

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



DANIELA DE ARGOLLO MARQUES

ESTABELECIMENTO E CULTURA *in vitro* DE RAÍZES  
NORMAIS E TRANSFORMADAS COM *Agrobacterium*  
*rhizogenes* PARA ESTUDOS DE TERPENOS DE INTERESSE  
EM GENÓTIPO SUPERIOR DE *Artemisia annua* L.

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
Daniela de Argollo  
Marques  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia para a obtenção do Título de  
Doutora em Biologia Vegetal.

  
Orientadora: Dra. Simone Liliane Kirszenzaft Shepherd

2002



i  
UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE Be  
Nº CHAMADA T/UNICAMP  
M348e  
V \_\_\_\_\_ EX \_\_\_\_\_  
TOMBO BCI 51155  
PROC 16.837/02  
C \_\_\_\_\_ DX \_\_\_\_\_  
PREÇO R\$11,00  
DATA 01/10/02  
Nº CPD \_\_\_\_\_

CM00174645-4

BIB ID 259911

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

**M348e**

**Marques, Daniela de Argollo**

Estabelecimento e cultura *in vitro* de raízes normais e transformadas com *Agrobacterium rhizogenes* para estudos de terpenos de interesse em genótipo superior de *Artemisia annua* L./Daniela de Argollo

Marques. --

Campinas, SP: [s.n.], 2002.

Orientadora: Simone Liliane Kirszenzaft Shepherd

Tese(Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas .

Instituto de Biologia.

1. Raízes transformadas. 2. Sesquiterpenos. 3. Cultura in vitro.
  4. *Artemisia annua* L. I. Shepherd, Simone Liliane Kirszenzaft.
- II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.  
III. Título.

**Data de Defesa: 16/08/2002**

**Banca Examinadora:**



**Professora Dra. Simone Liliane Kirszenaft Shepherd**



**Professor Dr. Ladaslav Sodek**



**Professora Dra. Helaine Carrer**



**Professora Dra. Mary Ann Foglio**



**Professor Dr. Walter Siqueira.**

**Professor Dr. Angelo Luiz Cortelazzo**

**Professora Dra. Marie Anne Van Sluys**

200246316

## DEDICATÓRIAS

*À Deus por iluminar  
meu caminho todos os dias*

*Aos meus filhos Gabriela e Guilherme, razões da minha vida,  
pelo amor e carinho, que me encorajam a seguir sempre em frente*

*Ao meu marido Rui,  
pelo companheirismo, amor e amizade*

*Aos meus pais, Victor e Bela, pelo amor e carinho  
e por estarem sempre ao meu lado, apoiando e incentivando,  
incondicionalmente, em todos os momentos da minha vida.*

*Aos meus irmãos André e Thiago,  
pelo apoio e amizade de sempre*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, em primeiro lugar.

Aos meus pais que tanto me ajudaram para que eu pudesse concluir este trabalho.

À Profa. Dra. Simone Liliane Kirszenzaft Shepherd pela orientação e pelos seus ensinamentos que muito me enriqueceram profissionalmente, além da amizade durante todos estes anos.

À Profa. Dra. Mary Ann Foglio pela inestimável contribuição nas análises químicas e pelos valiosos conhecimentos transmitidos, além do apoio e amizade.

À Profa. Dra. Marie-Anne Van Sluys pela gentil acolhida no laboratório do Instituto de Biociências da USP para a realização das análises biomoleculares, por permitir a utilização dos aparelhos e dos materiais necessários a estas análises e pela concessão do material bacteriológico utilizado neste trabalho.

À Profa. Dra. Marta Teixeira Duarte pela colaboração nos testes biológicos.

Aos colegas do Departamento de Fisiologia Vegetal da UNICAMP, pela agradável convivência e aos professores pelo conhecimento transmitido durante estes anos de estudo.

Aos funcionários do Departamento e das Secretarias de pós-graduação de Fisiologia Vegetal da UNICAMP, em especial à Dulce Regina G. Joaquim pelo apoio técnico e indispensável colaboração nos experimentos e à Josénia pelas dicas e apoio.

Aos colegas do CPQBA, especialmente à Érica, pela colaboração na obtenção dos extratos brutos do material vegetal.

Aos colegas do Departamento de Fisiologia Vegetal do Instituto de Biociências da USP, em especial à Patrícia Gleydes Morgante, pela valiosa colaboração na realização das análises biomoleculares, pela sua paciência e disponibilidade em me transferir experiências e conhecimentos, além da amizade.

Ao Engenheiro Agrônomo Dr. Victor André Argollo Ferrão Netto pela colaboração na confecção das fórmulas químicas do capítulo IV deste trabalho.

Aos professores Dra. Helaine Carrer, Dr. Ladaslav Sodek e Dra. Mary Ann Foglio pelas correções e sugestões na pré-banca.

Ao David Shepherd pela colaboração na confecção do Abstract deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pela bolsa concedida.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o pleno desenvolvimento deste trabalho

## ÍNDICE

Abreviaturas.....	xv.
Lista de Figuras.....	xix.
Lista de Tabelas.....	xxiii.
Resumo Geral.....	xxv.
Summary.....	xxix.
Introdução geral.....	1.
Revisão de literatura.....	7.
Objetivos gerais.....	16.
Capítulo I - Obtenção <i>in vitro</i> do genótipo superior de <i>A. annua</i> .....	17.
Resumo.....	19.
1. Introdução.....	20.
2. Objetivos.....	23.
3. Materiais e métodos.....	25.
3.1. Assepsia do material.....	25.
3.2. Isolamento dos explantes meristemáticos.....	27.
3.3. Meios de cultura.....	28.
3.4. Banco de material homogêneo do genótipo superior <i>in vitro</i> : iniciação e manutenção.....	28.
4. Resultados e discussão.....	32.
4.1. Procedimentos de esterilização.....	32.
4.2. Isolamento dos explantes: uso de agentes anti-oxidantes.....	34.
4.3. Interação de fitorreguladores e desenvolvimento de ápices meristemáticos.....	35.
5. Conclusões.....	37.

## Capítulo II – Iniciação, estabelecimento e cultura de raízes normais e transformadas com

<i>A. rhizogeneses</i> .....	39.
Resumo.....	41.
1. Introdução.....	43.
2. Objetivos.....	47.
3. Material e métodos.....	48.
3.1. Material vegetal e bacteriológico.....	48.
3.2. Raízes normais: estabelecimento e determinação das condições fotoperiódicas de cultivo <i>in vitro</i> .....	49.
3.3. Obtenção de raízes transformadas.....	50.
3.3.1. Metodologia para o processo de transformação.....	50.
3.3.1.1. Explante utilizado e preparo da planta para inoculação com <i>A. rhizogenes</i> .....	50.
3.3.1.2. Isolamento das raízes obtidas após inoculação com <i>A. rhizogenes</i> .....	52.
3.3.2. Cultivo das raízes transformadas em diferentes meios básicos.....	54.
3.3.3. Cultivo das raízes transformadas em meio líquido para determinação das taxas de crescimento dos clones obtidos.....	54.
3.3.4. Verificação da presença de pRi nas cepas de <i>A. rhizogenes</i> utilizadas.....	55.
3.3.5. Análises Biomoleculares.....	56.
3.3.5.1. Extração do DNA vegetal.....	56.
3.3.5.2. Estimativa da concentração de DNA obtida.....	58.
3.3.5.3. Obtenção do fragmento de DNA para marcação radioativa da sonda.....	58.
3.3.5.4. Marcação radioativa da sonda.....	60.
3.3.5.5. Análise por “Dot Blot”.....	60.

4. Resultados e Discussão.....	62.
4.1. Raízes normais: estabelecimento e determinação das condições de cultivo.....	62.
4.2. Verificação da presença de pRi nas cepas de <i>A. rhizogenes</i> utilizadas.....	64.
4.3. Transformação.....	65.
4.3.1. Virulência das cepas 15834 e 8196.....	65.
4.3.2. Isolamento das raízes transformadas.....	66.
4.3.3. Cultivo das raízes transformadas em diferentes meios básicos.....	70.
4.3.4. Características fenotípicas e taxas de crescimento dos clones obtidos.....	70.
4.3.5. Análises biomoleculares.....	76.
5. Conclusões.....	80.

Capítulo III - Obtenção de calos a partir de raízes de <i>A. annua</i> transformadas com as cepas 15834 e 8196 de <i>A. rhizogenes</i> : estudo da morfogênese <i>in vitro</i> .....	81.
Resumo.....	83.
1. Introdução.....	84.
2. Objetivos.....	87.
3. Material e Métodos.....	88.
3.1. Material Vegetal.....	88.
3.2. Inoculação dos explantes em meio de cultura sólido: estudos sobre a regeneração direta.....	88.
3.3. Obtenção de calos: interação auxina/citocinina.....	89.
3.4. Adição de água de coco e de diferentes doses de BA.....	89.
3.5. Utilização de TIBA, BAP, GA3 e zeatina.....	90.
3.6. Obtenção dos extratos e análises químicas preliminares dos calos obtidos.....	90.

4. Resultados.....	92.
4.1. Estudos da morfogênese das raízes transformadas.....	92.
4.2. Análises químicas preliminares para avaliação da presença dos terpenos de interesse nos calos.....	96.
5. Discussão.....	98.
5.1. Estudos da morfogênese das raízes transformadas.....	98.
5.2. Análises químicas preliminares para avaliação da presença dos terpenos de interesse nos calos.....	101.
6. Conclusões.....	103.

Capítulo IV – Análises químicas das raízes normais e transformadas de *A. annua* para avaliação da presença de terpenos de interesse..... 105.

Resumo.....	107.
1. Introdução.....	109.
2. Objetivos.....	112.
3. Material e Métodos.....	113.
3.1. Material Vegetal e preparação dos extratos para as análises químicas.....	113.
3.2. Isolamento e identificação dos terpenos de interesse.....	114.
3.3. Análises preliminares qualitativas por Cromatografia de Camada Delgada (CCD)..	114.
3.4. Análises qualitativas por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de massas (CG/EM).....	114.
3.5. Análises quantitativas por Cromatografia Gasosa com detector de ionização de chama (CG/DIC).....	115.
4. Resultados.....	116.
4.1. Análises preliminares por CCD.....	116.

4.2. Análises qualitativas por CG/EM.....	120.
4.3. Análises quantitativas por CG/DIC.....	127.
5. Discussão.....	128.
6. Conclusões.....	134.
7. Apêndice.....	135.
Capítulo V – Ensaio de bioautografia.....	137.
Resumo.....	139.
1. Introdução.....	140.
2. Objetivos.....	142.
3. Material e Métodos.....	143.
4. Resultados e Discussão.....	146.
5. Conclusões.....	150.
Conclusões gerais.....	151.
Literatura citada.....	153.

## ABREVIATURAS

- AIA: ácido indol-acético.
- AIB: ácido indol-butírico.
- ANA: ácido naftalenoacético.
- B5: composição salina básica do meio descrito por Gamborg *et al.* (1968) para cultivo de células de soja.
- B5/2: composição salina básica do meio B5 com a concentração original dos macronutrientes reduzida à metade.
- BA: 6-benziladenina.
- CCD: cromatografia de camada delgada.
- CG/DIC: cromatografia gasosa acoplada com detector de ionização de chamas.
- CG/EM: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.
- cpm: contagem por minuto.
- CPQBA: Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas localizado em Paulínia/SP.
- CTAB: Cetyltrimethyl ammonium bromide.
- dCTP: deoxicitidina trifosfato.
- DNA: ácido desoxiribonucléico.
- EDTA: etileno diamina tetra acético.
- FPP: farnesil pirofosfato.
- GA<sub>3</sub>: ácido giberélico.
- IPP: Isopentenil pirofosfato.
- Kpb: kilo pares de base (1 Kpb = 1000 pb - pares de bases).

- LB: composição do meio de cultura “Luria Bértani” para cultivo de bactérias *Escherichia coli*.
- MA: meio de cultura de sustentação composto de água e ágar utilizado para o cultivo das mini-estacas de *A. annua* não inoculadas (controle) e inoculadas com *A. rhizogenes*.
- MEDIPLANT: Centre de Recherches sur les Plantes Médicinales et Aromatiques, Suíça.
- MS: composição salina básica do meio descrito por Murashige & Skoog (1962) utilizado para *Nicotiana tabacum* acrescido de 30 g/L de sacarose (MS líquido) e solidificado com 8 g/L de Bacto-ágar (MS sólido).
- MS/2: composição salina básica do meio MS com a concentração original dos macronutrientes reduzida à metade.
- NAD: nicotinamida adenina dinucleotídeo.
- NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida.
- pRi: plasmídeo do *Agrobacterium rhizogenes*.
- RF: Fator de retenção que exprime a razão entre a distância percorrida pelos compostos e a distância percorrida pela fase móvel (eluente) nas cromatoplacas de CCD.
- RNA: ácido ribonucléico.
- RNase: ribonuclease.
- SDS: sódio dodecil sulfato.
- SSC: sódio sarcocil citrato.
- T-DNA: região do plasmídeo que é transferida para a planta, após a integração no genoma vegetal (DNA transferido).
- TIBA: ácido triiodobenzóico 2, 3, 5.
- Tris-HCl: tris (hidroximetil aminometano hidróclorido).
- Tris: tris (hidroximetil) aminometano.

- UNICAMP: Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil.
- USP: Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- White: composição salina básica do meio descrito por White, 1943, utilizado para o crescimento de raízes de tomate.

## LISTA DE FIGURAS

Figura I.1. Planta vegetativa de <i>A. annua</i> (híbrido CPQBA 2/39 x PL5 = genótipo superior) cultivada nos campos experimentais do CPQBA / UNICAMP e utilizada como matriz <i>in vivo</i> .....	24.
Figura I.2: Esquema dos procedimentos de esterilização e das metodologias utilizadas para o isolamento dos ápices meristemáticos caulinares.....	26.
Figura I.3: Composição esquemática dos explantes meristemáticos utilizados (ápices meristemáticos caulinares).....	27.
Figura I.4: Esquema da iniciação e manutenção de um banco de material homogêneo do genótipo superior <i>in vitro</i> .....	30.
Figura I.5: Aspecto das plantas constituintes do banco de material homogêneo do genótipo superior cultivadas <i>in vitro</i> .....	31.
Figura I.6: Relação entre os tipos de procedimentos de esterilização e a porcentagem de explantes sadios obtidos.....	33.
Figura I.7: Esquema dos fenótipos das plantas de <i>A. annua</i> obtidas 30 dias após a inoculação dos ápices meristemáticos caulinares nos meios MS sólidos contendo diversas interações entre AIB e BA.....	36.
Figura II.1: Esquema de corte e inoculação das mini-estacas de <i>A. annua</i> . As mini-estacas foram retiradas da região mediana de plantas constituintes do banco do genótipo superior <i>in vitro</i> e colocadas em frascos contendo meio de sustentação MA (Tabela II.2) com extremidade basal para cima e extremidade apical em contacto com o ágar.....	53.
Figura II.2: Fragmento de 3,6 Kpb isolado e purificado a partir da hidrólise do plasmídeo p19a com a endonuclease <i>Bam</i> HI.....	59.

Figura II.3: Efeito da adição de diferentes tipos e concentrações de auxinas no crescimento de raízes normais de <i>A. annua</i> cultivadas em meio MS líquido sob agitação contínua (110 rpm), fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25°C ± 2°C.....	63.
Figura II.4: Resposta da presença de folhas em mini-estacas de <i>A. annua</i> com cerca de 1,5 cm de comprimento após 7 dias da inoculação com a cepa 15834 de <i>A. rhizogenes</i> nas extremidades basais.....	68.
Figura II.5: Média do número de raízes por mini-estaca de <i>A. annua</i> após 14 dias da inoculação com as cepas 15834 e 8196 de <i>A. rhizogenes</i> .....	69.
Figura II.6: Médias das massas de matéria fresca e seca dos três clones selecionados ao acaso após 30 dias de cultivo em diferentes meios de cultura líquidos. As raízes foram mantidas sob agitação contínua (110 rpm), fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25°C ± 2°C.....	72.
Figura II.7: Fenótipo característico de raízes em cabeleira obtido para os clones FL, C5, C6, C7, C8, C12, C15.....	73.
Figura II.8: Fenótipo diferenciado observado para o clone C14 caracterizado por raízes engrossadas e com aspecto semelhante a calos obtido.....	74.
Figura II.9: Taxa de crescimento dos clones de raízes transformadas e normais após 30 dias de cultivo em meio MS líquido desprovido de fitorreguladores.....	75.
Figura II.10: Eletroforese em gel de agarose (0,8 %) para uma estimativa da concentração do DNA, após extração, nas amostras de raízes transformadas a partir da inoculação com as cepas 15834 (clones FL, C1, C3, C5, C6, C7, C8, C10, C11, C12, C14 e C15) e 8196 (clones C1*, C2*, C3* e C4*) de <i>A. rhizogenes</i> .....	78.
Figura II.11: Autoradiografia da membrana do “Dot Blot” após exposição de 6 dias.....	79.

Figura.III 1: Efeito da interação de diferentes concentrações de ANA e BA nos tamanhos dos calos obtidos após a inoculação dos explantes A e B em meio básico MS sólido e cultivados sob temperatura de 25°C ± 2°C e fotoperíodo de 16 horas.....	93.
Figura.III.2: Efeito de doses crescentes de BA no crescimento dos calos originados a partir dos explantes A (pedaços de raízes transformadas com a cepa 15834 de <i>A. rhizogenes</i> ) e B (pedaços de raízes transformadas com a cepa 8196 de <i>A. rhizogenes</i> ).....	94.
Figura III.3: Aspecto das estruturas alongadas diferenciadas que emergiram de calos originados a partir de explantes retirados de raízes transformadas de um clone específico (clone C8) e mantidos no meio H4 (5 mg/L TIBA + 10 mg/L BA).....	95.
Figura III.4: Placas de Cromatografia de Camada Delgada (CCD) para comparação dos padrões autênticos de artemisinina 1, ácido artemisinínico 3, dihidro-epideoxi-artenuína B 7 e dioxiartemisinina 10 com o extrato obtido da mistura de todos os calos originários a partir de ambos os explantes (A e B) e obtidos no item 3.5. deste capítulo.....	97.
Fig. IV.1. Curva padrão utilizada para a quantificação de 7 (dihidro-epidioxi-artenuína B) obtida em três concentrações conhecidas deste composto: 0,18 mg/mL, 0,73 mg/mL e 1,82 mg/mL.....	115.
Fig. IV.2: Análises químicas preliminares por CCD para a avaliação da presença dos terpenos de interesse nas raízes normais de <i>A. annua</i> obtidas e cultivadas <i>in vitro</i> conforme metodologias descritas no capítulo II.....	117.
Fig. IV. 3. Análises químicas preliminares por CCD para avaliação dos terpenos de interesse tanto nas raízes normais quanto nas transformadas de <i>A. annua</i> obtidas e cultivadas <i>in vitro</i> conforme metodologias descritas no capítulo II.....	118.

Fig. IV. 4. Placa de CCD para comparação dos padrões autênticos de ácido artemisinínico <b>3</b> e $\beta$ sitosterol <b>13</b> com os extratos das raízes normais e transformadas de <i>A. annua</i> obtidas e cultivadas <i>in vitro</i> conforme metodologias descritas no capítulo II.....	119.
Figura IV.5. Perfil cromatográfico do padrão autêntico do composto dihidro-epideoxi-artenuína B <b>7</b> obtido no cromatógrafo a gás (HP 5890) acoplado a um detector de massas (HP 5970).....	122.
Figura IV.6: Perfil cromatográfico do extrato das raízes normais cultivadas em meio MS desprovido de fitorreguladores sob fotoperíodo de 16 horas obtido no cromatógrafo a gás (HP 5890) acoplado a um detector de massas (HP 5970).....	123.
Figura IV.7: Perfil cromatográfico do extrato das raízes normais cultivadas em meio MS desprovido de fitorreguladores e sob condição de escuro contínuo obtido no cromatógrafo a gás (HP 5890) acoplado a um detector de massas (HP 5970).....	124.
Figura IV.8: Perfil cromatográfico do extrato das raízes normais cultivadas em meio MS acrescido de 0,01 mg/L de AIB e sob fotoperíodo de 16 horas obtido no cromatógrafo a gás (HP 5890) acoplado a um detector de massas (HP 5970).....	125.
Figura IV.9: Perfil cromatográfico do extrato das raízes transformadas (clone C8) cultivadas em meio MS desprovido de fitorreguladores e sob fotoperíodo de 16 horas obtido no cromatógrafo a gás (HP 5890) acoplado a um detector de massas (HP 5970).....	126.
Figura IV.10: Caminho biossintético da artemisinina <b>1</b> e seus precursores em <i>A. annua</i> .....	133.
Figura V.1. Placas de bioautograma para avaliação das atividades antimicrobianas de artemisinina <b>1</b> e do ácido artemisinínico <b>3</b> bem como do composto antiulcerogênico deoxiartemisinina <b>10</b> .....	147 e 148.
Figura V.2. Placas de bioautograma para avaliação das atividades antimicrobianas do composto dihidro-epideoxi-artenuína B <b>7</b> .....	149.

## LISTA DE TABELAS

Tabela II.1: Constituição do meio LB utilizado para cultivo das cepas 15834 e 8196 de <i>A. rhizogenes</i> .....	49.
Tabela II.2: Composição do meio de sustentação MA utilizado para o cultivo das mini-estacas não inoculadas (controles) e inoculadas com <i>A. rhizogenes</i> .....	51.
Tabela II.3: Constituição do meio seletivo AT utilizado para o cultivo das cepas 15834 e 8196 de <i>A. rhizogenes</i> .....	56.
Tabela II.4: Constituição do tampão microprep utilizado durante a extração do DNA vegetal.....	57.
Tabela IV.1: Teor de dihidro-epideoxi-artenuína B 7 detectado por CG/DIC em raízes normais cultivadas em meio MS sob fotoperíodo de 16 horas luz (N1) e sob de escuro contínuo (N2).....	127.
Tabela V.1: Ensaio bioautográfico: microorganismos empregados e volumes dos respectivos antibióticos a serem aplicados nas placas de CCD.....	145.
Tabela V.2: Sesquiterpenos de interesse empregados nos testes biológicos.....	145.
Tabela V.3: Atividade antimicrobiana dos sesquiterpenos.....	146.

## RESUMO GERAL

As plantas do gênero *Artemisia* se constituem numa rica fonte de sesquiterpenos, os quais têm recebido grande atenção dos pesquisadores devido a sua diversidade química e biológica. A continua investigação da presença de compostos secundários de interesse bem como de protocolos eficientes para a viabilização e otimização da produção em larga escala dos mesmos são extremamente recomendados e necessários para a exploração desta rica fonte de novos agentes quimioterapêuticos e agrícolas. A planta alvo deste estudo foi o híbrido CPQBA 2/39 x PL5 da espécie *Artemisia annua*, o qual foi obtido pelo programa de melhoramento genético da MEDIPLANT e do CPQBA. Com a finalidade de se manter algumas características desejáveis deste genótipo superior, tais como alta produção de biomassa e de artemisinina, um sesquiterpeno com ação antimalárica, o presente trabalho teve início a partir de um único explante meristemático, o qual foi excisado de uma única planta matriz do híbrido melhorado cultivada nos campos experimentais do CPQBA. Após o desenvolvimento do explante meristemático selecionado, este foi micropropagado até a obtenção de um banco de material homogêneo *in vitro* com número adequado de plantas saudáveis, as quais serviram como fontes de explantes para os experimentos posteriores. Foram desenvolvidas metodologias para a iniciação, estabelecimento e cultivo de raízes tanto normais como transformadas com duas cepas de *Agrobacterium rhizogenes* (15834 e 8196). A confirmação do caráter transgênico das raízes foi obtida por "Dot Blot", um método rápido e eficiente de triagem que permitiu uma análise molecular qualitativa. Estudos relacionados com a formação de calos e a morfogênese *in vitro* das raízes transformadas obtidas com ambas as cepas também foram realizados. Os extratos dos materiais vegetais foram analisados por cromatografia gasosa acoplado a um espectrômetro de massas (CG/EM) de acordo com metodologia analítica e de alta sensibilidade para detecção de terpenos que foi desenvolvida

por pesquisadores do CPQBA/UNICAMP. Os extratos dos calos obtidos bem como das raízes transformadas e normais estabelecidas e cultivadas em diferentes meios de cultura e sobre diferentes condições fotoperiódicas foram analisados quimicamente para a avaliação de alguns terpenos de interesse, tais como: artemisinina e ácido artemisinínico, além de dois outros compostos com forte atividade antiulcerogênica: dihidro-epideoxi-artenuína B e deoxiartemisinina. Os resultados destas análises revelaram que nenhum dos terpenos mencionados estavam presentes nos extratos dos calos e das raízes transformadas analisadas. Os cromatogramas dos extratos das raízes normais cultivadas em meio MS líquido desprovido de fitorreguladores revelaram a presença do composto antiulcerogênico dihidro-epideoxi-artenuína B e de um outro composto ainda não identificado. Pelas características do padrão de fracionamento do espectro obtido por CG/EM, podemos sugerir que este composto não identificado é também um terpeno, no entanto a confirmação desta hipótese deverá ser objetivo de trabalhos futuros. As condições fotoperiódicas de cultivo influenciaram na produção destes dois terpenos, sendo que a produção do composto não identificado foi inversamente proporcional à produção de dihidro-epideoxi-artenuína B, ou seja, sob condição de escuro contínuo, quando dihidro-epideoxi-artenuína B foi intensamente produzido, o composto não identificado foi detectado em pequenas proporções, e, sob fotoperíodo de 16 horas, o inverso ocorreu. A quantificação de dihidro-epideoxi-artenuína B por Cromatografia gasosa acoplado a um Detector de Ionização de Chamas (CG/DIC) revelou um aumento de aproximadamente cinco vezes na produção deste composto pelas raízes normais cultivadas sob condição de escuro contínuo em relação às raízes cultivadas na presença de 16 horas de luz. A presença de auxina no meio MS mantido sob condições de 16 horas de luz resultou em alta produção do composto não identificado pelas raízes normais, enquanto que a produção de dihidro-epideoxi-artenuína B não foi detectada nestas raízes através das metodologias empregadas. Os terpenos de interesse também foram estudados quanto as suas atividades

antimicrobianas através de ensaios bioautográficos. Para os testes biológicos foram utilizados os seguintes microrganismos: *Bacillus subtilis*, *Salmonella choleraesuis*, *Micrococcus luteus*, *Rhodococcus equi*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*. Os resultados destes testes mostraram que nenhum dos terpenos de interesse apresentou atividade antifúngica com a linhagem de *Candida albicans*. A atividade antibacteriana foi comprovada para artemisinina e para o ácido artemisinínico, com as linhagens das bactérias *B. subtilis*, *R. equi*, *S. aureus* e *E. coli*. O composto dihidro-epideoxi-artenuína B apresentou atividade antibacteriana com as linhagens das bactérias *B. subtilis*, *M. luteus* e *S. aureus* e o composto deoxiartemisinina com as linhagens *B. subtilis*, *R. equi*, *M. luteus* e *S. aureus*.

## SUMMARY

Plants of the *Artemisia* genera are a rich source of sesquiterpenes, which have received great attention from researchers due to their biological and chemical diversity. The continued investigation of the presence of secondary compounds is highly recommended and necessary for the exploration of this rich source of new chemotherapeutic and agricultural agents. The plant targeted in this study was the CPQBA 2/39 x PL5 hybrid of the *A. annua* species, obtained through the genetic improvement program of MEDIPLANT and CPQBA. With the intent of keeping some of the desirable characteristics of this superior genotype, such as high production of biomass and artemisinin, a sesquiterpene with antimalarial properties, the present study began with a single meristematic explant, excised from a single improved hybrid matrix plant cultivated in CPQBA's experimental fields. After the development of the selected meristematic explant, it was micropropagated until an *in vitro* homogenous material bank was obtained with a adequate number of healthy plants, which served as explant sources for later experiments. Methodologies were developed for the establishment and cultivation of roots, both normal and transformed with two strains of *Agrobacterium rhizogenes* (15834 and 8196). The confirmation of the transgenic nature of the roots was obtained by the "Dot Blot" technique, a fast and efficient screening method that allows a qualitative molecular analysis. Studies related to the formation of callus and the *in vitro* morphogenesis of the transformed roots obtained with both strains were also undertaken. The plant material extracts were analyzed by Gasos Chromatography acopladed to Spectrum Mass (GC/MS) according to the analytical methodology incorporating high sensitivity terpene detection developed by CPQBA/UNICAMP researchers. The callus extracts as well as the transformed and normal roots established and cultivated in different culture media under different photoperiodic conditions were chemically analysed for evaluation of relevant terpenes, such as: artemisinin,

artemisinic acid, as well as two other compounds with strong antiulcerogenic activity: dihydro-epideoxi-artenuin B and deoxiartemisinin. The analysis of results revealed that none of the afore mentioned terpenes were present in the callus extracts or transformed roots. The chromatograms of the extracts taken from normal roots cultivated in MS liquid medium deprived of phytohormones revealed the presence of the antiulcerogenic compound dihydro-epideoxi-artenuin B and another as yet unidentified compound. The characteristics of the mass fractioning pattern observed on GC/MS suggest that this unidentified compound is also a terpene, however confirmation of this hypothesis requires further studies. Photoperiod during cultivation influenced the production of both these terpenes, with the production of the unidentified compound being inversely proportional to the production of dihydro-epideoxi-artenuin B. Under continuous darkness dihydro-epideoxi-artenuin B was intensely produced and the unidentified compound present in small proportions, whereas the inverse occurred in a 16 hour photoperiod. The quantification of dihydro-epideoxi-artenuin B by Gas Chromatography coupled to Flame Ionization Detector (GC/FID) revealed as approximately fivefold increase in the production of this compound by normal roots cultivated under continuous darkness compared to roots cultivated in the presence of 16 hour of light. The presence of auxin in the MS medium maintained under 16 hour of light resulted in substantial production of the unidentified compound by normal roots, while the production of dihydro-epideoxi-artenuin B was not detected in these roots by the methods employed.

The relevant terpenes were also studied with regard to their antimicrobial properties through bioautographic tests. For such tests the following microorganisms were used: *Bacillus subtilis*, *Salmonella choleraesuis*, *Micrococcus luteus*, *Rhodococcus equi*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*. The results of these tests showed that none of the relevant terpenes presented antifungal activity with the *Candida albicans* line. The antibacterial activity was confirmed for

artemisinin and artemisinic acid, using *B. subtilis*, *R. equi*, *S. aureus*, and *E. coli* lines. The compound dihydro-epideoxi-artenuin B showed antibacterial activity with the bacterial lines *B. subtilis*, *M. luteus*, and *S. aureus* and the compound deoxiertemisinin with the lines *B. subtilis*, *R. equi*, *M. luteus*, and *S. aureus*.

## INTRODUÇÃO GERAL

A espécie *Artemisia. annua* (Asteraceae) é originária da Ásia sendo conhecida como *qinghaosu* (erva verde) e tem sido usada há séculos pelos chineses como planta medicinal para o tratamento de vários tipos de moléstias, incluindo febre de diferentes origens (Klayman, 1985). Planta exótica, foi introduzida no Brasil em 1987 através de sementes provenientes dos Estados Unidos, pelo Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agronômicas (CPQBA/UNICAMP) que desde então vem realizando experimentos e observando o comportamento da espécie com o objetivo de otimizar o cultivo em nossas condições (Figueira, 1995). A obtenção de híbridos de *A. annua* para o cultivo no Brasil e posteriormente, a otimização da produção de metabólitos secundários, através de ferramentas como a biotecnologia, são de grande interesse econômico e social.

A família Asteraceae é caracterizada pela presença de inulina, ácidos graxos, lactonas sesquiterpênicas, álcoois triterpênicos, ácido caféico, flavonas, flavonóis metilados, compostos acetilênicos e óleos essenciais e pela total ausência de taninos e de iridóides (Robbers *et al.*, 1996). A espécie *A. annua* se constitui numa rica fonte de lactonas sesquiterpênicas com importantes atividades biológicas como, por exemplo, a tão conhecida ação anti-malária conferida à artemisinina (Tan *et al.*, 1998). Além de artemisinina, as atividades biológicas de outras lactonas sesquiterpênicas produzidas por *A. annua* tais como: ácido artemisinínico, diidro-epídeoxi-artenuína B, epídeoxi-artenuína B, artenuína-B, deoxiartemisinina, dentre outras (Zaman & Sharma, 1991; Brown, 1992; Robbers *et al.*, 1996; Bouwmeester, 1999; Wallaart *et al.*, 2000), já são conhecidas. Por exemplo, diidro-epídeoxi-artenuína B e deoxiartemisinina demonstraram atividade antiulcerogênica nos modelos de úlcera induzidos por indometacina e etanol, respectivamente, comparável a droga padrão carbenoxolona (Foglió *et al.*, 2002). A atividade antiproliferativa destes dois compostos bem como do ácido artemisinínico também

foi avaliada em cultura de células tumorais humanas de mama (MCF-7), mama resistente (NCIADR), pulmão (NCI-460) e melanoma (UACC), em concentrações crescentes de até 125 µg/mL (Kohn, *et al.*, 2001). Segundo estes pesquisadores, dihidro-epideoxi-artenuína B e ácido artemisinínico apresentaram seletividade para as linhagens MCF-7 e NCI-460 enquanto que deoxiartemisinina apresentou citotoxicidade não seletiva. Diversas outras atividades biológicas de compostos presentes em *A. annua* foram relatadas por Tan *et al.* (1998). Uma investigação contínua das atividades biológicas dos compostos secundários presentes nesta espécie bem como em outras espécies do gênero *Artemisia* é extremamente recomendada e necessária para exploração desta rica fonte de novos agentes quimioterapêuticos e agrícolas. O estudo da viabilização e da otimização de protocolos para produção em larga escala destes importantes princípios ativos químicos é extremamente necessária já que a maioria destes são encontrados em baixíssimos níveis na planta. A concentração de artemisinina na parte aérea de *A. annua*, por exemplo, situa-se entre 0,1 e 1% do peso seco, dependendo da procedência geográfica da planta (Wallaart *et al.*, 2000). Segundo alguns estudos (Foglio, 1996; Wallaart *et al.*, 2000) os conteúdos de sesquiterpenos (como por exemplo artemisinina e seus precursores) bem como de óleos essenciais variaram entre plantas de diferentes origens geográficas, as quais pertenceriam a diferentes quimiotipos. Segundo Wallaart *et al.* (2000), em quimiotipos originários do Vietnã, foram encontrados altos níveis de artemisinina e de ácido dehidroartemisinínico e baixíssimos níveis de ácido artemisinínico, enquanto que em quimiotipos originários da China e Europa, ocorreu o inverso. Estes autores constataram ainda que plantas com altos níveis de ácido artemisinínico continham também altos níveis de artenuína B e epi-deoxiartenuína B, enquanto que plantas com altos níveis de ácido dehidroartemisinínico continham apenas dehidro-epideoxi-artenuína B.

Diversos esforços tem sido realizados para intensificar o inerente potencial biológico de certas plantas medicinais, aumentando a produtividade de seus princípios ativos a níveis

comercialmente viáveis. Uma das possibilidades para otimização da produção destes compostos seria através do melhoramento convencional e seleção genética em campo. A obtenção de um genótipo superior, com altos níveis de metabólitos secundários de interesse, merece todo o cuidado quanto à manutenção da fidelidade genética. Segundo alguns autores, a propagação *in vitro* a partir de ápices caulinares meristemáticos é bastante recomendada na propagação de variantes genéticas únicos e/ou genótipos superiores já que a planta propagada desta maneira será idêntica à planta-mãe, pois os tecidos organizados dos meristemas apresentam maior estabilidade cromossômica (Murashige, 1974; D' Amato, 1977; Grout, 1990; Argollo Marques, 1996). Em adição, o ápice é uma estrutura organizada, que pode desenvolver-se diretamente em parte aérea, em meio de cultura adequado, sem passar pela fase de calo (Torres *et al.*, 1998).

Outra possibilidade promissora para o incremento da produção de alguns metabólitos de interesse seria o uso de técnicas biotecnológicas como o cultivo de plantas *in vitro*, culturas de suspensões celulares e culturas de raízes normais e/ou transformadas geneticamente através da inoculação com *Agrobacterium rhizogenes*. Alguns pesquisadores utilizaram o método de cultura de *in vitro* de células e tecidos vegetais, porém, sem grande sucesso (Paniego & Giulietti, 1994). Segundo as autoras, artemisinina foi encontrada em culturas de tecidos diferenciados, porém foi encontrada apenas traços em culturas de tecidos não diferenciados (como cultura de células e de calos). As raízes são um exemplo de órgãos dispostos de uma variedade de tecidos diferenciados e especializados, no entanto a síntese de um determinado metabólito vai depender de condições citológicas, bioquímicas e estruturais específicas. Em muitos casos, a produção de metabólitos secundários em plantas é restrita a tecidos e órgãos específicos durante um particular estágio de desenvolvimento. A diferenciação morfológica das células das plantas em tipos especializados de células e tecidos é acompanhada pela diferenciação química, a qual estabelece uma rota metabólica levando a formação de produtos secundários (Croes *et al.*, 1989). Segundo os mesmos autores, o estabelecimento de rotas metabólicas

levando a formação de metabólitos secundários é um processo de diferenciação a nível celular o qual, em muitos casos, está ligado a diferenciação morfológica. Esta teoria é sustentada pela observação de que em culturas de calos ou suspensões celulares, que não são estruturas diferenciadas, o metabolismo secundário é frequentemente baixo ou completamente ausente (Rhodes *et al.*, 1987).

Os metabólitos secundários podem ser sintetizados e/ou acumulados na parte aérea da planta, no sistema radicular ou em ambos. A artemisinina é, principalmente, extraída da parte aérea de *A. annua*, no entanto, alguns autores encontraram este sesquiterpeno bem como seus precursores tanto em raízes normais (Jha *et al.*, 1988; Jaziri *et al.*, 1995) quanto em raízes geneticamente transformadas (Jaziri *et al.*, 1995) e sugeriram que estes sistemas poderiam ser utilizados em estudos experimentais de biossíntese de metabólitos secundários que normalmente não são encontrados no sistema radicular da planta. Paniego & Giulietti (1994) ressaltaram a necessidade de mais estudos sobre a biossíntese de artemisinina em cultura *in vitro* de raízes. Do ponto de vista da fitoquímica, o trabalho com raízes é bastante interessante, pois estas, além de apresentarem pouca (no caso de raízes cultivadas *in vitro* – Jaziri *et al.*, 1995) ou nenhuma clorofila, possuem pequenas quantidade de substâncias graxas que dificultam o processo de purificação e não apresentam interesse farmacológico específico (Dias, 1997). A cultura de raízes em cabeleira (fenótipo causado pela infecção com *A. rhizogenes*) apresenta a vantagem adicional de possuir uma rápida proliferação e um crescimento contínuo por várias subculturas, sem a necessidade da adição de fitorreguladores. No entanto, os produtos metabólicos destas raízes são, geralmente, limitados àqueles produzidos pelas raízes normais (Endress, 1994; Brasileiro & Dusi, 1999), muito embora alguns autores tenham observado diferenças na produção de metabólitos secundários pelas raízes transformadas (Moyano *et al.*, 1999; Malloí *et al.*, 2001). O processo de inoculação de *Agrobacterium* em diversas espécies de plantas, ocasionando a inserção de genes da bactéria ao genoma nuclear

da célula vegetal através da transferência do T-DNA pode proporcionar mudanças no metabolismo destas plantas, uma vez que os genes transferidos se expressam de maneira estável (Van Sluys *et al.*, 1992; Brasileiro, 1993; Zupan & Zambryski, 1995; Ream & Gelvin, 1996). No caso de *A. rhizogenes*, a inoculação de diferentes cepas tem proporcionado resultados distintos tanto na indução, na taxa de crescimento e no fenótipo das raízes obtidas, como no processo de regeneração e obtenção de plantas transgênicas (Otani *et al.*, 1996) e na produção de alguns metabólitos secundários (Mallol *et al.*, 2000).

Uma outra alternativa que poderia ser utilizada para aumentar a produção de um metabólito de interesse seria a engenharia de sua rota metabólica (Wallaart *et al.*, 2000). Entretanto, para muitos compostos, como por exemplo artemisinina, o caminho biossintético não tem sido completamente elucidado. Estudos que colaborem para a elucidação da rota biossintética de artemisinina são muito importantes para a otimização da produção tanto deste composto quanto de seus precursores.

## REVISÃO DE LITERATURA

### A PLANTA *A annua* L.

A espécie *A. annua* L., uma das 400 espécies da família Asteraceae (Compositae) é nativa da Ásia, mais provavelmente da China. É uma planta aromática, dicotiledônea, de ciclo anual que ocorre naturalmente como parte da vegetação de estepe no norte das províncias Chahar e Suiyuan (40° N, 109° L) na China, entre 1000 e 1500 metros acima do nível do mar, porém atualmente também pertence de maneira selvagem em outros países, tais como Yugoslavíia, Hungria, Turquia, Argentina, França, Itália, Espanha (Ferreira, 1994). No Brasil, foi introduzida por pesquisadores do CPQBA/UNICAMP, os quais vêm realizando diversos experimentos com a espécie objetivando a otimização do cultivo em nossas condições (Figueira, 1995). Esta planta tem sido utilizada há séculos pelos chineses, pois contém uma importante droga com potente efeito medicinal antimalárico, sendo também um eficiente redutor de febres de várias origens. Esta droga, a artemisinina, é uma lactona sesquiterpênica encontrada principalmente na parte aérea de três espécies do gênero *Artemisia*: *A. annua*, *A. apiecea* e *A. lancea* (Sharma, 1991). A planta apresenta carácter arbustivo podendo atingir alturas variando entre 0,8 e 2,0 metros (Ferreira & Janick, 1996). Propaga-se vegetativamente e por sementes, reproduzindo naturalmente por fecundação cruzada por insetos ou ação do vento (Magalhães, 1996). Possui fotoperíodo crítico para indução de floração desde 11 (Magalhães, 1996) até 12 a 14 horas (Van Geldre *et al.*, 1997). O número de cromossomo é  $2n = 18$  (Ferreira, 1994).

Em *A. annua*, as folhas e principalmente as inflorescências do tipo capítulo são cobertas de muitos tricomas glandulares, cada um deles contendo 5 pares de células diferenciadas. Pelas diferenças ultraestruturais, deduz-se que cada par possui diferentes funções (Duke & Paul, 1993). Morfologicamente, o gênero *Artemisia* é dotado de inflorescências distribuídas ao longo de

toda haste e possui uma das maiores taxas evolucionárias dentro das dicotiledôneas. Este progresso na taxonomia pode aumentar a diversidade química, além de aumentar a síntese de metabólitos secundários mais complexos (ciclizados, rearranjados e/ou oxigenados). Nas espécies do gênero *Artemisia*, os tricomas glandulares são sítios de acúmulo de diversos produtos metabólicos, tais como monoterpenos, sesquiterpenos lactônicos, flavonóides e cumarinas (Duke & Paul, 1993). A família Asteraceae é caracterizada pela presença de inulina, ácidos graxos, lactonas sesquiterpênicas, álcoois triterpênicos, ácido cafêico, flavonas, flavonóis metilados, compostos acetilênicos e óleos essenciais e pela total ausência de taninos e de iridóides. (Hegnauer, 1964, citado por Lima, 1995). O óleo essencial de *A. annua* vem sendo utilizado na produção de vermute como aromático e na indústria de fragâncias (Charles *et al.*, 1991). A *A. annua* é produtora marcante de lactonas sesquiterpênicas dentro da família *Asteraceae*.

## AS LACTONAS SESQUITERPÊNICAS

Os terpenos são produtos naturais cuja a estrutura pode ser dividida em unidades de isopreno. As unidades de isoprenos originam-se biogeneticamente do acetato por via do ácido mevalônico e têm cadeias ramificadas, com cinco unidades de carbono que contêm duas ligações duplas. Os terpenos são classificados de acordo com a quantidade de unidades de isoprenos que possuem. Os monoterpenos, possuem duas unidades de isopreno; os sesquiterpenos, contêm três unidades de isopreno; os diterpenos, têm quatro unidades de isopreno; os triterpenóides, são compostos por seis unidades de isoprenos e os tetraterpenóides ou carotenóides têm oito unidades de isopreno (Robbers *et al.*, 1996). Segundo os mesmos autores, o número de diferentes terpenóides isolados de fontes naturais é de aproximadamente vinte mil, muito superior ao de qualquer outro grupo de produtos naturais. Dentre os terpenos, os sesquiterpenos têm a mais

ampla distribuição na natureza. As lactonas sesquiterpênicas são quimicamente distintas dos outros membros do grupo dos terpenóides, devido a presença de um sistema  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona. Muitas delas contêm carbonilas  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturadas, bem como epóxidos. Estes grupos funcionais representam sítios receptores reativos para nucleófilos biológicos, tais como tiol e os grupos amino das enzimas. Isso confere um amplo espectro de atividades biológicas a estes compostos, como por exemplo a atividade antimicrobiana e antitumoral. As lactonas sesquiterpênicas podem ser classificadas de acordo com o seu esqueleto carbocíclico; os três principais grupos são o dos germacranolídos, com um anel de dez membros, o eudesmanolídos, com dois anéis fundidos de seis membros, e o dos guaianolídos, com um anel de cinco membros fundido a um anel de sete membros. As lactonas sesquiterpênicas são substâncias incolores, com sabor amargo, lipofílicas e podem agir como reguladores de crescimento, como é o caso do ácido abscísico (Robbers *et al.*, 1996). Dentre as lactonas sesquiterpênicas produzidas pela *A. annua* estão: a artemisinina, artenuína-B, artenuína-C, artemisiteno, ácido artemisinínico, dihidro-epideoxi-artenuína B, epideoxi-artenuína B (Zaman & Sharma, 1991; Wallart *et al.*, 2000; Sy & Brown, 2001). Destas, a artemisinina têm importância reconhecida devido a sua eficiente ação anti-malária. A ligação interna de peróxidos que apresenta é essencial a sua atividade (Robbers *et al.*, 1996). A atividade terapêutica da artemisinina consiste na destruição da membrana celular do parasita, pois esta lactona sesquiterpênica peróxido provoca mudanças estruturais nas membranas levando à perda do citoplasma e conseqüente morte do parasita (Klayman, 1989). Para resolver o problema de baixa solubilidade da artemisinina, são utilizadas várias posologias e vias de administração, e foram desenvolvidos vários derivados mais potentes, com possibilidades farmacológicas mais apropriadas, como é o caso do Artemether, que é lipossolúvel e o artessunato de sódio, que é hidrossolúvel e pode ser administrado por via intravenosa. Segundo Tan *et al.* (1998), a artemisinina, bem com outros sesquiterpenos, como os

guaianolide, seco-guaianolide e eudesmanolide também são aplicados no tratamento de alguns tipos de câncer. Outras lactonas sesquiterpênicas encontradas na planta de *A. annua* têm sido relacionadas a diversas atividades biológicas. Segundo Dias (1997), frações ricas em lactonas sesquiterpênicas extraídas tanto da parte aérea quanto de raízes desta planta apresentaram atividade antiulcerogênica relacionada com mecanismos citoprotetores da mucosa gástrica, especialmente o aumento dos níveis de prostaglandinas. A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas dos extratos brutos etanólicos e diclorometânico das partes aéreas revelou a presença de substâncias com tempo de retenção entre 10 e 25 minutos em todos os extratos e frações ativas analisadas. Nesta região, são encontrados sesquiterpenos e lactonas sesquiterpênicas, que podem ser os responsáveis pelos efeitos observados. Além disso, os princípios ativos responsáveis pela atividade antiulcerogênica nesta espécie, apresentaram características de média polaridade, como a classe das lactonas sesquiterpênicas. A artemisinina, artenuína B e o ácido artemisinínico também estavam presentes nas frações analisadas, porém não apresentaram diminuição do índice de lesões ulcerativas. (Dias, 1997).

### **O PROCESSO DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA COM *Agrobacterium***

A família Rhizobiaceae de bactérias de solo pode ser dividida em dois grandes grupos: (A) bactérias fixadoras de nitrogênio (gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e outros) que apresentam tal característica quando crescendo livremente no solo em condições favoráveis ou em nódulos de raízes em plantas leguminosas, e (B) bactérias do gênero *Agrobacterium*, que são caracterizadas por sua capacidade de induzir hipertrofias em plantas. O gênero *Agrobacterium* compreende quatro espécies: *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *A. radiobacter* e *A. rubi*. O *A. tumefaciens* causa na planta infectada uma galha ou tumor ao nível da coroa (junção entre o caule e a raiz), sendo essa doença conhecida na Europa desde a Antiguidade e denominada galha

da coroa ("crown gall"). O *A. rhizogenes* causa a síndrome de raízes em cabeleira ("hairy-root disease"), que caracteriza-se pelo crescimento anormal de grande quantidade de raízes. O *A. rubi* infecta espécies vegetais específicas e induz tumores nas partes aéreas da planta e *A. radiobacter* é avirulenta, embora seja freqüentemente encontrada em estreita associação com as espécies virulentas (Gordon, 1981).

A habilidade de transformar células vegetais está correlacionada com a presença nos *Agrobacterium* de duas importantes regiões nos plasmídeos: região-T e a região de virulência (*vir*). A região-T do plasmídeo é transferida da bactéria para a planta durante a infecção, passando a ser denominada T-DNA ("transferred-DNA") após ser integrada no genoma vegetal. Nessa etapa, os genes presentes nessa região começam a se expressar dando início à manifestação dos sintomas da doença. Existem duas diferenças básicas entre células de tecidos normais e de tecidos transformados: (1) as células da galha da coroa e das raízes em cabeleira são tumorosas porque proliferam-se de modo autônomo por várias subculturas, mesmo na ausência de fitorreguladores (auxinas e citocininas) necessários para o crescimento de células vegetais normais; (2) as células tumorosas têm capacidade de produzir e excretar opinas (aminoácidos e derivados de açúcares) que são utilizadas pela bactéria para sua manutenção e que não são sintetizados pelas células normais. Os genes responsáveis por ambas as características localizam-se na região-T do plasmídeo, sendo que a combinação na biossíntese de fitohormônios regulada pelo T-DNA leva à morfologia tumorosa dos tecidos transformados. Os genes que controlam a biossíntese dos fitohormônios são de origem bacteriana, pois a rota biossintética de auxinas utilizada pelo *Agrobacterium* não é normalmente utilizada pelas plantas (Klee *et al.*, 1987). A região *vir* ou região de virulência é indispensável à transferência e integração da região-T no genoma nuclear das células da planta hospedeira. Localiza-se fora da região-T do plasmídeo, não sendo portanto transferida (Jouanin, 1984), e age a partir de estímulos enviados pela célula vegetal após o ferimento (exsudatos) que ativam os genes dessa região (Klee *et al.*, 1987).

As diferentes cepas de *Agrobacterium* e seus plasmídeos são classificados de acordo com a principal opina encontrada nos tecidos transformados (Birot *et al.*, 1987), visto que a bactéria não contém nem sintetiza as opinas. Cada cepa específica de *A. tumefaciens* ou *A. rhizogenes* induz à produção e ao armazenamento na planta infectada da opina necessária para a manutenção do metabolismo da bactéria correspondente. As opinas são produzidas tendo como precursores compostos comumente encontrados nas células vegetais, tais como alfa-ceto-ácidos, aminoácidos e açúcares simples, e a cepa de *Agrobacterium* responsável pela transformação da planta pode utilizá-las, seletivamente, como fonte de energia, carbono e/ou nitrogênio, de acordo com as suas necessidades. As opinas não apresentam função nas células vegetais e são utilizadas somente pela bactéria colonizadora que induziu a produção na planta, conferindo uma vantagem evolucionária ao *Agrobacterium* em relação a outras bactérias de solo (Saito *et al.*, 1992).

Sabe-se, de longa data, que no processo de infecção deve haver um ferimento no tecido vegetal para que haja penetração do *Agrobacterium* (Braun & Mandle, 1948). As células vegetais quando lesadas passam a exsudar compostos fenólicos, açúcares e aminoácidos em resposta ao ferimento e as bactérias são atraídas por esses compostos, multiplicando-se e fixando-se nas paredes celulares (Hooykaas & Schilperoort, 1992). Outro fator importante para que ocorra a transferência de genes diz respeito à temperatura. Segundo Moore *et al.* (1979) para que o processo ocorra é necessário que haja um tipo de interação sensível ao calor. Além disso, a bactéria perde a sua capacidade infecciosa quando exposta a temperaturas elevadas durante algumas horas.

Uma das primeiras etapas na indução do tumor refere-se à ativação coordenada do sistema de virulência, regulado pelos genes *vir*, que são ativados quando a bactéria, próxima às células lesadas, percebe as substâncias liberadas pela planta (Stachel & Zambryski, 1986). Quando esses genes são expostos aos exsudatos de ferimentos das células (compostos fenólicos de baixo peso molecular, tais como aceto-siringona ou hidróxi-aceto-siringona) passam a ser

ativados (Hooykaas & Schilperoort, 1992). Com a ativação dos genes *vir* ocorre a transferência da região-T do plasmídeo para a planta e a expressão do T-DNA após a integração no genoma vegetal. Depois de algum tempo o tumor começa a desenvolver-se devido às divisões celulares estimuladas pela produção, comandada pelo T-DNA, de auxinas e citocininas. Estes hormônios são poderosos agentes de crescimento que controlam vários aspectos relativos à proliferação, alongamento e diferenciação celulares. Como consequência de um balanço hormonal desregulado induzido pelo T-DNA, a multiplicação celular torna-se descontrolada iniciando-se o desenvolvimento do tumor. Com a integração e expressão do T-DNA no genoma da planta hospedeira, as células contendo esse T-DNA passam a produzir e excretar as opinas que são consumidas especificamente pela bactéria colonizadora.

Embora a transformação genética das células da planta hospedeira também represente a base da síndrome de raízes em cabeleira, este processo apresenta-se com algumas particularidades quando comparada com os tumores do tipo galha da coroa induzidos nas plantas através da infecção pelo *A. tumefaciens*. Segundo Van Sluys (1999), no T-DNA de *A. tumefaciens*, verifica-se a presença de genes codificadores da síntese de fitormônios. Estes genes são o *iaaH* e o *iaaM*, que codificam a síntese de ácido indolacético (AIA), uma auxina (Inzé *et al.*, 1984) e o gene *iptZ* que é responsável pelo fitormônio isopenteniladenina, uma citocinina (Barry *et al.*, 1984). Portanto, o crescimento do tecido, em forma de tumor, é decorrente de um aumento nas quantidades de auxina e citocinina endógena, gerado pela síntese *de novo* destas substâncias nas células transformadas. Por causa do aporte destes fitormônios, os tumores do tipo galha de coroa são quimeras, isto é, são formados por células transformadas pelo T-DNA e por células normais que também são sensíveis aos fitormônios em questão (Van Sluys, 1999). Por outro lado, as raízes em cabeleira induzidas através de infecção por *A. rhizogenes* são clonais, ou seja, cada raiz transformada é originada de uma única célula transformada. Desta maneira, as raízes transformadas são compostas somente por células

transformadas, constituindo, assim, clones celulares (Bercetche *et al.*, 1987; Van Sluys, 1999). Esta característica pode ser bastante vantajosa em processos de obtenção de plantas transgênicas a partir de raízes transformadas, muito embora diversos outros aspectos possam interferir nestes processos, tais como a recalcitrância da espécie (Jaziri *et al.*, 1995), as diferentes cepas de *A. rhizogenes* utilizadas no processo de transformação genética (Otani *et al.*, 1996), o antibiótico utilizado no momento da descontaminação e isolamento das raízes transformadas (Vergauwe *et al.*, 1996b), mudanças no número e/ou estrutura dos cromossomos após algumas subculturas (Xu & Jia, 1996), dentre outros. A regeneração de plantas a partir de tumores do tipo galha de coroa apresenta-se bem mais difícil de ser obtida, devendo sempre vir acompanhada de rearranjos importantes na estrutura do seu T-DNA retirando os genes que codificam a síntese dos hormônios auxina e citocinina (T-DNA desarmado) (Wullems *et al.*, 1981; Zambryski *et al.*, 1983; Van Sluys, 1999). Segundo Otani *et al.* (1996), o tipo de cepa de *A. rhizogenes* utilizada no processo de transformação pode influenciar não somente no processo de regeneração e obtenção de plantas transgênicas, mas também em processos anteriores como indução, taxa de crescimento e fenótipo das raízes obtidas, podendo interferir, ainda, na produção de alguns metabólitos secundários (Mallol *et al.*, 2001). A capacidade na indução de raízes varia entre as diferentes cepas de *A. rhizogenes*, de modo que algumas cepas apresentam-se mais eficientes no processo de infecção ou mais “virulentas” do que outras. A eficiência das cepas difere não somente quanto à quantidade de espécies vegetais que são capazes de infectar, como também com relação às respostas de inoculação em diferentes partes das plantas de uma mesma espécie. As cepas de *A. rhizogenes* que apresentam Ri plasmídeos tipo agropina (como por exemplo as cepas A4, 1855, 15834, entre outras) carregam e inserem no hospedeiro duas regiões T-DNA denominadas TL-DNA e TR-DNA (Jouanin, 1984) e apresentam-se mais virulentas que outras tipo manopina (como por exemplo as cepas 8196, TR107) ou cucumopina (NCPPB2659), que carregam somente uma região T-DNA

(Combard *et al.*, 1987; Dobigny *et al.*, 1995). A região TR-DNA carrega genes que codificam a biossíntese de auxinas e agropinas (Otani *et al.*, 1996; Malloí *et al.*, 2001) e a região TL-DNA é homóloga à região-T única das cepas dos outros tipos (Combard *et al.*, 1987). Ambas as regiões possuem funções rizogênicas tendo sido demonstrado que os genes envolvidos na biossíntese de auxinas (localizados na região do TR-DNA) são os responsáveis pela diferenciação primária das raízes após a infecção, enquanto os genes localizados na região do TL-DNA respondem pela proliferação contínua de raízes, característica fenotípica das raízes transformadas. A ação combinada das duas regiões de T-DNA das cepas mais virulentas passa a produzir uma melhor resposta infectiva em comparação a outras cepas menos virulentas, devido ao fato de que as cepas mais virulentas (tipo agropina) conseguem induzir o início da síntese de auxinas nas células hospedeiras, enquanto as outras cepas não apresentam tal capacidade (Cardarelli *et al.*, 1987). Alguns autores têm considerado importante o papel dos fragmentos de TL-DNA e TR-DNA nas diferentes morfologias observadas nas raízes transformadas de algumas espécies bem como na produção de alguns metabólitos secundários pelas mesmas. Por exemplo, em raízes transformadas de *Panax ginseng* obtidas pela inoculação da cepa A4 (produtora de agropina) foram observados diferentes fenótipos (Malloí *et al.*, 2001). Os autores relacionaram estes diferentes fenótipos com a capacidade de produção de biomassa e de ginsenosídeos (mistura de triterpenos). Moyano *et al.* (1999) demonstraram que o gene *aux*, situado no segmento de TR-DNA, proporcionaram às células transformadas uma adicional fonte de auxinas, a qual exerceu um importante papel tanto na morfologia como na produção de alcalóides em raízes transformadas de *Datura metel* e *Duboisia hybrid*. É sugerido ainda, que esta fonte adicional de auxinas poderia influenciar sobremaneira no processo de formação de brotos, regeneração e obtenção de plantas transgênicas, uma vez que promoveria um desequilíbrio hormonal endógeno afetando, assim, a relação auxina/citocinina favorável a estes processos (Otani *et al.*, 1996).

## OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho teve como objetivos:

- A obtenção de um banco de material homogêneo *in vitro* do genótipo superior (híbrido CPQBA 2/39 x PL5) usando a metodologia de cultura de ápices meristemáticos com a finalidade de se manter características desejáveis nas plantas obtidas, as quais serviram como fonte de explantes para os experimentos posteriores;
- Estudo das condições ideais para a iniciação, estabelecimento e cultura de raízes normais e transformadas;
- Estudos da morfogênese *in vitro* das raízes transformadas;
- Estudos químicos das raízes normais e transformadas para a avaliação da presença de terpenos de interesse, tais como: artemisinina, ácido artemisinínico, dihidro-epideoxi-artenuína B e deoxiartemisinina;
- Avaliação das atividades antimicrobianas (antifúngicas e antibacterianas) dos terpenos de interesse citados acima.

## CAPÍTULO I

### **OBTENÇÃO *in vitro* DO GENÓTIPO SUPERIOR DE *A. annua***

## RESUMO

O genótipo superior utilizado como fonte de explantes neste estudo se refere ao híbrido CPQBA 2/39 x PL5 de *A. annua*, o qual foi obtido pelo programa de melhoramento genético da MEDIPLANT e do CPQBA e cultivado nos campos experimentais CPQBA/UNICAMP. Devido a grande importância da manutenção das características genéticas de interesse deste híbrido superior, tais como alta produção de biomassa e de metabólitos secundários como artemisinina, o presente trabalho teve início a partir de um único explante meristemático, o qual foi excisado de uma única planta matriz *in vivo* durante a fase vegetativa. Posteriormente ao desenvolvimento do explante meristemático selecionado, o mesmo foi micropropagado via brotações laterais até a obtenção de uma quantidade adequada de plantas *in vitro*, as quais foram utilizadas como fontes de explantes para os experimentos dos capítulos posteriores.

Com o objetivo de se contornar alguns problemas inerentes ao híbrido em questão, neste capítulo procurou-se otimizar os protocolos necessários para a obtenção do banco de material homogêneo do genótipo superior. Foram testadas diversas metodologias para a esterilização das extremidades caulinares retiradas da planta matriz *in vivo* e para o isolamento do ápice meristemático caulinar. Destas metodologias a mais eficiente se resume nas seguintes etapas: lavagem prévia com água corrente de torneira por 20 minutos consecutivos; exposição curta (8 minutos) deste material ao hipoclorito de sódio 5 %; pré-armazenagem das extremidades caulinares esterilizadas em solução anti-oxidante “coquetel de banana” (100 mg/L de ácido ascórbico, 100 mg/L de ácido cítrico e 2,0 mg/L de cisteína) durante 1 hora em geladeira anteriormente ao isolamento dos ápices meristemáticos caulinares. Diversas interações entre auxina (AIB) e citocinina (BA) foram testadas. Dos meios de cultura testados, o MS totalmente desprovido de fitorreguladores foi o que mais favoreceu o desenvolvimento normal dos ápices meristemáticos caulinares.

## 1. INTRODUÇÃO

O genótipo superior utilizado como fonte de explantes neste estudo se refere ao híbrido CPQBA 2/39 x PL5 de *A. annua*, o qual foi cultivado nos campos experimentais CPQBA/UNICAMP (Fig. I. 1). Este híbrido é proveniente do cruzamento de um clone com características de florescimento tardio e de grande produção de folhas (PL5) selecionado dentre uma população original do Vietnã, com outro clone (2/39), da mesma população, com alto teor de artemisinina (maior que 1 %). A seleção, cruzamento e obtenção do híbrido melhorado foram realizados por Magalhães (1996) durante seu trabalho de doutoramento na Mediplant (Suíça). Os clones 2/39 e PL5 são ambos de uma mesma população do Vietnã (na Mediplant, designada Viet II). Os parentais também pertencem a populações melhoradas. Por ser um híbrido superior, com altos níveis de metabólitos secundários de interesse, a manutenção da fidelidade genética é muito importante. Por este motivo, o presente trabalho teve início a partir de um único explante meristemático, o qual foi selecionado e, posteriormente, micropropagado até a obtenção de uma quantidade adequada de plantas *in vitro* para realização de etapas posteriores. A propagação *in vitro* à partir de ápices caulinares meristemáticos é bastante importante na propagação de variantes genéticas únicos e/ou híbridos superiores, obtidos naturalmente ou em laboratório, já que a planta propagada desta maneira será idêntica à planta-mãe, pois os tecidos organizados dos meristemas apresentam maior estabilidade cromossômica (Murashige, 1974; D' Amato, 1977; Grout, 1990; Argollo Marques, 1996). Em adição, o ápice é uma estrutura organizada, que pode desenvolver-se diretamente em parte aérea, em meio de cultura adequado, sem passar pela fase de calo (Torres *et al.*, 1998). Outra grande vantagem da utilização da cultura de explantes meristemáticos está relacionada ao melhoramento fitossanitário e limpeza clonal de patógenos endógenos às plantas, tais como fungos, bactérias e, principalmente, micoplasmas e vírus.

Segundo Crocomo (1986) e Torres *et al.* (1998), os tecidos meristemáticos são insetos de grande parte dos microrganismos devido à ligação vascular incipiente com outros tecidos da planta. É conhecido da literatura que em uma infecção viral sistêmica, os vírus têm que ter acesso ao sistema vascular da planta (Nono-Womdim *et al.*, 1993; Torres *et al.*, 1998). Segundo os mesmos autores, há muitas evidências que o floema funciona como veículo para o transporte do vírus a longas distâncias, enquanto que o transporte célula a célula ocorre via plasmodesmatas. Portanto, a cultura de ápices caulinares meristemáticos não garante a exclusão total de vírus, pois alguns deles podem ser transportados via plasmodesmatas, e portanto, estar presentes no meristema apical. A probabilidade de se isolar tecidos livres de microrganismos e, principalmente, de vírus, está inversamente relacionada ao tamanho do explante (Murashige, 1977; Torres *et al.*, 1998). Segundo os mesmos autores, quanto menor o explante, menor será a insenção de contaminações, porém, menor será a taxa de sobrevivência e o desenvolvimento do meristema em planta. O tamanho do tecido meristemático utilizado como explante para fins de limpeza clonal varia muito de acordo com a espécie, mas, em geral, encontra-se na faixa de 0,1 a 0,5 mm englobando o domo meristemático (ou meristema propriamente dito) com um ou dois primórdios foliares mais a porção subjacente do caule (Sutter & Langhans, 1979; Betti, 1991; Argollo Marques, 1996; Torres *et al.*, 1998). Segundo Chiari & Bridgen (2002), explantes meristemático de 0,7 mm foram eficientes na erradicação do “*Alstroemeria mosaic potyvirus*” (AIMV) em 73,7% das plantas de *Alstroemeria* infectadas. A taxa de erradicação deste vírus caiu para 14,7% quando se aumentou o tamanho do explante meristemático utilizado para 2,0 mm. Geralmente, explantes constituídos apenas do domo meristemático não são usados em virtude da difícil manipulação, baixa taxa de sobrevivência e necessidade de um meio de cultura mais elaborado com adição de fitorreguladores exógenos para o sucesso do desenvolvimento do meristema em planta (Torres *et al.*, 1998). Segundo os autores, a presença dos primórdios foliares nos explantes é

desejável, pois estes, quando em desenvolvimento, são fontes de substâncias orgânicas essenciais, como por exemplo as auxinas e citocininas, que favorecem o crescimento dos ápices caulinares em cultura. Segundo Jacobs (1961) e Shabde & Murashige (1977), a síntese de auxina ocorre no segundo par de primórdio foliar, enquanto que a síntese de citocinina ocorre no terceiro. Por isso, muitos trabalhos com meristemas têm envolvido não somente a cúpula meristemática mas, também, os primórdios foliares. Segundo Cuzzuol (1993), as auxinas e citocininas estão intimamente ligados à divisão celular bem como ao crescimento do meristema e a interação entre ambas parece determinar a iniciação de novas folhas, da parte aérea e de raízes.

Indiscutivelmente, a cultura de ápices caulinares meristemáticos e posterior micropropagação para uma propagação clonal rápida em larga escala são métodos biotecnológicos de essencial importância não somente quanto ao aspecto fitossanitário, mas principalmente para a manutenção de genótipos superiores e produtivos. Entretanto, o desenvolvimento de um protocolo eficiente para uma determinada espécie vegetal, depende da otimização de diversos aspectos, tais como o tamanho do explante meristemático e a metodologia para seu isolamento, além de um meio de cultura adequado e do controle das condições ambientais e microambientais, contornando-se, assim, os problemas inerentes a cada cultura.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo deste capítulo foi desenvolver protocolos eficientes para os procedimentos de esterilização das extremidades caulinares excisadas da planta matriz *in vivo* (híbrido CPQBA 2/39 x PL5) e de isolamento dos ápices meristemáticos caulinares, bem como estudar as influências da interação entre fitorreguladores no desenvolvimento dos mesmos com a finalidade de se estabelecer as condições ideais para o cultivo *in vitro* do genótipo superior. A importância de se iniciar o cultivo *in vitro* a partir de um único ápice meristemático caulinar foi a manutenção do patrimônio genético do híbrido melhorado, o qual foi utilizado como fonte dos explantes para os experimentos dos capítulos posteriores.



Figura I.1: Planta vegetativa de *A. annua* (híbrido CPQBA 2/39 x PL5 = genótipo superior) cultivada nos campos experimentais do CPQBA/UNICAMP e utilizada como matriz *in vivo*. As setas indicam a localização aproximada das extremidades caulinares laterais que foram coletadas e, posteriormente, esterilizadas e levadas à câmara de fluxo laminar para o isolamento *in vitro* dos ápices meristemáticos caulinares.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. ASSEPSIA DO MATERIAL

Extremidades caulinares foram retiradas da planta matriz *in vivo* selecionada durante a fase vegetativa e levadas ao laboratório onde três procedimentos de esterilizações foram experimentados:

- Esterilização I: Mergulhou-se o material em solução de hipoclorito de sódio p.a. (5%) + 5 gotas do agente espalhante Tween 20 durante 20 minutos sob agitação constante. Em seguida, as extremidades caulinares foram mergulhadas em solução de fungicida Benlate (Benomyl) 1% v/v por 10 minutos sob agitação constante. Finalmente, procedeu-se às lavagens (4 vezes) em água destilada e autoclavada (Fig. I. 2A).
- Esterilização II: Primeiramente foi realizada uma lavagem em água destilada e autoclavada + algumas gotas de detergente comum mantendo o frasco por 10 minutos sob agitação constante. Em seguida mergulhou-se o material em uma solução de hipoclorito de sódio na mesma concentração da esterilização I, diminuindo-se o tempo de exposição de 20 para 12 minutos. Por último, procedeu-se às lavagens (4 vezes) em água destilada e autoclavada (Fig. I. 2B)
- Esterilização III: O material em lixiviação foi colocado numa peneira sob uma torneira com água corrente constante por 20 minutos. As etapas posteriores foram idênticas ao processo de esterilização II, sendo que o tempo de exposição a solução de hipoclorito de sódio foi diminuído de 12 para 8 minutos (Fig. I. 2C).

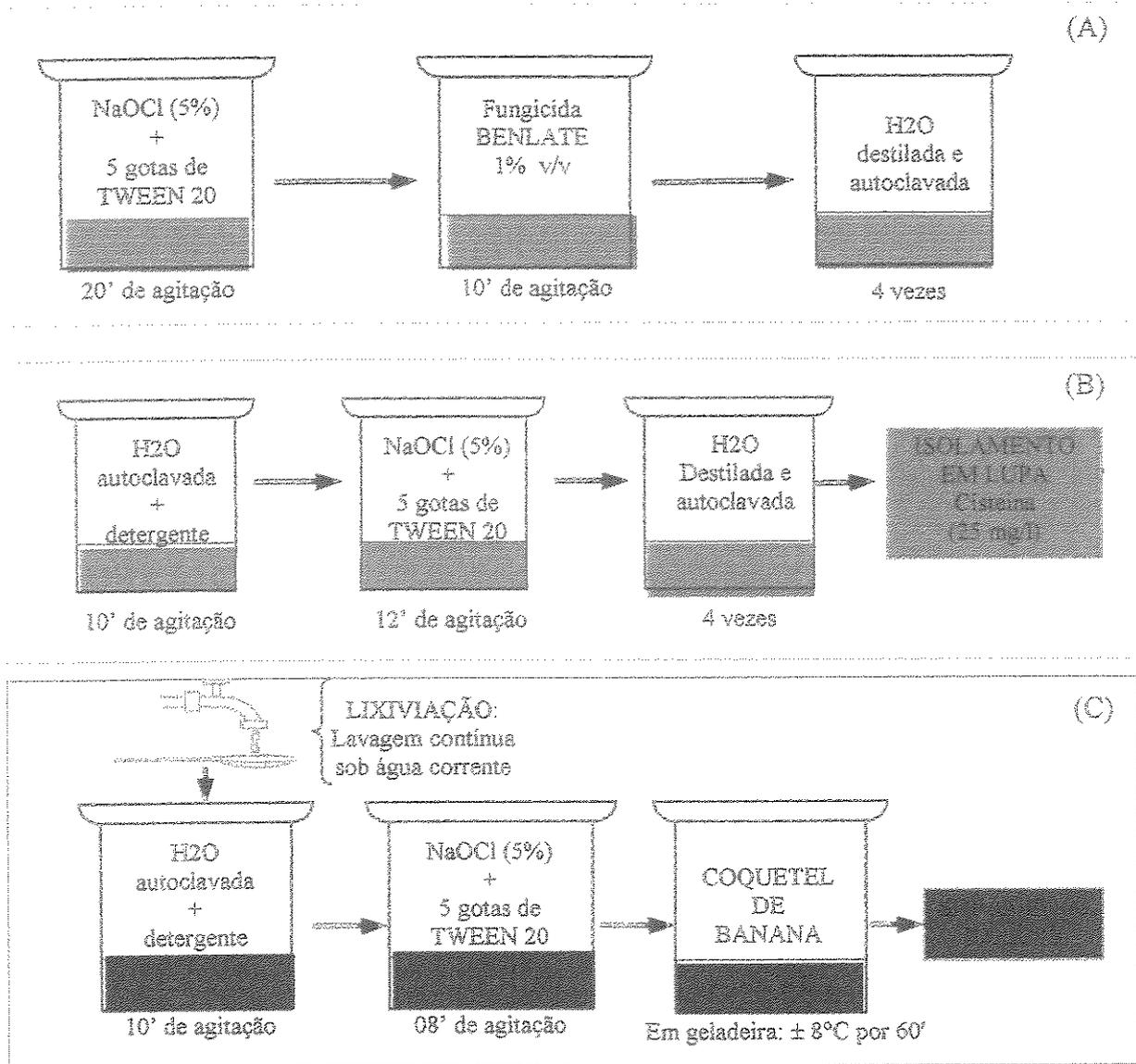


Figura I.2: Esquema dos procedimentos de esterilização e das metodologias utilizadas para o isolamento dos ápices meristemáticos caulinares. (A) Esterilização I: pré-tratamento com fungicida e utilização de NaOCl por 20 minutos. (B) Esterilização II – lavagem prévia do material com água + detergente comum; utilização de NaOCl por 12 minutos e de solução de cisteína durante o isolamento dos explantes. (C) Esterilização III – lavagem contínua sob água corrente por 20 minutos; utilização de NaOCl por 8 minutos e armazenamento do material em frasco contendo “coquetel de banana” (100 mg/L de ácido ascórbico, 100 mg/L de ácido cítrico e 2,0 mg/L de cisteína) por 60 minutos anteriormente ao isolamento dos explantes.

### 3.2. ISOLAMENTO DOS EXPLANTES MERISTEMÁTICOS

Os explantes utilizados consistiram de ápices meristemáticos caulinares de aproximadamente 0,5 mm contendo o domo meristemático mais dois ou três primórdios foliares (Fig. I.3). Após a esterilização, estes explantes foram isolados sob condições assépticas, utilizando-se um estereoscópio (lupa – marca comercial Micronal), pinças, agulhas e bisturis. Dois tipos de procedimentos foram testados. No primeiro, o material esterilizado foi mergulhado em uma placa de Petri contendo papel de filtro embebido em uma solução de cisteína 25 mg/L onde se procedeu o isolamento dos explantes meristemáticos (Fig. I.2B). No segundo, o material já esterilizado foi colocado em frasco erlenmeyer contendo uma solução denominada "coquetel de banana" (100 mg/L de ácido ascórbico, 100 mg/L de ácido cítrico e 2,0 mg/L de cisteína) (Linda Caldas, comunicação pessoal). Os frascos contendo o material vegetal estéril e mergulhado no "coquetel de banana" foram mantidos em geladeira ( $\pm 3^{\circ}\text{C}$ ) por 60 minutos antes do isolamento dos ápices meristemáticos caulinares (Fig. I.2C).

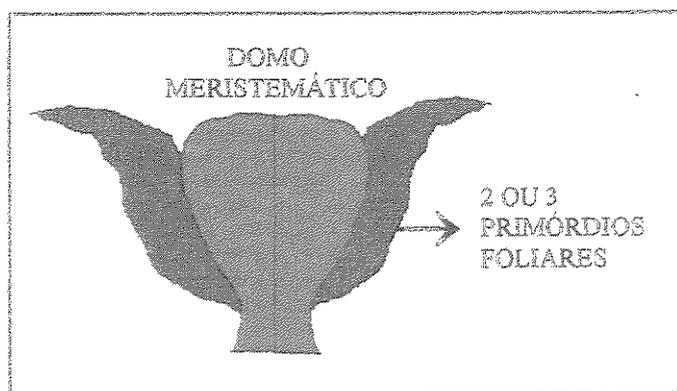


Figura I.3: Composição esquemática dos explantes meristemáticos utilizados (ápices meristemáticos caulinares): domo meristemático mais dois ou três primórdios foliares.

### 3.3. MEIOS DE CULTURA

O meio de cultura utilizado para a inoculação dos ápices meristemáticos caulinares foi o meio MS sólido acrescido das seguintes concentrações de fitorreguladores: 0,0; 0,01 e 0,1 mg/L de auxina (AIB) e 0,0; 0,2; 0,4 e 0,8 mg/L de citocinina (BA). O pH foi ajustado a 5,8 anteriormente a autoclavagem. Os explantes foram mantidos à temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  e sob fotoperíodo de 16 horas. No total, foram realizados 12 tratamentos com três repetições cada, tendo sido inoculados, portanto, 36 ápices meristemáticos caulinares, pois foi inoculado um explante por frasco (tubetes de 8,5 de comprimento e 2,0 de diâmetro).

### 3.4. BANCO DE MATERIAL HOMOGÊNIO DO GENÓTIPO SUPERIOR

#### *in vitro*: INICIAÇÃO E MANUTENÇÃO

A iniciação e manutenção de um banco de material homogêneo do genótipo superior *in vitro* é mostrada esquematicamente na sequência das Figs. I.4a e I.4b. Os explantes iniciais utilizados foram retirados das extremidades caulinares de uma única planta do híbrido CPQBA 2/39 x PL5 selecionada durante sua fase vegetativa nos campos experimentais do CPQBA (planta matriz *in vivo*). Após os procedimentos otimizados de esterilização e isolamento (Fig. I.2C), o ápice meristemático caulinar selecionado foi imediatamente inoculado em um tubete contendo o meio MS sólido desprovido de fitorreguladores (Fig. I.4a). Um único ápice meristemático caulinar diferenciou-se em uma única planta de aparência sadia (planta matriz *in vitro*), a qual deu origem as demais plantas via brotações laterais. Segmentos nodais contendo uma gema e uma folha e medindo aproximadamente 1,0 cm de comprimento foram excisados assepticamente da parte central da região caulinar desta planta matriz *in vitro* e transferidos para o meio de multiplicação MS sólido (Fig. I.4b). As plantas *in vitro* assim

obtidas, foram novamente multiplicadas via brotações laterais. Este processo se repetiu mensalmente até a obtenção de um estoque com número adequado de plantas saudáveis e bem enraizadas *in vitro* (Fig. I.5), com as quais se iniciou as demais etapas deste trabalho.

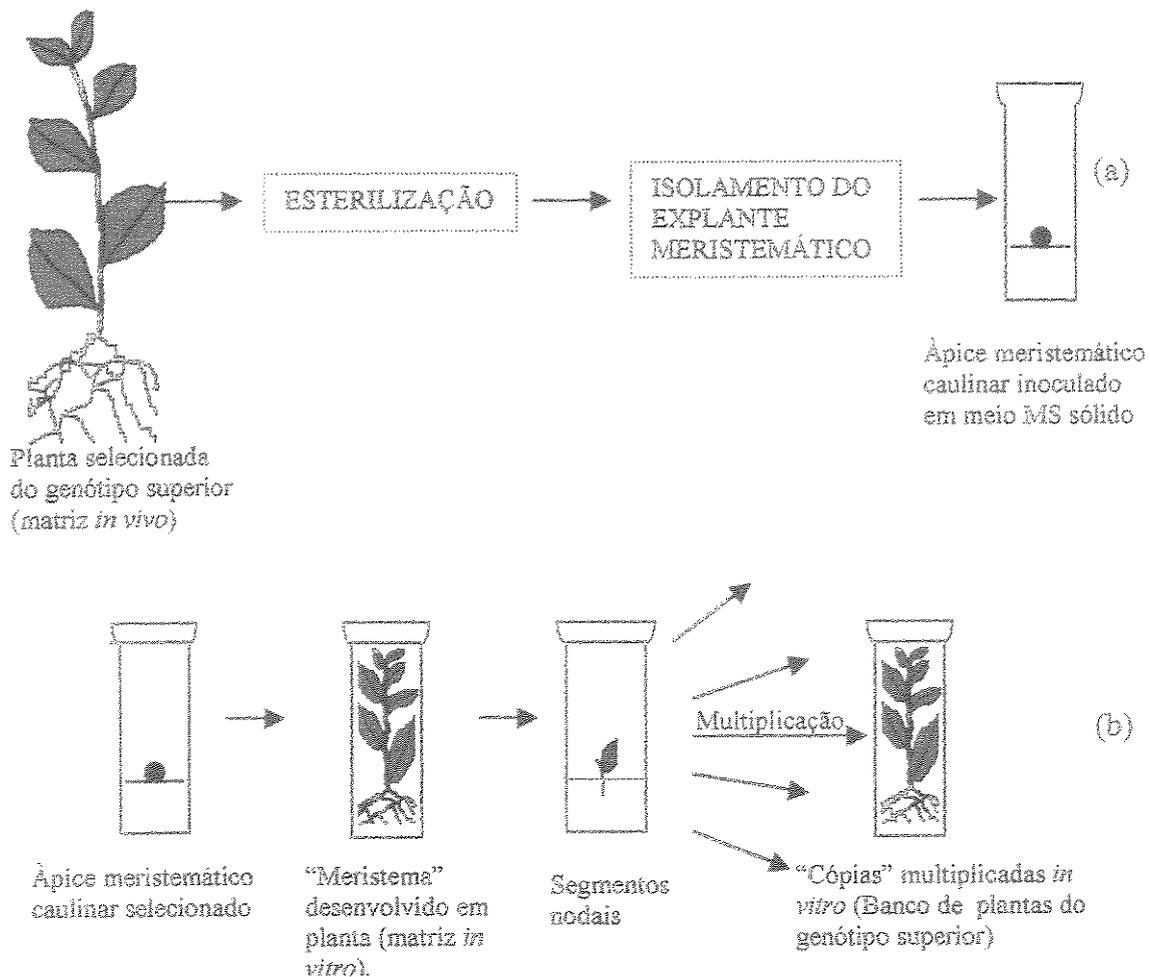


Figura I.4: Esquema da iniciação e manutenção de um banco de material homogêneo do genótipo superior *in vitro*. (a) Excisão das extremidades caulinares da planta matriz *in vivo* selecionada (genótipo superior); realização dos procedimentos otimizados de esterilização, isolamento (Fig. I.2C) e inoculação do ápice meristemático caulinar selecionado em meio MS sólido sem fitorreguladores. (b) Desenvolvimento do ápice meristemático caulinar em uma única planta (matriz *in vitro*) e micropropagação da mesma via brotações laterais a partir de segmentos nodais até a obtenção de um banco de plantas saudias.



Figura I.5: Aspecto das plantas constituintes do banco de material homogêneo do genótipo superior cultivadas *in vitro*. Estas plantas foram utilizadas como fontes de explantes para os experimentos subsequentes descritos nos capítulos posteriores.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. PROCEDIMENTOS DE ESTERILIZAÇÃO

A otimização das metodologias para os procedimentos de esterilização das extremidades caulinares excisadas da planta matriz *in vivo* e isolamento dos ápices meristemáticos caulinares foi de extrema importância para o sucesso da obtenção de um banco de material homogêneo do genótipo superior *in vitro*. A grande susceptibilidade da *A. annua* à oxidação levou a necessidade da elaboração de diferentes procedimentos de esterilização e de isolamento do explante meristemático a fim de se alcançar um protocolo ótimo. Quanto aos procedimentos de esterilização, observou-se que a utilização de um pré-tratamento com fungicida (benlate-Benomyl - 1 % v/v) aliado à exposição a um agente desinfetante (hipoclorito de sódio - 5 %) por um tempo prolongado (20 minutos), resultou em oxidação total dos tecidos dos explantes (Fig. I.6 - esterilização I). A ausência do pré-tratamento com fungicida e a diminuição do tempo de exposição ao hipoclorito de sódio (5 %) de 20 para 12 minutos parecem ter sido favoráveis ao aumento da porcentagem de explantes não oxidados (40 %) sem haver prejuízo quanto ao aspecto de contaminação após inoculação dos explantes meristemáticos em meio de cultura. (Fig. I.6 - esterilização II). A redução ainda maior do tempo de exposição ao hipoclorito de sódio de 12 para 8 minutos realizada no procedimento de esterilização III, parece ter sido mais eficiente no controle dos dois problemas: oxidação e contaminação, pois foi obtido 96 % de explantes sadios (Fig. I.6- esterilização III). A lixiviação por pré-lavagem do material vegetal (extremidades caulinares) por 20 minutos consecutivos em água corrente de torneira parece ter contribuído positivamente para o aumento da porcentagem de explantes sadios. É importante ressaltar que numa planta medicinal nativa, *Maytenus ilicifolia* ou, popularmente, “Espinheira Santa”, resultados

semelhantes foram obtidos (Ana Maria Pereira, comunicação pessoal). Para *A. annua*, esta prévia lixiviação de impurezas, microorganismos superficiais e substâncias fenólicas oxidantes solúveis presentes no material vegetal possibilitou a diminuição da exposição ao agente desinfetante (hipoclorito de sódio - 5 %) sem prejudicar a eficiência do procedimento de esterilização quanto a solução de problemas inerentes a planta *A. annua*, tais como oxidação e contaminação.

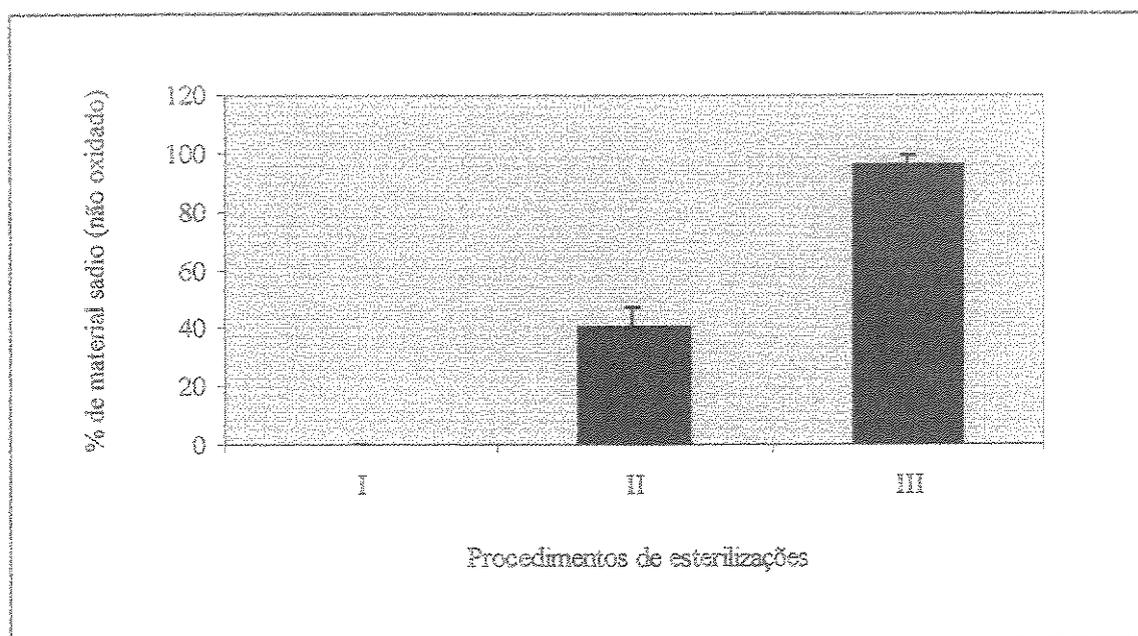


Figura I.6: Relação entre os tipos de procedimentos de esterilização e a porcentagem de explantes sadios obtidos. Esterilização I: pré-tratamento com fungicida e utilização de NaOCl por 20 minutos. Esterilização II – lavagem prévia do material com água + detergente e exposição ao NaOCl por 12 minutos. Esterilização III – lavagem contínua sob água corrente por 20 minutos e exposição ao NaOCl por 3 minutos. As barras representam o desvio padrão da média ou erro da média.

## 4.2. ISOLAMENTO DOS EXPLANTES: USO DE AGENTES ANTI-OXIDANTES

Outra etapa crítica quanto a oxidação do material foi o isolamento dos ápices meristemáticos caulinares. O fluxo de ar da câmara asséptica e o tempo demandado bem como as injúrias decorrentes deste procedimento podem contribuir para o aumento da oxidação e desidratação podendo levar à morte dos tecidos vegetais. Portanto, o isolamento do explante meristemático deve ser realizada o mais rapidamente possível, o que exige treinamento e destreza manual do operante. Alguns procedimentos podem facilitar e/ou diminuir o risco de oxidações nesta etapa. Um destes procedimentos é o uso de soluções anti-oxidantes. A imersão do material esterilizado em solução de cisteína (25 mg/L) no momento do isolamento não foi um procedimento favorável, pois os explantes tornaram-se moles dificultando a extração dos ápices meristemáticos caulinares. No entanto, a manutenção dos explantes esterilizados em frasco contendo “coquetel de banana” (100 mg/L de ácido ascórbico, 100 mg/L de ácido cítrico e 2,0 mg/L de cisteína) (Linda Caldas, comunicação pessoal) durante 60 minutos em geladeira anteriormente ao isolamento dos ápices meristemáticos caulinares contribuiu intensamente para o sucesso desta etapa. Além do efeito da combinação das três substâncias anti-oxidantes presentes no “coquetel de banana”, a manutenção do frasco à temperatura de aproximadamente 8°C também pode ter favorecido para a diminuição do processo de oxidação, pois temperaturas baixas, normalmente, desaceleram o metabolismo celular, diminuindo a velocidade de inúmeras reações, inclusive das reações de oxidação dos compostos fenólicos presentes.

O tamanho dos explantes utilizados (aproximadamente 0,5 mm) foi adequado e permitiu a sobrevivência dos mesmos após inoculação no meio de cultura. A grande vantagem da utilização de ápices caulinares meristemáticos para *A. annua* foi que os primórdios foliares parecem ter atuado como um “escudo protetor” diminuindo, assim, os problemas relacionados

aos processos de desidratação e oxidação. Além disso, os primórdios foliares em desenvolvimento produzem hormônios vegetais endógenos, os quais são essenciais ao desenvolvimento e sobrevivência dos explantes mesmo em meio de cultura desprovido de fitorreguladores exógenos (Torres *et al.*, 1998).

#### **4.3. INTERAÇÃO DE FITORREGULADORES E DESENVOLVIMENTO DE ÁPICES MERISTEMÁTICOS**

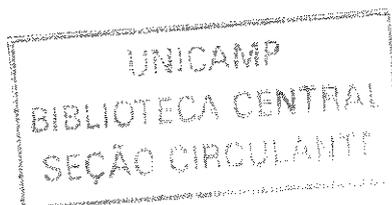
A influência da interação entre os fitorreguladores AIB e BA no desenvolvimento dos ápices meristemáticos caulinares pode ser observada pelo diagrama da Fig. 1.7. Os ápices meristemáticos caulinares inoculados em meio MS sem a adição de fitorreguladores foram os que apresentaram melhor desenvolvimento tanto da parte aérea quanto de raízes, originando plantas com aspecto normal, as quais atingiram uma altura média do eixo caulinar de  $1,7 \pm 0,47$  cm (em análise aos 20 dias após a instalação do experimento) e  $3,9 \pm 0,35$  cm (aos 40 dias). Nos meios de cultura acrescidos de apenas AIB na concentração de 0,01 mg/L, também se obteve plantas de aspecto normal, porém menos desenvolvidas e com pequenos calos basais. A grande desvantagem da formação destes calos basais é que, muitas vezes, eles provocam variabilidades genéticas indesejáveis, principalmente na forma de poliploidização e aneuploidização (Amiratto, 1983). Estas plantas atingiram altura média de  $1,5 \pm 0,68$  cm (aos 20 dias) e  $3,5 \pm 0,51$  cm (aos 40 dias) e a visualização das raízes foi possível somente após 20 dias da inoculação dos ápices meristemáticos caulinares. Todas as demais interações entre os fitorreguladores AIB e BA resultaram em plantas com alterações no desenvolvimento, tais como: formações de grandes calos basais, vitrificação das folhas e entouceiramento.

BA AIB mg/L mg/L	0,0	0,2	0,4	0,8
0,0	 (a)	 (b)	 (c)	 (d)
0,01	 (e)	 (f)	 (g)	 (h)
0,1	 (i)	 (j)	 (k)	 (l)

Figura I.7: Esquema dos fenótipos das plantas de *A. annua* obtidas 30 dias após a inoculação dos ápices meristemáticos caulinares nos meios MS sólidos contendo diversas interações entre AIB e BA. Observa-se formação de calos em todos os tratamentos exceto no tratamento (a), cuja planta foi utilizada como matriz *in vitro*.

## 5. CONCLUSÕES

A importância deste capítulo refere-se ao sucesso da obtenção de um protocolo eficiente para iniciação e manutenção de um banco de material homogêneo do genótipo superior *in vitro*, a partir de um único ápice meristemático caulinar multiplicado sucessivamente via brotações laterais até a obtenção de um número adequado de “cópias” do híbrido melhorado (CPQBA 2/39 x PL5), as quais serviram de fontes de explantes para os experimentos subsequentes dos capítulos posteriores deste trabalho. A metodologia mais eficiente para esterilização das extremidades caulinares excisadas da planta matriz *in vivo* englobou as seguintes etapas: uma lavagem prévia com água corrente de torneira por 20 minutos consecutivos e, em seguida, exposição curta (8 minutos) deste material ao hipoclorito de sódio (5 %). O procedimento de isolamento dos ápices meristemáticos caulinares foi otimizado pela pré-armazenagem das extremidades caulinares esterilizadas em solução antioxidante “coquetel banana” (100 mg/L de ácido ascórbico, 100 mg/L de ácido cítrico e 2,0 mg/L de cisteína) durante 1 hora em geladeira. O tamanho dos explantes meristemáticos utilizados foi adequado e permitiu a sobrevivência dos mesmos após inoculação em meio de cultura. A inoculação de um único ápice meristemático caulinar em meio MS sem fitorreguladores favoreceu o desenvolvimento e crescimento normal de uma planta (matriz *in vitro*), a qual foi selecionada e multiplicada via brotações laterais.



## **CAPÍTULO II**

### **INICIAÇÃO, ESTABELECIMENTO E CULTURA DE RAÍZES NORMAIS E TRANSFORMADAS COM *Agrobacterium rhizogeneses***

## RESUMO

O estudo da viabilização e da otimização de protocolos para produção em larga escala de importantes princípios ativos é extremamente necessária já que a maioria destes são encontrados em baixíssimos níveis nas plantas. O incremento da produção de alguns destes metabólitos de interesse poderia ser conseguido através do uso de técnicas biotecnológicas, como por exemplo a cultura de raízes normais e/ou transformadas geneticamente. No caso de metabólitos produzidos pelas raízes, a cultura *in vitro* é uma metodologia que apresenta inúmeras vantagens quanto ao isolamento, identificação e extração destes princípios ativos. A cultura de raízes transformadas através da inoculação com *Agrobacterium rhizogenes* apresenta a vantagem adicional da rápida proliferação sem a necessidade da adição de fitorreguladores. Diversas metodologias foram desenvolvidas com a finalidade de se estudar as condições ideais para a iniciação, o estabelecimento e a cultura de raízes normais e transformadas do genótipo superior de *A. annua*. Para o estabelecimento das raízes normais o meio MS sólido foi utilizado sem fitorreguladores ou suplementado com duas auxinas: AIB (0,01 mg/L) e AIA (0,01 e 0,1 mg/L). A influência das condições fotoperiódicas de cultivo no crescimento destas raízes também foi investigada. Para tanto, as raízes em meio MS sólido foram cultivadas sob duas condições: fotoperíodo de 16 horas e escuro contínuo. As raízes transformadas foram obtidas através da inoculação de mini-estacas com as cepas 15834 e 8196 de *A. rhizogenes*. Cada raiz que surgiu no ponto de inoculação foi isolada antes da etapa seguinte, de desinfecção. Para esta etapa, três antibióticos foram testados: cefataxime (100 mg/L), cefalexina (1 g/L) e vancomicina (500 mg/L com gradual redução mensal para 250 mg/L e 100 mg/L). Foram obtidos 16 clones: FL, C1, C3, C5, C6, C7, C8, C10, C11, C12, C14, C15 resultantes da inoculação com a cepa 15834 e C1\*, C2\*, C3\*, C4\* resultantes da inoculação com a cepa 8196. Para o cultivo das raízes transformadas foram testados quatro

tipos de meios básicos sólidos: MS, White, B<sub>5</sub> e B<sub>5</sub>/2. Para a determinação e comparação das taxas de crescimento dos clones bem como das raízes normais, explantes radiculares foram excisados das raízes transformadas e normais cultivadas em meio MS sólido sob condição de escuro e transferidos para o meio MS líquido mantido sob fotoperíodo de 16 horas. As raízes normais quando cultivadas nos meios MS e MS acrescido de 0,01 mg/L de AIB apresentaram um bom crescimento. Notou-se a formação de calos basais e diminuição do crescimento destas raízes quando cultivadas nos meios acrescidos de AIA, em ambas as concentrações testadas. Quanto as condições de cultivo, observou-se maior crescimento quando as raízes foram cultivadas sob escuro contínuo. A metodologia de transformação utilizada foi um sucesso. Das cepas de *A. rhizogenes* utilizadas, a 15834 revelou-se mais virulenta que a 8196. A confirmação da transformação genética por “Dot Blot” não foi possível apenas para as raízes dos clones C1 e o C2\*. O cefotaxime, na concentração de 100 mg/L, foi o antibiótico mais eficiente quanto a descontaminação das raízes e o único que não prejudicou o crescimento e desenvolvimento normal das mesmas. Dos meios básicos testados, o MS foi o que mais favoreceu o crescimento das raízes transformadas bem como o aparecimento de raízes secundárias. Foram obtidos três tipos de fenótipos de raízes transformadas: “raízes em cabeleira”; raízes finas e sem ramificações e um fenótipo diferenciado caracterizado por raízes engrossadas com aspecto semelhante a calos obtido exclusivamente para o clone C14. O crescimento das raízes transformadas foi sempre maior que das raízes normais, nos três fenótipos observados. Dos clones obtidos, os clones C6, C7 e C8 foram os que apresentaram maiores taxas de crescimento quando as raízes foram cultivadas em meio MS líquido. Amostras das raízes pertencentes a estes clones foram secadas e armazenados em “freezer” para as análises químicas posteriores.

## 1. INTRODUÇÃO

As raízes são órgãos heterotróficos, de forma que muitos processos são alterados, por exemplo, quando um ápice radicular é isolado e transferido para um meio de cultura (Kerbauf, 1998). Este fato se deve a instabilidade genética da cultura de tecidos, pois as exigências nutricionais e ambientais específicas da planta são maiores quando cultivada *in vitro* e diferentes das exigências da planta cultivada em campo (Grattapaglia & Machado, 1998). Segundo Nogueira (1999), existem inúmeras vantagens da cultura de tecidos sobre a extração dos metabólitos secundários direto das plantas e dentre elas podemos citar: a facilidade de separação do composto de interesse devido a uma menor complexidade do extrato; a independência dos vários fatores ambientais, incluindo clima, pragas, doenças e limitações geográficas e estacionais; a otimização dos parâmetros de crescimento e de produção (meio, pH, luz, temperaturas, etc.), para fornecer a substância de interesse em rendimentos mais elevados do que em plantas; o controle e conseqüente reprodutibilidade das condições de crescimento em laboratório. Do ponto de vista da fitoquímica, a utilização de raízes para trabalhos com metabólitos secundários é mais interessante que a utilização da parte aérea, pois nas raízes a ausência ou limitada presença da clorofila e de substâncias graxas facilitam o isolamento e purificação dos compostos de interesse (Dias, 1997). No caso de metabólitos produzidos pelas raízes, a utilização da técnica de cultura de raízes *in vitro* pode ser extremamente viável. Segundo Grattapaglia & Machado (1998), a composição nutritiva básica dos meios de culturas mais utilizados para este fim são o MS e o de White. A adição de fitorreguladores a estes meios, principalmente de auxinas, influenciam sobremaneira o processo de enraizamento. Dentre as auxinas mais utilizadas para a manutenção e crescimento das raízes *in vitro* estão o AIA e AIB, sendo que as concentrações empregadas no meio de cultura, variam conforme a espécie. Concentrações excessivas de auxinas, normalmente levam a formação de calos na base dos explantes, comprometendo,

deste modo, a rizogênese. A suplementação de auxinas pode incrementar o crescimento de raízes normais cultivadas *in vitro*, porém também podem causar modificações significativas na produção de alguns metabólitos secundários (Hashimoto *et al.*, 1986; Norton & Towers, 1986). Segundo Endress (1994), os efeitos das auxinas na produção de metabólitos secundários também variam de acordo com o tipo e concentração da auxina utilizada, sendo que alguns metabólitos são produzidos ou têm sua produção aumentada quando as auxinas estão presentes em concentrações muito baixas (0,01-0,2 µg/mL), enquanto que outros requerem concentrações mais elevadas. O autor relata ainda que o uso de auxinas com alta atividade fisiológica tem um especial efeito inibitório em culturas em que os metabólitos secundários se acumulam paralelamente ao crescimento da cultura *in vitro*, sendo recomendado, nestes casos, o uso de auxinas de baixa atividade fisiológica. Além do uso de fitorreguladores, outros parâmetros podem exercer grande influência na produção de diversos compostos secundários, tais como: o uso de diferentes concentrações de macro e micronutrientes e de elementos bióticos e abióticos; pH e grau de aeração; frequência de agitação dos frascos, condições fotoperiódicas de cultivo e temperatura (Rokem & Goldberg, 1985; Roper *et al.*, 1985).

A obtenção de raízes transformadas pela inoculação de *A. rhizogenes* é uma metodologia que tem sido muito utilizada ultimamente para obtenção de alguns compostos secundários em plantas. Muitos destes compostos possuem valor de mercado elevado, justificando sua exploração mesmo para culturas com capacidade de síntese pequena (Hamill *et al.*, 1987). Em alguns casos, a transformação não afeta as quantidades relativas de compostos secundários sintetizados e as concentrações geralmente se encontram nos mesmos níveis que as raízes normais (Endress, 1994), sendo que as diferenças básicas referem-se à taxa de crescimento das culturas. O cultivo de raízes transformadas geralmente origina culturas de crescimento mais rápido que as normais, sem a necessidade da utilização de

fitorreguladores. O processo de inoculação de *Agrobacterium* em diversas espécies de plantas, ocasionando a inserção de genes da bactéria ao genoma nuclear da célula vegetal através da transferência do T-DNA pode proporcionar mudanças no metabolismo destas plantas, uma vez que os genes transferidos se expressam de maneira estável. Esta expressão ocorre somente porque todos os genes presentes no T-DNA, apesar de sua origem procariota, possuem sinais de regulação que podem ser reconhecidos pelo sistema de transcrição eucariota vegetal (Van Sluys *et al.*, 1992; Brasileiro, 1993; Zupan & Zambryski, 1995; Ream & Gelvin, 1996). No caso de *A. rhizogenes*, a inoculação com diferentes cepas tem proporcionado resultados distintos tanto na indução, taxa de crescimento e fenótipo das raízes como na regeneração destas raízes em plantas transgênicas (Otani *et al.*, 1996) e na produção de alguns metabólitos secundários (Mallol *et al.*, 2001). Segundo Capone *et al.* (1989), Caboni *et al.* (1996), Otani *et al.* (1996), e Mallol *et al.* (2001), nas cepas produtoras de agropina, dois fragmentos de T-DNA (TL-DNA-“left” e TR-DNA-“right”) são separadamente transferidos para o material vegetal. A integração do TL-DNA ao genoma da planta é essencial para o desenvolvimento das raízes transformadas. Os genes *rol* (A, B, C e D) localizados neste fragmento estão envolvidos na formação e indução da diferenciação radicular. O TR-DNA carrega genes que codificam a síntese de opinas e auxinas. Apesar do TR-DNA não ser essencial à formação de das raízes transformadas, tem sido demonstrado que os genes *aux* inseridos neste fragmento de T-DNA proporcionam uma adicional fonte de auxina às células transformadas (Mallol *et al.*, 2001). Dobigny *et al.*, (1995), nas cepas produtoras de manopina e de cucumipina, o plasmídeo pRi carrega apenas uma fração de T-DNA que codifica a síntese de opinas e carrega os genes *rol*, não havendo genes codificadores da síntese de auxinas. Durante o processo de transformação utilizando as cepas produtoras de agropina, pode haver transferência, ao acaso, do fragmento TL-DNA, do fragmento TR-DNA ou de ambos para o genoma da planta inoculada (Marie-Anne Van Sluys, comunicação pessoal), originando clones

com diferentes fenótipos e diferentes balanço endógeno de hormônios, influenciando em muitos processos relacionados à transformação.

A confirmação do caráter transgênico do material vegetal obtido a partir da transformação genética pode ser realizada por diversas análises biomoleculares. Para transformações utilizando cepas de *Agrobacterium* produtoras de manopínas e cucumipina, o teste de opinas pode ser utilizado com sucesso, pois estas cepas possuem um único T-DNA. Porém, no caso de cepas produtoras de agropina, este teste não é eficiente, sendo recomendada a utilização de outras análises biomoleculares como o “Dot Blot” (Thomas, 1983), o “Southern Blot” (Chen *et al.*, 2000; Ohara *et al.*, 2000) ou o PCR (Vergauwe *et al.*, 1996a). O “Dot Blot” permite uma análise molecular semi-quantitativa ou qualitativa fornecendo um método rápido e eficiente de “screening” (Thomas, 1983), já o “Southern Blot”, permite uma análise mais detalhada e quantitativa. O PCR é uma metodologia que requer otimização em relação a espécie a ser analisada e a diversos outras etapas da análise. Vergawe *et al.* (1996a) observou que o PCR foi altamente influenciado pelo método de extração de DNA. Quando os autores utilizaram o método de extração de Stacey & Isaac (1994) obtiveram sucesso nas reações de PCR em todos os casos, porém, quando utilizaram o método de Dellaporta *et al.* (1983) não obtiveram resultados positivos.

## 2. OBJETIVOS

Este capítulo teve como objetivo desenvolver metodologias para o estudo das condições ideais para a iniciação, o estabelecimento e a cultura de raízes normais e transformadas pela inoculação de mini-estacas do híbrido CPQBA 2/39 x PL5 de *A. annua* com duas cepas de *A. rhizogenes* (15834 e 8196). A finalidade da obtenção da cultura destas raízes *in vitro* foi a aquisição de explantes radiculares tanto para estudos da morfogênese como para estudos químicos relacionados a avaliação da presença dos terpenos de interesse: artemisinina, ácido artemisinínico, dihidro-epidéoxi-artenuína B e deoxiartemisinina.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. MATERIAL VEGETAL E BACTERIOLÓGICO

Da planta matriz *in vivo* (híbrido CPQBA 2/39 x PL5 = genótipo superior) foi retirada uma extremidade caulinar, a qual foi esterilizada e, posteriormente, levada à câmara asséptica para o isolamento do ápice meristemático caulinar. Este único ápice meristemático caulinar foi, então, inoculado em meio MS sólido e desenvolveu-se em uma única planta de aparência sadia e bem enraizada (matriz *in vitro*), a qual foi multiplicada via brotações laterais dando origem as demais plantas. Estas plantas foram novamente multiplicadas. Este processo se repetiu mensalmente até a obtenção de um banco contendo um número adequado de “cópias” do genótipo superior *in vitro*. Deste banco de plantas foram retirados os explantes radiculares para os experimentos com as raízes normais e os segmentos nodais para inoculação do *A. rhizogenes* e estabelecimento e cultivo das raízes transformadas realizados neste capítulo.

Utilizou-se, como material bacteriológico, duas cepas de *A. rhizogenes* (8196 e 15834), as quais foram gentilmente cedidas pela Dra. Marie-Anne Van Sluys do Laboratório de Biologia Celular de Plantas do Departamento de Botânica da USP. As repicagens para manutenção das bactérias foram realizadas periodicamente utilizando-se alça de platina, em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro, cada placa contendo 10 mL de meio LB (Tabela II.1). Após cada repicagem das bactérias as placas foram mantidas no escuro, à temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , durante cerca de 48 horas até o crescimento das colônias. Em seguida, estas placas foram embrulhadas em papel alumínio e mantidas a  $5^{\circ}\text{C}$  em geladeira durante mais ou menos 30 dias até uma nova repicagem.

Tabela II.1: Constituição do meio LB utilizado para cultivo das cepas 15834 e 8196 de *A. rhizogenes*.

Componentes	Concentrações
Bacto triptona	10,0 g/L
Extrato de levedura	5,00 g/L
NaCl	5,00 g/L
Difco bacto-ágar	5,00 g/L
NaOH	300 µL/L

Esterilização em autoclave à 120°C e 1 atm durante 20 minutos e pH = 7,3

### 3.2. RAÍZES NORMAIS: ESTABELECIMENTO E CONDIÇÕES FOTOPERIÓDICAS DE CULTIVO *in vitro*

Para o estabelecimento das raízes normais *in vitro*, explantes radiculares (pedaços de raízes com cerca de 3 cm de comprimento contendo o ápice) foram inoculados em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo meio MS líquido acrescido de diferentes tipos e concentrações de auxinas: meio M1 = MS; meio M2 = MS + 0,01 mg/L de AIB; meio M3 = MS + 0,01 mg/L de AIA e meio M4 = MS + 0,1 mg/L de AIA. O valor do pH dos meios foi ajustado para 5,8 anteriormente à autoclavagem. Cada erlenmayer foi inoculado com quatro explantes, sendo que o peso inicial do inóculo para cada frasco foi de aproximadamente 16,0 mg. Foram realizados quatro tratamentos com oito repetições cada. Para todos os tratamentos, as condições de cultivo foram: temperatura de  $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ; luz branca incandescente (intensidade luminosa de  $3000 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ); fotoperíodo de 16 horas e velocidade do agitador orbital (New Brunswick) de 110 rpm. Após 30 dias de cultivo, as raízes foram retiradas dos frascos, lavadas em água corrente e secadas em papel filtro para a determinação da massa de matéria fresca. Em seguida, estas raízes foram secadas em estufa a

30°C ± 2°C por 48 horas para a determinação da massa de matéria seca e, posteriormente, armazenadas em congelador para as análises químicas.

Para a determinação das condições fotoperiódicas de cultivo, os explantes radiculares foram cultivados em “scale-up” dentro de frascos erlenmeyers de 2000 mL contendo 800 mL de meio M1. O peso inicial do inóculo para cada frasco foi de aproximadamente 150 mg. Foram inoculados oito frascos, sendo que quatro deles foram mantidos sob fotoperíodo de 16 horas e os restantes foram envoltos em papel alumínio, permanecendo sob condição de escuro constante. Para este e para os demais experimentos deste capítulo, a iluminação, quando utilizada, foi fornecida por lâmpadas brancas incandescentes de intensidade luminosa de 3000 mmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. A temperatura (25° ± 2°C) e a velocidade do agitador orbital (New Brunswick - 110 rpm) foram mantidas constantes em ambos os tratamentos. Após um período de 30 dias de cultivo, as raízes foram analisadas quanto as massas de matéria fresca e seca e, em seguida, armazenadas para as análises químicas posteriores.

### 3.3. RAÍZES TRANSFORMADAS

#### 3.1.1. METODOLOGIA PARA O PROCESSO DE TRANSFORMAÇÃO

##### 3.3.1.1. EXPLANTES UTILIZADOS INOCULAÇÃO COM *Agrobacterium*

Plantas mantidas no banco do genótipo superior *in vitro* com cerca de 5,5 cm de comprimento foram removidas do meio nutritivo, sendo separadas mini-estacas da região mediana do eixo principal (explantes). As mini-estacas medindo cerca de 1,5 cm de comprimento foram utilizadas com ou sem a presença de duas ou três folhas. Em seguida, estas mini-estacas foram colocadas com a extremidade basal para cima e a extremidade apical em contato com o

ágar, conforme indicado na Fig. II.1, em meio de cultura estéril contendo apenas água destilada e ágar na concentração de 8,0 g/L, denominado meio MA (Tabela II.2), sendo acertado o valor de pH 5,8 anteriormente à autoclavagem. Para esta etapa foram utilizados frascos de vidro com 7,0 cm de altura por 5,5 cm de diâmetro.

Duas cepas de *A. rhizogenes* (8196 e 15834) foram utilizadas para a inoculação das mini-estacas. Cada uma destas cepas foi inoculada, separadamente, em 16 mini-estacas. Cada frasco continha duas mini-estacas inoculadas. O controle consistiu de mini-estacas não inoculadas com nenhuma das duas cepas de *A. rhizogenes*. Para a inoculação, as mini-estacas foram retiradas do frasco com o auxílio de uma pinça, colocadas em contato com a colônia de bactérias e recolocadas, logo em seguida, dentro do frasco original. Todo este procedimento foi executado no interior de uma câmara de fluxo laminar HLFS12 marca Veco. O material de *A. annua* inoculado com os *Agrobacterium* foi mantido à temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , sob fotoperíodo de 16 horas. Os frascos contendo mini-estacas não inoculadas (controles) foram mantidos sob estas mesmas condições de cultivo.

Tabela II.2: Composição do meio de sustentação MA utilizado para o cultivo das mini-estacas não inoculadas (controles) e inoculadas com *A. rhizogenes*.

Componentes	Concentrações
Água destilada	1,00 L
Difco bacto-ágar	9,00 g

Esterilização em autoclave à 120°C e 1 atm durante 20 minutos e pH = 5,8

### 3.3.1.2. ISOLAMENTO DAS RAÍZES OBTIDAS APÓS INOCULAÇÃO COM

#### *A. rhizogenes*

Após a inoculação das mini-estacas de *A. annua* com *A. rhizogenes* começaram a surgir primórdios das raízes no ponto de inoculação. Estas raízes, quando crescidas com cerca de 1 cm de comprimento, foram excisadas e, posteriormente, transferidas isoladamente para placas contendo meio sólido MS/2 acrescido de antibiótico visando impedir o crescimento e proliferação do *A. rhizogenes*.

Nesta fase de descontaminação e isolamento das raízes foram testados três antibióticos: o cefataxime (marca comercial Claforan) utilizado na concentração de 100 mg/L de meio de cultura, o cefalexina (marca comercial União Química) utilizado na concentração de 1 g/L e o vancomicina (marca comercial Lilly) utilizado na concentração de 500 mg/L na inoculação, 250 mg/L na primeira repicagem e 100 mg/L na segunda repicagem. Os meios de cultura foram distribuídos em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro, para onde se transferiu as raízes excisadas das mini-estacas de *A. annua*. Delimitou-se, com caneta, o comprimento original (comprimento zero) de cada uma das raízes no verso de cada placa. Estas placas foram mantidas no escuro à temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . A parte crescida destas raízes foi excisada e colocada em meio sólido MS/2 novo contendo o mesmo antibiótico. As repicagens foram realizadas duas vezes em intervalos de 30 dias.

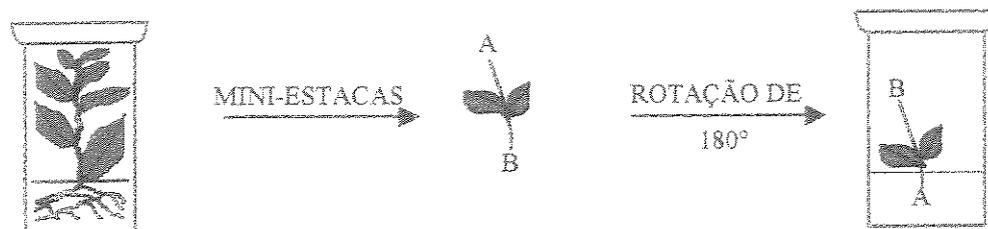


Figura II.1: Esquema de corte e inoculação das mini-estacas de *A. annua*. As mini-estacas foram retiradas da região mediana de plantas constituintes do banco do genótipo superior *in vitro* e colocadas em frascos contendo meio de sustentação MA (Tabela II.2) com extremidade basal para cima e extremidade apical em contacto com o ágar.

### **3.3.2. CULTIVO DAS RAÍZES TRANSFORMADAS EM DIFERENTES MEIOS BÁSICOS**

Após três passagens por meio de cultura contendo antibiótico, as raízes que já se apresentavam livres de qualquer contaminação pelo *A. rhizogenes* passaram a ser cultivadas em meio MS sólido sem a adição de antibiótico e de fitorreguladores. Cada clone foi individualizado e inoculado separadamente em placas de Petri diferentes. Estas placas foram mantidas no escuro e as repicagens foram realizadas a cada 30 dias. Deste estoque, foram selecionados, ao acaso, quatro clones, sendo dois obtidos pela transformação com a cepa 15834 e dois, pela cepa 8196. Destes clones foram retirados os explantes (raízes com aproximadamente 3,0 cm de comprimento contendo o ápice e pesando aproximadamente 0,07 mg). Estes explantes foram, então, transferidos para placas de Petri contendo quatro tipos de meios básicos sólidos: MS; White; B5 e B5/2. Os recipientes foram, então, mantidos à temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  sob condição de escuro contínuo. Após 30 dias de cultivo, as raízes de cada clone foram retiradas dos meios de cultura, levemente enxugadas em papel filtro e pesadas para a obtenção das massas de matéria fresca. Em seguida, estas raízes foram mantidas em estufa à  $30 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$  por 48 horas e pesadas para a obtenção das massas de matéria seca. As massas de matéria fresca e seca obtidas em cada meio de cultura testado foram a média dos quatro clones de raízes selecionados.

### **3.3.3. CULTIVO DAS RAÍZES TRANSFORMADAS EM MEIO LÍQUIDO PARA DETERMINAÇÃO DAS TAXAS DE CRESCIMENTO DOS CLONES OBTIDOS**

Explantes de aproximadamente 3,0 cm de comprimento foram exsistados da extremidade apical das raízes transformadas cultivadas em meio MS sólido mantidas no escuro e transferidos para o meio MS líquido. O meio foi distribuído em frascos erlenmeyers de 250 mL, na proporção de 100 mL de meio para cada frasco. Os recipientes foram, então, mantidos sob agitação

constante em agitador orbital New Brunswick (110 rpm), à temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  sob fotoperíodo de 16 horas. Foram estabelecidos três frascos para cada clone: FL, C1, C3, C5, C6, C7, C8, C10, C11, C12, C14, C15 (inoculados com a cepa 15834) e C1\*, C2\*, C3\*, C4\* (inoculados com 8196). Três frascos foram inoculados com raízes normais e utilizados como controle. O inóculo inicial foi colocado em tubo Eppendorf e pesado anteriormente a inoculação dos mesmos nos frascos contendo o meio líquido. O peso inicial dos inóculos foi de aproximadamente 4 mg. Após 30 dias, a taxa de crescimento das raízes para cada clone foi estimada pela razão: peso fresco obtido após 30 dias de cultivo / peso fresco inicial do inóculo. Posteriormente, amostras contendo o material de cada clone foi secado em estufa e armazenado separadamente em “freezer” para posteriores análises químicas.

### **3.3.4. VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE pRi NAS CEPAS DE *A. rhizogenes* UTILIZADAS**

Para a verificação da presença de pRi nas cepas 15834 e 8196 de *A. rhizogenes* utilizadas no processo de obtenção das raízes transformadas, ambas as cepas foram inoculadas em placas de Petri contendo meio seletivo AT (Tabela II.3), o qual continha manopina como única fonte de carbono. Estas placas foram mantidas no escuro por 48 horas e, em seguida, o crescimento das bactérias neste meio específico foi investigado. Este teste foi realizado antes da inoculação das bactérias nas mini-estacas de *A. annua*.

Tabela II.3: Constituição do meio seletivo AT utilizado para o cultivo das cepas 15834 e 8196 de *A. rhizogenes*.

Constituintes	Concentrações
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10900,0 mg/l
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	160,0 mg/l
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5,0 mg/l
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	10,0 mg/l
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	2,0 mg/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0 mg/l
Extrato de levedura	50,0 mg/l
Difco bacto-ágar	20,00 g/l
Manopina	2,00 mg/ml

Esterilização em autoclave à 120°C e 1 atm por 30 minutos e pH = 7,3

### 3.3.5. ANÁLISES BIOMOLECULARES

#### 3.3.5.1. EXTRAÇÃO DO DNA VEGETAL

A extração do DNA das raízes inoculadas com *A. rhizogenes* (cepas 15834 e 8196) foi realizada segundo metodologia descrita por Fulton *et al.* (1995). Esta metodologia se consistiu de uma mini preparação de DNA vegetal simples e rápida, apropriada para quantidades de material entre 50 e 100 mg. No entanto, neste trabalho, se utilizou quantidades menores que 50 mg (entre 20 e 30 mg). O material vegetal foi transferido para tubos Eppendorf de 1,5 mL, pesado e macerado em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. Adicionou-se, então, 200 µL de tampão microprep (Tabela II.4) e continuou-se macerando até obtenção de um material homogêneo. Em seguida, foram adicionados mais 500 µL de tampão microprep em cada tubo, agitando-se levemente para depois incubá-los a 65°C por 90 minutos em

banho-maria. Após este período, adicionou-se aproximadamente 650  $\mu\text{L}$  de uma solução de clorofórmio:isoamílico (24:1), agitando-se levemente e depois, centrifugou-se o material a 10000 g por 5 minutos (“Superspeed RC-5B Sorvall, rotor HS-4”) para separação das fases. Após a centrifugação a fase aquosa foi transferida para novo tubo Eppendorf (1,5 mL) adicionando-se 2/3 a 1 vez o volume com isopropanol gelado. Cada tubo foi então lentamente invertido várias vezes para provocar uma precipitação do DNA. O precipitado foi recuperado após uma nova centrifugação a 10000 g a 5 minutos (“Superspeed RC-5B Sorvall, rotor HS-4”), descartando-se o isopropanol e lavando-se o “pellet” com etanol 70 % para retirar o resto de sais existentes. Os tubos eppendorf foram colocados sobre a bancada em papel filtro na posição invertida por aproximadamente 1 hora até secagem do “pellet”. O DNA precipitado foi ressuscitado em 50  $\mu\text{L}$  de tampão TE (10 mM Tris, pH 8 + 1 mM EDTA, pH 8) e, em seguida, incubado a 65°C por 15 minutos. Nova centrifugação foi realizada a 10000 g por 10 minutos. A remoção dos resíduos contaminantes de RNA foi feita por adição de RNase A (USB, Amersham Life Science) às amostras na concentração final de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , seguida de incubação em banho-maria a 25°C durante 10 minutos. O material foi então mantido a 4°C.

Tabela II.4: Constituição do tampão microprep utilizado durante a extração do DNA vegetal

Componentes	Concentrações
a. Tampão de extração	5 mL
b. Tampão de lise	5 mL
c. Sarkosyl 5%	2 mL
d. Bissulfito de sódio	0,04 g

- a. Tampão de extração para 100 mL: 0,35 M de sorbitol + 0,1 Tris-base + 5 mM EDTA. O pH do tampão deve ser igual a 7,5.
- b. Tampão de lise para 100 mL: 0,2 Tris (pegar 10 mL do estoque de 2 M) + 0,05 M EDTA + 2 M de NaCl + 2 % CTAB.

### 3.3.5.2. ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO DE DNA OBTIDA

Para estimar a concentração de DNA obtida após a extração foi realizada uma eletroforese em gel de agarose, comparando-se os extratos obtidos com padrão de DNA de bacteriófagos  $\lambda$  ( $\lambda 100 = 100 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ). O DNA foi separado em gel de agarose 0,8 % diluído em tampão TBE (1 M Tris, pH 8 + 1 M Ácido Bórico + 20 mM de EDTA, pH 8) 0,5 x, durante aproximadamente 1 hora sob corrente de 50 V (25 mA). Para a revelação o gel foi corado com 5  $\mu\text{L}$  de Brometo de etídeo 5 mg/L diluído em 20 mL de água destilada durante 20 minutos, sendo posteriormente lavado em água destilada por pelo menos 30 minutos, agitando-se de vez em quando. A visualização do DNA e a estimativa da concentração obtida foi possível após a exposição do gel à luz ultra-violeta.

### 3.3.5.3. OBTENÇÃO DO FRAGMENTO DE DNA PARA MARCAÇÃO RADIOATIVA DA SONDA

O plasmídeo p19a contém um fragmento de 3,6 Kpb da região T de pRi de *A. rhizogenes* clonado no sítio de restrição *Bam*HI. Este foi o fragmento de DNA selecionado para a utilização como sonda na análise através de "Dot Blot". Para obtenção do fragmento, o plasmídeo p19a foi hidrolisado com endonuclease *Bam*HI, seguindo as instruções do fabricante ("New England Biolabs"), e, a banda de 3,6 Kpb foi isolada do gel e purificada com o uso do "Kit GFX<sup>TM</sup> PCR DNA and Gel Band Purification" ("Amersham Pharmacia Biothech"). O fragmento de DNA purificado foi submetido a eletroforese em gel de agarose 0,8 % e sua concentração foi estimada pela utilização de um marcador de concentração de 100 ng (Fig. II.2).

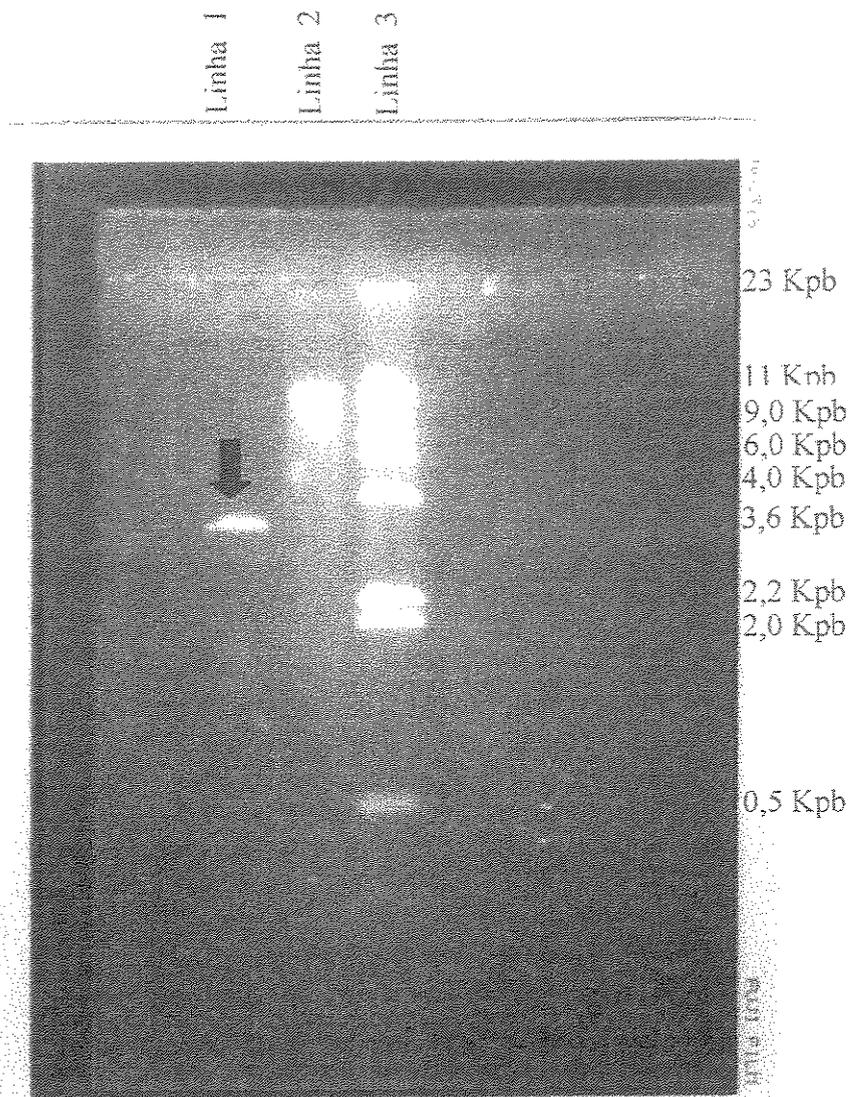


Figura II.2: Fragmento de 3,6 Kpb isolado e purificado a partir da hidrólise do plasmídeo p19a com a endonuclease *Bam*HI. Linha 1: fragmento de 3,6 Kpb purificado (indicado pela seta). Linha 2: marcador de concentração 100 ng. Linha 3:  $\lambda$  Hind II – marcador de tamanho molecular.

#### 3.3.5.4. MARCAÇÃO RADIOATIVA DA SONDA

A sonda utilizada nesta marcação foi um fragmento de DNA da região T de pRi, de 3,6 Kpb digerido pela endonuclease de restrição *Bam*HI. Foram utilizados 100 ng de sonda e a desnaturação do DNA foi feita a 100°C durante 2 minutos. A incorporação do desoxirribonucleotídeo radioativo ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P)dCTP foi realizada utilizando-se o “Kit Multiprimer” para marcação radioativa (marca comercial Gibco), em reação a 37°C durante 1 hora. Para eliminação dos nucleotídeos não incorporados durante a reação utilizou-se coluna de resina Sephadex G-50 fina, equilibrada com o tampão TE/SDS (10 mM Tris, pH 8 + 1 mM EDTA, pH 8 + 0,5 % SDS) por onde foi passada a sonda. A atividade utilizada de sonda por membrana foi de  $4 \times 10^5$  cpm/mL de solução de hibridação.

#### 3.3.5.5. ANÁLISE DO DNA POR “DOT BLOT”

Para a preparação da membrana foram obtidas amostras de 5  $\mu$ L contendo cerca de 500 ng de DNA não digerido extraído de cada clone. As amostras de DNA foram desnaturadas por aquecimento, tendo sido submetidas à temperatura de 95°C durante 5 minutos e logo a seguir resfriadas sobre gelo durante 2 minutos. Estas amostras foram aplicadas sobre membrana de nylon (“Gene Screen Plus hybridization transfer membrane”, marca comercial DuPont) em duas alíquotas de 2,5  $\mu$ L. Além das amostras de DNA das raízes, foi aplicado como controle positivo uma amostra de DNA de raízes de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*) transformadas com *A. rhizogenes* (Morgante, 1997) e como controle negativo uma amostra de DNA da mesma espécie vegetal, porém não transformada. Como sonda foi utilizado o fragmento do plasmídeo p19a. Após a secagem total das amostras a membrana foi colocada

durante 5 minutos em uma solução desnaturante (1,5 M NaCl + 0,5 M NaOH), sendo logo a seguir transferida para a solução de neutralização (1,5 M NaCl + 0,5 M Tris HCl pH 7,5), onde permaneceu por mais 5 minutos. Após este período a membrana foi retirada da solução e colocada para secar sobre papel de filtro, onde foi deixada até que estivesse completamente seca.

Numa etapa seguinte, a membrana foi previamente umedecida com SSC 2x sob agitação durante 2 minutos. Em seguida, foi realizada uma pré-hibridação incubando-se a membrana em solução de hibridação (SSC 5x + 0,5 % SDS + 1 % Leite em pó desnatado - Molíco) a 65°C sob agitação durante 24 horas. O volume da solução de hibridação, em mL, foi igual a 20 % da área da membrana, em cm<sup>2</sup>. Após este período de pré-hibridação, um volume de sonda marcada radioativamente foi desnaturado adicionando-se 1/3 do volume da sonda de NaOH 10 N durante 5 minutos, sendo logo a seguir neutralizado por adição de 1 volume de Tris 1 M pH 8,0 durante 5 minutos. O volume obtido foi adicionado à solução de hibridação. O processo de hibridação prosseguiu após a adição da sonda mantendo-se a membrana em incubação 24 horas a 65°C sob agitação. Após a retirada da membrana da solução de hibridação procedeu-se às lavagens para eliminação da sonda não hibridada. Primeiramente foram realizadas duas lavagens em SSC 2x à temperatura ambiente durante 5 minutos sob leve agitação. Após as duas lavagens, quando verificados os níveis ainda elevados de radiação, foram realizadas mais duas lavagens em solução de SSC 2x + 1 % SDS à 65°C durante 30 minutos. A membrana lavada foi exposta a um filme de raio X em chassi com intensificador, mantido em "freezer" a -70°C por tempo variável de acordo com o sinal obtido. A revelação do filme foi feita por imersão durante 3 minutos em revelador, seguida de imersão por 2 minutos, em água e por 5 minutos em fixador, sendo então lavados em água corrente por 30 a 40 minutos e colocados para secar. O filme de raio X, as soluções de revelação e fixação foram fornecidas pela Kodak.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. RAÍZES NORMAIS: ESTABELECIMENTO E DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO

Raízes cultivadas nos meios M1 (MS) e M4 (MS + 0,01 mg/L de AIB) apresentaram maior crescimento em relação às raízes cultivadas nos demais meios (Fig. II.3). Notou-se uma diminuição do crescimento das raízes quando cultivadas nos meios acrescidos de AIA. Além disso, observou-se a formação de calos nas bases destas raízes. Isso sugere que o balanço endógeno auxina/citocinina das raízes estaria favorecendo um bom crescimento das mesmas em meio MS líquido sem a necessidade da adição de auxinas exógenas. A adição de pequena quantidade de AIB (0,01 mg/L), que é uma auxina de baixa atividade, não interferiu no crescimento das raízes, ao passo que a mesma quantidade de AIA, uma auxina de maior atividade, diminuiu significativamente o crescimento, além de favorecer o aparecimento de calos. A presença destes calos basais além de interferir no crescimento das raízes, pode provocar variações somaclonais indesejáveis (Ammirato, 1983). Caponi *et al.* (1996) utilizou estes dois tipos de auxina (AIA e AIB) para estudos de indução de raízes transformadas com *A. rhizogenes* e observou que 58,6% de enraizamento foi induzido quando utilizou-se meio livre de auxina exógena; 62,9% de enraizamento foi induzido quando utilizou-se 10 µM de AIB e nenhum enraizamento foi induzido quando 10 µM de AIA foi utilizado, havendo apenas formação de pequenos calos.

Quanto as condições fotoperiódicas de cultivo, pôde-se observar que as raízes cultivadas em meio MS líquido mantidas sob fotoperíodo de 16 horas apresentaram-se mais espessas, e com coloração branco-esverdeada, enquanto que as raízes cultivadas sob condições de escuro total, apresentaram um fenótipo diferente, pois eram bem fininhas e tinham

coloração bege-marrom. Além do fenótipo foram observadas diferenças quanto ao crescimento das raízes cultivadas sob fotoperíodo de 16 horas e sob escuro contínuo. As médias das massas de matéria fresca e secas para as raízes cultivadas sob fotoperíodo de 16 horas foram de  $4,012 \pm 0,520$  g e  $0,887 \pm 0,489$  g, respectivamente e, para as raízes cultivadas no escuro, foram  $5,661 \pm 0,450$  g e  $1,003 \pm 0,680$  g, respectivamente.

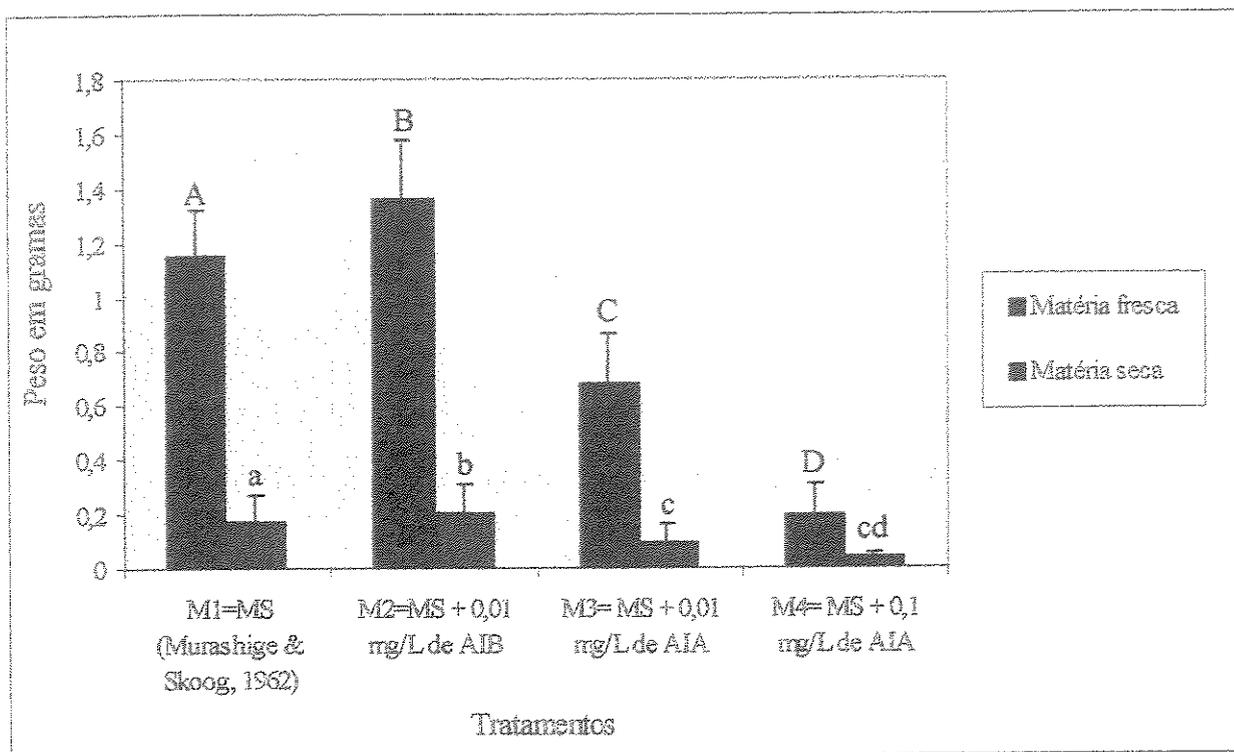


Figura II.3: Efeito da adição de diferentes tipos e concentrações de auxinas no crescimento de raízes normais de *A. annua* cultivadas em meio MS líquido sob agitação contínua (110 rpm), fotoperíodo de 16 horas e temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Médias assinaladas com letras distintas diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

## 4.2. VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE pRi NAS CEPAS DE *A. rhizogenes*

### UTILIZADAS

Durante o processo de transformação genética, após a integração e expressão do T-DNA no genoma da planta hospedeira, as células contendo esse T-DNA passam a produzir e excretar opinas (aminoácidos e derivados de açúcares) que são consumidas especificamente pela bactéria colonizadora (por exemplo: cepas produtoras de octopina podem metabolizar octopina, mas não nopalina, enquanto cepas produtoras de nopalina metabolizam nopalina, mas não octopina). As diferentes cepas de *Agrobacterium* e seus plasmídeos são classificados de acordo com a principal opina encontrada nos tecidos transformados (Bírot *et al.*, 1987; Hooykaas & Schilperoort, 1992), visto que a bactéria não contém nem sintetiza as opinas. Por exemplo, a cepa 8196 de *A. rhizogenes* induz a produção e o armazenamento na planta infectada de manopina, enquanto a cepa 15834 induz a produção e armazenamento de manopina e agropina (Otani *et al.*, 1996). Ambas estas cepas contêm genes responsáveis pelo catabolismo de manopina no plasmídeo pRi. Assim, quando inoculadas em meio seletivo contendo esta opina como única fonte de carbono, são capazes de metabolizá-la e utilizá-la como fonte de energia, carbono e/ou nitrogênio, para seu crescimento normal, desde que seu pRi esteja presente e íntegro. Com base nestas informações, as cepas de *A. rhizogenes* 15834 e 8196, utilizadas para transformação genética das raízes neste trabalho, foram testadas quanto a presença de seus plasmídeos pRi sendo inoculadas em meio AT (Tabela II.3), contendo manopina como única fonte de carbono. Após quarenta e oito horas da inoculação, observou-se o crescimento normal de ambas as cepas no meio seletivo, fato que indicou que ambas apresentavam seus plasmídeos indutores de rizogênese e estavam, portanto, aptas ao processo de transformação genética das plantas de *A. annua*.

### 4.3. TRANSFORMAÇÃO

#### 4.3.1. VIRULÊNCIA DAS CEPAS 15834 E 8196

Após a inoculação das mini-estacas de *A. annua* com *A. rhizogenes* começaram a surgir primórdios das raízes no ponto de inoculação. Inicialmente verifica-se um inchaço na região da inoculação, que transforma-se mais tarde em raízes diferenciadas (Fig. II.4). A cepa 15834 revelou-se mais virulenta do que a cepa 8196. Sete dias após a inoculação com a cepa 15834 surgiram raízes em 75 % das estacas, sendo que a média do número de raízes por estaca foi de  $7,87 \pm 1,17$ . O surgimento de raízes nas estacas inoculadas com a cepa 8196 ocorreu em quatorze dias e em 30 % das estacas. A média do número de raízes por estaca foi de  $3,37 \pm 0,98$  (Fig. II.5). Segundo Otani *et al.* (1996), diferenças na virulência foram observadas em muitas combinações plantas-cepas de bactérias. David & Tempé (1988) concluíram que cepas produtoras de agropina (como a 15834) foram mais virulentas que cepas produtoras de manopina (como a 8196) em plantas de couve-flor. Dobigny *et al.* (1995) observaram que a resposta da formação de raízes em explantes caulinares de batata variaram conforme a cepa de *Agrobacterium* utilizada, sendo que a cepa produtora de cucumopina (NCPB 2659) foi mais virulenta que as cepas produtoras de agropina e manopina.

Observou-se uma forte influência da presença de folhas nas mini-estacas de *A. annua* em relação à resposta de produção de raízes (Fig. II.4). Após a inoculação de ambas as cepas de *A. rhizogenes* nas mini-estacas contendo duas ou três folhas, houve uma maior produção de raízes do que nas mini-estacas sem folhas. É conhecido da literatura que as folhas são produtoras de muitos hormônios vegetais, inclusive auxinas (Jacobs, 1961; Shabde & Murashige, 1977, Torres *et al.*, 1998). Segundo Endress (1994), o enraizamento é altamente influenciado por este hormônio vegetal. A presença de raízes, embora em pequena quantidade,

nas mini-estacas não inoculadas (controles), sugere que o nível endógeno de auxina produzido pelas folhas destas estacas pode ter sido suficiente para proporcionar a formação de algumas raízes.

A obtenção de brotos regenerados a partir de raízes transformadas é um importante pré-requisito para o sucesso na produção de plantas transgênicas através do uso de *A. rhizogenes*. Segundo Otani *et al.* (1996), a utilização de diferentes cepas influenciou na frequência de regeneração das raízes transformadas obtidas. Em seu trabalho, o autor observou que a utilização da cepa produtora de agropina (15834) resultou em uma maior frequência de regeneração de brotos de batata em comparação com a utilização da cepa produtora de mikimopina (A13). No presente trabalho, não foi observada regeneração direta em nenhum dos clones das raízes transformadas por ambas as cepas utilizadas. Para a espécie estudada, *A. annua*, raízes transformadas foram obtidas com sucesso em diversos trabalhos, utilizando-se diferentes cepas de *A. rhizogenes* (Weathers *et al.*, 1994; Jaziri *et al.*, 1995; Banerjee *et al.*, 1997; Xie *et al.*, 2000), porém, apesar dos esforços, nenhum protocolo eficiente para regeneração destas raízes e obtenção de plantas transgênicas foi, até o momento, proposto.

#### **4.3.2. ISOLAMENTO DAS RAÍZES TRANSFORMADAS**

Para o isolamento das raízes transformadas das mini-estacas de *A. annua*, padronizou-se que a raiz a ser isolada deveria ter cerca de 1 cm de comprimento ou mais, pois raízes menores além de apresentarem uma maior tendência a romperem-se durante o isolamento não cresciam de forma satisfatória.

Os testes com os três antibióticos tiveram o objetivo de otimizar o meio de isolamento para que fosse utilizado um antibiótico eficiente quanto a eliminação da bactéria nas raízes.

Segundo Vergauwe *et al.* (1996b), o cefataxime (Claforan) tem sido um excelente agente antimicrobiano para diversas cepas de *Agrobacterium*, no entanto falhou no processo de regeneração em *Arabidopsis thaliana* (Valvekens *et al.*, 1988) e *Brassica napus* (De Block *et al.*, 1989) e *A. annua* (Vergauwe *et al.*, 1996a). A regeneração de brotos à partir de raízes transformadas é um importante pré-requisito para o sucesso da produção de plantas transgênicas pelo uso de *A. rhizogenes* (Otani *et al.*, 1996). Como o estudo da morfogênese *in vitro* das raízes transformadas era um dos objetivos do capítulo III deste trabalho, optou-se por testar a utilização de outros antibióticos (vancomicina e cefalexina) que, de acordo com alguns autores, possivelmente não influenciariam no sucesso do processo de formação de brotos (Vergauwe *et al.*, 1996a; Vergauwe *et al.*, 1996b; Banerjee *et al.*, 1997).

Dos antibióticos testados, o cefotaxime, na concentração de 100 mg/L, foi o mais eficiente quanto a descontaminação das raízes e o único que não prejudicou o crescimento e desenvolvimento normal das mesmas. A concentração utilizada foi sugerida pela Dra. Marie-Anne Van Sluys do Laboratório de Biologia Celular de Plantas do Departamento de Biociências da USP. Quando utilizou-se vancomicina na concentração inicial de 500 mg/L, diminuindo gradualmente para 250 mg/L e 100 mg/L nas repicagens seguintes, as contaminações não foram observadas no início, porém depois de dois ou três subcultivos, os meios de cultura líquidos tornaram-se turvos e visivelmente contaminados. Segundo Vergauwe *et al.* (1996a), apesar de não interferir no processo de regeneração, o uso de vancomicina apresenta duas desvantagens: o alto custo e a fraca atividade sobre *Agrobacteria* Gram-negativa. Esta fraca atividade leva ao supercrescimento da bactéria na placa de Petri, o que prejudica o crescimento normal das raízes. O uso de cefalexina na concentração de 1 g/L não proporcionou a contaminação das raízes, porém se mostrou extremamente prejudicial ao crescimento das mesmas. Somente 10 % das raízes transformadas cresceram em meio contendo este antibiótico, o que sugere que, na concentração utilizada, o cefalexina foi bastante tóxico.

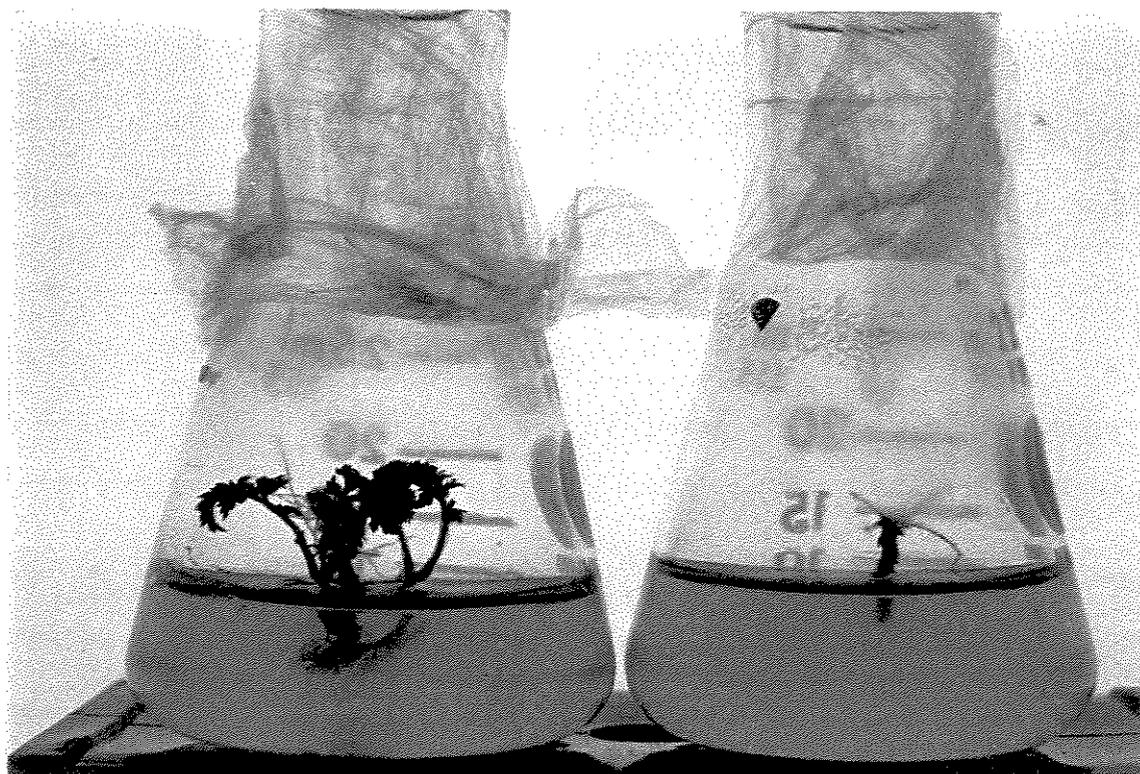


Figura II.4: Influência da presença de folhas em mini-estacas de *A. annua* com cerca de 1,5 cm de comprimento após 7 dias da inoculação com a cepa 15834 de *A. rhizogenes* nas extremidades basais. No exemplo ilustrado nesta figura, (a) refere-se a uma mini-estaca contendo três folhas a qual resultou no surgimento de 9 raízes no ponto de inoculação e (b) refere-se a uma mini-estaca desprovida de folhas a qual resultou no surgimento de 4 raízes no ponto de inoculação. Meio de cultura e condições de cultivo v $\acute{e}$ de F $\acute{g}$ . II.5.

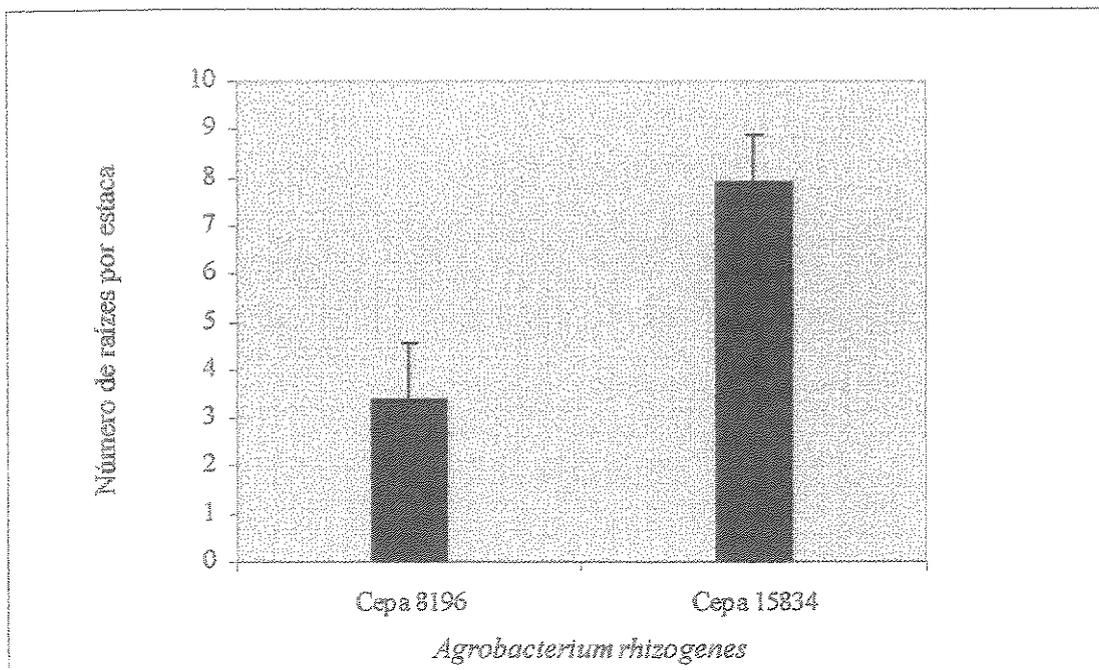


Figura II.5: Média do número de raízes por mini-estaca de *A. annua* após 14 dias da inoculação com as cepas 15834 e 8196 de *A. rhizogenes*. As mini-estacas inoculadas foram cultivadas em meio MA (vide composição na Tabela II.2), sob fotoperíodo de 16 horas e temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

### 4.3.3. CULTIVO DAS RAÍZES TRANSFORMADAS EM DIFERENTES MEIOS

#### BÁSICOS

Nenhum dos meios básicos sólidos testados resultou em regeneração direta de brotos a partir das raízes transformadas obtidas. Porém o meio MS foi o que mais favoreceu o crescimento das raízes bem como o aparecimento de raízes secundárias. Observa-se que a média aritmética de matéria fresca obtida para as raízes cultivadas no meio MS foi quase duas vezes maior do que a média obtida para as raízes cultivadas no meio White. Nos demais tratamentos o crescimento das raízes foi desprezível (Fig. II.6). De acordo com os resultados observados durante o cultivo das raízes transformadas nos meios de cultura básicos sólidos, estas foram transferidas para meio líquido, optando-se pela utilização do meio MS, onde as raízes apresentaram maior crescimento em meio sólido. No caso de cultivo em meio MS líquido, as raízes cresceram mais rapidamente quando comparado ao cultivo em meio sólido, sendo que dobravam sua biomassa em aproximadamente 7 dias de cultivo.

### 4.3.4. CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS E TAXAS DE CRESCIMENTO DOS CLONES OBTIDOS

As características fenotípicas apresentadas pelas raízes obtidas após a inoculação das mini-estacas de *A. annua* com as cepas 15834 e 8196 de *A. rhizogenes* diferiram entre os clones obtidos. O fenótipo e padrão de crescimento das “raízes em cabeleira”, característico de raízes transformadas em muitas espécies e considerado como marcador positivo da transformação por alguns autores (David *et al.*, 1984; David & Tempé, 1988 e Van Sluys, 1999) foi obtido apenas para os clones FL, C5, C6, C7, C8, C12, C15. Estes clones, quando cultivados em meio MS líquido sob fotoperíodo de 16 horas, apresentaram raízes com coloração branco-amareladas e

espessura média (Fig. II.7). Já os clones C2, C3, C10, C11 (inoculados com a cepa 15834) e C1\*, C2\*, C3\* e C4\* (inoculados com a cepa 8196), quando cultivados sob as mesmas condições, apresentaram-se finas e sem ramificações, com coloração bege. Um dos clones obtidos pela inoculação com a cepa 15834, o clone C14, apresentou um fenótipo diferente caracterizado por raízes engrossadas com aspecto semelhante a calos (Fig. II.8). Raízes transformadas com fenótipos diferentes também foram obtidas por Mallol *et al.* (2001). Os autores sugeriram que os genes *aux* desempenham um significativo papel na morfologia das raízes transformadas de *Panax ginseng*. Estes autores estudaram a integração dos fragmentos de TL-DNA e TR-DNA do pRi A4 no genoma das raízes e constataram que o gene *aux* era sempre detectado nos fenótipos típicos de “raízes em cabeleira” e nos fenótipos de raízes engrossadas semelhantes a calos.

O crescimento das raízes transformadas foi sempre maior que das raízes normais, nos três fenótipos observados. A Fig. II.9, ilustra a taxa de crescimento dos clones obtidos. A taxa de crescimento para cada clone foi estimada pela média dos valores obtidos em cada frasco da razão: peso fresco após 30 dias de cultivo / peso do fresco inicial do inóculo. Observa-se que os clones com fenótipo de “raízes em cabeleira” (FL, C5, C6, C7, C8, C12, C15) e o clone C14, que apresentou fenótipo de raízes semelhantes a calos, apresentaram maior crescimento que os clones de raízes sem ramificação. Os clones que apresentaram taxas de crescimento e características fenotípicas semelhantes ao padrão característico de raízes transformadas para a espécie *A. annua* foram individualizados, secados em estufa a  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 48 horas e armazenados em “freezer” para futuras análises químicas. A escolha destes clones para as análises químicas se baseou em relatos da literatura nos quais a quantidade de alguns metabólitos secundários foi aumentada em raízes com taxas de crescimento e fenótipos típicos de “raízes em cabeleira” (Moyano *et al.*, 1999; Mallol *et al.*, 2001).

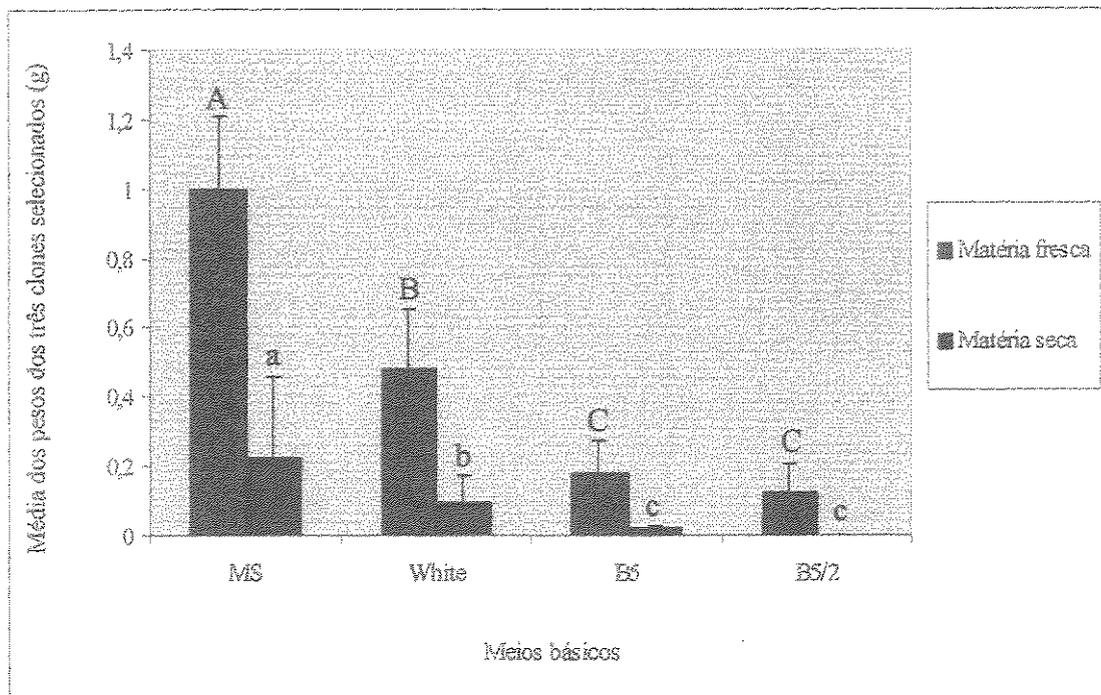


Figura II.6: Médias das massas de matéria fresca e seca dos três clones selecionados ao acaso após 30 dias de cultivo em diferentes meios de cultura sólidos. As raízes foram mantidas sob agitação contínua (110 rpm), fotoperíodo de 16 horas e temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Médias assinaladas com letras distintas diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

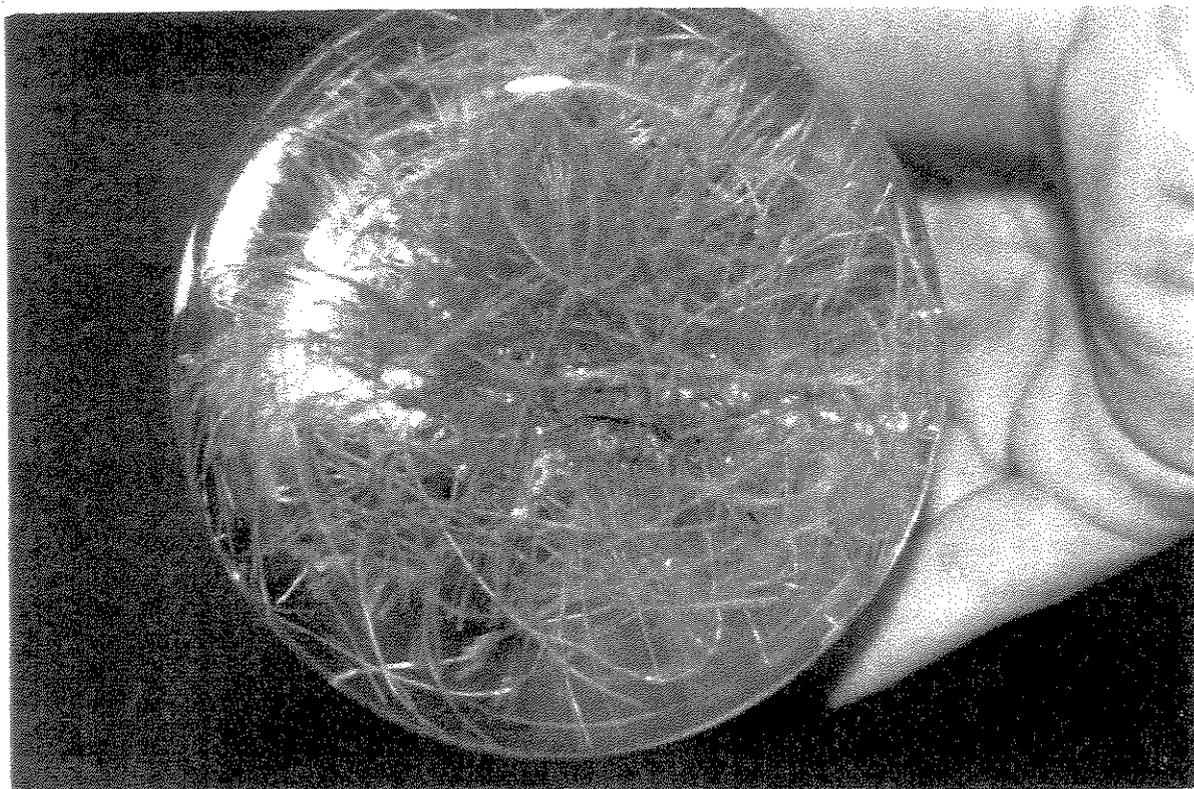


Figura II.7: Fenótipo característico de raízes em cabeleira obtido para os clones FL, C5, C6, C7, C8, C12, C15. Estas raízes foram transformadas a partir da inoculação com a cepa 15834 e cultivadas em meio MS líquido desprovido de fitorreguladores, sob agitação contínua (ciclos de 110 rpm), fotoperíodo de 16 horas e temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

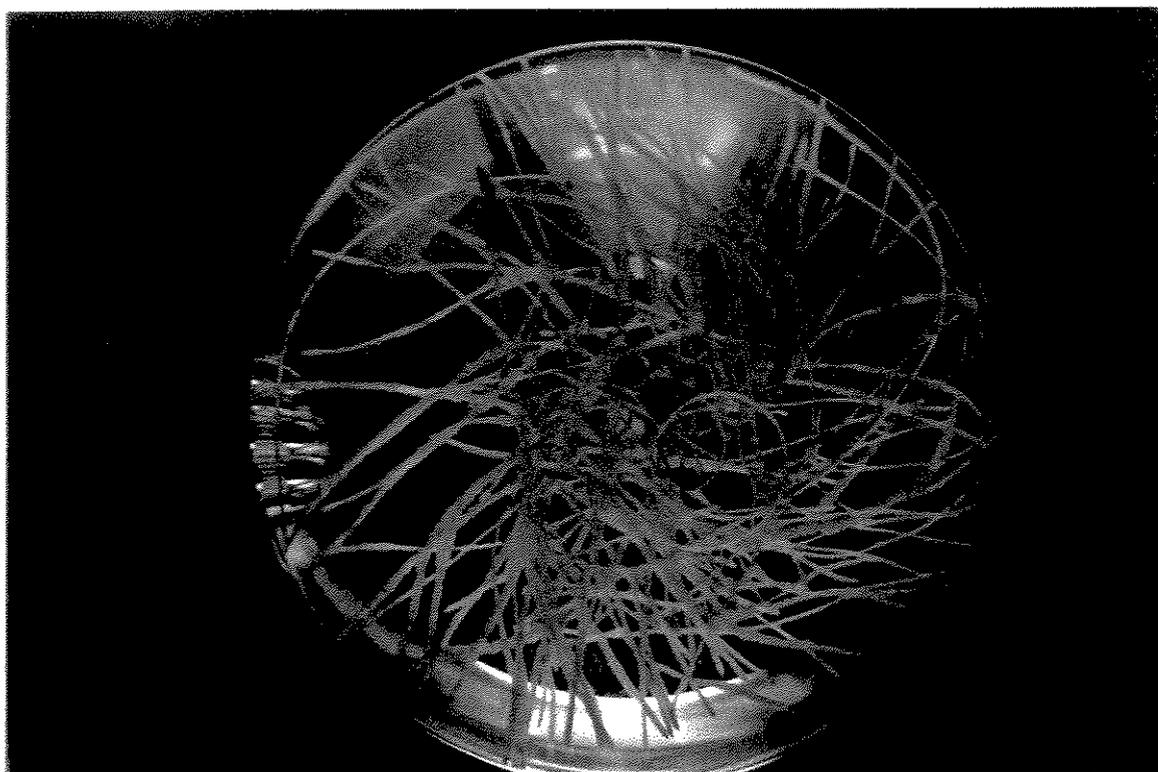


Figura II.8: Fenótipo diferenciado observado para o clone C14 caracterizado por raízes engrossadas e com aspecto semelhante a calos. Estas raízes foram transformadas a partir da inoculação com a cepa 15834 e cultivadas em meio MS líquido (sem fitorreguladores), sob agitação contínua (110 rpm), fotoperíodo de 16 horas e temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

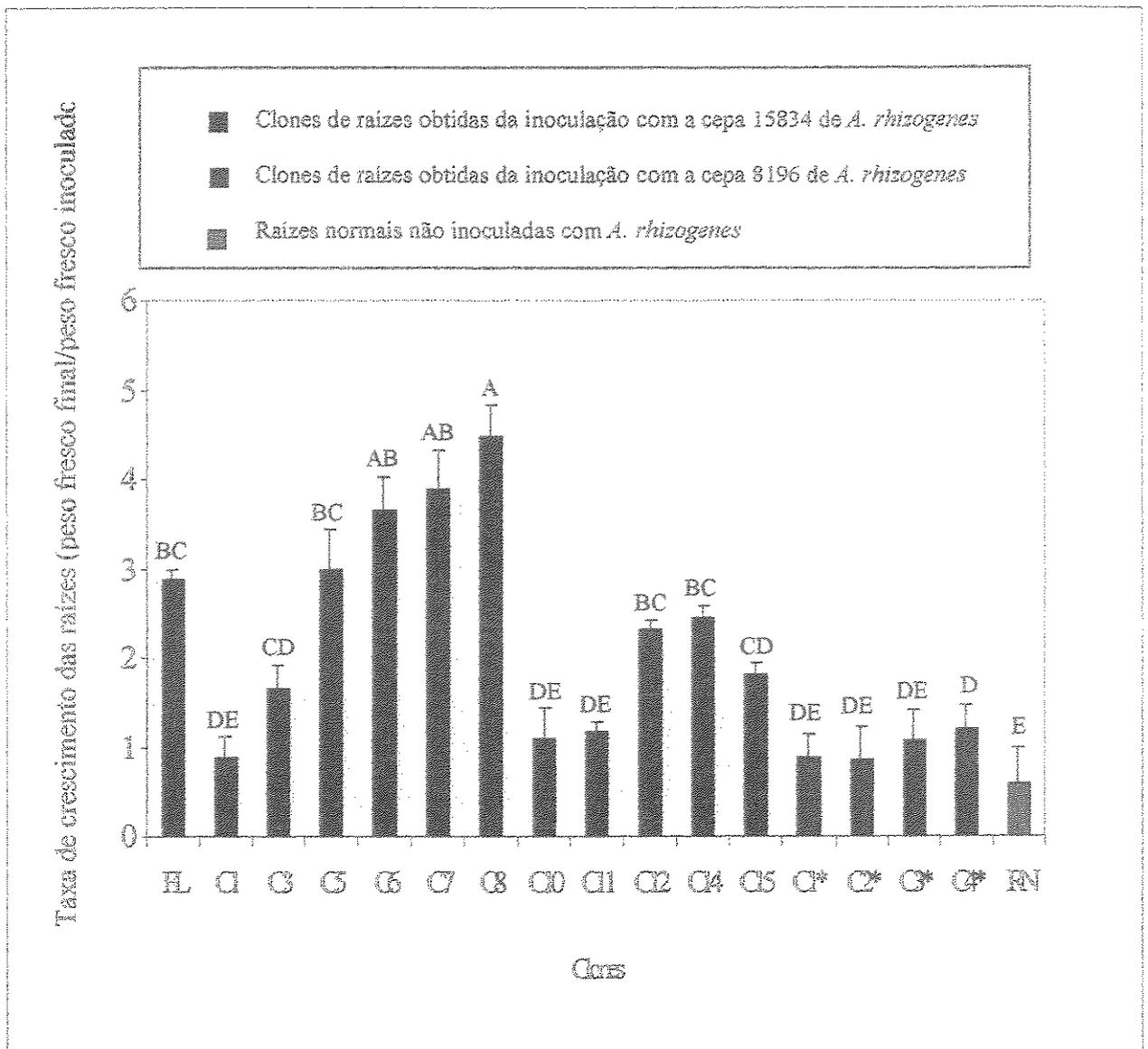


Figura II.9: Taxa de crescimento dos clones de raízes transformadas e normais após 30 dias de cultivo em meio MS líquido desprovido de fitorreguladores. A taxa de crescimento para cada clone foi obtida pela razão: peso fresco obtido após 30 dias de cultivo / peso fresco inicialmente inoculado. Os valores das taxas de crescimento são a média de três frascos. Raízes normais não inoculadas com *A. rhizogenes* foram utilizadas como controle (RN). Os clones C1\*, C2\*, C3\* e C4\* foram obtidos a partir da inoculação com a cepa 8196. Os demais clones (FL, C1, C3, C5, C6, C7, C8, C10, C11, C12, C14 e C15) foram obtidos a partir da inoculação com a cepa 15834. Médias assinaladas com letras distintas diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

#### 4.3.5. ANÁLISES BIOMOLECULARES

A caracterização molecular do material teve como objetivo evidenciar a passagem do material genético da bactéria para a planta, tendo sido selecionados 16 clones, sendo 12 clones inoculados com a cepa 15834 e 4 clones inoculados com a cepa 8196. Partindo-se de raízes com 30 dias de cultivo foi feita a extração de DNA dos extratos dos clones a serem analisados baseada na metodologia de Fulton *et al.* (1995). As concentrações de DNA foram estimadas por comparação com o padrão de concentração de 100 ng/ $\mu$ L para as três amostras das raízes transformadas, sendo que o DNA obtido por esta metodologia apresentou-se bastante puro e íntegro (Fig. II.10). A análise molecular dos clones inoculados com as cepas 15834 e 8196 de *A. rhizogenes* foi realizada através de "Dot Blot". Nesta metodologia, o DNA de cada clone foi extraído em quantidades semelhantes e depositado diretamente sobre uma membrana de "nylon" e esta foi submetida a uma hibridação molecular com sonda marcada com isótopo radioativo ( $^{32}$ P). A sonda utilizada foi um fragmento de 3,6 kpb, obtido da digestão do T-DNA do pRi com a endonuclease *Bam*HI. A exposição da membrana a um filme de raio X revelou que os clones FL, C3, C5, C6, C7, C8, C10, C11, C12, C14, C15 (inoculados com a cepa 15834) e C1\*, C3\*, C4\* (inoculados com a cepa 8196) são transgênicos. Tais evidências confirmam que essas raízes isoladas após inoculação com ambas as cepas de *Agrobacterium* foram originadas a partir da transformação genética mediada pela bactéria. A confirmação não foi obtida para os clones C1 (inoculado com a cepa 15834) e C2\* (inoculado com a cepa 8196). Como a transformação caracteriza-se pela passagem e integração de T-DNA da bactéria para o genoma da planta, após a hibridação espera-se um sinal positivo nas amostras de DNA das raízes, que seria resultante da ligação dos nucleotídeos marcados da sonda aos fragmentos do T-DNA existentes nas raízes transformadas. Por outro lado, o controle negativo não deveriam se hibridar com a sonda, não apresentando, assim, nenhum sinal impresso no

filme de raio X. Como pode ser visualizado na Fig. II.11, as amostras de raízes transformadas apresentaram o sinal positivo representado pelas manchas impressas no filme de raio X, e as amostras dos clones C1 e C2\*, bem como do controle negativo (DNA de planta não transformada) não apresentaram sinal algum.

O "Dot Blot" permite uma análise molecular apenas semi-quantitativa, sendo que a extensão da hibridação para cada mancha de DNA é avaliada, após a impressão do filme, por comparação visual da intensidade e do diâmetro aparente das manchas com um padrão (Sambrook *et al.*, 1989). Com o emprego desta metodologia, geralmente utiliza-se amostras com quantidades de DNA semelhantes e não exatamente iguais e origina-se manchas de tamanho variável, não sendo possível obter-se medidas quantitativas precisas, conseguindo-se entretanto determinar a expressão do gene desejado, por comparação relativa. Esta técnica é, portanto, especialmente conveniente quando são necessárias apenas estimativas semi-quantitativas fornecendo um método rápido e eficiente de triagem. Para uma análise mais detalhada e quantitativa, os dados obtidos neste trabalho deverão ser refinados futuramente através do uso de "Southern Blot".

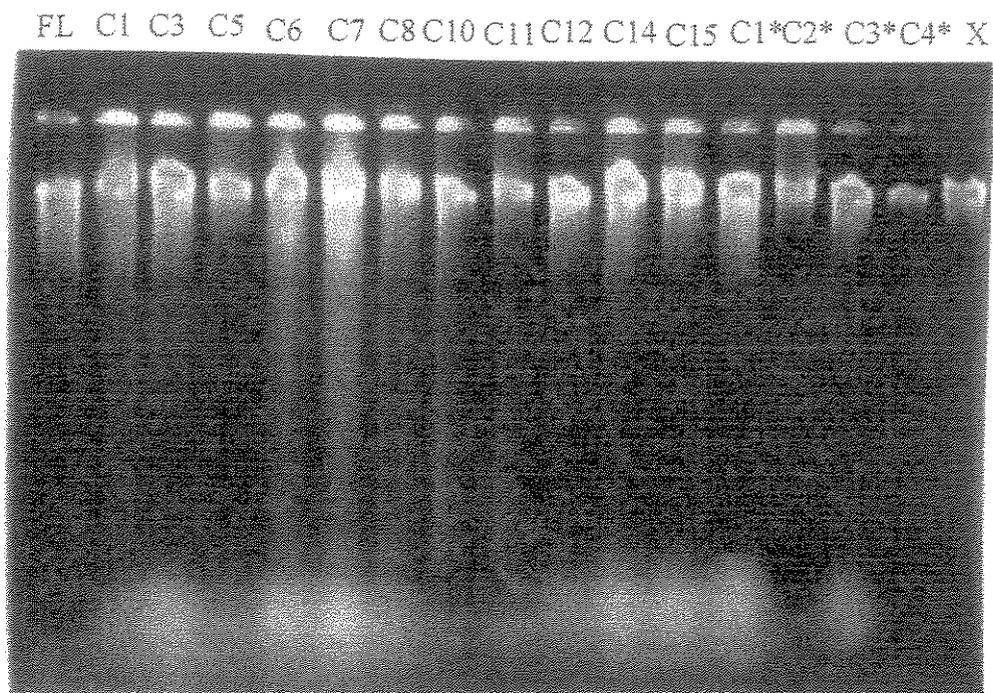


Figura II.10: Eletroforese em gel de agarose (0,8 %) para uma estimativa da concentração do DNA após extração nas amostras de raízes transformadas a partir da inoculação com as cepas 15834 (clones FL, C1, C3, C5, C6, C7, C8, C10, C11, C12, C14 e C15) e 8196 (clones C1\*, C2\*, C3\* e C4\*) de *A. rhizogenes*. A última linha (X) representa o marcador de concentração: DNA de bacteriófago  $\lambda$  na concentração de 100 ng/ $\mu$ L.

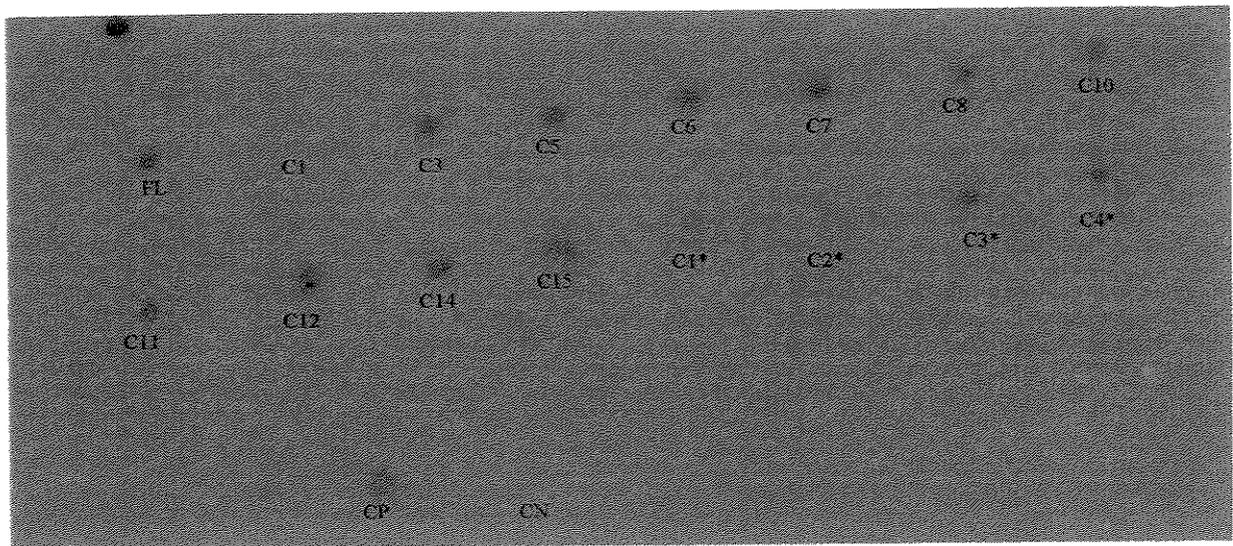


Figura II.11: Autoradiografia da membrana do "Dot Blot" após exposição de 6 dias. As amostras FL, C1, C3, C5, C6, C7, C8, C10, C11, C12, C14 e C15 referem-se aos clones de raízes transformadas com a cepa 15834 de *A. rhizogenes* e as amostras C1\*, C2\*, C3\* e C4\* referem-se aos clones de raízes transformadas com a cepa 8196. A amostra CN corresponde à planta não transformada de tomateiro (controle negativo) e a amostra CP corresponde às raízes transformadas de tomateiro (controle positivo), ambas cedidas por Morgante (1997).

## 5. CONCLUSÕES

O estabelecimento das raízes normais foi obtido com sucesso quando estas raízes foram cultivadas no meio MS desprovido de fitorreguladores. Neste meio as raízes apresentaram um bom crescimento durante 30 dias de cultivo. A condição de escuro contínuo favoreceu um maior crescimento das raízes normais em comparação com a condição de ciclo luz e escuro (fotoperíodo de 16 horas). A metodologia de transformação utilizada mostrou-se adequada tendo sido obtidas raízes transformadas a partir da inoculação de mini-estacas do genótipo superior de *A. annua* com ambas as cepas de *A. rhizogenes*. No entanto, a cepa 15834 revelou-se mais virulenta que a 8196, sendo que dos 16 clones obtidos, 12 clones foram resultantes da inoculação com a cepa 15834 e apenas 4 foram resultantes da inoculação com a cepa 14834. A confirmação da transformação genética por "Dot Blot" não foi possível apenas para as raízes dos clones C1 (cepa 15834) e o C2\* (cepa 8196). Dos antibióticos testados na fase de descontaminação e isolamento das raízes após a inoculação com *Agrobacterium*, o cefotaxime, na concentração de 100 mg/L, foi o mais eficiente quanto a descontaminação e o único que não prejudicou o crescimento e desenvolvimento normal das mesmas. Dos meios básicos sólidos testados, o MS sólido foi o que mais favoreceu o crescimento das raízes transformadas bem como o aparecimento de raízes secundárias. Foram observados três tipos de fenótipos de raízes transformadas: raízes em cabeleira; raízes finas e sem ramificações e um fenótipo diferenciado caracterizado por raízes engrossadas com aspecto semelhante a calos obtido exclusivamente para o clone C14. No meio MS líquido desprovido de fitorreguladores, o crescimento das raízes transformadas foi sempre maior que das raízes normais. Dos clones obtidos, os clones C6, C7 e C8 foram os que apresentaram maiores taxas de crescimento. Amostras das raízes pertencentes a estes clones foram secadas e armazenados em "freezer" para as análises químicas posteriores.

### **CAPÍTULO III**

**OBTENÇÃO DE CALOS A PARTIR DE RAÍZES DE *A. annua* TRANSFORMADAS  
COM AS CEPAS 15834 E 8196 DE *A. rhizogenes*: ESTUDOS DA MORFOGÊNESE**

*in vitro*

## RESUMO

Este capítulo objetivou os estudos fisiológicos relacionados a formação de calos e ao processo morfogenético utilizando como explantes iniciais raízes transformadas a partir da inoculação de mini-estacas do híbrido CPQBA 2/39 x PL5 com as cepas 15834 (Explantes A) e 8196 (Explantes B) de *A. rhizogenes* (Capítulo II). A partir dos calos obtidos foram realizadas análises preliminares através de CCD com a finalidade de se avaliar a presença dos terpenos de interesse (artemisinina, ácido artemisinínico, dihidro-epídeoxi-artenuína B e díoxiartemisinina).

Para a formação dos calos, diversas interações entre ANA e BA foram testadas, sendo que as que mais favoreceram a formação e o tamanho dos calos obtidos foram: 0,01 mg/L de ANA + 1,0 mg/L de BA (Tratamento T9) e 0,02 mg/L de ANA + 1,0 mg/L de BA (Tratamento T10). Estes tratamentos foram os melhores independentemente do tipo de explante radicular utilizado como fonte inicial de inóculo para o processo morfogenético.

Os maiores crescimentos dos calos, independentemente dos explantes radiculares utilizados, foram observados quando estes foram transferidos para meio MS sólido, desprovido de auxina, acrescido de água de coco e suplementado com 5 mg/L (tratamento T15) ou 6 mg/L (Tratamento T16). O uso de um inibidor de auxina (TIBA) na concentração de 5 mg/L, independentemente ou em combinação com altas concentrações de BA (6 e 10 mg/L) bem como de outros fitorreguladores tais como GA<sub>3</sub> (10 mg/L) e zeatina (2 mg/L) não possibilitou a visualização macroscópica de brotos. A relação auxina/citocinina favorável ao processo de regeneração de brotos não foi observada.

As análises químicas preliminares dos calos obtidos revelaram a ausência dos terpenos de interesse estudados neste trabalho.

## 1. INTRODUÇÃO

Alguns metabólitos secundários de interesse podem ter sua produção aumentada através de técnicas biotecnológicas. No caso de *A. annua*, algumas ferramentas tais como cultura de células e tecidos vegetais *in vitro* têm sido utilizadas, porém, sem grande sucesso, na tentativa de incrementar a produção de artemisinina, um sesquiterpeno antimalárico de grande interesse comercial (Paniego & Giulietti, 1994). Nos últimos anos, foram obtidos progressos no uso de métodos moleculares para a produção de metabólitos secundários. Um destes métodos seria a obtenção de raízes transformadas geneticamente através da inoculação com *A. rhizogenes*. Segundo Brasileiro & Dusí (1999), a rápida proliferação das raízes transformadas com *A. rhizogenes* sem o uso de substâncias reguladoras de crescimento e a alta produção de alguns metabólitos específicos tornam este sistema vantajoso. No entanto, os produtos são limitados àqueles normalmente produzidos pelas raízes. Metabólitos normalmente sintetizados em partes clorofiladas da planta, para serem produzidos nas raízes, requerem um sistema de transformação com a inserção de um gene específico ou então a regeneração destas raízes transformadas para a obtenção de plantas transgênicas (Brasileiro & Dusí, 1999). Para algumas espécies, como *Arabidopsis thaliana*, a regeneração direta à partir destas raízes transformadas é facilmente obtida (Tepfer *et al.*, 1990). Outras espécies, como *Lycopersicon esculentum* var. cerasiforme (Peres *et al.*, 2001) e *Crotalaria juncea* L (Ohara *et al.*, 2000) exigem modificações apropriadas no meio de cultura e obtenção de calos para posterior regeneração. Para *A. annua*, até o presente momento, não foi constatado um protocolo eficiente para obtenção de plantas transgênicas à partir da regeneração das raízes transformadas, o que poderia indicar a recalcitrância desta espécie (Weathers *et al.*, 1994; Jaziri *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1998). Um maior conhecimento fisiológico dos mecanismos envolvidos no processo de regeneração contribuiria para contornar o possível problema relacionado ao fator genético da recalcitrância

desta espécie. Para regeneração a partir de raízes transformadas via *A. rhizogenes*, diversos fatores devem ser levados em consideração. Um destes fatores seria a escolha das cepas de *A. rhizogenes* utilizadas durante o processo de transformação. Segundo Otani *et al.* (1996), as cepas produtoras de agropina transferem separadamente dois fragmentos de T-DNA: o TL-DNA, que carrega os genes *rol* essenciais ao desenvolvimento das raízes transformadas e o TR-DNA que carrega os genes de produção de opinas e de síntese de auxinas (Mallol *et al.*, 2001). Esta fonte adicional de auxina endógena pode provocar um desequilíbrio hormonal afetando a relação auxina/citocinina, interferindo, assim, no processo de regeneração destas raízes.

O antibiótico utilizado durante a descontaminação das raízes transformadas é outro fator que pode interferir no processo de formação de brotos e regeneração. Segundo Vergauwe *et al.* (1996a), o cefataxime (Claforan) é um excelente agente antimicrobiano para diversas cepas de *Agrobacterium*, porém falhou no processo de regeneração de *A. annua*, bem como de *Arabidopsis thaliana* e *Brassica napus*. Segundo Vergauwe *et al.*, (1996b), o antibiótico cefataxime exibiu um efeito semelhante a atividade auxínica nestas plantas que foi prejudicial ao processo de regeneração das raízes. Mesmo com o aumento da concentração de citocinina para compensar esta elevada atividade auxínica, não houve a formação de brotos.

Em alguns casos, a regeneração de raízes transformadas com *A. rhizogenes* pode ser influenciado também pelas alterações no número e/ou estrutura dos cromossomos, as quais podem ocorrer durante a transformação genética. Xu & Jia (1996), observaram que ocorreu uma eliminação de cromossomos em raízes transformadas de *Onobrychis viciaefolia* e que esta eliminação aumentava com a idade da subcultura. Segundo os autores, a mudança no número de cromossomos das raízes transformadas durante as subculturas, sugere que a integração do Ri T-DNA promoveu a eliminação de cromossomos. O nível da eliminação parece estar ligado a idade da subcultura. Esta perda de cromossomos, inclinando-se para a haploidização, provocou o

declínio gradativo da habilidade de diferenciação espontânea direta de brotos a partir das raízes transformadas de *O. viciaefolia* com a cepa A<sub>4</sub> de *A. rhizogenes*.

## 2. OBJETIVOS

Este capítulo teve como objetivos: a) os estudos fisiológicos relacionados a formação de calos e ao processo morfogenético utilizando como explantes iniciais raízes transformadas a partir da inoculação de mini-estacas do híbrido CPQBA 2/39 x PL5 com as cepas 15834 (Explantes A) e 8196 (Explantes B) de *A. rhizogenes*, as quais foram obtidas no capítulo II deste trabalho. b) as análises químicas preliminares dos calos obtidos para a avaliação da presença dos terpenos de interesse (artemisinina, ácido artemisinínico, dihidro-epideoxi-artenuína B e díoxiartemisinina).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. MATERIAL VEGETAL**

Os explantes utilizados consistiram de pedaços de raízes transformadas obtidas no capítulo II com aproximadamente 3 cm de comprimento e contendo o ápice radicular. As raízes, fontes dos explantes, foram cultivadas em meio MS líquido desprovido de fitorreguladores e sob temperatura constante de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 16 horas. Os explantes utilizados foram retirados de raízes transformadas a partir da inoculação com a cepa 15834 (clones C1, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C10, C11, C12, C14 e C15) (Explantes A) e de raízes transformadas a partir da inoculação com a cepa 8196 de *A. rhizogenes* (clones C1\*, C2\*, C3\* e C4\*) (Explantes B).

#### **3.2. INOCULAÇÃO DOS EXPLANTES EM MEIO DE CULTURA SÓLIDO: ESTUDOS DA REGENERAÇÃO DIRETA**

Para estudos da regeneração direta, ambos os tipos de explantes radiculares (A e B) foram retirados das raízes transformadas e inoculados em placas de Petri contendo meio básico MS sólido desprovido de fitorreguladores. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem ( $120^{\circ}\text{C}$  e 1 atm). Foram realizadas repicagens mensais. Anteriormente a cada repicagem, o surgimento espontâneo de brotos foi investigado.

### **3.3. OBTENÇÃO DE CALOS: INTERAÇÃO AUXINA/CITOCININA**

Para a obtenção de calos, explantes A e B foram transferidos para placas de Petri contendo o meio MS sólido acrescido de diferentes combinações de BA e de ANA: T1 (0 mg/L ANA + 0 mg/L de BA); T2 (0 mg/L de ANA + 0,1 mg/L de BA); T3 (0 mg/L de ANA + 0,5 mg/L de BA); T4 (0,02 mg/L de ANA + 0 mg/L de BA); T5 (0,02 mg/L de ANA + 0,1 mg/L de BA); T6 (0,02 mg/L de ANA + 0,5 mg/L de BA); T7 (0mg/L ANA + 1,0 mg/L de BA); T8 (0,01 mg/L de ANA + 1,0 mg/L de BA); T9 (0,01 mg/L de ANA + 1,0 mg/L de BA); T10 (0,02 mg/L de ANA + 1,0 mg/L de BA). As placas contendo os explantes foram mantidas sob temperatura constante de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 16 horas. Observou-se, em experimentos preliminares, que os calos formados tendiam a crescer predominantemente no sentido longitudinal, por este motivo, a área basal, neste caso em particular, foi um parâmetro que traduziu relativamente bem o crescimento dos calos obtidos. Por isso, após 30 dias de cultivo, os valores da média das áreas basais ( $\text{cm}^2$ ) dos calos obtidos foi investigada. Para tanto, utilizou-se folhas de papel milimetrado, as quais foram colocadas sob os calos, efetuando-se, assim, as medidas das áreas basais.

### **3.4. ADIÇÃO DE ÁGUA DE COCO E DE DIFERENTES DOSES DE BA**

Os calos anteriormente obtidos foram repicados e inoculados em meio MS sólido acrescidos de 10 % de água de coco e suplementado com diferentes doses de BA: T12 (1 mg/L); T13 (2 mg/L); T14 (3 mg/L); T15 (4 mg/L); T16 (5 mg/L) e T17 (6 mg/L). As condições de cultivo foram as mesmas do item 3.3. As áreas basais dos calos inicialmente inoculados foram de aproximadamente  $1,0 \text{ cm}^2$ . Após 30 dias, a taxa de crescimento dos calos

foi estimada pela razão: área basal dos calos ( $\text{cm}^2$ ) após 30 dias de cultivo / área basal dos calos inicialmente inoculados ( $\text{cm}^2$ ).

### **3.5. UTILIZAÇÃO DE TIBA, BA, GA<sub>3</sub> E ZEATINA**

Os calos obtidos no experimento do item 3.4. foram repicados e, posteriormente, transferidos em meios MS sólidos nos seguintes tratamentos: H1 (5 mg/L TIBA); H2 (5 mg/L TIBA + 10 mg/L GA<sub>3</sub>); H3 (5 mg/L TIBA + 2 mg/L zeatina); H4 (5 mg/L TIBA + 10 mg/L BA); H5 (5 mg/L TIBA + 10 mg/L GA<sub>3</sub> + 2 mg/L zeatina); H6 (5 mg/L TIBA + 10 mg/L GA<sub>3</sub> + 6 mg/L BA). O tamanho inicial (área basal) do calo inoculado e as condições de cultivo foram idênticas as do item 3.4. Foram realizadas repicagens mensais. Anteriormente a cada repicagem, a presença de brotos foi investigada.

### **3.6. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E ANÁLISES QUÍMICAS PRELIMINARES DOS CALOS OBTIDOS**

Todos os calos originados a partir de ambos os explantes (A e B) e obtidos no item 3.5. foram reunidos em uma única amostra para a realização das análises químicas preliminares. A extração dos materiais foi realizada a frio e sob agitação constante por 2 horas em 3 etapas utilizando-se como solvente o diclorometano (Marry Ann Foglio, comunicação pessoal). A quantidade de extrato bruto extraída foi: 86,7 mg. Para a CCD a aplicação dos extratos foi feita com microseringa nas cromatoplasas de sílica gel para os padrões de artemisinina, ácido artemisinínico, diidro-epideoxiartenuína B e dioxiartemisinina. Estes padrões foram gentilmente cedidos pela Dra. Marry Ann Foglio da Divisão de Fitoquímica do CPQBA. Os cromatogramas foram desenvolvidos por corrida unidimensional ascendente de 10 cm de

comprimento, em cuba cromatográfica e o sistema de solvente empregado foi: hexano: acetato de etila (20 % v/v). Para a revelação dos cromatogramas utilizou-se anisaldeído. Após a revelação as placas foram aquecidas para permitir a visualização dos resultados.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. ESTUDOS DA MORFOGÊNESE DAS RAÍZES TRANSFORMADAS

Quanto a formação de calos, os tratamentos T9 (0,01 mg/L de ANA + 1,0 mg/L de BA) e T10 (0,02 mg/L de ANA + 1,0 mg/L de BA) foram os melhores independentemente do tipo de explante utilizado como inóculo inicial para o processo morfogênético. As médias dos valores das áreas basais dos calos obtidos nestes tratamentos foram respectivamente  $8,05 \pm 0,26$  (T9) e  $10,35 \pm 0,31$  (T10), quando se utilizou explantes A e  $7,31 \pm 0,56$  (T9) e  $9,11 \pm 0,38$  (T10), quando se utilizou explantes B (Fig. III.1).

Quando os calos foram colocados em meio sólido MS desprovido de auxina e acrescido de doses crescentes de BA, os maiores valores de crescimento, estimados pela razão área basal dos calos após 30 dias de cultivo ( $\text{cm}^2$ ) / área basal dos calos inicialmente inoculados ( $\text{cm}^2$ ), foram obtidos nos tratamentos T15 (5 mg/L) e T16 (6 mg/L) para ambos os explantes utilizados (A e B). Para os explantes A, estes valores foram, respectivamente,  $10,87 \pm 0,32$  (T15) e  $11,3 \pm 0,46$  (T16) e para os explantes B,  $9,48 \pm 0,68$  (T15) e  $11,08 \pm 0,47$  (T16) (Fig. III.2). A combinação do acréscimo de BA na concentração de 10 mg/L e TIBA na concentração de 5 mg/L TIBA ao meio MS (meio H4 – item 3.5) proporcionou o aparecimento de algumas estruturas alongadas diferenciadas que emergiram dos calos bem como pontos verde-escuros, os quais poderiam corresponder a gemas (Fig. III.3).

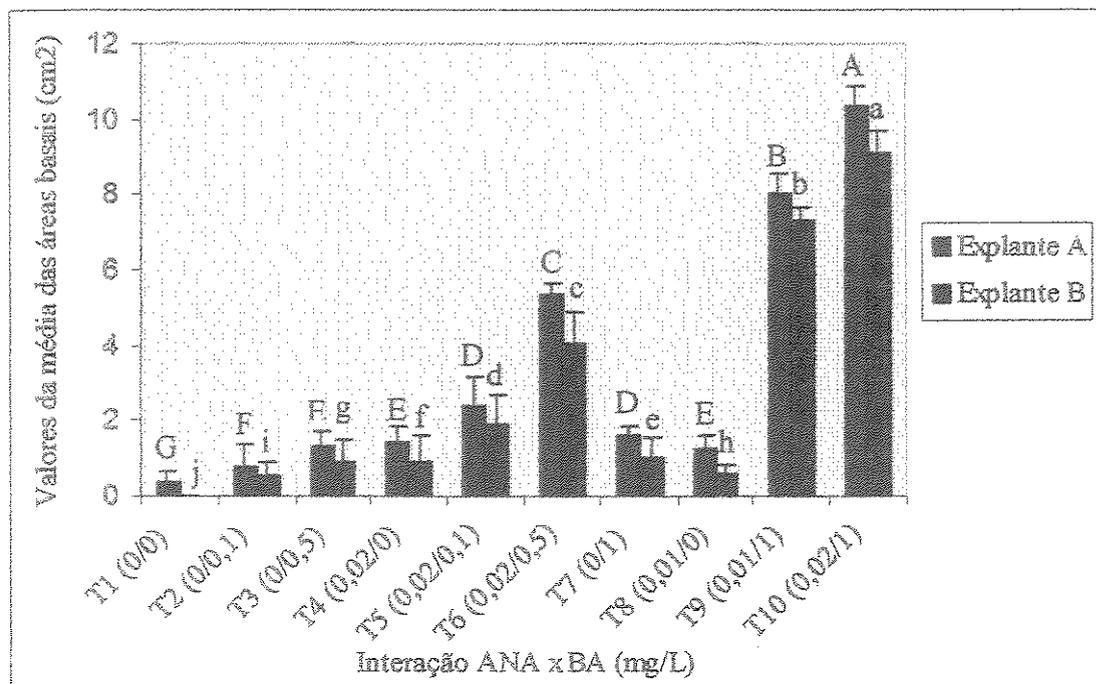


Figura.III 1: Efeito da interação de diferentes concentrações de ANA e BA nos tamanhos dos calos obtidos após a inoculação dos explantes A e B em meio básico MS sólido e cultivados sob temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 16 horas. Os tamanhos dos calos foram estimados pelos valores das áreas basais em  $\text{cm}^2$  e referem-se a média obtida para calos oriundos dos explantes A (pedaços de raízes transformadas com a cepa 15834 – clones C1, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C10, C11, C12, C14 e C15) e oriundos dos explantes B (pedaços de raízes transformadas com a cepa 8196 – clones C1\*, C2\*, C3\* e C4\*). Médias assinaladas com letras distintas diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 %.

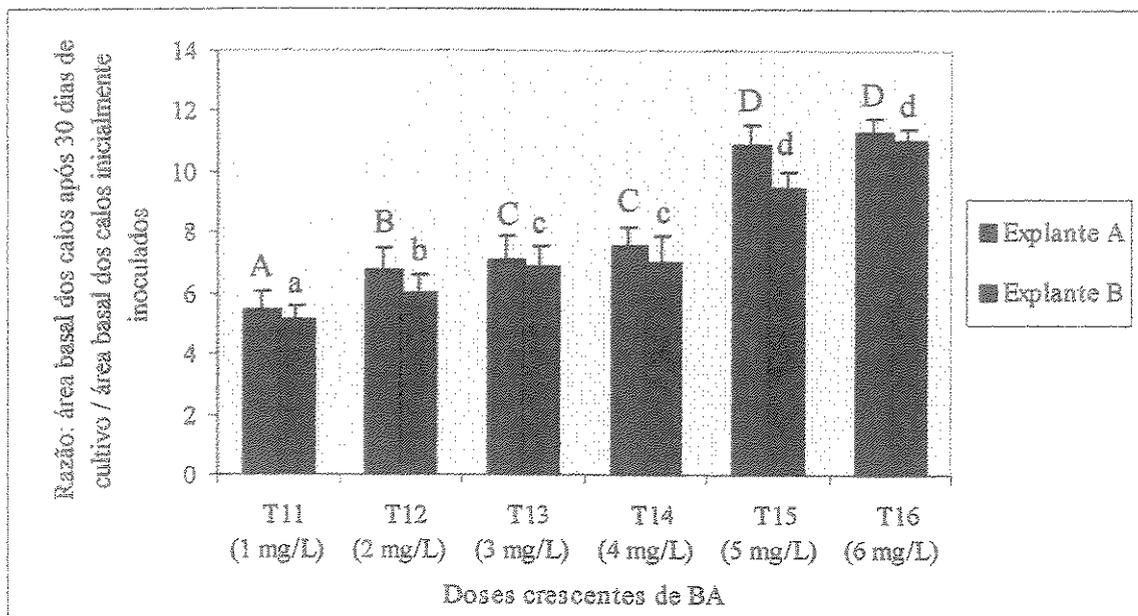


Figura.III.2: Efeito de doses crescentes de BA no crescimento dos calos originados a partir dos explantes A (pedaços de raízes transformadas com a cepa 15834 de *A. rhizogenes*) e B (pedaços de raízes transformadas com a cepa 8196 de *A. rhizogenes*). O crescimento foi estimado pela razão: área basal final dos calos ( $\text{cm}^2$ ) após 30 dias de cultivo / área basal inicial dos calos inoculados. Os calos foram cultivados em meio MS sólido acrescido de 10 % de água de coco e de diferentes doses de BA. Condições de cultivo vide Fig. III. 1. Médias assinaladas com letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 %.

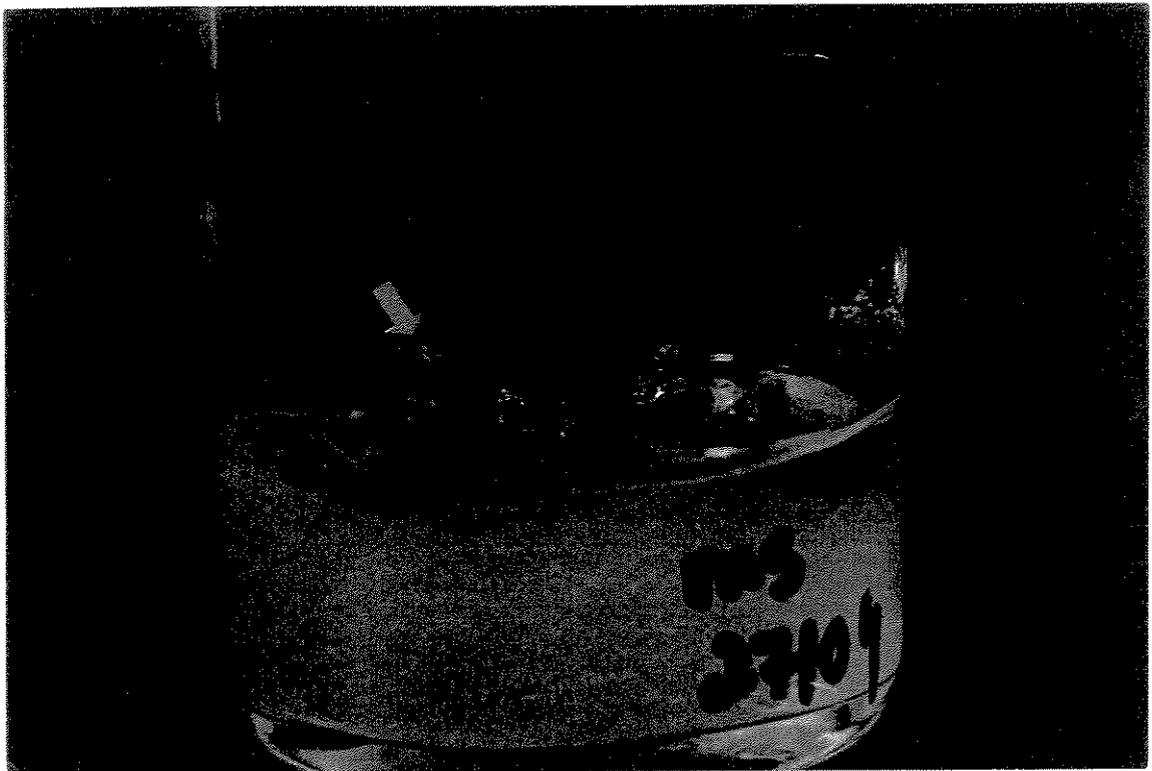


Figura III.3: A seta mostra um exemplo do aspecto das estruturas alongadas diferenciadas que emergiram de calos originados a partir de explantes retirados de raízes transformadas de um clone específico (clone C8) e mantidos no meio H4 (5 mg/L TIBA + 10 mg/L BA). As raízes do clone C8 foram transformadas pela inoculação de mini-estacas de *A. annua* com a cepa 15834 de *A. rhizogenes*.

#### 4.2. ANÁLISES QUÍMICAS PRELIMINARES PARA AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DOS TERPENOS DE INTERESSE NOS CALOS

Através das análises químicas preliminares realizadas, com base nos resultados obtidos na CCD, podemos observar a ausência dos terpenos de interesse (artemisinina, ácido artemisinínico, dihidro-epideoxiartenuína B e dioxiartemisinina) no extrato da mistura de calos transformados a partir da inoculação com ambas as cepas de *A. rhizogenes* (15834 e 8196) utilizadas (Fig. III.4).

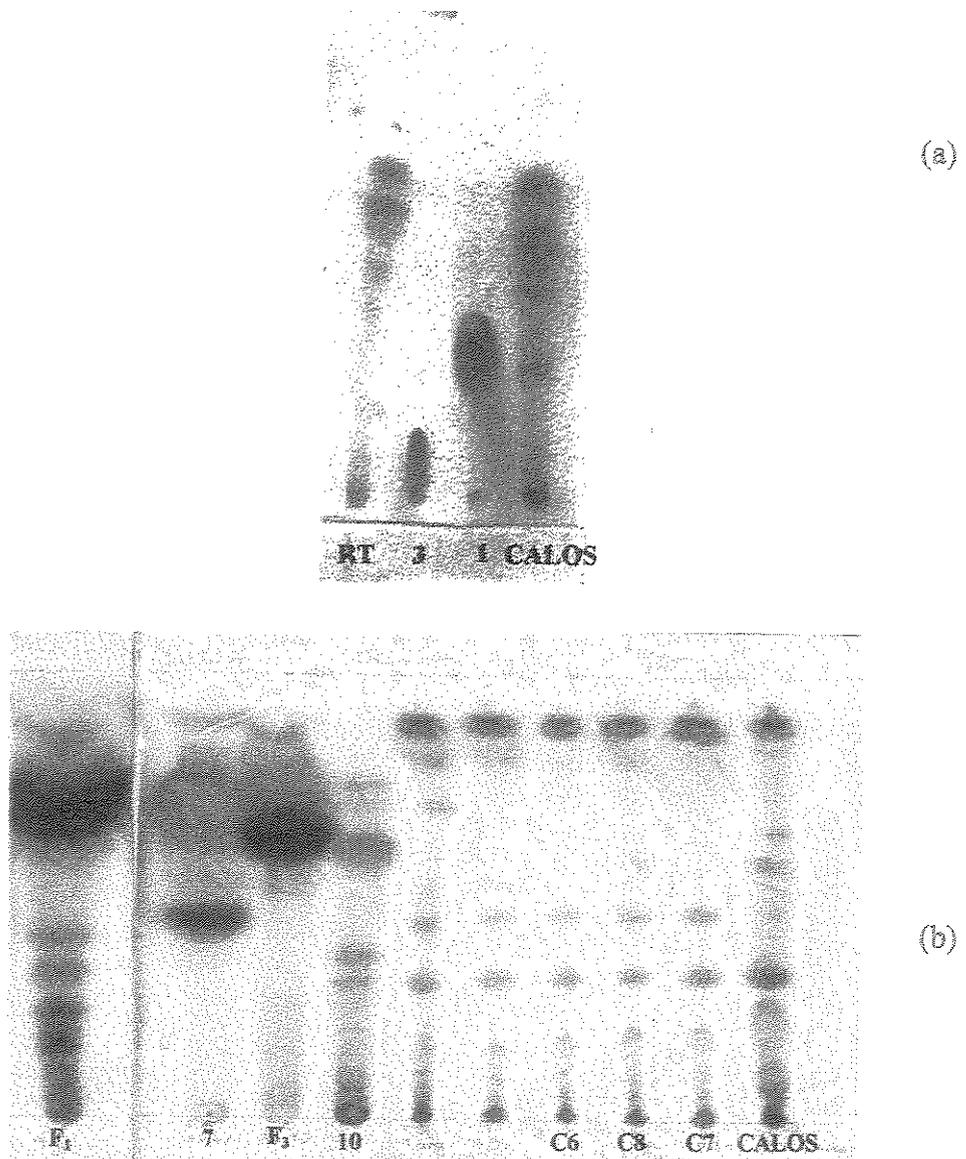


Figura III.4: Placas de Cromatografia de Camada Delgada (CCD) para comparação dos padrões autênticos de artemisinina (1), ácido artemisinínico (3), dihidro-epideoxi-artenuína B (7) e díoxiartemisinina (10) com o extrato obtido da mistura de todos os calos originários a partir de ambos os explantes (A e B) e obtidos no item 3.5. deste capítulo. Condições de cultivo vide Fig. III.1. (a) Placa de CCD contendo os padrões autênticos 1 e 3 e os extratos dos calos e das raízes transformadas (RT) do clone C5. (b) Placa de CCD contendo os padrões autênticos 7 e 10, os extratos dos calos, das raízes transformadas dos clones C6, C7 e C8 e das frações F<sub>1</sub> e F<sub>3</sub>. Estas frações contêm uma mistura de compostos ainda não identificados, mas que apresentaram atividade antiulcerogênica.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. ESTUDOS DA MORFOGÊNESE DAS RAÍZES TRANSFORMADAS

Para a formação de calos utilizou-se ANA, pois de acordo Paniego & Giulietti (1994) e Vergauwe *et al.* (1996a) esta auxina sintética proporcionou a formação de calos clorofilados e mais compactos em *A. annua*, características estas, favoráveis ao processo de regeneração. Segundo estes autores, o uso de outra auxina sintética, como o 2,4 D, promoveu a obtenção de indesejáveis calos friáveis com coloração branco-amarelados ou marrons. A interação de ANA e BA nas concentrações dos tratamentos T9 (0,01 mg/L de ANA + 1,0 mg/L de BA) e T10 (0,02 mg/L de ANA + 1,0 mg/L de BA) parece ter sido favorável a formação e ao crescimento dos calos originados a partir de raízes transformadas com ambas as cepas de *A. rhizogenes* (Fig. III.1). Estes calos se caracterizaram por serem verdes e compactos. A comparação das áreas basais dos calos originados a partir de raízes transformadas com a cepa 15834 (explantes A) e de raízes transformadas com a cepa 8196 (explantes B) revelou um incremento no crescimento dos calos obtidos a partir dos explantes A em todas as interações de fitorreguladores testadas. Observou-se, ainda, que os explantes retirados das raízes transformadas com a cepa 15834 de *A. rhizogenes* (explantes A) formavam calos mesmo quando colocados em meio MS desprovido de fitorreguladores (tratamento controle T1). Este fato poderia sugerir um alto nível de auxina endógena nestas raízes. Segundo Malloí *et al.* (2000), cepas produtoras de agropinas como a 15834 podem proporcionar às células transformadas uma fonte adicional de auxinas. Esta fonte adicional de auxinas pode ter favorecido um bom crescimento das raízes e/ou calos mesmo em meio desprovido de fitorreguladores, no entanto, também pode ter ocasionado um desequilíbrio hormonal endógeno, afetando a relação auxina/citocinina, dificultando, assim, o processo de formação

de brotos. Segundo Peres *et al.* (2001), raízes transformadas de tomate mostraram consideráveis diferenças morfológicas, quando comparadas com raízes não transformadas. Os autores atribuíram estas diferenças à influência dos genes *rol* introduzidos durante o processo de transformação genética, os quais promoveriam um aumento da sensibilidade hormonal interferindo, conseqüentemente, no processo de regeneração de brotos a partir de raízes transformadas.

Nenhum dos antibióticos utilizados para descontaminação das raízes obtidas no capítulo II após o processo de inoculação com *A. rhizogenes* proporcionou a formação de brotos direta ou indiretamente. Dos antibióticos utilizados, o cefotaxime na concentração de 100 mg/L foi o mais eficiente quanto a eliminação do *A. rhizogenes* e o único que não prejudicou o desenvolvimento e crescimento normal das raízes. O uso de cefalexina na concentração de 1 g/L foi eficiente quanto a descontaminação das raízes, porém se mostrou extremamente prejudicial ao crescimento das mesmas. Vancomicina, na concentração inicial de 500 mg/L com gradual diminuição para 250 e 100 mg/L nas repicagens subsequentes, foi ineficiente quanto a eliminação do *A. rhizogenes*, pois foi observada 65 % de contaminação. Segundo Vergauwe *et al.* (1996a) o uso de vancomicina apresenta duas desvantagens: o alto custo e a fraca atividade sobre *Agrobacteria* Gram-negativa. Esta fraca atividade leva ao supercrescimento da bactéria, o que prejudica o crescimento normal das raízes. Segundo os mesmos autores, o uso de derivados de penicilina (como a cefalexina) é mais barato e eficiente que vancomicina, porém também falhou no processo de regeneração em *A. annua*, sendo recomendado apenas quando a produção de calos é desejado como, por exemplo, no caso do estabelecimento de cultura de células transformadas ou para o estudo de metabólitos secundários. Segundo Vergauwe *et al.* (1996b), o antibiótico cefotaxime tem sido um excelente agente anti-microbiano de raças de *Agrobacteria*, porém, assim como a cefalexina, também falhou no processo de regeneração tanto de *A. annua* como de *Arabidopsis thaliana* e

*Brassica napus*. Os autores relatam que este antibiótico exibiu um efeito semelhante a atividade auxínica em *A. annua* e, mesmo aumentando a quantidade de citocininas visando compensar esta ação similar a auxina, não foi obtido sucesso na formação de brotos. A hipótese de que alguns fatores tais como o aumento da sensibilidade hormonal conferida pelos genes rol, a fonte adicional de auxina proporcionada pelos genes de síntese deste hormônio (cepa 15834) e a intensificação da atividade auxínica devido ao uso do antibiótico cefotaxime poderiam estar interferindo na relação auxina/citocinina e dificultando, assim, o estabelecimento do equilíbrio hormonal necessário ao processo de formação de brotos levou a utilização de metodologias que pudessem vencer estes problemas. Neste sentido, foi elaborado um experimento no qual todos os tratamentos continham TIBA (um inibidor de auxina). Porém, no presente trabalho, nem a utilização de doses crescentes de BA independentemente ou combinado com o uso de TIBA na concentração de 5 mg/L foi suficiente para fornecer uma relação auxina/citocinina favorável ao processo de formação de brotos. Apesar dos esforços, até o presente momento, não foi constatado um protocolo eficiente para obtenção de plantas transgênicas à partir de regeneração de raízes transformadas de *A. annua*, o que poderia sugerir uma recalcitrância desta espécie (Jaziri *et al.*, 1995). Há na literatura apenas um relato de obtenção de planta transgênica de *A. annua* à partir da regeneração espontânea de uma única raiz, pertencente a um clone específico, a qual foi transformada a partir da inoculação com a cepa A<sub>4</sub> de *A. rhizogenes* (Banerjee *et al.*, 1997). No entanto, este fato isolado parece ter ocorrido ao acaso e, neste caso, as metodologias utilizadas para regeneração das raízes transformadas não são representativas, não podendo, assim, serem repetidas ou utilizadas como protocolo.

A hipótese de que alterações no número de cromossomos das raízes transformadas pudessem ter ocorrido durante as subculturas, fato que, segundo Xu & Jia (1996), poderia prejudicar o processo de regeneração, foi investigada. Para tanto, amostras das raízes

transformadas com idade de subcultivo de 12 meses obtidas no capítulo II deste trabalho foram cedidas à Júlia Costa, aluna de mestrado do Departamento de Botânica da UNICAMP, que realizou o monitoramento cromossômico. Neste trabalho, Costa *et al* (1999) concluíram que não ocorreram alterações nem no número e nem na estrutura dos cromossomos das raízes, sendo que o número de cromossomos permaneceu idêntico ao das raízes normais.

## 5.2. ANÁLISES QUÍMICAS PRELIMINARES PARA AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DOS TERPENOS DE INTERESSE NOS CALOS

As análises químicas preliminares do extrato bruto dos calos por CCD revelou ausência dos sesquiterpenos de interesse (artemisinina, ácido artemisinínico, dihidro-epideoxi-artenuína B e dioxiartemisinina) (Fig. III 4). Jha *et al.* (1988) e Paniago & Giuletta (1994) relataram a presença, embora em quantidades muito pequenas, de artemisinina em tecidos indiferenciados não transformados. Estas quantidades observadas nos calos declinaram a zero após três subculturas (Paniago & Giuletta, 1994). Em calos primários, as autoras observaram valores de 1.13 e 0.78 mg de artemisinina, enquanto que nenhuma quantidade de artemisinina estava presente em suspensões celulares. Este rápido declínio da quantidade de artemisinina em calos após algumas subculturas poderia explicar, em parte, a total ausência deste composto observada em suspensões celulares (Paniago & Giuletta, 1994; Van Geldre *et al.*, 1997). Segundo alguns autores, a ausência de muitos metabólitos em suspensões celulares poderia estar relacionada a baixa diferenciação citológica (Ketel, 1986) e/ou a alta taxa de crescimento das suspensões celulares (Lindsey & Yeoman, 1985). Em muitos casos, a produção de metabólitos secundários em plantas é restrita a tecidos e órgãos específicos durante um particular estágio de desenvolvimento. A diferenciação morfológica das células das plantas em tipos especializados de células e tecidos é acompanhada pela diferenciação química, a qual

estabelece uma rota metabólica levando à formação de produtos secundários (Croes *et al.*, 1989). Segundo este autor, esta teoria é sustentada pela observação de que em cultura de calos ou suspensões celulares, que não são estruturas diferenciadas, o metabolismo secundário é frequentemente baixo ou completamente ausente.

## 6. CONCLUSÕES

Os estudos da morfogênese *in vitro* das raízes transformadas revelaram uma forte tendência à recalcitrância do híbrido CPQBA 2/39 x PL5 de *A. annua* quanto a formação de brotos tanto direta como indiretamente. A origem do explante radicular não interferiu no processo de regeneração, pois tanto a utilização de explantes A, oriundos de raízes transformadas com a cepa 15834, como a utilização de explantes B, oriundos de pedaços de raízes transformadas com a cepa 8196, não proporcionaram a formação de brotos.

A morfogênese das raízes transformadas com ambas as cepas de *A. rhizogenes* inclinou-se para a formação de calos. O processo de formação e crescimento dos calos foi favorecido pela interação de ANA e BA nas concentrações observadas nos tratamentos T9 (0,01 mg/L de ANA + 1,0 mg/L de BA) e T10 (0,02 mg/L de ANA + 1,0 mg/L de BA).

A hipótese de que a relação auxina/citocinina favorável a formação de brotos foi altamente influenciada por alguns fatores relacionados ao processo de transformação genética, tais como o aumento da sensibilidade dos tecidos vegetais conferida pelos genes *rol*; a fonte adicional de auxina proporcionada pelo gene de síntese deste hormônio no caso de cepas produtoras de agropinas; a intensificação da atividade auxínica promovida pelo uso do antibiótico cefataxime, parece ser viável, uma vez que a regeneração de brotos a partir de raízes transformadas com ambas as cepas de *A. rhizogenes* não foi observada. Nem o uso de altas doses de citocíninas combinado com o uso de um inibidor de auxina, o TIBA, parece ter sido suficiente para promover uma relação de hormônios favorável ao processo de regeneração.

## **CAPÍTULO IV**

**ANÁLISES QUÍMICAS DAS RAÍZES NORMAIS E TRANSFORMADAS DE  
*A. annua* PARA AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE TERPENOS DE INTERESSE**

## RESUMO

Com a finalidade de se avaliar a presença das lactonas sesquiterpênicas de interesse (artemisinina 1, ácido artemisinínico 3, dehidro-epideoxi-artenuína B 7, deoxiartemisinina 10), foram obtidos os extratos das raízes normais e transformadas obtidas no capítulo II deste trabalho, os quais foram analisados preliminarmente por CCD e posteriormente por CG/EM em cromatógrafo a gás (HP 5890) acoplado a um detector de massas (HP 5970). As análises por CG/EM seguiram metodologia analítica e de alta sensibilidade para detecção de terpenos, a qual foi desenvolvida por pesquisadores do CPQBA/UNICAMP. O perfil cromatográfico dos extratos analisados foi comparado com o perfil cromatográfico dos padrões autêntico dos sesquiterpenos de interesse. A quantificação dos compostos presentes nos extratos foi realizada através de CG/DIC, sendo que as mesmas condições de análise para lactonas sesquiterpênicas utilizadas em CG/EM foram empregadas. Dos compostos estudados, 1, 3 e 10 não foram detectados nos extratos das raízes normais e transformadas analisados. As análises dos cromatogramas dos extratos das raízes normais cultivadas em meio MS líquido desprovido de fitorreguladores revelaram a presença de dois picos com tempos de retenção 23.874 e 12.767 correspondentes aos compostos 7 e 14, respectivamente. Embora o composto 14 ainda não tenha sido isolado e identificado, pelas características do padrão de fracionamento obtidas por CG/EM, podemos supor que este composto se trate de um terpeno. No cromatograma observou-se dois compostos principais: o primeiro com íon molecular de 234 no seu espectômetro de massas idêntico ao padrão autêntico de 7 e o outro com íon molecular em  $m/z$  204, correspondente ao composto 14. Observou-se uma influência das condições ambientais (presença ou ausência de luz) na produção destes dois terpenos de interesse nas raízes normais. Assim, a produção do composto não identificado 14 foi inversamente proporcional à de 7, ou seja, sob condição de escuro contínuo, quando o terpeno 7 foi intensamente

produzido, o terpeno 14 foi detectado em pequenas proporções. Já na presença de 16 horas de luz, as produções dos dois compostos mencionados se inverteram. A quantificação do composto 7 por CG/DIC revelou um aumento de aproximadamente cinco vezes na produção deste composto nas raízes normais cultivadas sob condição de escuro total em relação às raízes cultivadas na presença de 16 horas de luz. A presença de auxina no meio sob condições de 16 horas de luz resultou em alta produção do composto não identificado 14, enquanto que a produção do composto 7 foi diminuída a tal ponto que não pôde mais ser detectada pela metodologia empregada. Por esta mesma metodologia, as análises químicas realizadas evidenciaram que após a transformação das raízes com a cepa 15834 de *Agrobacterium rhizogenes*, os clones resultantes selecionados (C6, C7 e C8) não apresentaram os terpenos de interesse.

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem aumentado muito o interesse na pesquisa de plantas medicinais com a finalidade de se estudar a viabilização e a otimização do protocolo de produção em larga escala de importantes princípios ativos (Tan *et al.*, 1998; Floryanowicz-Czekalska & Wysokinska, 2000). A espécie *A. annua*, planta alvo de estudo deste trabalho, se constitui numa rica fonte de lactonas sesquiterpênicas. As lactonas sesquiterpênicas são quimicamente distintas dos outros membros do grupo dos terpenóides, devido a presença de um sistema  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona. Muitas delas contêm carbonilas  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturadas, bem como epóxidos. Estes grupos funcionais representam sítios receptores reativos para nucleófilos biológicos, tais como tiol e os grupos amino das enzimas (Robbers *et al.*, 1996). Isso confere um amplo espectro de atividades biológicas a estes compostos, como por exemplo a tão conhecida ação antimalárica conferida à artemisinina **1** (Robbers *et al.*, 1996, Tan *et al.*, 1998; Bhakuni *et al.*, 2001). Além de **1**, outras lactonas sesquiterpênicas produzidas pela espécie *A. annua* são: amorfa-4,11-diene **2**, ácido artemisinínico **3**, ácido dihidroartemisinínico **4**, ácido dihidroartemisinínico hidroperóxido **5**, ácido artemisinínico hidroperóxido **6**, dihidro-epídeoxi-artenuína B **7**, epídeoxi-artenuína B **8**, artenuína-B **9**, deoxiartemisinina **10**, dentre outras (Zaman & Sharma, 1991; Brown, 1992; Robbers *et al.*, 1996; Bouwmeester *et al.*, 1999; Wallaart *et al.*, 2000). Segundo Foglio *et al.* (2002), os compostos **7** e **10** demonstraram forte atividade antiulcerogênica nos modelos de úlcera induzidos por indometacina e etanol comparável a droga padrão carbenoxolona. Segundo as pesquisadoras, o composto **7** inibiu o índice de lesões ulcerativas em 94,5% no modelo de úlcera induzida por indometacina, enquanto que o composto **10** apresentou 62,6% de inibição. No modelo de úlcera induzida por etanol, ambos os compostos apresentaram 95% de inibição das lesões ulcerativas em ratos. A atividade antiproliferativa destes compostos (**7** e

10) bem como de 3 também foi avaliada em cultura de células tumorais humanas de mama (MCF-7), mama resistente (NCIADR), pulmão (NCI-460) e melanoma (UACC), em concentrações crescentes de até 125 µg/mL (Kohn, *et al.*, 2001). Segundo estes pesquisadores, 7 e 3 apresentaram seletividade para as linhagens MCF-7 e NCI-460 enquanto que 10 apresentou citotoxicidade não seletiva.

Há um grande interesse econômico no aumento da produção comercial de compostos com importantes atividades biológicas. No entanto, normalmente, estes compostos são encontrados em baixíssimos níveis na planta. A concentração do composto 1 em *A. annua*, por exemplo, situa-se entre 0,1 e 1% do peso seco, dependendo da origem geográfica da planta (Wallaart *et al.*, 2000). Além disso, a complexidade química, de 1 em particular, torna inviável economicamente, a síntese deste composto, sendo, assim, a planta *A. annua*, considerada a única fonte comercialmente possível de extração deste sesquiterpeno lactônico para formulações de medicamentos (Van Geldre *et al.*, 1997; Bouwmeester *et al.*, 1999). Diversos esforços têm sido realizados no sentido de se obter maiores quantidades de metabólitos de interesse nas plantas. Uma das possibilidades para otimização da produção destes compostos seria através do melhoramento convencional e seleção genética em campo. Outra possibilidade seria o uso de técnicas biotecnológicas, tais como: o cultivo de plantas *in vitro*, o cultivo de suspensões celulares e o cultivo de raízes normais e/ou transformadas geneticamente através da inoculação de *A. rhizogenes*. Uma outra alternativa utilizada para este fim seria a engenharia da rota metabólica dos compostos de interesse (Wallaart *et al.*, 2000). Entretanto, para alguns compostos, como por exemplo, 1, o caminho biossintético não tem sido completamente elucidado. Segundo Bouwmeester *et al.* (1999), o primeiro passo do caminho biossintético de 1 em *A. annua* seria a conversão do farnesil pirofosfato 11 a um sesquiterpeno intermediário identificado como amorfa 4,11 diene 2 através de uma enzima com características de sesquiterpeno sintetase denominada amorfa 4,11 diene sintetase. Em seguida, o citocromo P-450 catalizaria a hidroxilação do C12 de 2

produzindo o álcool artemisinínico. Este álcool poderia, então, ser oxigenado duas vezes no C12 pela ação do citocromo P-450 produzindo o ácido correspondente, o ácido artemisinínico 3. Em seguida, 3 seria reduzido ao ácido dihidroartemisinínico 4 através da enzima ácido artemisinínico redutase. Muitos autores têm demonstrado que *A. annua* converte 3 e 4 em artemisinina 1 (Sangwan *et al.*, 1993; Wallaart *et al.*, 1999a). Segundo alguns autores (Foglio, M.A., 1996; Wallaart *et al.*, 1999a; Wallaart *et al.*, 2000) os conteúdos destes sesquiterpenos bem como dos óleos essenciais variam entre plantas de *A. annua* de diferentes origens geográficas, as quais resultam em diferentes quimiotipos. Wallaart *et al.*(2000) encontraram altos níveis de 1 e de 4 e relativamente baixos níveis de 3 em quimiotipos originários do Vietnã, enquanto que nos quimiotipos originários da China e Europa, ocorreu o inverso. Segundo estes autores, a observação de altos níveis de 3 nos quimiotipos originários da China e Europa, pode indicar a presença de um obstáculo no caminho biossintético de 1, justamente na redução enzimática de 3 em 4 pela enzima ácido artemisinínico redutase. À partir de 4 todas as outras conversões até 1 seriam não enzimáticas e sim oxidativas ou fotooxidativas. Estes autores constataram ainda que plantas com altos níveis de 3 continham também altos níveis de 9 e 6, enquanto que plantas com altos níveis de 4 continham apenas 7.

## 2. OBJETIVOS

Com a finalidade de se comprovar a eficácia das metodologias empregadas para a otimização do protocolo de produção, foram realizadas análises químicas para a avaliação da presença dos terpenos de interesse (artemisinina 1, ácido artemisinínico 3, , dihidro-epidioxi-artenuína B 7, deoxiartemisinina 10) nas raízes normais e transformadas obtidas e cultivadas *in vitro* conforme as metodologias descritas no capítulo II deste trabalho.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. MATERIAL VEGETAL E PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS PARA ANÁLISES QUÍMICAS

Amostras de raízes normais e transformadas obtidas conforme metodologias descritas no capítulo II deste trabalho foram utilizadas para a realização das análises químicas com a finalidade de se avaliar a presença dos terpenos de interesse. As raízes normais analisadas foram: raízes cultivadas em meio MS líquido desprovido de fitorreguladores sob fotoperíodo de 16 horas (N1); raízes cultivadas em meio MS líquido desprovido de fitorreguladores sob condição de escuro contínuo (N2) e raízes cultivadas em meio MS líquido acrescido de 0,01 mg/L de AIB sob fotoperíodo de 16 horas. Para as análises químicas das raízes transformadas, três clones foram selecionados, clones C6, C7 e C8 (Fig. II. 9). Baseado na literatura, os critérios de seleção utilizados para a escolha destes clones foram altas taxas de crescimento e fenótipos típicos de raízes em cabeleira (Moyano *et al.*, 1999; Mallof *et al.*, 2001). Os três clones selecionados foram obtidos pela inoculação de mini-estacas de *A. annua* com a cepa 15835 de *A. rhizogenes*. Estes materiais já secos foram, então, retirados do “freezer” onde estavam armazenados e submetidos imediatamente à maceração e à extração a frio e sob agitação constante por 2 horas em 3 etapas utilizando-se como solvente o diclorometano (Foglio *et al.*, 2002). A concentração dos extratos, sobre pressão reduzida em rotavapor, forneceu os seguintes extratos diclorometânicos: 33,9 mg para raízes normais N1; 50 mg para raízes normais N2; 33 mg para raízes normais N3, 38 mg para raízes transformadas do clone C6; 43 mg para raízes transformadas do clone C7 e 57 mg para raízes transformadas do clone C8.

### **3.2. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS SESQUITERPENOS DE INTERESSE**

Os padrões autênticos dos compostos 1, 3, 7 e 10, utilizados para o desenvolvimento deste trabalho, foram isolados e identificados a partir de extratos das partes aéreas do híbrido CPQBA 2/39 x PL5 de *A. annua* cultivado em campo durante o projeto Fapesp 99/00262-6 elaborado e executado por pesquisadores do CPQBA. Os compostos 7 e 10 foram identificados pela comparação de seus dados espectrais com os da literatura (Brown, 1992).

### **3.3. ANÁLISE QUALITATIVA POR CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA**

#### **(CCD)**

As cromatografias de camada delgada (CCD) foram efetuadas em cromatoplacas de Sílicagel 60 F254 (Merck 1.05554). A eluição das cromatoplacas foi realizada com um sistema de solventes hexano/acetato de etila 20 % (v/v). Para a visualização dos resultados utilizou-se o revelador anisaldeído (ácido acético/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/0-anisaldeído (50:1:0,5), seguido de aquecimento em estufa Corporation Precision (110°C, 5 min.).

### **3.4. ANÁLISE QUALITATIVA POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À**

#### **ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG/EM)**

Os extratos e substâncias puras (padrões autênticos) foram diluídas em acetato de etila ou metanol e analisadas por cromatografia gasosa capilar acoplada a um detector de massas (CG Hewlett Packard 5890, série II, diretamente acoplado a um detector seletivo de massas Hewlett Packard 5970, equipado com uma coluna de sílica fundida WCOT, 30m x 0,25 mm, DB-1 ou DB-5, ou similares). As condições de análise para lactonas sesquiterpênicas foram:

temperatura de injeção: 250°C; temperatura do detector: 300°C; programa de temperatura: 40 (2 min) -240°C, 5°C/min., 240-300°C, 10°C/min.; com ou sem razão de split 1:100 (dependendo da concentração da amostra); gás de arraste He 0,7 bar, 1 mL/min.; volume da amostra 1-2 µL.

### 3.5. ANÁLISE QUANTITATIVA POR CROMATOGRAFIA GASOSA COM DETECTOR DE IONIZAÇÃO DE CHAMAS (CG/DIC)

CG/DIC foi utilizado para a quantificação dos compostos isolados presentes nos materiais vegetais cultivados *in vitro*. As mesmas condições de análise para lactonas sesquiterpênicas utilizadas em CG/EM foram empregadas. A calibração linear da curva padrão para a quantificação do composto 7 foi obtida em três concentrações conhecidas deste composto: 0,18 mg/mL, 0,73 mg/mL and 1,82 mg/mL (Fig. IV.1).

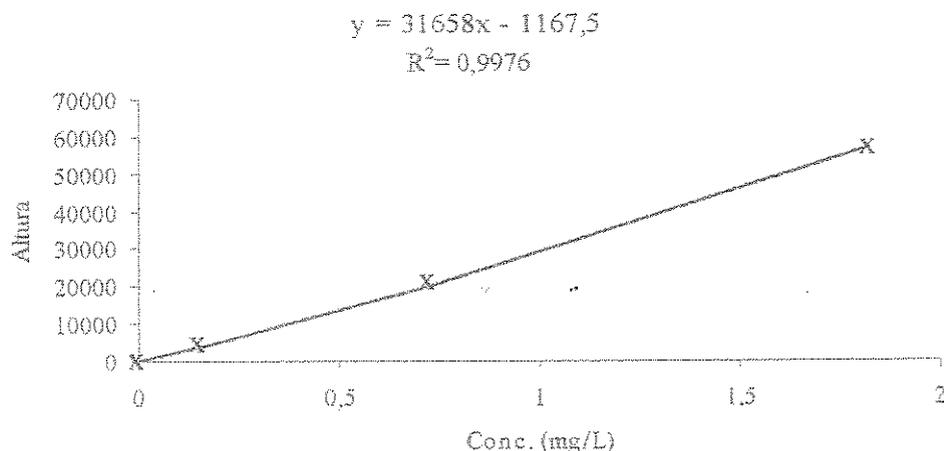


Fig. IV.1. Curva padrão utilizada para a quantificação de 7 (dihidro-epidioxi-artemúina B) obtida em três concentrações conhecidas deste composto: 0,18 mg/mL, 0,73 mg/mL e 1,82 mg/mL.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. ANÁLISES PRELIMINARES POR CCD

As análises químicas preliminares realizadas através de CCD revelaram a presença de **7** nas raízes normais cultivadas em meio MS sem adição de fitorreguladores sob ambas as condições de cultivo: fotoperíodo de 16 horas luz e escuro constante. Porém no extrato das raízes cultivadas sob escuro constante, a mancha com  $RF = 0,51$ , correspondente ao composto **7**, apareceu mais intensa, sugerindo maior concentração deste composto nestas raízes (Figura IV. 2a). A placa contendo ponto misto do padrão autêntico de **7** e do extrato das raízes cultivadas sob escuro contínuo pôde confirmar a presença do composto **7** neste extrato (Figura IV. 2b).

Na Fig. IV. 3, podemos observar que as manchas com coloração, formato e  $R_f$ s correspondentes aos padrões autênticos de **1** ( $RF = 0,24$ ), de **3** ( $RF = 0,28$ ) e de **10** ( $RF = 0,26$ ) não foram visualizadas nos extratos de nenhuma das raízes cultivadas *in vitro*. Nas raízes transformadas a mancha correspondente ao composto **7** ( $RF = 0,39$ ) também não foi visualizada.

Uma mancha com características idênticas ao padrão autêntico do composto  $\beta$  sitosterol **13** foi visualizada no extrato de todas as raízes cultivadas *in vitro*, inclusive das raízes transformadas (Fig. IV. 4).

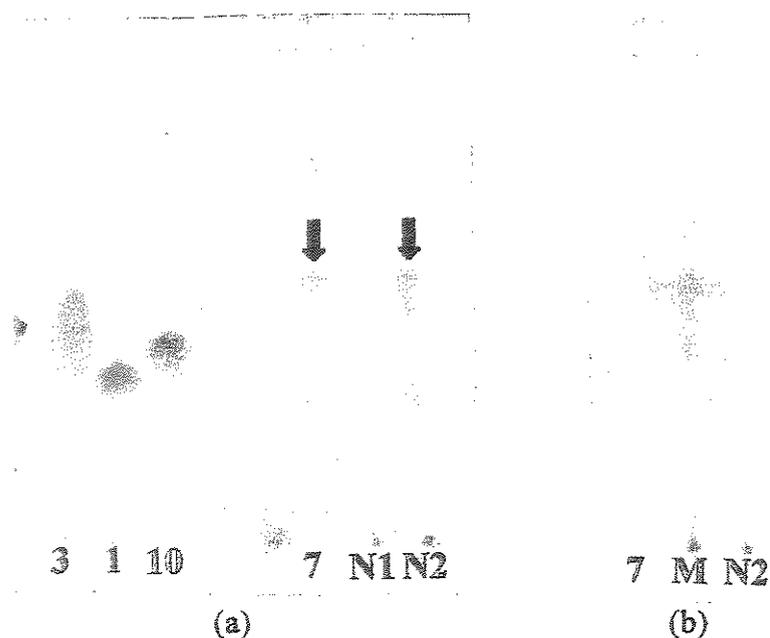


Fig. IV.2: Análises químicas preliminares por CCD para a avaliação da presença dos terpenos de interesse nas raízes normais de *A. annua* obtidas e cultivadas *in vitro* conforme metodologias descritas no capítulo II. (a) Placa para comparação dos padrões autênticos de artemisinina 1, ácido artemisinínico 3, dihidro-epidioxi-artenuína B 7 e deoxiartemisinina 10 com os extratos de raízes normais cultivadas em meio MS desprovidos de fitorreguladores sob fotoperíodo de 16 horas (N1) e sob condição de escuro contínuo (N2). (b) Ponto misto para confirmação da presença de 7 no extrato de raízes normais cultivadas em meio MS sob condição de escuro contínuo. M representa o ponto misto, onde foram colocadas quantidades semelhantes de ambos os extratos (padrão autêntico do composto 7 e raízes cultivadas sob escuro contínuo - N2).

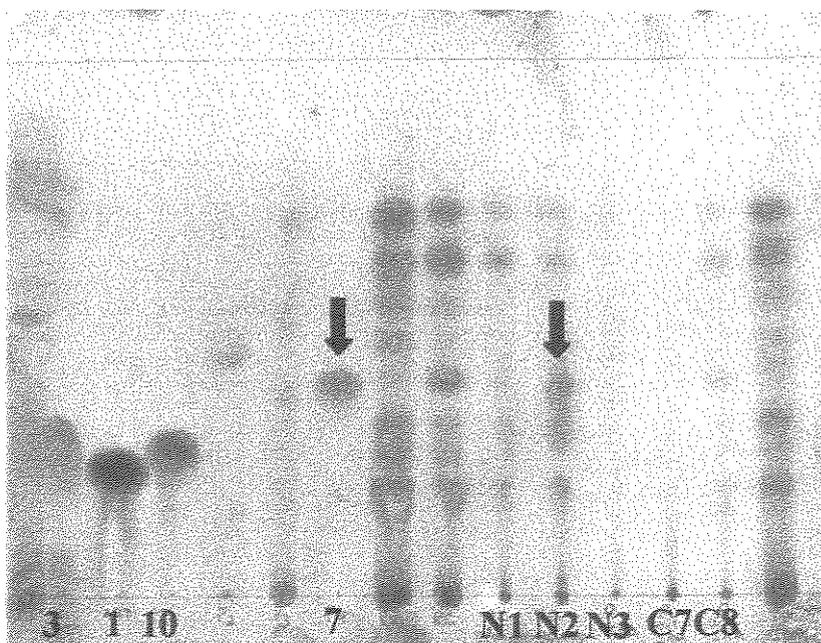


Fig. IV. 3. Análises químicas preliminares por CCD para avaliação dos terpenos de interesse tanto nas raízes normais quanto nas transformadas de *A. annua* obtidas e cultivadas *in vitro* conforme metodologias descritas no capítulo II. Placa para comparação dos padrões autênticos de artemisinina 1, ácido artemisinínico 3, dihidro-epidioxi-artenuína B 7 e deoxiartemisinina 10 com os extratos das raízes normais cultivadas em meio MS sem fitorreguladores sob fotoperíodo de 16 horas (N1) e sob escuro contínuo (N2); das raízes normais cultivadas em meio MS acrescidas de 0,01 mg/L de AIB sob fotoperíodo de 16 horas (N3); e de dois dos clones selecionados de raízes transformadas (clones C7 e C8) cultivados sob fotoperíodo de 16 horas.

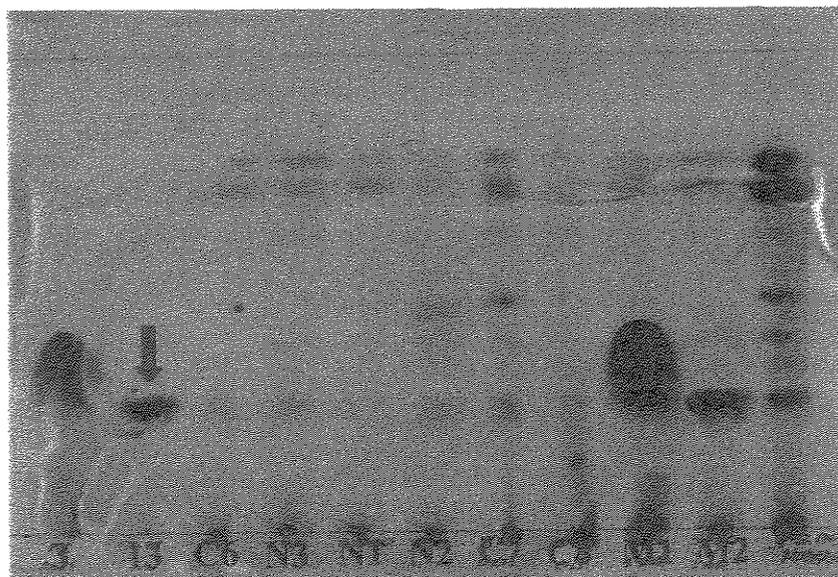


Fig. IV. 4. Placa de CCD para comparação dos padrões autênticos de ácido artemisinínico 3 e  $\beta$  sitosterol 13 com os extratos das raízes normais e transformadas de *A. annua* obtidas e cultivadas *in vitro* conforme metodologias descritas no capítulo II. Ambos os padrões foram comparados com extratos das raízes normais cultivadas em meio MS sem fitorreguladores sob fotoperíodo de 16 horas (N1) e sob escuro contínuo (N2); das raízes normais cultivadas em meio MS acrescidas de 0,01 mg/L de AIB sob fotoperíodo de 16 horas (N3); e dos três clones selecionados de raízes transformadas (clones C6, C7 e C8) cultivados sob fotoperíodo de 16 horas. M1 e M2 referem-se a pontos mistos, sendo que em M1 foram aplicadas quantidades semelhantes do padrão autêntico de 3 e de N3 e em M2 foram aplicadas quantidades semelhantes do extratos do padrão autêntico de 13 e de N3.

## 4.2. ANÁLISE QUALITATIVA POR CG/EM

A presença do composto 7 nas raízes normais cultivadas *in vitro* foi confirmada por comparação do seu perfil cromatográfico com o do padrão autêntico deste composto (Fig. IV.5) que foi gentilmente cedido pela Dra. Mary Ann Foglio. A análise do extrato destas raízes por cromatografia gasosa, revelou um pico A com tempo de retenção 12.767 minutos e no espectômetro de massas, foi obtido um íon molecular em  $m/z$  234 idêntico ao do padrão autêntico do composto 7. Um outro pico B com tempo de retenção 23.874 minutos foi detectado no extrato destas raízes. No espectro de massas foi observado um íon molecular em  $m/z$  204. Pelas características do padrão de fracionamento observado por CG/EM deste composto ainda não identificado 14, podemos sugerir que se trata de um terpeno. No extrato das raízes cultivadas sob fotoperíodo de 16 horas, pela comparação dos dois picos (A e B) obtidos nos cromatogramas, podemos observar que a concentração do composto 14 foi bem maior que a concentração do composto 7 (Fig. IV. 6). O inverso ocorreu no extrato das raízes cultivadas sob escuro contínuo, pois nesta condição, o teor do composto 7 foi superior ao teor do composto 14 (Fig. IV.7). A suplementação do meio MS com uma auxina de baixa atividade fisiológica (AIB) na concentração de 0,01 mg/L não interferiu na produção do composto 14, pois este composto foi detectado em quantidade apreciável no extrato das raízes normais cultivadas neste meio, sob fotoperíodo de 16 horas. No entanto, o cultivo destas raízes neste meio sob estas condições parece ter influenciado intensamente a produção do composto 7, diminuindo seu teor a tal ponto que o pico A, correspondente a este composto, não pode mais ser visualizado por CG/EM (Fig. IV.8).

Não foi verificada a presença de nenhum dos terpenos de interesse (1, 3, 7, 10 e 14) através das análises por CG/EM das raízes transformadas (clones selecionados C6, C7 e C8). O perfil cromatográfico do extrato das raízes transformadas do clone C8 indica a presença de

um pico C com tempo de retenção 19.454 correspondente a um composto contaminante do solvente orgânico, o ftalato 15, e um pico D com tempo de retenção 20.977, correspondente a um outro composto ainda não identificado 16, o qual provavelmente também pertence à classe dos terpenos. Nos espectros de massas aparece um íon molecular em  $m/z$  149 correspondente ao ftalato 15 e um íon molecular em  $m/z$  220 (Fig. IV.9).

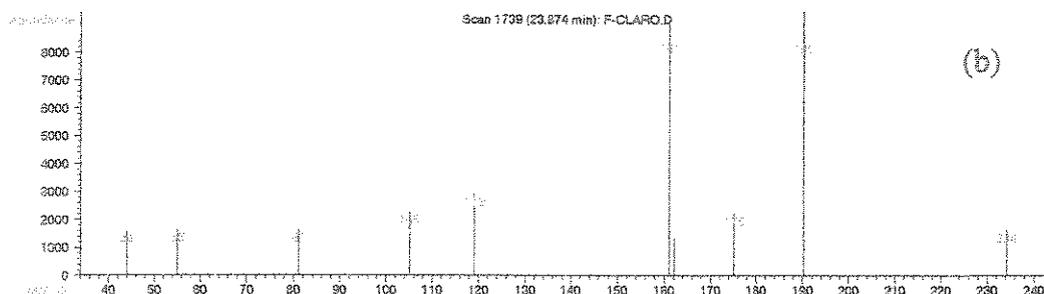
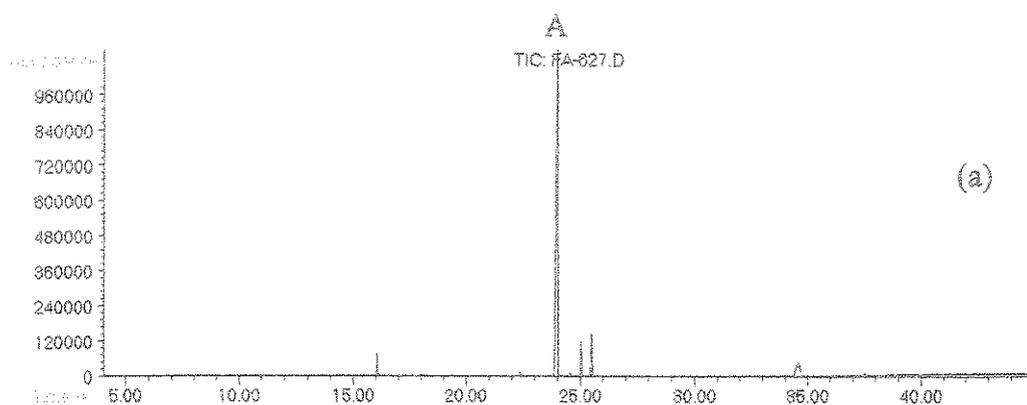


Figura IV.5. Perfil cromatográfico do padrão autêntico do composto dihidro-epideoxi-artenuína B 7 obtido no cromatógrafo a gás (HP 5890) acoplado a um detector de massas (HP 5970). (a) Cromatograma contendo um pico A com tempo de retenção 23.989 minutos. (b) Espectro de massas com íon molecular  $m/z$  234.

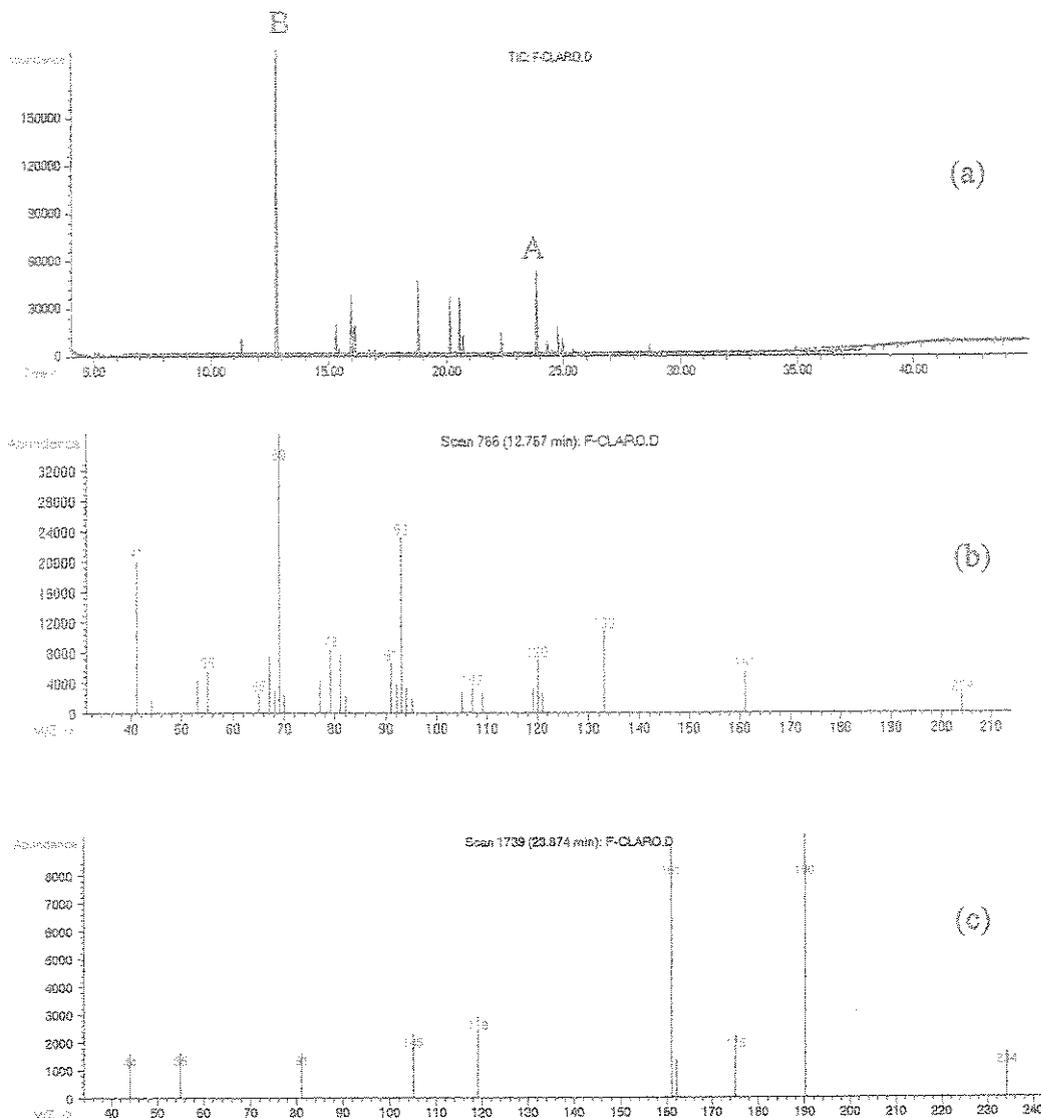


Figura IV.6: Perfil cromatográfico do extrato das raízes normais cultivadas em meio MS desprovido de fitorreguladores sob fotoperíodo de 16 horas obtido no cromatógrafo a gás (HP 5890) acoplado a um detector de massas (HP 5970). (a) Cromatograma contendo pico A com tempo de retenção 23.874 minutos correspondente ao composto dihidro-epideoxi-artenuína B 7 e pico B com tempo de retenção 12.767 minutos correspondente ao composto ainda não identificado 14. (b) Espectro de massas com íon molecular em  $m/z$  204 correspondente ao composto ainda não identificado 14. (c) Espectro de massas com íon molecular em  $m/z$  234 idêntico ao do padrão autêntico do composto dihidro-epideoxi-artenuína B 7.

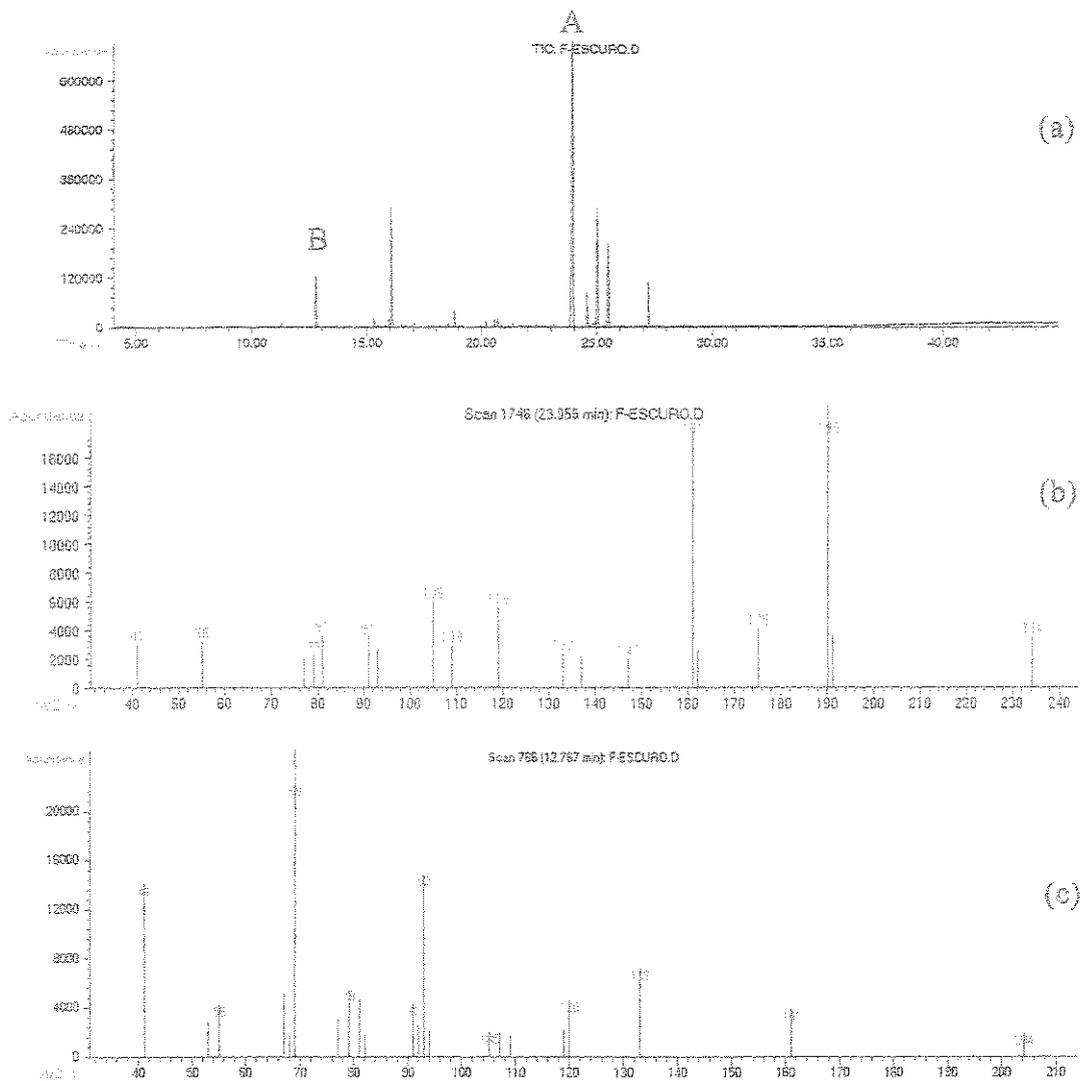


Figura IV.7: Perfil cromatográfico do extrato das raízes normais cultivadas em meio MS desprovido de fitoreguladores e sob condição de escuro contínuo obtido no cromatógrafo a gás (HP 5890) acoplado a um detector de massas (HP 5970). (a) Cromatograma contendo pico A com tempo de retenção 23.874 minutos correspondente ao composto dihidro-epideoxi-artenuína B 7 e pico B com tempo de retenção 12.757 minutos correspondente ao composto ainda não identificado 14. (b) Espectro de massas com íon molecular em  $m/z$  234 idêntico ao do padrão autêntico do composto dihidro-epideoxi-artenuína B 7. (c) Espectro de massas com íon molecular em  $m/z$  234 correspondente ao composto 14.

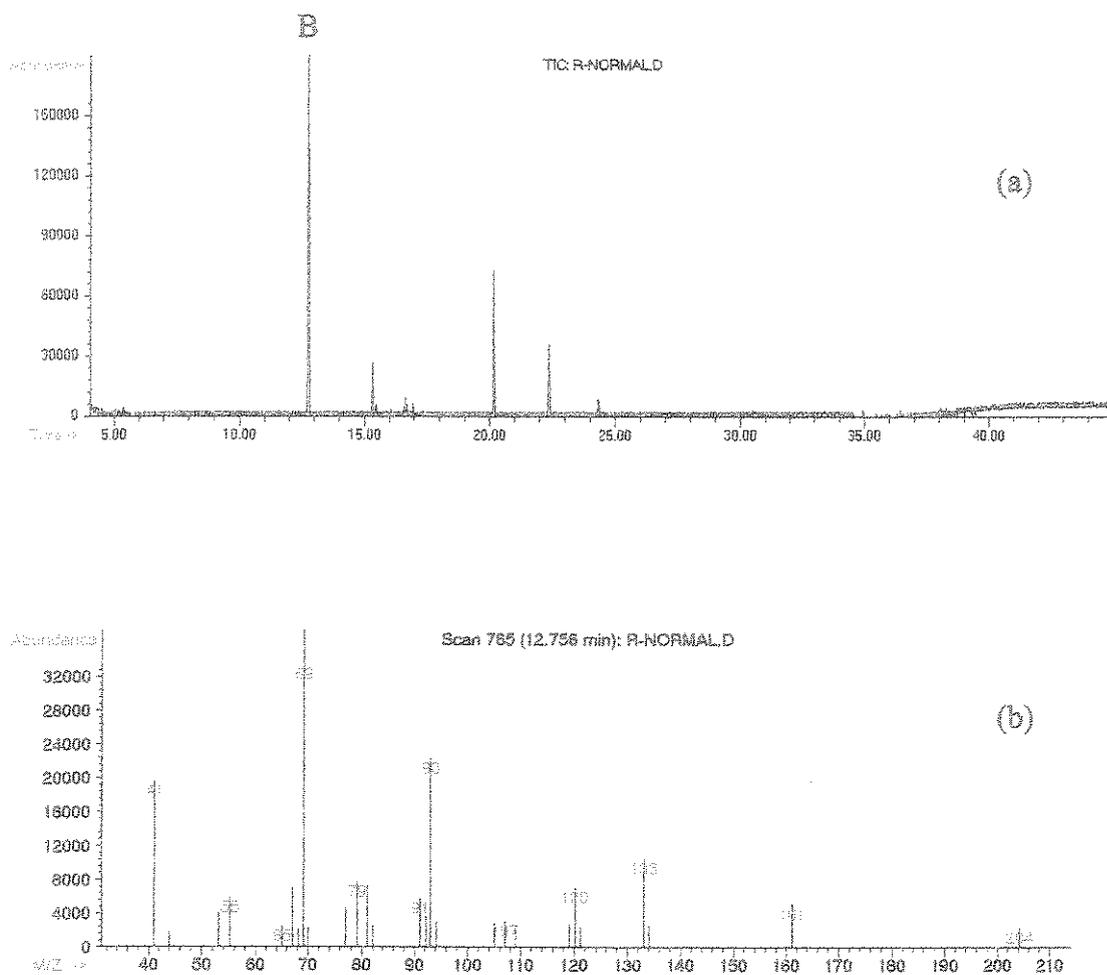


Figura IV.8: Perfil cromatográfico do extrato das raízes normais cultivadas em meio MS acrescido de 0,01 mg/L de AIB e sob fotoperíodo de 16 horas obtido no cromatógrafo a gás (HP 5890) acoplado a um detector de massas (HP 5970). (a) Cromatograma contendo pico B com tempo de retenção 12.767 minutos correspondente ao composto 14. (b) Espectro de massas com íon molecular em  $m/z$  204 correspondente ao composto 14.

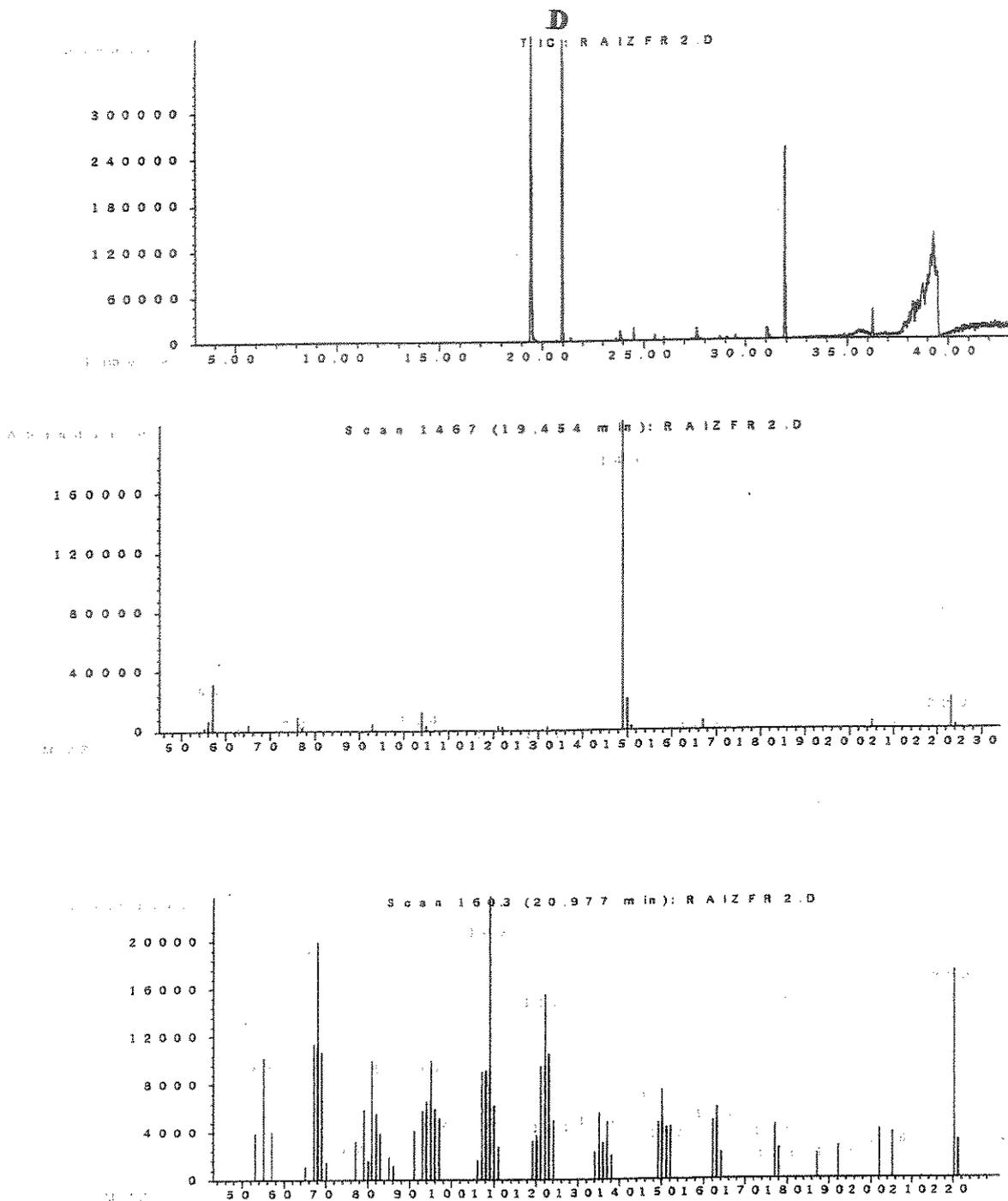


Figura IV.9: Perfil cromatográfico do extrato das raízes transformadas (clone C8) cultivadas em meio MS desprovido de fitorreguladores e sob fotoperíodo de 16 horas obtido no cromatógrafo a gás (HP 5890) acoplado a um detector de massas (HP 5970). (a) Cromatograma contendo pico D com tempo de retenção com tempo de retenção 20.977 minutos correspondente a um outro composto ainda não identificado 16. (b) Espectro de massas com íon molecular em 220 correspondente ao composto 16.

### 4.3. ANÁLISE QUANTITATIVA POR CG/DIC

A quantificação de 7 nas raízes normais mantidas sob diferentes condições de cultivo pôde ser realizada através de CG/DIC. Por esta metodologia pudemos constatar que o teor de 7 nas raízes cultivadas sob condição de escuro constante foi cinco vezes superior aquele observado nas raízes cultivadas sob ciclo de luz e escuro (Tabela IV.1).

Tabela IV.1: Teor de dihidro-epideoxi-artenuína B 7 detectado por CG/DIC em raízes normais cultivadas em meio MS sob fotoperíodo de 16 horas luz (N1) e sob de escuro contínuo (N2). As alturas são valores do eixo y (Figura IV.1). Estes valores, quando substituídos na equação da reta:  $y = 31658x - 1167,5$ , nos revelam os valores de x, correspondentes às concentrações de 7 em cada amostra.

Amostras	Alturas	Concentrações (mg/L)
N1	2521	0,12
N2	18978	0,64

## 5. DISCUSSÃO

As análises químicas das raízes cultivadas em meios MS acrescido de AIA nas concentrações de 0,1 e 0,01 mg/L não foram realizadas, pois nestes meios, as raízes apresentaram calos basais, os quais poderiam ocasionar variações genéticas indesejáveis, principalmente sob a forma de poliploidização e aneuploidização (Ammirato, 1983), modificando, desta maneira, as características do híbrido em questão, inclusive no que diz respeito ao conteúdo dos terpenos de interesse, não havendo, assim, fidelidade às características iniciais da planta matriz.

Para a avaliação da presença dos terpenos de interesse nas raízes transformadas foram selecionados três clones (C6, C7 e C8) que apresentaram maiores taxas de crescimento (Fig. II. 9) além de fenótipos típicos de raízes em cabeleira, pois de acordo com a literatura recente (Moyano *et al.*, 1999; Mallof *et al.*, 2001), raízes com este tipo de fenótipo têm apresentado maiores quantidades de metabólitos secundários. No entanto, nenhum dos compostos de interesse foi detectado nos clones analisados, através das metodologias empregadas neste trabalho. O metabolismo nestas raízes parece ter sido desviado para a produção de outros compostos, como pode ser observado no perfil cromatográfico do clone C8 (Fig. IV.9). Testes farmacológicos preliminares foram realizados nos extratos das raízes transformadas dos clones selecionados numa dosagem de 500 mg/Kg no modelo de úlcera induzido por indometacina, conforme a metodologia descrita por Dias (1997). Os resultados destes testes foram negativos, ou seja, não exibiram inibição nas lesões ulcerativas em ratos. Este fato reforça os resultados obtidos neste trabalho, os quais indicam ausência dos compostos antiulcerogênicos (dihidro-epideoxi-artenuína B 7 e deoxiartemisina II) nas raízes transformadas analisadas. Segundo, Endress (1994), em alguns casos, a transformação genética com *A. rhizogenes*, não afeta as quantidades relativas de compostos secundários

síntetizados, sendo que as concentrações encontradas geralmente se encontram nos mesmos níveis que nas raízes normais. Em outros casos, porém, modificações no conteúdo de metabólitos secundários em raízes transformadas têm sido observadas (Moyano *et al.*, 1999; Mallol *et al.*, 2001). O processo de inoculação de *Agrobacterium* em diversas espécies de plantas, ocasionando a inserção de genes da bactéria ao genoma nuclear da célula vegetal através da transferência do T-DNA pode proporcionar mudanças no metabolismo destas plantas, uma vez que os genes transferidos se expressam de maneira estável (Van Sluys *et al.*, 1992; Ream & Gelvin, 1996). Um dos genes transferidos da bactéria para a planta é o de produção de opinas. O desvio de esqueleto carbônico para a produção de opinas pode ocorrer, modificando, assim, a produção de alguns metabólitos secundários pelas raízes transformadas. Os três clones de raízes transformadas selecionados para as análises químicas foram obtidos pela inoculação das mini-estacas de *A. annua* com cepa 15834, a qual induz o armazenamento de manopina e agropina pela planta (Van Sluys, 1999; Otani *et al.*, 1996). Segundo alguns autores, o gene *aux* situado no segmento de TR-DNA das cepas produtoras de agropina, proporcionam às células transformadas uma adicional fonte de auxinas e podem exercer um importante papel tanto na morfologia como na produção de compostos secundários como terpenos (Mallol *et al.*, 2001) e alcalóides (Moyano *et al.*, 1999). A suplementação do meio de cultura com auxinas exógenas também pode causar modificações significativas na produção de alguns metabólitos secundários, apesar de normalmente incrementarem o crescimento de raízes normais (Norton & Towers, 1986). A produção de **7**, por exemplo, parece ter sido altamente influenciada pela presença de auxina, já que este sesquiterpeno estava completamente ausente no extrato das raízes normais cultivadas em meio MS acrescido de baixa concentração (0,01 mg/L) de AIB, uma auxina de baixa atividade fisiológica (Fig. IV.8). A presença de auxina parece não ter prejudicado a produção do composto **14**, o qual foi detectado em quantidade apreciável no extrato das raízes normais cultivadas em meio MS acrescido de AIB

na mesma concentração (0,01 mg/L). A ausência de **7** nos extratos dos clones de raízes transformadas analisados (clone C8 vide Fig IV.9) poderia ser explicada, em parte, pela maior sensibilidade hormonal das células transformadas aliada aos altos níveis endógenos de auxinas proporcionados por genes codificadores deste hormônio vegetal, os quais poderiam ter sido transferidos para o genoma da planta durante o processo de transformação genética.

A produção de deoxiartemisinina **10** parece ter sido altamente influenciada pelas condições de cultivo *in vitro*, já que a sua presença não foi detectada em nenhum dos extratos de raízes analisados. A ausência de **3** observada no extrato de todas as raízes analisadas, sugere fortemente a ocorrência de uma funcionalização do esqueleto carbônico deste composto para produção dos intermediários seguintes na rota biossintética de **1**, como, por exemplo, de **7** (Figura IV.10). Segundo Wallaart *et al.* (2000), nos quimiotipos originários do Vietnã, como é o caso do híbrido CPQBA 2/39 x PL5 utilizado neste trabalho, também foram encontrados baixos níveis de **3** bem como de **6** e **9** e altos níveis de **4** e **7**. De acordo com a rota biossintética sugerida por estes autores, após a conversão de **3** em **4**, todas as outras conversões posteriores até **1** seriam não enzimáticas e sim oxidativas ou fotooxidativas, sendo portanto altamente influenciadas pela luz (Figura IV.10). Sy & Brown (2001) também sugeriram que dihidro-epídeoxi-artenuína B **7** bem como outros sesquiterpenos são formados por reações de oxidação do ácido artemisinínico **3** e do ácido dihidroartemisinínico **4**. Estes autores comentam ainda que **7** poderia ser formado a partir do ácido dihidroartemisinínico hidroperóxido **5**. Os resultados obtidos neste trabalho, indicam que o teor de **7** observado nas raízes normais cultivadas em meio MS desprovido de fitorreguladores sob condição escuro contínuo foi aproximadamente cinco vezes superior aquele observado nas raízes cultivadas no mesmo meio de cultura, porém sob fotoperíodo de 16 horas (Tabela IV.1). Sob total ausência de luz poderia estar acontecendo uma inibição das reações dependentes de luz (oxidação e fotooxidação), o que ocasionaria um acúmulo de **4**, o qual seria convertido diretamente em **7**, possivelmente pela ação

de uma desidrogenase. Esta enzima seria ativada pelo acúmulo do substrato 4, sob condição de escuro contínuo (Lehninger *et al.*, 1993). Esta hipótese está representada pelas setas vermelhas na Fig. IV.10. Na presença de 16 horas de luz, as condições seriam favoráveis às reações de oxidação e fotooxidação, o que levaria a diminuição do substrato 4, o qual estaria sendo convertido a 5. Esta diminuição do substrato 4 levaria também a desativação da desidrogenase, e, conseqüentemente, a diminuição da produção de 7 que passaria a ser produzido, em menores quantidades, durante as 8 horas de escuro (Fig. IV.6). A produção de 7 parece ser inversamente proporcional a produção do composto não identificado 14, ou seja, no escuro, quando 7 é altamente produzido, 14 é detectado em pequena quantidade (Fig. IV.7) e sob ciclo de luz e escuro, o inverso ocorre (Fig. IV.6). Sob condição de ciclo de luz e escuro parece ter havido um desvio na rota metabólica no sentido da produção do composto 14. Segundo Wallart *et al.* (2000), a produção de 1 ocorre na presença de luz por oxidação de seu precursor direto, 5, e exige a presença de grande quantidade de  $^1\text{O}_2$ . Os autores afirmam que a produção desta forma de oxigênio pode ser realizada por certos produtos secundários conhecidos como cromatóforos, os quais são eficientes em catalisar a energia de transferência de um fóton para o oxigênio triplo ( $^3\text{O}_2$ ) produzindo o oxigênio único ( $^1\text{O}_2$ ). Yang *et al.* (1995), encontraram cromatóforos de diversas origens biogénicas, como por exemplo poliacetilenos e chromenos, na parte aérea de *A. annua*. Segundo Wallaart *et al.*, 1999a, a existência de outros compostos com potencial capacidade de gerar  $^1\text{O}_2$  em diversas partes da planta *A. annua* não é improvável já que este é um fenômeno bastante comum em diversas espécies de plantas. Por exemplo, a clorofila, presente nos cloroplastos, estão contidos na parte aérea de inúmeras plantas. Em *A. annua*, os tricomas glandulares, presentes principalmente nas inflorescências e folhas jovens, possuem grande quantidade de cloroplastos. Segundo Wallaart *et al.* (1999a), a clorofila excitada mais um sistema de fotogeração de oxigênio são potenciais fontes de produção de  $^1\text{O}_2$ , que é a molécula essencial para a conversão do ácido dihidroartemisínico 4

em artemisinina 1. No sistema radicular da planta cultivada no campo, a ausência de luz e de clorofila aliadas a pequena quantidade de oxigênio atmosférico seriam fatores limitantes a produção de artemisinina 1. No entanto, em raízes transformadas de *A. annua* cultivadas *in vitro* e mantidas sob fotoperíodo de 16 horas, a presença de clorofila foi observada por alguns autores (Jaziri *et al.*, 1995). Segundo Wallart *et al.* (2000), altos níveis de  $^1\text{O}_2$  podem ser formados em plantas sobre condições de estresse, tais como, água limitada, altos níveis de UV-B, condições de baixas temperaturas, ferimento nos tecidos das plantas, etc. As próprias condições de cultivo *in vitro* também impõe aos tecidos vegetais uma situação de estresse (Murashige, 1990). Os ferimentos dos tecidos promovido pelos cortes com bisturi realizados no momento das repicagens das raízes cultivadas *in vitro*, poderiam expor os cromatóforos existentes nestas raízes ao ar atmosférico presente no interior dos frascos, os quais, na presença de luz, produziram  $^1\text{O}_2$ . Devido a limitada troca de ar atmosférico permitida pela tampa dos frascos, a produção de  $^1\text{O}_2$  teria sido, hipoteticamente, insuficiente para a produção do composto 1, mas suficiente para a produção do ácido dihidroartemisinínico hidroperóxido 5. É conhecido da literatura que estes peróxidos (como por exemplo o composto 5) não podem ser acumulados nas plantas, pois eles contribuiriam para o ferimento e disfunção de muitas organelas (Knox. & Dodge, 1985). Este fato aliado a conhecida instabilidade do composto 5 (Wallaart *et al.*, 1999a) nos leva a levantar a hipótese de que outro composto, que não artemisinina 1, possa ter armazenado os oxigênios reativos, desviando, assim, a rota metabólica. A grande quantidade do composto 14 encontrada nos extratos das raízes normais cultivadas na presença de 16 horas de luz, poderia nos sugerir que o desvio da rota metabólica estaria ocorrendo no sentido da produção deste composto ainda não identificado (setas verdes-Figura IV.10). No entanto, a comprovação desta hipótese é algo que deverá ocorrer após o isolamento e identificação do composto 14, etapas que serão objetivos de trabalhos futuros.

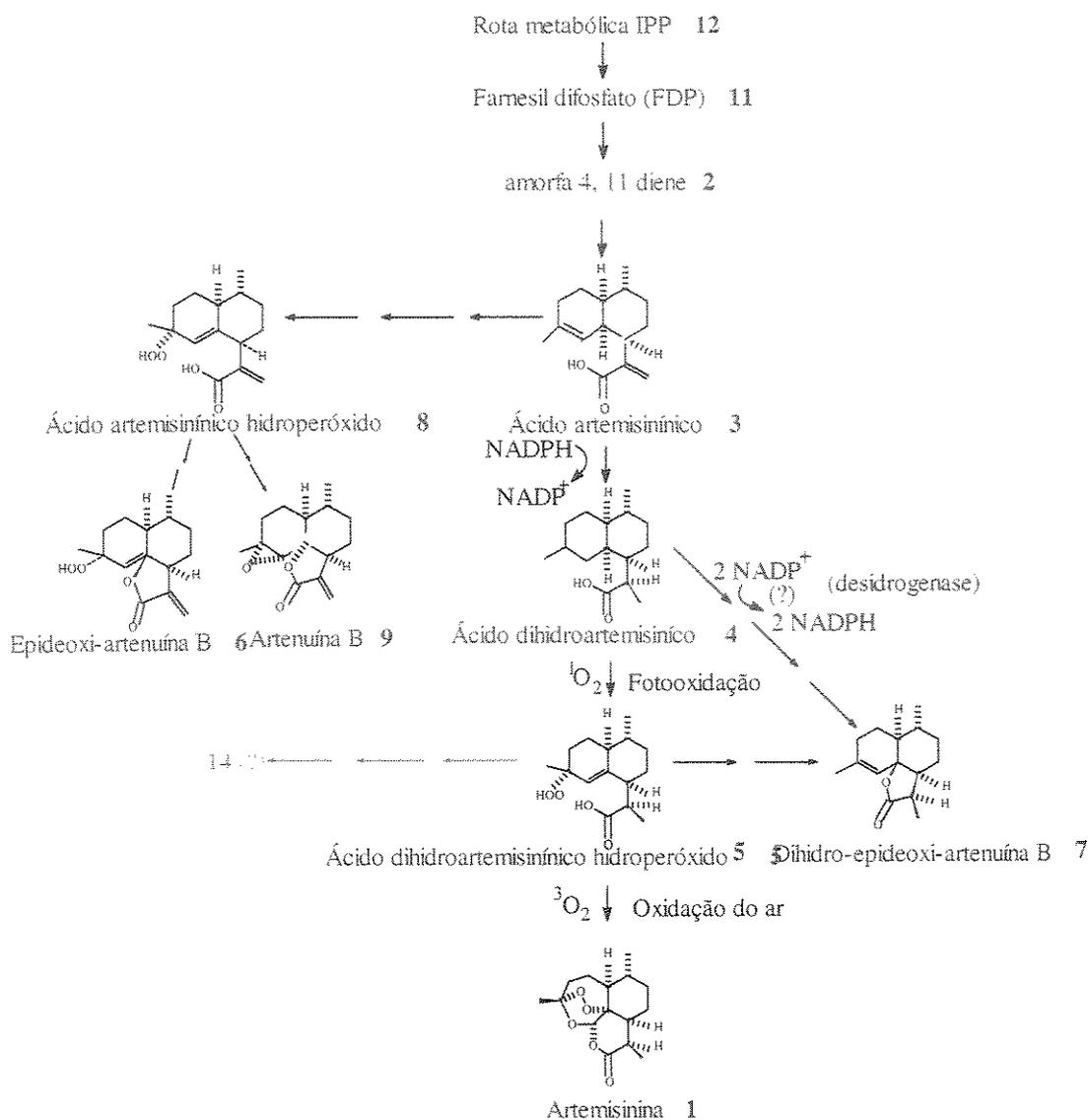


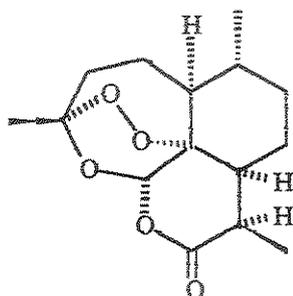
Figura IV.10: Caminho biossintético da artemisinina 1 e seus precursores em *A. annua*. O primeiro passo seria a conversão de 11 a 2 pela enzima amorfa 4, 11 diene sintetase (Bouwmeester *et al.*,1999). Em seguida, 2 seria convertido a 3. Após a conversão de 3 em 4 pela enzima ácido artemisinínico redutase, todas as outras conversões posteriores até o composto final, 1, seriam não enzimáticas e sim fotooxidativas (Waallart *et al.*, 2000). As flexas vermelhas sugerem um possível caminho para a formação do dihidro-epideoxi-artenuína B 7, sob condição escuro contínuo, no qual 4 se converteria diretamente em 7, provavelmente através da ação de uma desidrogenase. As flexas verdes indicam um possível caminho hipotético no qual o composto ainda não identificado 14 poderia ser formado na presença de 16 horas de luz.

## 6. CONCLUSÕES

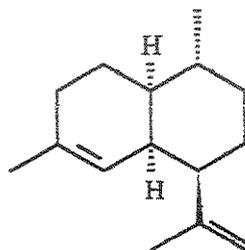
Dos terpenos estudados, artemisinina **1**, ácido artemisinínico **3** e deoxiartemisinina **10** não estavam presentes em nenhum dos extratos de raízes normais e transformadas analisados através das metodologias empregadas neste capítulo.

As análises por CG/EM dos extratos das raízes normais cultivadas no meio MS desprovido de fitorreguladores revelaram a presença de dihidro-epideoxi-artenuína B **7** e do composto **14**, um composto ainda não identificado. As características do padrão de fracionamento observada por CG/EM do composto **14** nos sugerem que se possa tratar de um terpeno. As condições fotoperiódicas de cultivo das raízes influenciaram na produção destes dois terpenos, sendo que a produção do composto **14** foi inversamente proporcional a produção do composto **7**, ou seja, sob condição de escuro contínuo, quando o composto **7** foi intensamente produzido, o composto **14** foi detectado em pequenas proporções e, sob fotoperíodo de 16 horas, o inverso ocorreu. A quantificação do composto **7** por CG/DIC revelou que no extratos das raízes normais cultivadas sob escuro contínuo, este composto estava presente numa concentração cinco vezes superior àquela encontrada no extrato destas raízes cultivadas na presença de 16 horas de luz. A presença de auxina no meio MS (0,01 mg/L de AIB) também influenciou na produção dos compostos **7** e **14** pelas raízes normais cultivadas sob fotoperíodo de 16 horas, pois no extrato destas raízes, se observou a total ausência de **7**, enquanto que **14** estava presente em quantidade apreciável. O processo de transformação genética parece ter influenciado sobremaneira a produção dos compostos estudados, pois nenhum deles, nem mesmo os compostos **7** e **14**, estavam presentes nos extratos das raízes transformadas dos clones analisados (C6, C7 e C8). Nestas raízes, o metabolismo possivelmente foi desviado para a produção de outros compostos.

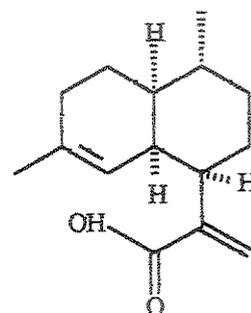
## 7. APÉNDICE



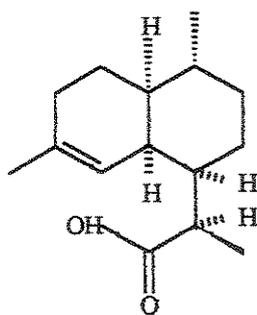
Artemisinina  
1



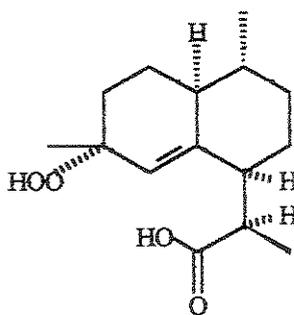
Amorfa 4,11 diene  
2



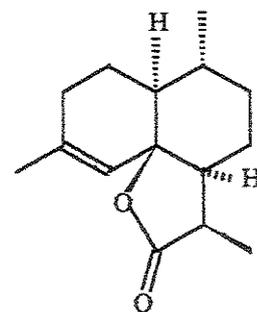
Ácido artemisinico  
3



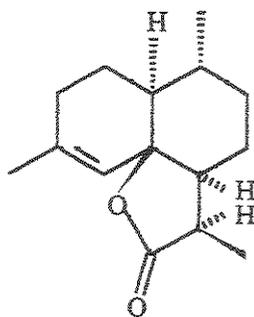
Ácido dihidroartemisinínico  
4



Ácido dihidroartemisinínico hidropéroxido  
5

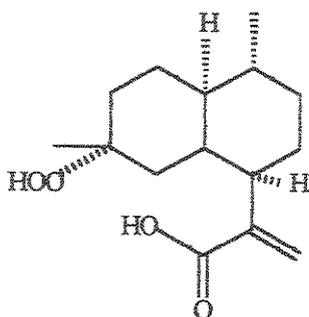


Epi-dioxiartenuína B  
6



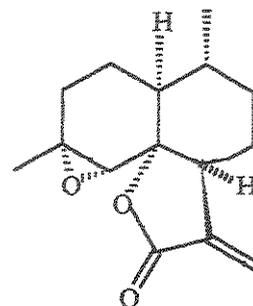
Dihidro-epideoxi-artenuína B

7



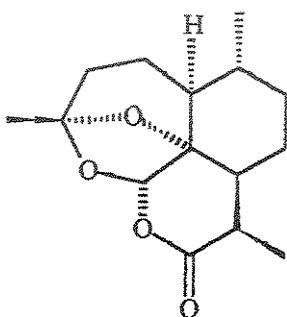
Ácido artemisinínico hidroperóxido

8



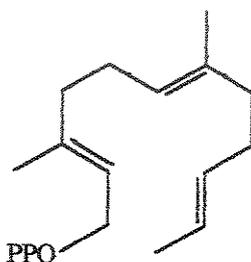
Artenuína B

9



Deoxiartemisina

10



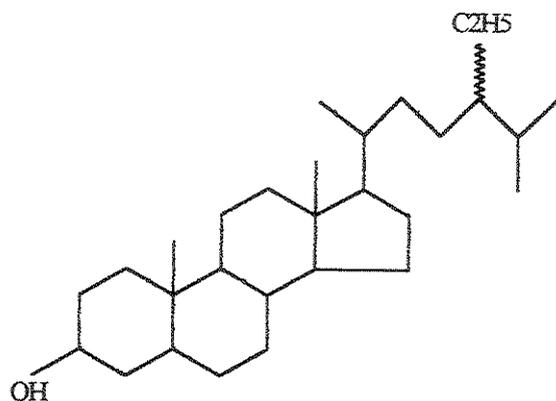
Farnesil pirofosfato (FDP)

11



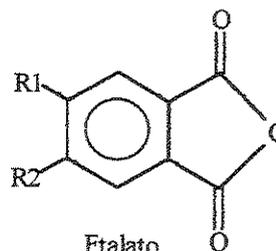
Isopentaniil pirofosfato

12



B Sitosterol

13



Ftalato

15

## **CAPÍTULO V**

### **ENSAIOS DE BIOAUTOGRAFIA**

## RESUMO

Os terpenos de interesse (artemisinina 1, ácido artemisinínico 3, dihidro-epideoxi-artenuína-B.7 e deoxiartemisinina 10) foram estudados quanto as suas atividades antimicrobianas (antifúngicas e antibacterianas) através de ensaios bioautográficos. Estes ensaios foram realizados com CCD utilizando cromatoplasmas, as quais foram preparadas em duplicata, aplicando-se concentrações conhecidas das soluções dos terpenos estudados, além de uma solução antibiótica de Cloranfenicol (bactericida) ou Nistatina (fungicida), compostos usados como padrão para visualização da inibição do crescimento dos microrganismos selecionados. Após a eluição das cromatoplasmas, uma das placas foi submetida aos ensaios bioautográficos com os microrganismos e a outra foi revelada. Os microrganismos selecionados foram: *Bacillus subtilis*, *Salmonella choleraesuis*, *Micrococcus luteus*, *Rhodococcus equi*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*. Para os testes de bioautografia utilizou-se a técnica de inoculação por Pour-Plate (Marta Teixeira Duarte, comunicação pessoal). Os resultados mostram que nenhuma das lactonas sesquiterpênicas estudadas apresentou atividade antifúngica com a linhagem de *Candida albicans*. Já as atividades antibacterianas foram comprovadas tanto para os compostos 1 e 3, ambos com as linhagens das bactérias *B. subtilis*, *R. equi*, *S. aureus* e *E. coli*, como para o composto 7 com as linhagens das bactérias *B. subtilis*, *M. luteus* e *S. aureus* e para o composto 10, com as linhagens das bactérias *B. subtilis*, *R. equi*, *M. luteus* e *S. aureus*.

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente a aplicação de bioensaios visando o isolamento de compostos ativos vem sendo muito apreciada pelos pesquisadores, não só pelo número de metabólitos secundários biologicamente ativos isolados de plantas, como também pelo desenvolvimento de inúmeros testes biológicos sensíveis e simples.

A bioautografia ou bioautograma é um teste biológico muito utilizado pelos fitoquímicos. É uma técnica baseada na resposta biológica (crescimento ou inibição) de um determinado composto em análise, quando exposta a ação de microorganismos (Van den Dool, 1963 citado por Nogueira, 1999). Esta técnica foi desenvolvida inicialmente para detecção de antibióticos, os quais são ainda hoje as substâncias mais testadas por esse tipo de ensaio. Tanto a cromatografia de papel com a cromatografia de camada delgada (CCD) tem sido utilizada com sucesso na análise de várias compostos por esta técnica. A cromatografia de papel foi utilizada pela primeira vez por Goodall & Levi em 1946 e quinze anos depois, Fisher & Lauttner utilizaram esta técnica com CCD também para análise de antibióticos, sendo que os resultados foram tão satisfatórios que abriram caminho para o enorme desenvolvimento da bioautografia (Nogueira, 1999).

Segundo Tang *et al.* (2000), as plantas do gênero *Artemisia* se constituem numa rica fonte de sesquiterpenos, os quais têm recebido grande atenção dos pesquisadores devido a sua diversidade biológica e química. As espécies *A. annua* e *A. sieversiana* têm sido utilizadas há séculos como agentes antimicrobianos pelos chineses (Peana *et al.*, 1997). Ao longo do tempo, ambas as espécies têm sido estudadas química e biologicamente, porém ainda muito pouco é conhecido sobre as atividades antimicrobianas de seus compostos, pois a maioria dos trabalhos realizados concentraram objetivos em outras atividades biológicas importantes, tais como: antimalárica, antitumor, alelopática, anti-inflamatória, antiulcerogênica, antipirética,

analgésica, etc (Mimaki *et al.*, 1999; Tan *et al.*, 1998). Segundo Rahalison *et al.* (1993) citado por Tan *et al.* (1998), as pesquisas de novos agentes antifúngicos têm sido uma tarefa urgente devido ao extraordinário aumento da incidência de micoses sistêmicas oportunistas. Recentemente, Tang *et al.* (2000) relataram o efeito inibitório de artenuína B no crescimento do fungo patogênico humano *Candida albicans* e do fitopatogênico *Gaeumannomyces graminis*, *Gerlachia nivalis* e *Verticillium dahliae*. O efeito antibacteriano de alguns compostos presentes em *A. annua* bem como em outras espécies deste gênero, também tem sido relatado (Tan *et al.*, 1998). Segundo os autores, alguns destes compostos fazem parte das classes dos flavonóides e dos terpenos (monoterpenos e sesquiterpenos lactônicos). É relatado que o ácido artemisinínico, por exemplo, demonstrou forte atividade antibacteriana.

Uma investigação contínua das atividades biológicas dos compostos secundários presentes no gênero *Artemisia* é extremamente recomendada e necessária para exploração desta rica fonte de novos agentes quimioterapêuticos e agrícolas.

## 2. OBJETIVO

Como as lactonas sesquiterpênicas são mencionadas como portadoras de diversas atividades biológicas, este capítulo teve como finalidade a verificação das atividades antimicrobianas (antifúngicas e antibacterianas) dos sesquiterpenos de interesse estudados neste trabalho (artemisinina 1, ácido artemisinínico 3, dihidro-epideoxi-artenuína-B.7 e deoxiartemisinina 10) através de alguns ensaios bioautográficos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Para os ensaios bioautográficos foram utilizadas cromatoplasmas de Silicagel 60 F<sub>254</sub> (Merck 1.05554.) na dimensão de 6 x 6 cm ou 3 x 6 cm (largura x comprimento). As placas foram preparadas em duplicata, aplicando-se concentrações conhecidas das soluções dos compostos estudados, além de uma solução antibiótica de Cloranfenicol (bactericida) ou Nistatina (fungicida), compostos usados como padrão para visualização da inibição do crescimento dos microrganismos. As concentrações destes compostos foram específicas para cada microrganismo e estão expostas na Tabela V.1. Para se conseguir amostras de concentração de 5mg/L, aplicou-se em cada placa 1µL (ou 5µg) de cada um dos compostos analisados (Tabela V.2). Eluiu-se as cromatoplasmas com o sistema de solventes hexano/acetato de etila 20 % (v/v). Uma das placas foi submetida aos ensaios bioautográficos com os microrganismos selecionados e a outra foi revelada com solução de anisaldeído (ácido acético/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/p-anisaldeído (50:1:0,5) (ácido acético/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/p-anisaldeído (50:1:0,5)).

Para os testes biológicos foram utilizados os seguintes microrganismos: *Bacillus subtilis*, *Salmonella choleraesuis*, *Micrococcus luteus*, *Rhodococcus equi*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Para os testes de bioautografia utilizou-se a técnica de inoculação por Pour-Plate sob a orientação da Dra. Marta Teixeira Duarte da Divisão de Microbiologia do CPQBA/UNICAMP, onde alíquotas das culturas dos microrganismos selecionados, com densidade óptica de suspensão de 25 % de transmitância em espectrofotômetro, foram inoculadas em 20 mL de meios NA ou YNA com cerca de 40°C de temperatura sendo acrescido com 0,5 mL de solução reveladora de Cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio (CCT). Após a homogeneização, esta mistura, contendo meio semi-sólido, culturas dos microrganismos e solução reveladora, foi, então, imediatamente vertida em placas de Petri, as quais já continham

a placa de CCD eluída com os compostos em estudo. Posteriormente, estas placas foram levadas à estufa com temperatura e tempo de permanência variável dependendo do microorganismo em questão (*Candida albicans* 36°C por 48 horas, os demais microorganismos 28° C por 24 horas).

Para a preparação do meio de cultura de bactérias NA foi usado Nutrient ágar (Oxoid) em água destilada na concentração de 28 g/L. Na preparação do meio YNA foram utilizados: 20 g ágar-ágar (Merck), 10 g glicose (Synth), 5 g peptona (Oxoid), 3 g extrato de levedura (Merck), 5 g extrato malte (Biobrás) para cada litro de água destilada.

Tabela V.1: Ensaios bioautográficos: microorganismos empregados e volumes dos respectivos antibióticos a serem aplicados nas placas de CCD.

Microorganismos empregados para os ensaios bioautográficos	Solução antibiótica inibidora	Concentração da solução estoque	Volume a ser aplicado nas placas-CCD
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Clorafenicol	6 mg/mL	2 µl
<i>Salmonella choleraesuis</i>	Clorafenicol	0,5 mg/mL	1 µl
<i>Bacillus subtilis</i>	Clorafenicol	0,5 mg/mL	0,5 µl
<i>Rhodococcus equi</i>	Clorafenicol	0,5 mg/mL	2 µl
<i>Micrococcus luteus</i>	Clorafenicol	0,5 mg/mL	4 µl
<i>Staphylococcus aureus</i>	Clorafenicol	0,5 mg/mL	1 µl
<i>Escherichia coli</i>	Clorafenicol	0,5 mg/mL	3 µl
<i>Candida albicans</i>	Nistatina	3 mg/mL	1 µl

Tabela V.2: Sesquiterpenos de interesse empregados nos testes biológicos.

Sesquiterpenos empregados
Artemisinina 1
Ácido artemisinínico 3
Dihidro-epideoxi-artenuína B 7
Deoxiartemisinina 10

#### 4.. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nos ensaios bioautográficos com as amostras dos compostos em estudo encontram-se na Tabela V.3 e nas Figs. V. 1 e V.2 indicadas posteriormente.

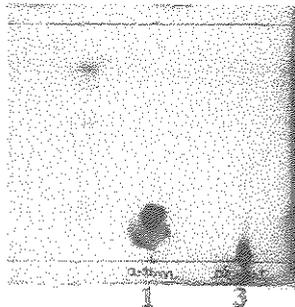
Tabela V.3: Atividade antimicrobiana dos sesquiterpenos.

Compostos empregados	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Salmonella choleraesuis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Rhodococcus equi</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>
1	-	-	+	+	-	+	+	-
3	-	-	+	+	-	+	+	-
7	-	-	+	-	+	+	-	-
10	-	-	+	+	+	+	-	-

+ = ativo ; - = inativo

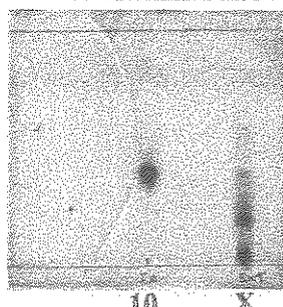
Como pode ser observado nos resultados apresentados na Tabela V.3 e nas placas de bioautograma das Figs. V.1 e V.2, nenhuma das lactonas sesquiterpênicas estudadas apresentou atividade antifúngica com a linhagem de *Candida albicans*. Já a atividade antibacteriana foi comprovada tanto para os compostos 1 e 3, ambos com as linhagens das bactérias *B. subtilis*, *R. equi*, *S. aureus* e *E. coli*, como para o compostos 7, com as linhagens das bactérias *B. subtilis*, *M. luteus* e *S. aureus* e para o composto 10, com as linhagens *B. subtilis*, *R. equi*, *M. luteus* e *S. aureus*

Artemisinina 1/ ác.artemisinínico 3

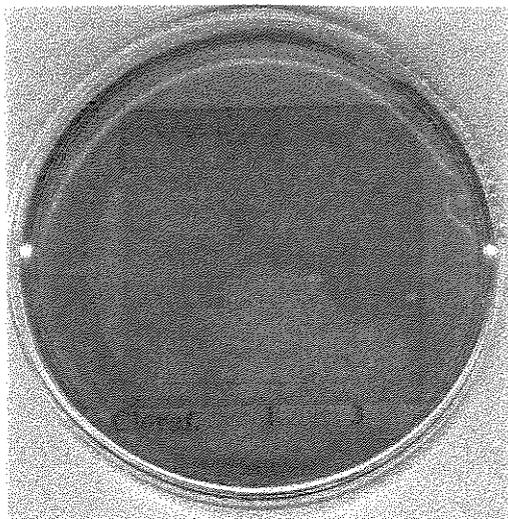


*Staphylococcus aureus* (art. 1/ ácido art. 3)

Deoxiartemisinina 10

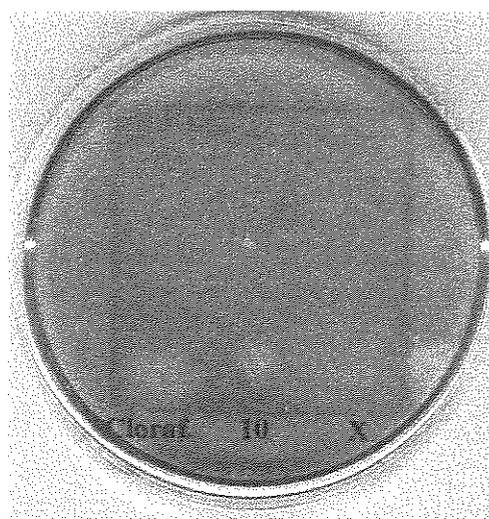


*Micrococcus luteus* (deoxiart. 10)



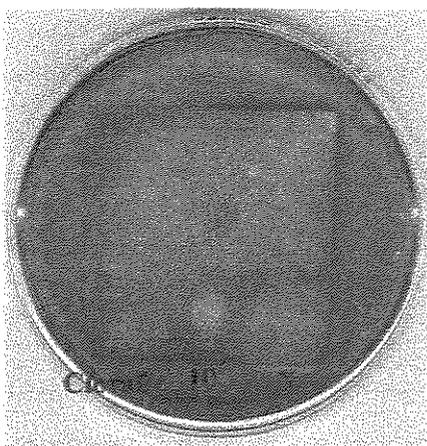
Concent. amostra: 1 mg/mL  
Aplicação: 1 µL

*Staphylococcus aureus* (deoxiart. 10)

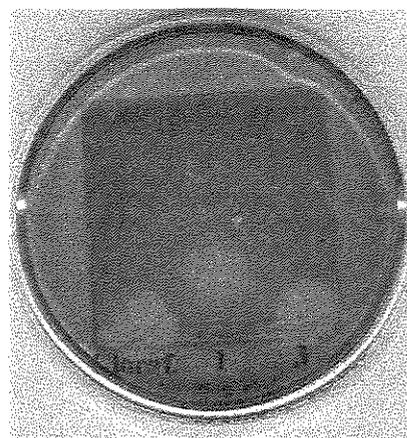


Concent. amostra: 1 mg/mL  
Aplicação: 1 µL

*Bacillus subtilis* (art. 1/ ácido art. 3)

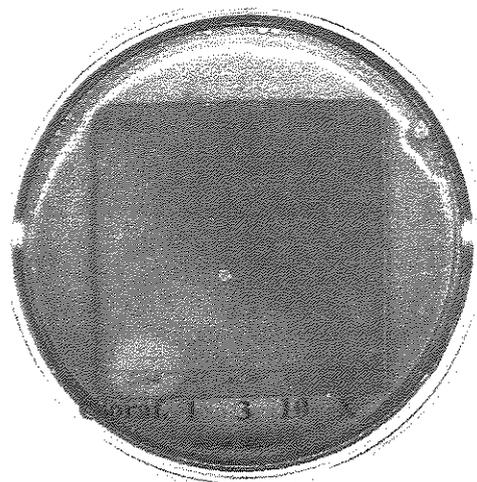


Concent. amostra: 1 mg/mL  
Aplicação: 1 µL



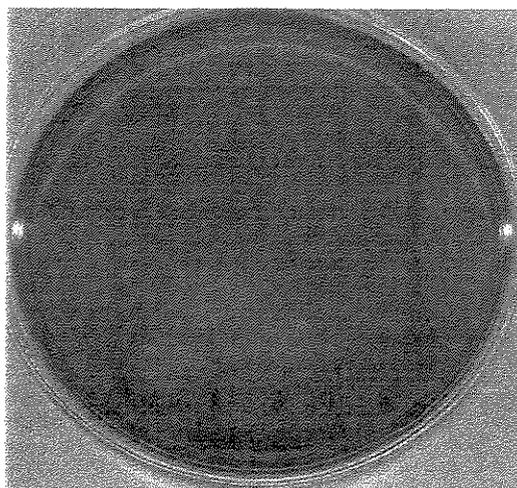
Concent. amostra: 1 mg/mL  
Aplicação: 1 µL

*Escherichia. coli* (art. 1/ác. art. 3/deoxiart 10)



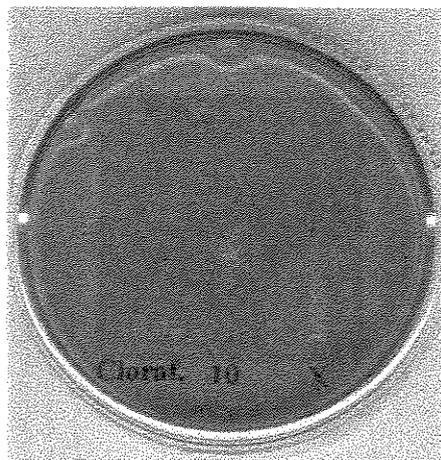
Concent. amostra: 5 mg/mL  
Aplicação: 1 µL

*Rhodococcus equi* (art. 1/ác.art.3/deoxiart 10)



Concent. amostra: 5 mg/mL  
Aplicação: 1 µL

*Bacillus subtilis* (deoxiart. 10)



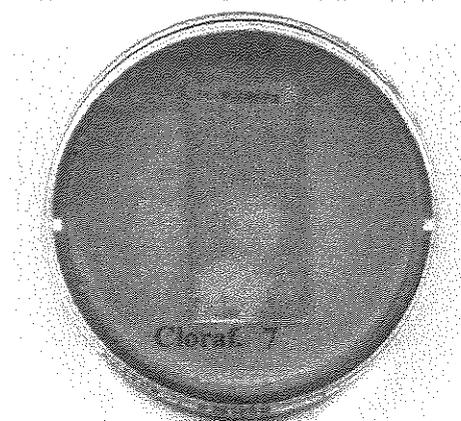
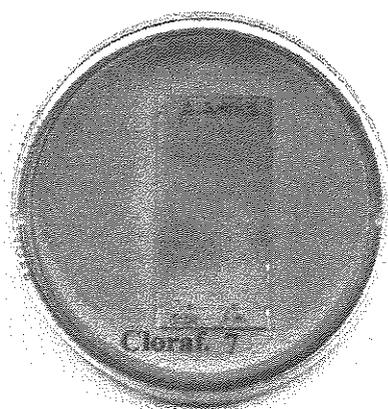
Concent. amostra: 5 mg/mL  
Aplicação: 1 µL

Figura V.1. Placas de bioautograma para avaliação das atividades antimicrobianas de artemisinina 1 e do ácido artemisinínico 3 bem como do composto antiulcerogênico deoxiartemisinina 10. O ponto X refere-se às atividades antimicrobianas da fração F<sub>3</sub>. Esta fração contém uma mistura de compostos ainda não isolados nem identificados, mas que também apresentou atividade antiulcerogênica (Dias, 1997).



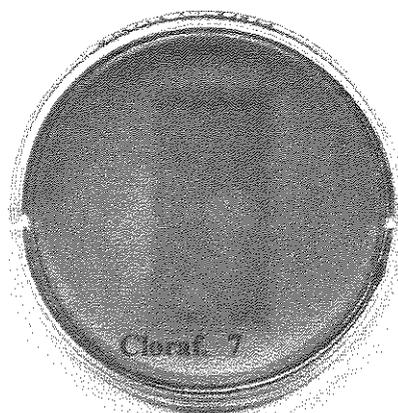
*Bacillus subtilis*

*Micrococcus luteus*



Conc. amostra: 5 mg/mL - Aplicação: 1  $\mu$ L (5  $\mu$ g)

*Staphylococcus aureus*



Conc. 2,5 mg/mL - Aplicação: 2  $\mu$ L (2,5  $\mu$ g)

Figura V.2. Placas de bioautograma para avaliação das atividades antimicrobianas do composto dihidro-epideoxi-artenuína B 7.

## 5. CONCLUSÃO

Neste capítulo foram detectadas atividades antibacterianas em todos os sesquiterpenos estudados (artemisinina, ácido artemisinínico, deoxiartemisinina e dihidro-epídeoxi-artenuína B), porém nenhum deles apresentou efeito inibitório no crescimento da linhagem do fungo testado (*Candida albicans*).

## CONCLUSÕES GERAIS

A propagação *in vitro* à partir de ápices meristemáticos caulinares vem se mostrando uma poderosa ferramenta para o estudo de processos metabólicos em plantas de diferentes espécies, além de ser comprovadamente viável como metodologia para propagação de genótipos únicos e/ou híbridos superiores, como é o caso do híbrido CPQBA 2/39 xPL5 utilizado neste trabalho. Diversas são as vantagens da utilização da cultura de tecidos sobre a extração de metabólitos secundários diretamente de plantas. A utilização de raízes para trabalhos com metabólitos secundários é ainda mais interessante que a utilização da parte aérea, pois nas raízes a ausência ou limitada presença da clorofila e de substâncias graxas facilitam o isolamento e purificação dos compostos de interesse. No caso de metabólitos produzidos pelas raízes, a utilização da técnica de cultura de raízes normais e/ou transformadas geneticamente com *A. rhizogenes* pode ser extremamente viável. Neste sentido, foram desenvolvidos protocolos para a iniciação, estabelecimento e cultura *in vitro* destas raízes bem como de calos originados a partir de explantes radiculares, tendo como finalidade o estudo de alguns terpenos com importantes atividades biológicas, tais como: os compostos antiulcerogênicos dihidro-epideoxi-artenuína B e deoxiartemisínina; o composto antimalárico artemisínina e seu precursor ácido artemisinínico, o qual, ultimamente, também tem sido relacionado a importantes atividades medicinais. Estudos recentes têm ressaltado a importância do estudo de metodologias para otimização dos compostos antiulcerogênicos mencionados, pois outras importantes atividades medicinais, como por exemplo a antiproliferativa, têm sido atribuídas a estes compostos.

O processo de transformação genética interferiu intensamente na produção dos terpenos de interesse. Parece ter havido um desvio do metabolismo secundário para a produção de outros compostos, pois os terpenos mencionados não foram detectados nos extratos das raízes transformadas analisados pelas metodologias empregadas neste trabalho. No entanto, a produção

do composto dihidro-epideoxi-artenuína B foi intensamente incrementada pelas condições de cultivo das raízes normais *in vitro*. A produção deste composto foi aproximadamente cinco vezes maior quando estas raízes foram cultivadas sob condição de escuro total em relação ao cultivo na presença de 16 horas de luz. O inverso ocorreu com a produção de um outro composto ainda não identificado (composto 14) que foi detectado pelas análises químicas. O padrão de fracionamento observado por CG/EM deste composto sugere que o mesmo se trate de um sesquiterpeno, no entanto, trabalhos futuros serão de extrema importância não somente para o seu isolamento e identificação, mas também para estudos da relação biossintética entre o composto 14 e o dihidro-epideoxi-artenuína B 7 e da(s) atividade(s) biológica(s) relacionada(s) ao composto ainda não identificado.

Todos os terpenos de interesse estudados neste trabalho (artemisinina 1, ácido artemisinínico 3, dihidro-epideoxi-artenuína B 7 e deoxiartemisinina 10) apresentaram atividades antibacterianas com as linhagens de bactérias testadas, porém nenhum deles inibiu o crescimento do fungo *Candida albicans*.

## LITERATURA CITADA

- Altman, A & Goren, R., 1977. Horticultural and physiological aspects of *Citrus* bud culture. *Acta Hort.* 78: 51-60.
- Ammirato, P. V., 1983. Embryogenesis. In: *Handbook of Plant Cell Culture* (Evan, D. A., Sharp, W. R., Ammirato, P. V., Yamada, Y., eds.) Vol. I. Techniques for Propagation and Breeding. Macmillan Publishing Company, New York, 82-123.
- Argollo Marques, D., 1996. Influência de fitorreguladores e de fontes de nitrogênio na morfogênese *in vitro* de *Chrysanthemum morifolium* (Ramat) Tzvelev cv. Amarelo São Paulo. Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil, tese de mestrado, 90p.
- Banerjee, S., Zehra, M., Gupta, M.M. & Kuma, S., 1997. *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of *Artemisia annua*: Production of transgenic plants. *Planta Med.* 63 (5): 467-469.
- Barry, G.F., Rogers, S.G., Fraley, R.T. & Brand, L., 1984. Identification of a cloned cytokinin biosynthetic gene. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, Vol. 81, p. 4776-4780.
- Bercetche, J., Chriqui, D., Adam, S. & David, C. 1987. Morphogenetic and cellular reorientations induced by *Agrobacterium rhizogenes* (strains 1855, 2659 and 8196) on carrot, pea and tobacco. *Plant Sci.* 52: 195-210.
- Betti, J. A., 1991. Obtenção de material propagativo vegetal testado livre de vírus. In: *Biotechnology para a produção vegetal* (Crocomo, O. J., Sharp, W. R., Melo, M., ed.) Piracicaba, FEALQ. p 145-170.
- Bhakuni, R.S., Jain, D.C., Sharma, R.P. & Kumar, S., 2001. Secondary metabolites of *Artemisia annua* and their biological activity. *Curr. Sci.* 80 (1): 35-48.

- Birot, A.M., Bouchez, D., Casse-Delbart, F., Durand-Tardif, M., Jouanin, L., Pautot, V., Robaglia, C., Tepfer, D., Tepfer, M., Tomeur, J. & Vilaine, F. 1987. Studies and uses of the Ri plasmids of *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Physiol. Biochem.* 25: 323-335.
- Bouwmeester, H.J., Wallaart, T.E., Janssen, M.H.A., Van Loo, B. Jansen, B.J.M., Posthumus, M.A., Schmidt, C.O., De Kraker, J.W., König, W.A. & Franssen, M.C.R., 1999. Amorpha-4,11-diene synthase catalyses the first probable step in artemisinin biosynthesis. *Phytochemistry.* 52: 843-854.
- Brasileiro, A. C. M., 1993. Biologia de *Agrobacterium* sp. *ABCTP Notícias*, 20: 2-6.
- Brasileiro, A.C.M. & Dusi, D.M.A., 1999. Transformação genética de plantas. In: *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas* (Torres, A.C., Caldas, L.S. & Buso, J.A., eds.) Vol. 2. Embrapa-SPI / Embrapa CNPH, Brasília, pp. 679-735.
- Braun, A.C. & Mandle, R. J. Studies on inactivation of tumor-inducing principle in crown gall. *Growth.* 12, 255-269.
- Brown, G.D., 1992. The new compounds from *Artemisia annua*. *J. Nat. Prod.* 55: 1756-1760.
- Brown, G.D., 1993. Production of anti-malarial and anti-migraine drugs in tissue culture of *Artemisia annua* and *Tanacetum partherium*. *Acta Hort.* 330: 269-276.
- Caboni, E., Lauri, P., Tonelli, M., Falasca, G. & Damiano, C., 1996. Root induction by *Agrobacterium rhizogenes* in walnut. *Plant Sci.* 118: 203-208.
- Capone, I., Spano, L., Cardarelli, M., Bellincampi, D., Petit, A. & Costantino, P., 1989. Induction and growth properties of carrot roots with different complements of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA. *Plant Mol. Biol.* 13: 43-52

- Cardarelli, M., Spano, L., De Paolis, A., Mauro, M.L., Vitali, G. & Constantino, P., 1985. Identification of the genetic locus responsible for non-polar root induction by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Mol. Biol.* 5: 385-391.
- Cardarelli, M., Spano, L., Mariotti, D., Mauro, M.L., Van Sluys, M. A. & Constantino, P., 1987. The role of auxin in hairy root induction. *Mol. Gen. Genet.* 208: 457-463.
- Charles, D.J., Cebert, E. & Simon, J.E., 1991. Characterization of the essential oil of *Artemisia annua* L. *J. Ess. Oil Res.* 3: 33-39.
- Chen, D.H., Meng, Y.L., Ye, H.C., Li, G.F. & Chen, X.Y., 1998. Culture of transgenic *Artemisia annua* hairy root with cotton cadinene synthase gene. *Acta Bot. Sin.* 40: 711-714.
- Chen, D.H., Ye, H.C. & Li, G.F., 2000. Expression of a chimeric farnesyl diphosphate synthase gene in *Artemisia annua* L. transgenic plants via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plant Sci.* 155: 179-185.
- Chiari, A. & Bridgen, M.P., 2002. Meristem culture and virus eradication in *Alstroemeria*. *Plant Cell Tiss. Org.* 68 (1): 49-55.
- Combard, A., Brevet, J., Borowski, D., C.A.M., K. & Tempé, J., 1987. Physical map of the T-DNA region of *Agrobacterium rhizogenes* NCPPB2659. *Plasmid* 18: 70-75.
- Costa J.Y., Forni-Martins E.R., Shepherd S.L.K. 1999. Plantas medicinais nativas e exóticas: monitoramento cromossômico durante a fase de cultura *in vitro*. In: IV Congresso Aberto aos Estudantes de Biologia, Campinas, São Paulo, resumos.
- Croes, A. F.; Van den Berg, A.J. R.; Bosveld, M.; Breteler, H.; Wullem, G.J., 1989. Thiophene accumulation in relation to morphology in roots of *Tagetes patula*. *Planta* 179: 43-50.

- Crocomo, O.J., 1986. Plant biotechnology in the agriculture and development in Brasil. Anais do Simpósio anual da academia de ciências de São Paulo, São Paulo, Brasil, Vol.11, p 53-71.
- Cronquist, A., 1981. An integrated system of classification of flowering plants. New York: Columbia University Press, 1262p.
- Cuzzuol, G.R.F., 1993. Parâmetros bioquímicos e fisiológicos da vitrificação e do desenvolvimento do cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) *in vitro*. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil, tese de mestrado.
- D' Amato, F., 1977. Cytogenetics of differentiation in tissue and cell culture. In: Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture (Reinert, J & Bajaj, Y. P. S., eds.) New York, Springer-Verlag. p. 343-464.
- David, C. & Tempé, J., 1988. Genetic transformation of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. Botrytis) by the Ri T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Cell Rep. 7: 88-91.
- David, C., Chilton, M.D. & Tempé, J., 1984. Conservation of T-DNA in plants regenerated from hairy root cultures. Bio/Technology 2: 73-76.
- Deikman, J & Hammer, P. E., 1995. Induction of anthocyanin accumulation by cytokinins in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. 108: 47-57.
- Dellaporta, S.L., Wood, J. & Hicks, J.B. 1983. A plant DNA miniprep: version 2. Plant Mol. Biol. Reporter 1:19-21
- Dias, P., 1997. Atividade antiulcerogênica dos extratos brutos e das frações semi-purificadas de *Artemisia annua* L. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo, Brasil, dissertação de mestrado.

- Dias, P., Nogueira, C.F., Possenti, A., Foglio, M.A. & Carvalho, G.E., 1997. Atividade antiulcerogênica das frações semi-purificadas de *Artemisia annua* L. In: III Jornada de Plantas Mediciniais, Campinas, Brasil, resumos, pp 155-157
- Dobigny, A., Ambroise, A., Haicour, R., David, C., Rossignol, L. & Sîhachakr, 1995. Transformation of potato using mannopine and cucumopine strains of *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 40: 225-230.
- Duke, S.O. & Paul, R.N., 1993. Development and fine structure of glandular trichomes of *Artemisia annua* L. *Inst. J. Plant Sci.*, 154:107-118.
- Endress, R., 1994. Plant cells as producers of secondary compounds. In: *Plant Cell Biotechnology* (Endress, R. eds.) ISBN 3-540-56947-2 Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, pp. 121-255.
- Ferreira, J.F.S., 1994. Production and detection of artemisinin in *Artemisia annua* L. Purdue University, EUA, tese de doutorado, 125p.
- Ferreira, J.F.S. & Janick, J., 1996. Roots as enhancing factor for the production of artemisinin in shoot cultures of *Artemisia annua*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 44: 211-217.
- Figueira, G.M., 1995. Nutrição mineral, produção e concentração de artemisinina em *Artemisia annua* L. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil, tese de mestrado, 74 p.
- Flores, H.E., 1987. Use of plant cell and organ culture in the production of biological chemicals. *Proc. Am. Chem. Soc.* 190: 66-85.
- Floryanowicz-Czekalska, K. & Wysokinska, H., 2000. Transgenic shoots and plants as a source of natural phytochemical products. *Acta Soc. Bot. Pol.* 69 (2): 131-136.

- Foglio, M.A., 1996. Um estudo químico da *Artemisia annua* L. aclimatada no Brasil. Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo, Brasil. Tese de doutorado.
- Foglio, M.A., Dias, P.C., Antônio, M.A., Possenti, A., Rodrigues, R.A.F, Silva, E.F., Rehder, V.L.G. & Carvalho, J.E., 2002 Antiulcerogenic activity of some sesquiterpene lactones isolated from *Artemisia annua*. *Planta Med.* (no prelo).
- Fulton T.M., Chunwongse J. & Tanksley S.D., 1995. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Mol. Biol. Reporter* 13: 207-209.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A. & Ojima, K., 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.*, 50:151-158.
- Garner, W. W. & Allard, H.A., 1920. Effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants. *J. Agric. Res.* 18: 553-606.
- Ghosh, B., Mukherjee, S. & Jha, S., 1997. Genetic transformation of *Artemisia annua* by *Agrobacterium tumefaciens* and artemisinin synthesis in transformed cultures. *Plant Sci.* 122: 193-199.
- Gordon, M.P., 1981. Tumor formation in plants. In: *The Biochemistry of Plants*, vol.6, pp. 531-570. Academic Press, Inc.
- Grattapaglia, D & Machado, M. A., 1998. Micropropagação. In: *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas* (Torres A. C., Caldas L. S., & Buso, J.A., eds.) Brasília, DF, EMBRAPA. Vol. 1. pp. 183-260.
- Grout, B.W.W., 1990. Meristem tip culture. In: *Methods in molecular biology: plant cell and tissue culture* (Pollard, J. W. & Walker, J. M., ed.) New Jersey: Humana Press. 597p.

- Hamill, J.D., Parr, A.J., Rhodes, M.J.C., Robins, R.J. & Walton, N.J., 1987. New routes to plant secondary products. *Bio/Technology* 5: 800-804
- Hashimoto, T., Ykimune, Y. & Yamada, Y., 1986. Tropane alkaloid production in *Hyoscyamus* root cultures. *J. Plant. Physiol.* 124: 61-75.
- Hooykaas, P.J.J. & Schilperoort, R.A., 1992. *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Mol. Biol.* 19: 15-38.
- Hooykaas, P.J.J., Klapwijk, P.M., Nutti, P.M., Schilperoort, R.H. & Rorsch, A., 1977. Transfer of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid to avirulent agrobacteria and to *Rhizobium* explant. *J. Gen. Microbiol.* 98: 477-484.
- Inze, D., Follin, A., Van Lijsebettens, M., Simoens, C., Genetello, C., Van Montagu, M. & Schell, J., 1984. Genetic analysis of the individual T-DNA genes of *Agrobacterium tumefaciens*; further evidence that two genes are involved in indole-3-acetic acid synthesis. *Mol. Gen. Genet.* 194: 265-274.
- Jacobs, W. P., 1961. Auxin as a limiting factor in the differentiation for plant tissue. *Recent Advan. in Bot.* 8: 786-90.
- Janik, J. & Ferreira, J. F. S., 1996. Roots as an enhancing factor for the production of artemisinin in shoots cultures of *Artemisia annua*. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 44: 211-217.
- Jaziri, M., Shimomura, K., Yoshimatsu, K., Fauconnier, M. L., Marlier, M. & Homes, J., 1995. Establishment of normal and transformed root cultures of *Artemisia annua* L. for artemisinin production. *J. Plant Physiol.*, 145: 175-177.
- Jha, S., Jha, T.B. & Mahato, S.B., 1988. Tissue culture of *Artemisia annua* L. – A potential source of antimalarial drug. *Curr. Sci.* 57: 344-346.

- Jouanin, L., 1984. Restriction map of an agropine-type R<sub>i</sub> plasmid and its homologies with Ti plasmids. *Plasmid* 12: 91-102.
- Kerbaux, G. B., 1998. Cultura de raízes e regeneração de plantas. In: *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. (Torres, A. C., Caldas, L. S. & Buso, J. A., eds.) Vol. 1. pp. 161-181.
- Ketel, D. H., 1986. Morphological differentiation and occurrence of thiophenes in leaf callus cultures from *Tagetes* species: relation to growth medium of the plants. *Physiol. Plant.* 66: 392-396.
- Klayman, D.L., 1989. Weeding out malaria. *Nat. Hist. Oct.*: 18-26.
- Klayman, D.L., 1985. Qinghaosu (artemisinin): An antimalarial drug from China. *Science*, 288: 1049-1055.
- Klee, H., Horsch, R. & Rogers, S., 1987. *Agrobacterium*-mediated plant transformation and its further applications to plant biology. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 38: 467-486.
- Konh, L.K., Antônio, M.A., Silva, E.F., Dias, P.C., Foglio, M.A. & Carvalho, J.E., 2001. Atividade antiproliferativa da dihidro-epideoxi-artenuína B, deoxiartemisinina e ácido artemisinínico isolados da *Artemisia annua*. XVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de biologia Experimental, Caxambú, Minas Gerais, Brasil, p.208.
- Laughlín, J.C., 1993. Agricultural production of artemisinin: a review. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* 88(1): 21-22.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L. & Cox, L., 1993. *Principles of Biochemistry*. 2<sup>ª</sup> ed., Worth Publishers, New York, USA, 725p.
- Lieersh, R., Soicke, H., Stehr, C. & Tullner, Hu., 1986. Formation of artemisinin in *Artemisia annua* during one vegetative period. *Plant Med.* 52: 387-390.

- Lindsey, K. & Yeoman, M. M., 1985. Dynamics in plant cell cultures. In: Cell culture and somatic cell genetics of plants. Vol. 2. Vasil, I. K., Ed., Academic Press, San Diego, pp. 66-101.
- Magalhães, P. M., 1996. Seleção, melhoramento e nutrição da *Artemisia annua* L. para cultivo em região intertropical. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, tese de doutorado.
- Mallol, A., Cusidó, M., Palazón, J., Bonfill, M., Morales, C. & Pinol, M. T., 2001. Ginsenoside production in different phenotypes of *Panax ginseng* transformed roots. *Phytochemistry* 57: 365-371.
- Mimaki, Y., Kuroda, M., Fukasawa, T., Sashida, Y., 1999. Steroidal glycosides from the bulbs of *Allium jesdianum*. *J. Nat. Prod.* 62: 194-197.
- Moore, L.; Warren, G. & Strobel, G. 1979. Involvement of a plasmid in the hairy root disease of plants caused by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plasmid* 2: 617-626.
- Morgante, P.G., 1997. Seleção genética negativa em raízes transformadas de *Lycopersicon esculentum* var. cerasiforme com o gene da enzima timidina quinase viral. Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil, tese de Mestrado.
- Mori, K., 1977. Localization of viruses in apical meristems and production of virus-free plants by means of meristem and tissue culture. *Acta Hort.* 78: 386-396.
- Moyano, E., Fornalé, S., Palazón, J., Cusidó, R.M., Bonfill, M., Morales, C. & Pinol, M.T., 1999. Effect of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA on alkaloid production in *Solanaceae* plants. *Phytochemistry*. 52: 1287-1292.
- Murashige, T., 1974. Plant propagation by tissue culture. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, Copenhagen, 25: 135-66.

- Murashige, T., 1977. Manipulation of organ initiation in plant tissue culture. Bot. Bull. Acad. Sinica 18: 1-24.
- Murashige, T., 1990. Plant propagation by tissue culture. A practice release potencial. Chapter I. In: Handbook of Plant Cell Culture (Ammirato, P.V., Evans, D.A., Sharp, W.R., Bajaj, V.P.S., eds.) Vol. V. Ornamental Species. Mc. Graw-Hil, New York. pp. 3-9.
- Murashige, T. & Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tabacco tissue cultures. Physiol. Plant, 15: 473-497.
- Nair, M.S.R., Acton, N., Klayman, D.L., Kendrick, K., Basile, D.V. & Mante, S., 1986. Production of artemisinin in tissue culture of *Artemisia annua* L. J. Nat. Prod., 19: 502-507.
- Nogueira, R.T., 1999. Estudo fitoquímico da *Hymenaea coubaril* var. *stilbocaroa* e *Hymenaea coubaril* var. *altíssima*. Cultura de tecidos da *Hymenaea coubaril* var. *stilbocarpa*. Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil, tese de doutorado. 363p.
- Nono-Worndim, R., Gebre-Selessie, K. & Marchoux, G., 1993. Migration des virus dans la plante: revue bibliographique. Agronomie, Vol. 13, p. 785-813.
- Norton, R.A. & Towers, G.H.N., 1986. Factors affecting synthesis of polyacetylenes in root cultures of *Bidens alba*. J. Plant. Physiol. 122: 41-53.
- Ohara, A., Akasaka, Y., Daimon, H & Mii, M., 2000. Plant regeneration from hairy roots induced by infection with *Agrobacterium rhizogenes* in *Crotalaria juncea* L. Plant Cell Rep. 19 (6): 563-568.
- Otani, M., Shimada, T., Kamada, H., Truya, H. & Mii, M., 1996. Fertile trasgenic plants of *Ipomoea trichocarpa* Ell. Induced by differents strains of *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Sci. 116: 169-175.

- Paniego, N.B. & Giulietti, A.M., 1994. *Artemisia annua* L.: dedifferentiated and differentiated cultures. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 36: 163-168.
- Paniego, N.B., Maligne, AE. & Giuliette, AM. 1993. *Artemisia annua*: "in vitro" culture and the production of artemisinin. In: *Medicinal and Aromatic Plants. Biotechnology in Agriculture and Forestry* (Bajaj Y.P.S.,eds.) Vol. 5, pp. 70-78.
- Peana, A.T., Moretti, M.D.L., Manconi, V., Desole, G., Pippia, P., 1997 Anti-inflammatory activity of aqueous extracts and steroidal sapogenins of *Agave americana*. *Planta Medica*.63: 199-202.
- Peres, L.E.P.; Morgante, P.G., Vecchi, C.; Kraus, J.E.; Van Sluys, M.A., 2001. Shoot regeneration capacity from roots and transgenic hairy roots of tomato cultivars and wild related species. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 65: 37-44.
- Raineri, D.M., Bottino, P. & Gordon, M.P.; Nester, E.W. 1990. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice (*Oryza sativa* L.). *Bio/Technology* 8: 33-38.
- Ream W. & Gelvin, S.B., 1996. Crown gall: advances in understanding interkingdom gene transfer. Saint Paul, APS Press. 148p.
- Rokem, J.S. & Goldberg, I., 1985. Secondary metabolites from plant cell suspension cultures: methods for yield improvement. *Adv. Biotechnol. Proc.* 4: 241.
- Robbers, J.E., Speedie, M.K., Tyler, V.E, 1996. Terpenoides. Cap. 6. In: *Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology* (Robbers, J.E., Speedie, M.K., Tyler, V.E. eds) Williams & Willians, A. Waverly Company. 212p.
- Roper, W., Schulze, M., Chaouiche, E. & Melch, K.A., 1985. Nicotine production by tissue culture of tobacco as influenced by various culture parameters. *J. Plant Physiol.* 118: 463.

- Rhodes, M.J., Robins, R.J., Hamill J.D., Parr, A.J. & Walton, N.J., 1987. Secondary product formation using *Agrobacterium rhizogenes* - transformed hairy root cultures. IAPTC Newletters. 53: 2-15.
- Rodriguez, E., Towers, G.H.N. & Mitchell, J.C., 1976. Biological activities of sesquiterpene lactones. *Phytochemistry*. 15: 1573-1580.
- Saito, K. Yamazaki, M. & Murakoshi, I., 1992. Transgenic medicinal plants: *Agrobacterium*-mediated foreign gene transfer and production of secondary metabolites. *J. Nat. Prod.* 55: 149-162.
- Sambrook, J., Fritschi, E.F. Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> Edition, Cold Spring Harbor: CHS Press. 1626 p.
- Sangwan, R.S., Agarwal, K., Luthra, R., Thakur, R.S. & Singh-Sangwan, N., 1993. Biotransformation of arteannuic acid into arteannuin-B and artemisinin in *Artemisia annua*. *Phytochemistry*. 34: 1301-1302.
- Shabde, M. & Murashige, T., 1977. Hormonal requirements of excised *Dianthus caryophyllus* L. shoot apical meristem "*in vitro*". *Amer. J. Bot.*, Baltimore. 64(4): 433-48.
- Stacey, J. & Isaac, P.G., 1994. Protocols for nucleic acid analysis by nonradioactive probes. In: *Methods in Molecular Biology* (Isaac, P.G. ed). Vol. 28. Humana Press Inc., Towota, NJ, pp. 9-15
- Stachel, S.E. & Zambryski, P.C., 1986. *virA* and *virG* control the plant-induced activation of the T-DNA transfer process of *Agrobacterium tumefaciens*. *Cell* 46: 325-333.
- Sy, L.K. & Brown, G.D., 2001. Deoxyarteannuin B, dihydro-deoxyarteannuin B and *trans*-5-hydroxy-2-isopropenyl-5-methylhex-3-en-1-ol from *Artemisia annua*. *Phytochemistry*. 58: 1159-1166.

- Sutter E.G. & Langhans, R.W., 1979. Epicuticular wax formation on carnation plantlets regenerated from shoot tip culture. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.* 104(4): 493-6.
- Tan, R.X., Zheng, W.F., Tang, H.Q., 1998. Biologically active substances from the genus *Artemisia*. *Planta Med.* 64: 295-302.
- Tang, H.Q., Hu, J., Yang, L. & Tan, R.X., 2000. Terpenoids and flavonoids from *Artemisia* species. *Planta Med.* 66: 391-396.
- Tepfer, D., 1990. Genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes*. *Physiol. Plant.* 79: 140-146.
- Thomas, P.S., 1983. Hybridization of denatured RNA transferred or dotted to nitrocellulose paper. *Methods Enzymol.* 100: 255-266
- Torres, A.C., Teixeira, S.L. & Pozzer, L., 1998. Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus In: *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.* (Torres, A. C.; Caldas, L. S.; Buso, J. A. ed.) Vol. 1. Embrapa-SPI / Embrapa CNPH, Brasília, pp. 133-159.
- Van Geldre, E., Vergauwe, A. & Van den Eeckhout, E., 1997. State of the art of the production of the antimalarial compound artemisinin in plants. *Plant Mol. Biol.* 33: 199-209.
- Van Larebeke, N.; Genetello, C., Schell, J., Schilperoort, R.A., Hermans, A.K., Hernalsteens, J.P. & Van Montagu, M., 1975. Acquisition of tumour-inducing ability by non-oncogenic agrobacteria as a result of plasmid transfer. *Nature* 255: 742-743.
- Van Sluys, M.A., 1999. *Agrobacterium*: um vetor natural para transformação em plantas. In: *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas* (Torres, A.C., Caldas, L.S. & Busi, J.A., eds.). Vol. 2, pp. 737-759.

- Van Sluys, M.A.; Hashimoto, R.Y. & Scortecchi, K.C, 1992. Gene transfer from *Agrobacterium* to plants. *Ci. Cult.*, São Paulo, 44: 296-300.
- Vandenbergh, D.R., Vergauwe, N.A., Van Montagu, M. & Van Den Eeckhout, E.G., 1995. Simultaneous determination of artemisinin biosynthetic precursors in *Artemisia annua*. *J. Nat. Prod.* 58: 798-803.
- Verguwe, A., Cammaert, R., Vandenberg, D.; Genetello, C., Inze, D., Van Montagu, M. & Van Den Eeckhout, E. 1996a. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Artemisia annua* L. and Regeneration of transgenic Plant. *Plant Cell Reports*, 15: 929-933.
- Verguwe, A., Van Geldre, E., Inze, D., Van Montagu, M. & Van Den Eeckhout, E., 1996b. The use of amoxicillin and ticarcillin in combination with a  $\beta$ -lactamase inhibitor as decontaminating agents in the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Artemisia annua*. *J. Biotechnol.* 52: 89-95.
- Vervliet, T.G., Holsters, M., Teuchy, H., Van Montagu, M. & Schell, J., 1975. *J. Gen. Virol.* 26: 33-48.
- Wallaart, T.E., Van Uden, W., Lubberink, H.G.M, Woerdenbag, H.J., Pras, N. & Quax, W.J., 1999a. Isolation and Identification of Dihydroartemisinin Acid from *Artemisia annua* and Its Possible Role in the Biosynthesis of Artemisinin. *J. Nat. Prod.* 62 (3): 430-433.
- Wallaart, T.E., Pras, N. & Quax, W.J., 1999b. Isolation and Identification of Dihydroartemisinin Acid Hydroperoxide from *Artemisia annua*: A Novel Biosynthetic Precursor of artemisinin. *J. Nat. Prod.* 62 (8): 1160-1162.
- Wallaart, T.E., Pras, N., Beekman, A.C. & Quax, W.J., 2000. Seasonal Variation of Artemisinin and Biosynthetic Precursors in Plants of *Artemisia annua* of Different

- Geographical Origin: Proof for the Existence of Chemotypes. *Planta medica*. 66: 57-62.
- Weathers, P.J., Cheetham, R.D., Follansbee, E. & Theoharides, K., 1994. Artemisinin production by transformed roots of *Artemisia annua*. *Biotechnol. Lett.*, 16: 1281-1286.
- White, P.R.A., 1943. *Handbook of Plant Tissue Culture*. Jacques Cottell Press, Lancaster, Penn, 277 p.
- Woerdenbag, H.J., Luers, F.J., Uden, W.V., Pras, N., Maligré, T.M. & Afterman, A.W., 1993. Production of the new antimalarial drug artemisinin in shoot culture of *Artemisia annua* L. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 32: 247-257.
- Wullems, G.J., Molendijk, L., Ooms, G. & Schilperoort, R.A., 1981. Retention of tumor markers in F1 progeny plants from "in vitro" induced octopine and nopaline tumor tissues. *Cell*. 24: 719-727.
- Xie, D.Y., Zou, Z.R., Ye, H.C., Li, G.F. & Guo, Z.C., 2001. Selection of hairy root clones of *Artemisia annua* L. for artemisinin production. *Israel J. Plant Sci.* 49 (2): 129-134.
- Xu, Z.Q. & Jia, J.F., 1996. The reduction of chromosome number and the loss of regeneration ability during subculture of hairy root cultures of *Onobrychis viciaefolia* transformed by *Agrobacterium rhizogenes* A<sub>4</sub>. *Plant Sci.* 120: 107-112.
- Zaenen, I., Van Larebeke, N., Teuchy, H., Van Montagu, M. & Schell, J., 1974. Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing *Agrobacterium* strains. *J. Mol. Biol.* 86: 109-127.
- Zaman, S.S. & Sharma, R.P., 1991. Some aspects of the chemistry and biological activity of artemisinin and related antimalarials. *Heterocycles* 32: 1593-1638.



Zambryski, P., Joos, H., Genetello, C., Leemans, J., Van Montagu, M. & Schell, J., 1983. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* Vol. 2, p. 2143-2150.

Zupan, J.R. & Zambryski, P., 1995. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant Physiol.* 107: 1041-1047.