29**: 78-82, 2002.

CREEMERS-MOLENAAR, J.; HAKKERT, J.C.; VAN STAVEREN, M.J.; GILISSEN, L.J.W. Histology of the morphogenic response in thin cell layer explants from vegetative tobacco plants. **Annals of Botany**, **73**:547-555, 1994.

DEBATA, B.K.; PUNK, F. Micropropagation of *Bixa orellana* L. In: Breeding Research on Medicinal and Aromatics Plants. **Proceedings...**Germany: 30 June-4 july, v.2, p. 334-337. 1996.

DREW, R.A. In vitro culture of adult and juvenile bud explants of *Passiflora* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **26**:23-27, 1991.

D'SOUZA, M.C.; SHARON, M. *In vitro* clonal propagation of annatto (*Bixa orellana* L.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant**, **37**:168-172, 2001.

FONTES, M.A. **Morfogênese in vitro, isolamento e cultivo de protoplastos e transformação genética de pimentão (*Capsicum* sp.)** Dissertação (Mestrado em Botânica). Universidade Federal de Viçosa, 175p., 1998.

FRANCO, C.F.O.; SILVA, F.C.P.; CAZÉ FILHO, J.; BARREIRO NETO, M.; SÃO JOSÉ, A.R.; REBOUÇAS, T.N.H.; FONTINÉLLI, I.S.C. **Urucuzeiro – Agronegócio de corantes naturais**. Emepa, SAIA, João Pessoa, 120p., 2002.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, **50**:151-158, 1968.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. 2nd Edition, 574 p.,1993.

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

KHAN, M.R.; RASHID, H.; QURAI SI, A. *In vitro* shoot development from juvenile cuttings of field-grown olive (*Olea europea* L.) cv. Leccino. **Journal of Biological Sciences**, 2: 438-440, 2002.

KUMAR, R.; SHARMA, K.; AGRAWAL, V. *In vitro* clonal propagation of *Holarrhena antidysenterica* (L.) Wall. through nodal explants from mature trees. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, 41:134-144, 2005.

MAJADA, J.P.; TADEO, F.; FAL, M.A.; SÁNCHEZ-TAMÉS, R. Impact of culture vessel ventilation on the anatomy and morphology of micropropagated carnation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 63:207-214, 2000.

MEIRELLES FILHO, J.C. **O livro de ouro da Amazônia: mitos e verdades sobre a região mais cobiçada do planeta**. Rio de Janeiro: Ediouro, 398 p., 2004.

MUNDHARA, R. & RASHID, A. TDZ-induced triple-response and shoot formation on intact seedlings of *Linum*, putative role of ethylene in regeneration. **Plant Science**, 170:185-190, 2006.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15:473– 497, 1962.

O'BRIEN, T.P. & McCULLY, M.E. **The study of plant structure principles and selected methods**. Melbourne – Australia: Termarcarphi Pty Ltd., 45p., 1981.

PAIVA NETO, V.B. **Morfogênese in vitro de urucum (*Bixa orellana* L.)**. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal). Viçosa, UFV, MG. 127p; 2002.

PAIVA NETO, V.B.; BOTELHO, M.N.; AGUIAR, R.; SILVA, E.A.M; OTONI, W.C. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of annatto (*Bixa orellana* L.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant**, 39:629-634, 2003a.

PAIVA NETO, V.B.; MOTA, T.R.; OTONI, W.C. Direct organogenesis from hypocotyl-derived explants of annatto (*Bixa orellana*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 75:159-167, 2003b.

RIBAS, L.L.F.; ZANETTE, F.; KULCHETSCKI, L.; GUERRA, M.P. Micropropagação de *Aspidosperma polyneuron* (Peroba-Rosa) a partir de segmentos nodais de mudas juvenis. **Revista Árvore**, 29:517-524, 2005.

RIVERA-MADRID, R.; ESCOBEDO-GM, R.M.; BALAM-GALERA, E.; VERA-KU, M.; HARRIES, H. Preliminary studies toward genetic improvement of annatto (*Bixa orellana* L.). **Scientia Horticulturae**, 106:165-172, 2006.

SHA VALLI KHAN, P.S.; PRAKASH, E.; RAO, K.R. Callus induction and plantlet regeneration in *Bixa orellana* L., an annatto-yelding tree. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, 38:186-190, 2002.

SILVEIRA, M. O preparo das amostras biológicas para microscopia eletrônica de varredura. In: SOUZA, W. (Ed.) **Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica de varredura**, v.1, Técnicas Básicas. Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, p.71-82, 1989.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 693 p., 2004.

VENCADESAN, G.; CANAPATHI, A.; PREAM ANAND, R.; SELVARAJ, N. *In vitro* propagation of *Acacia sinuate* (Lour.) Merr. from nodal segments of a 10-year-old tree. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, 39:409-414, 2003.

ZANIOLO, S.R. & ZANETE, F. Micropropagação de erva-mate a partir de segmentos nodais. **Scientia Agraria**, 2: 6p., 2001.

CONCLUSÕES GERAIS

Nas condições experimentais em que os experimentos foram conduzidos as seguintes conclusões podem ser obtidas:

- A germinação no escuro resulta em maior número de explantes regenerados;
- Hipocótilos dispostos sobre o meio de cultura apresentam organogênese direta, ao contrário dos demais que, cujas respostas diferenciadas são relacionadas à profundidade de imersão do explante no meio de cultura;
- Para todos os genótipos estudados, a utilização de hipocótilos invertidos, quando comparados aos não invertidos, se mostrou mais eficiente quanto ao processo organogênico;
- O meio líquido é superior na expansão da planta, quando comparado à utilização de meio semi-sólido, no entanto há necessidade do uso de fitorreguladores para indução à rizogênese nas brotações;
- As raízes como fonte de explantes são efetivas quando foram expostas à luz em meio líquido; a ausência de fitorreguladores não promove a organogênese em segmentos radiculares;
- As brotações oriundas de segmentos radiculares, induzidas pelo efeito de BAP, apesar de ocorrerem em menor quantidade apresentam qualidade superior, quando comparadas à utilização de TDZ e ZEA como fitorreguladores;
- Análises histológicas realizadas em explantes radiculares, revelaram que o início da regeneração ocorre a partir da intensa proliferação celular na região do periciclo e tecidos vasculares associados como floema do explante;

- Segmentos internodais (SIN) como fonte de explantes apresentam a regeneração de brotações aos 30 dias de cultura; nos tratamentos com fitorreguladores, no entanto, o controle (MS0) ocorre apenas a calogênese;
- O uso de BAP resulta em maior número de explantes responsivos à organogênese, entretanto com o 2iP ocorre o inverso, caracterizando-se como a citocinina menos responsiva;
- Em segmentos internodais adultos a responsividade morfogênica dos explantes ocorre na maioria das vezes por via direta, havendo apenas como exceção o BAP;
- O início do processo da divisão celular, a qual culmina na morfogênese, é observado a partir da intensa proliferação celular na região do câmbio, que se estende até o floema secundário do explante;
- Similarmente às brotações incididas de SIN, as brotações regeneradas de SN de *B. orellana* apresentaram senescência foliar, quando do isolamento do explante original, necessitando da adição de STS no meio para alongamento e manutenção.