

ELYABE MONTEIRO DE MATOS

**MORFOGÊNESE *in vitro* A PARTIR DE SEGMENTOS DE HIPOCÓTILOS E
DE RAÍZES DE URUCUM (*Bixa orellana* L.)**

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
2009

RESUMO

MATOS, Elyabe Monteiro de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2009. **Morfogênese *in vitro* a partir de segmentos de hipocótilos e de raízes de urucum (*Bixa orellana* L.)** Orientador: Wagner Campos Otoni. Co-orientadores: Luzimar Campos da Silva e Marcio Gilberto Cardoso Costa.

A espécie *Bixa orellana* (Bixaceae) é conhecida como popularmente como urucum, sendo uma lenhosa nativa da América Tropical e amplamente distribuída em todas as regiões do Brasil. As sementes de urucum são ricas em carotenóides bixina e norbixina, muito utilizados nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica, despertando imenso interesse econômico. O desenvolvimento de protocolos de morfogênese *in vitro* de urucum é importante por gerar novas alternativas para obtenção de plantas transformadas geneticamente com genes de interesse agrônômico e aqueles associados à biossíntese de pigmentos carotenóides, permitindo o melhor entendimento e a manipulação das rotas de sua produção. Os objetivos desse trabalho foram avaliar a influência de pulsos de zeatina, testar diferentes meios de cultivo na organogênese de urucum, além de testar diferentes concentrações de *Pluronic*[®] F-68 e de analisar as combinações de manose:sacarose na morfogênese de urucum. Foram testados diferentes tempos de exposição de segmentos de hipocótilo. Observou-se em média, 8,8 brotos por explantes e frequência de organogênese de 80 % quando os explantes permaneceram no meio de indução (meio MS suplementado com zeatina 4,56 μ M) por 6 dias e depois transferidos para meio MS sem o regulador de crescimento. Contudo, frequências de brotações adventícias em torno de 60 % foram obtidas para os explantes que permanecer 2 ou 3 dias no meio de indução. Foram testadas formulações de meios de cultivo na indução de organogênese em urucum. Os meios MS e JADS propiciaram as maiores frequências de organogênese para o genótipo ‘M2’ (98 e 90 %, respectivamente), enquanto o uso do meio WPM levou a índices de regeneração mais baixos (6 %). Quanto ao meio DKW observaram-se frequências intermediárias de 70 a 80 %. Para ‘Piave Vermelha’ observou-se que meio JADS proporciona as frequências mais elevadas, em comparação aos demais meios (68 %). Notaram-se respostas diferenciadas entre os genótipos. O surfactante não-iônico *Pluronic*[®] F-68 foi testado

em diferentes combinações com a zeatina 4,56 μM , tanto em explantes de hipocótilos quanto em segmentos de raízes. Não foram observadas grandes variações em relação às concentrações de *Pluronic*[®] F-68 utilizadas para ‘M2’, porém as frequências mais baixas foram observadas na concentração 0,001 % (82 %). Já para ‘Piave Vermelha’ as baixas concentrações do surfactante (0,001 e 0,1 %) mostraram as maiores frequências de brotações em segmentos de hipocótilo (28 e 12 %, respectivamente). As concentrações 0,001 e 0,5 % de *Pluronic*[®] F-68 para explantes radiculares no genótipo ‘M2’ promoveram os maiores números de brotações adventícias (43 e 40, respectivamente); o genótipo ‘Piave Vermelha’ não respondeu aos tratamentos. A possibilidade da utilização da fonte de carbono manose como agente de seleção em experimentos de transformação genética de urucum como gene *pmi* (fosfomanose isomerase) foi testada com segmentos de hipocótilo e de raízes. O urucum, aparentemente, não foi capaz de metabolizar a manose presente em diferentes combinações com sacarose no meio de indução JADS suplementado com zeatina 4,56 μM . Dessa forma não foram observadas brotações adventícias quando a manose era a única fonte de carbono do meio, e a presença de sacarose, mesmo na concentração mais baixa (21,9 mM), foi capaz de promover a morfogênese. Os explantes radiculares de ‘Piave Vermelha’ não responderam aos tratamentos, enquanto os de ‘M2’ emitiram o maior número médio de brotações (7,2) quando 75 % da manose foram substituídos por sacarose. Portanto, analisando-se o comportamento geral dos dois genótipos conclui-se que a variação interespecífica, a constituição mineral, a adição de substâncias orgânicas/inorgânicas, reguladores de crescimento e agentes gelificantes, assim como também os tipos de explantes analisados são fatores que devem ser considerados quando se estuda a morfogênese *in vitro* de urucum, tendo em vista a busca por melhores resultados e conhecimento melhor fundamentado do comportamento demonstrado pela espécie em cultura de tecidos.

ABSTRACT

MATOS, Elyabe Monteiro de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2009. **Morphogenesis *in vitro* from hypocotyl and root explants of annatto (*Bixa orellana* L.).** Adviser: Wagner Campos Otoni. Co-advisers: Luzimar Campos da Silva and Marcio Gilberto Cardoso Costa.

Bixa orellana (Bixaceae) popularly known as annatto is a wood species native from Tropical America, and widely distributed in all Brazilian territory. The seeds are a wealthy source of the carotenoids bixin and norbixin, largely used in food, cosmetic, and pharmaceutical industries, and presenting high economic interest. The development of *in vitro* regeneration protocols is important as a mean to generate new alternatives for obtainment of genetically modified plants with genes of agronomic interest and those associated to the biosynthesis of carotenoids, allowing a better understanding and manipulation their biosynthetic pathways. The goals of this work had been to evaluate the influence of zeatin pulses, to test different medium of culture in organogenesis of annatto, beyond testing different concentrations of *Pluronic*[®] F-68 and to analyze the combinations of mannose: sucrose in morphogenesis of annatto. In the present work, different exposure periods to growth regulators using hypocotyl segments were assayed. In average, 8.8 shoots were obtained per explant and high organogenesis frequency (80 %), when explants were cultured on induction medium (MS supplemented with 4.56 μ M zeatin) during 6 days, and transferred to MS medium devoid of growth regulators. However, adventitious regeneration frequencies around 60 % were achieved when explants remained for 2 or 3 days on induction medium. Regarding media formulation used, MS and JADS propitiated the highest organogenic frequencies for genotype 'M2' (98 and 90 %, respectively), whereas WPM led to the lowest regeneration frequencies (6 %). DKW medium enabled intermediate regeneration frequencies ranging from 70 to 80 %. For 'Piave Vermelha' it was observed that JADS medium provided the highest frequencies, as compared to other media (68 %). It was noticed genotype-dependent regeneration responses. The non-ionic surfactant *Pluronic*[®] F-68 was tested in different combinations with zeatin 4.56 μ M, for both hypocotyl and root segment explants. No significant variations were observed for *Pluronic*[®] F-68 used for 'M2', but the lowest frequencies were obtained at 0.001 % (82 %). However, for 'Piave Vermelha' the lower

surfactant concentrations (0.001 and 0.1 %) led to greater shooting frequencies in hypocotyl segments (28 and 12 %, respectively). For ‘M2’ root explants, *Pluronic*[®] F-68 at 0.001 e 0.5 %, promoted the highest adventitious shoot numbers (43 e 40 %, respectively); root explants of ‘Piave Vermelha’ did not display any response to the same surfactant treatments. The use of an alternative carbon source (mannose) as a selective agent in annatto genetic transformation by means of *pmi* (phosphomannose isomerase) gene was evaluated for both hypocotyl and root explants. Annatto explants were not able to metabolize the mannose present alone or in combination with sucrose, on zeatin-supplemented (4.56 μ M) JADS medium. This way, no regenerative response was achieved when mannose was the sole carbon source; sucrose, even at the lowest concentration (21.9 mM) promoted shoot morphogenesis. Root explants from ‘Piave Vermelha’ did not show any response to the different carbon source treatments, however ‘M2’ root explants showed the higher number of shoots (7.2) when 75 % of the mannose were replaced by sucrose. Therefore, analyzing the overall behavior of both genotypes it can be concluded that interespecific variation, the mineral composition of the medium, the supplementation with organic/inorganic substances, growth regulators, gelling agents, and the type of explants must be taken into account when targeting the *in vitro* morphogenesis of annatto, aiming at the optimization of *in vitro* responses of this species.