



DESENVOLVIMENTO DE RAÍZES TRANSFORMADAS POR *Agrobacterium rhizogenes* A PARTIR DE EXPLANTES DE *Stevia rebaudiana*

Mariane Grigio Francisco (PIBIC/CNPq/DFA/Uem), Sheila Mara Sanches Lopes, Regina Aparecida Correia Gonçalves, Arildo José Braz de Oliveira (Orientador), e-mail: ajboliveira@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia, Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Ciência e Tecnologia de Alimentos 5.07.01.02-9 Química, Física, Físico-Química e Bioquímica dos Alimentos e das Matérias Primas Alimentares

Palavras-chave: *Stevia rebaudiana*, raízes transformadas, *Agrobacterium rhizogenes*

Resumo

Os processos biotecnológicos, tais como cultura de tecidos e órgãos de plantas *in vitro*, representam uma alternativa sustentável para produção de metabólitos naturais a partir de plantas medicinais sem ocasionar a colheita destrutiva da mesma. A *S. rebaudiana* é uma planta utilizada comercialmente para produção de glicosídeos de esteviol a partir de suas folhas. O objetivo do trabalho foi estabelecer a cultura *in vitro* de raízes transformadas de explantes de *S. rebaudiana*. Duas metodologias, descritas na literatura com algumas diferenças no procedimento de cada uma delas foram testadas para avaliar qual foi a mais eficiente para o estabelecimento da cultura de raízes transformadas. Bem como duas cepas de *Agrobacterium rhizogenes* (A4 e ATCC 31749), dois diferentes meios de cultivos (LB e YMA) e dois diferentes tipos de explantes (folhas e caules) foram testados como variáveis no procedimento. A infecção das plantas com a bactéria *A. rhizogenes* realizada por esfaqueamento com lamina de bisturi estéril e injeção da suspensão bacteriana na nervura central da folha, foi a metodologia que mostrou-se mais eficiente. Pois, a partir dessa metodologia pode-se observar que as raízes começaram a ser formadas após 7 dias da inoculação, e as raízes formadas foram mais numerosas e espessas. A partir dos dados obtidos, pode-se concluir que entre as duas metodologias testadas, a metodologia II mostrou-se mais eficiente para indução da formação das raízes transformadas. Podendo ser adotada como metodologia padrão no Laboratório de Biotecnologia de Produtos Naturais e Sintéticos (LABIPROS).

Introdução

A *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni é uma planta da família *Asteraceae*, ficou mundialmente conhecida devido a produção dos glicosídeos de esteviol um adoçante não calórico natural a partir de suas folhas. Polissacarídeos do tipo frutanos utilizados na indústria de





alimentos como ingrediente funcional e prebiótico foram recentemente isolados a partir das raízes de *S. rebaudiana* (LOPES et al., 2016)

A cultura de órgãos e tecidos vegetais *in vitro* é uma alternativa para o cultivo de plantas em grande escala, dentro de um curto período e com condições físicas e químicas definidas. As culturas vegetais *in vitro* são utilizadas para melhoramento genético de plantas, propagação clonal e a produção de metabólitos de interesse comercial (THIYAGARAJAN & VENKATACHALAM, 2012).

Dois tipos de cultura de raízes são geralmente empregados com o objetivo de produzir metabólitos de interesse: raízes adventícias e raízes transformadas (raízes em cabeleira). As raízes transformadas consistem em uma alternativa utilizada para o aumento da produção de biomassa em culturas de raízes *in vitro*. Essa técnica utiliza a bactéria *Agrobacterium rhizogenes*, um patógeno do solo, que quando infecta o tecido vegetal tem a capacidade de aumentar a ploriferação celular e formação de raízes adventícias do tipo “cabeleira” (GUILLON et al., 2006) O objetivo do presente estudo foi desenvolver um protocolo para obtenção de raízes transformadas *in vitro* de *S. rebaudiana*.

Materiais e métodos

1. Preparo do Inóculo da *Agrobacterium rhizogenes*

Duas cepas de *A. rhizogenes* (A4 e ATCC 31749) foram utilizadas no experimento. Os inóculos para os testes foram preparados utilizando-se dois meios, Luria Bertani (LB) e “Yeast Malt Agar” (YMA). Uma alíquota de 100 μ L da suspensão bacteriana cultivados nos diferentes meios, foram adicionados a 50 mL de seus respectivos meios em erlenmeyer de 250 mL e cultivados em agitador orbital a 150 rpm, $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 16 horas. Essa etapa de cultivo em shaker foi necessária para a cultura atingir sua fase exponencial de crescimento (bactéria é mais infectante nessa fase) (BRASILEIRO & CARNEIRO, 1998).

2. Infecção da Planta

Duas metodologias foram testadas com algumas variações nos procedimentos para avaliar qual seria mais eficiente para o estabelecimento da cultura de raízes transformadas.

2.1 Metodologia I

Os explantes foliares e caulinares utilizados no ensaio foram obtidos a partir da cultura de plântulas de *S. rebaudiana in vitro*, mantida no próprio laboratório (LABIPROS).

Após 16 horas de cultivo das bactérias, 1 mL das suspensões de *A. rhizogenes* foram transferidas para tubos Falcon estéril e em seguida centrifugado à $5000 \times g/ 5 \text{ min}$. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” de células foi ressuspenso em 1 mL de salina (NaCl 0,85%) (BRASILEIRO & CARNEIRO, 1998).

As folhas e os caules foram infectados pelo *A. rhizogenes* utilizando uma seringa contendo a suspensão bacteriana. Em seguida as folhas e caules infectados foram colocados





em placas de petri contendo meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) sólido. As culturas foram mantidas em estufa de cultivo na presença de luz com um fotoperíodo de 16 h a uma temperatura de 28 ± 1 °C. Após a observação da formação das raízes, os explantes foram transferidos para meio MS sólido contendo antibiótico, ampicilina (0,5 mg/mL). E mantidos sob as mesmas condições de cultivos (BRASILEIRO & CARNEIRO, 1998).

2.2 Metodologia II

Os explantes foliares e caulinares utilizados no ensaio foram obtidos a partir da cultura de plântulas de *S. rebaudiana in vitro*, mantida no próprio laboratório (LABIPROS).

Após 16 horas de cultivo das bactérias, uma alíquota de 1 mL foi retirada e utilizada diretamente para infecção dos explantes. A infecção foi feita por escarificação com lamina de bisturi estéril e injeção da suspensão bacteriana na nervura central da folha e ao longo dos caules. Após a infecção, as folhas foram cultivadas em meio MS sólido, na ausência de luz a 28 ± 1 °C durante 72 horas. Após esse período os explantes foram transferidos para meio MS sólido com antibiótico, ampicilina (0,5 mg/mL) e mantidos em estufa de crescimento à 28 °C no escuro (GUILLON et al., 2006).

Resultados e Discussão

Dentre as cepas de *A. rhizogenes* utilizadas no experimento, a ATCC mostrou melhores resultados quanto à capacidade de infectar a planta e transferir através do plasmídeo bacteriano a capacidade de produção de raízes transformadas ou “em cabeleira”. E o meio YMA foi o que melhor favoreceu o crescimento e a manutenção das cepas de *A. rhizogenes*.

Em relação aos explantes, as folhas foram as mais adequadas, podendo-se observar com mais eficiência a formação das raízes transformadas.

Dentre as metodologias propostas, a metodologia I, observou-se a formação das primeiras raízes após 30 dias (Figura 1A) de infecção com a *A. rhizogenes*, já na metodologia II a formação das primeiras raízes (Figura 1B) foi observada após 7 dias decorridos da infecção da planta.

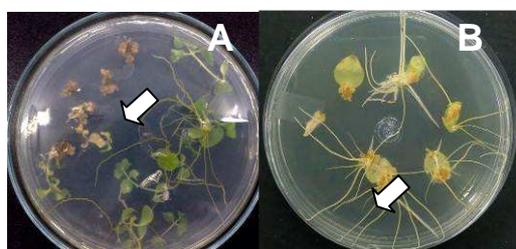


Figura 1. A - As setas indica as raízes transformadas após inoculação dos explantes de *S. rebaudiana* com *A. rhizogenes* (Metodologia I); B – A seta indica as raízes transformadas através da metodologia II.

Entre as duas metodologias testadas, a metodologia II mostrou-se mais eficiente, apresentando raízes numerosas e mais espessas (Figura 1B). A concentração do inóculo na





metodologia II foi superior, uma vez que uma alíquota direta foi retirada da suspensão bacteriana, o que pode ter influenciado em maior capacidade infectante da bactéria. Assim como a ausência de luz na metodologia II pode ter favorecido o crescimento das raízes por simular as condições naturais de crescimento das mesmas.

Conclusões

Pode-se concluir que a metodologia II foi a mais eficiente para a produção de raízes transformadas *in vitro*, pois apresentaram raízes numerosas e espessas em um menor período de tempo. A partir dos bons resultados obtidos, pode-se utilizar como metodologia padrão no LABIPROS para a produção de raízes transformadas e o aumento de biomassa das mesmas. Com perspectivas futuras de produção de compostos bioativos.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer ao CNPq pela bolsa auxílio, a Doutoranda Sheila Mara Sanches Lopes que foi quem me ensinou e me acompanhou em todos os experimentos realizados e ao Orientador Arildo José Braz de Oliveira pelas orientações no projeto.

Referências

- BRASILEIRO, A. C. M., CARNEIRO, V. T. C. **Embrapa - Manual de Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenagen, 1998.
- GUILLON, S., GUILLER, J. T., PATI, P. K., RIDEAU, M. & GANTET, P. Harnessing the potential of hairy roots: dawn of a new era. **Trends in Biotechnology**, v. 24, p. 403 - 409, 2006.
- LOPES, S. M. S., FRANCISCO. M. G., HIGASHI. B., ALMEIDA, R. T. R., KRAUSOVÁ, G., PILAU, E. J., GONÇALVES, J. E., GONÇALVES, R. A. C. & OLIVEIRA, A. J. B. Chemical characterization and prebiotic activity of fructo-oligosaccharides from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) roots and *in vitro* adventitious root cultures. **Carbohydrate Polymers**, v. 152, p. 718–725, 2016.
- MURASHIGE, T., & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiological Plant**, 15, p. 473–495, 1962.
- THIYAGARAJAN, M., & VENKATACHALAM, P. Large scale *in vitro* propagation of *Stevia rebaudiana* (bert) for commercial application : Pharmaceutically important and antidiabetic medicinal herb. **Industrial Crops & Products**, 37(1), p. 111–117, 2012.

