

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal



Dissertação

**Multiplicação *in vitro* e produção de betacianina em
Alternanthera philoxeroides cultivadas sob efeito de
elicitores abióticos**

Janieli Cristina Perotti

Pelotas, 2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

JANIELI CRISTINA PEROTTI

**MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* E PRODUÇÃO DE BETACIANINA EM *Alternanthera
philoxeroides* CULTIVADAS SOB EFEITO DE ELICITORES ABIÓTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Fisiologia Vegetal).

Orientadora: Eugenia Jacira Bolacel Braga

Co-orientadores: Jose Antonio Peters

Marcos Antonio Bacarin

Pelotas, abril de 2010.

Banca Examinadora:

Dra. Rosa Lia Barbieri

Dr. Willian Barros

Dra. Eugenia Jacira Bolacel Braga

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por tornar tudo isto possível.

À Prof^a. Eugenia Jacira Bolacel Braga, meu agradecimento e admiração por sua dedicação, paciência e profissionalismo, por ter sido muito mais que uma orientadora, uma verdadeira amiga, dando-me sempre apoio, principalmente nas horas mais difíceis. Devo a esta professora uma grande parcela do meu desenvolvimento científico.

Ao Prof. José Antonio Peters pela sua contribuição neste trabalho, por seus ensinamentos e por sua amizade, pelas inúmeras vezes que me aconselhou e me motivou a prosseguir em busca de meus ideais.

Aos demais professores do Curso de Pós Graduação em Fisiologia Vegetal, especialmente ao Prof. Marcos Antonio Bacarin, pela sua ajuda nas análises espectrofotométricas, e ao Prof. Willian Barros pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos colegas de Curso pelo companheirismo, em especial à Ilda de Castro e Aline Scheer, pela amizade, pelos inúmeros conselhos, pelas risadas, e pelo apoio incondicional.

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, especialmente à Isabel Rodrigues, Anderson Einhardet, Márcia Ribeiro Alícia Kleinowski e Letícia Benitez pela participação neste trabalho, pela amizade e pelas horas de descontração.

À amiga Cristina Ritterbush pelo companheirismo, por ficar do meu lado nos momentos em que mais precisei e por ter sido muito mais que uma amiga, uma verdadeira irmã.

Aos meus queridos pais, Vera e Paulo Perotti; e minhas irmãs Janaine e Ana Paula Perotti, pelo amor incondicional, paciência, dedicação e compreensão. Agradeço a todos por estarem sempre presentes na minha vida, me dando força e carinho.

À CAPES, pela concessão da Bolsa de Mestrado, que possibilitou o desenvolvimento desta pesquisa.

RESUMO

PEROTTI, Janieli Cristina. Multiplicação *in vitro* e produção de betacianina em *Alternanthera philoxeroides* cultivadas sob efeito de elicitores abióticos. 2010. 63 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Betacianinas são pigmentos nitrogenados pertencentes à classe das betalainas, restritas a espécies da Ordem Caryophyllales e algumas espécies de fungos. Entre as plantas que possuem estes pigmentos há a espécie *Alternanthera philoxeroides*, pertencente à família Amaranthaceae. As betacianinas são amplamente utilizadas como aditivos de produtos alimentícios e medicamentos devido à sua comprovada ação antioxidante e ausência de toxicidade, desta forma, torna-se importante maximizar e padronizar a produção deste composto. Os jasmonatos têm um importante papel no processo de tradução de sinais que regulam os genes de defesa nas plantas. Desta forma, estão sendo amplamente utilizados como agentes estimuladores para a produção de diversos metabólitos secundários. A manipulação das concentrações dos microelementos no meio de cultura também tem representado uma boa estratégia para aumentar a produção de metabólitos secundários em cultura de tecidos vegetais. Tais elementos têm sido considerados elicitores abióticos ou fatores de indução que desencadeiam a formação de metabólitos secundários. Diante do exposto, pretendeu-se verificar a ação dos elicitores abióticos CuSO₄, Fe-EDTA e Metil jasmonato (MeJA) na produção de betacianina e na multiplicação de plantas de *A. philoxeroides* cultivadas *in vitro*. Para isso, segmentos nodais foram inoculados em meio MS básico com diferentes concentrações de CuSO₄ (0; 25; 75; 125; 175; 200 µM), Fe-EDTA (0; 75; 150; 300; 450 µM) e MeJA (0; 0,01; 0,1; 1; 10; 100 µM). Os experimentos foram conduzidos

separadamente e em cada um avaliados o número de brotos e gemas, comprimento dos brotos e das raízes, massa fresca da parte aérea e teor de betacianina. Os elicitores testados apresentaram efeitos positivos na produção de betacianina, aumentando em 60% o teor de betacianina com adição de CuSO_4 , 140% com Fe-EDTA e 300% com MeJA. Baixas concentrações de Fe-EDTA (25 -75 μM) e CuSO_4 (75 μM) estimularam o crescimento radicular e altas concentrações, superiores a 75 μM em ambos elicitores e 10 μM em MeJA diminuíram nitidamente o crescimento das plantas, apresentando efeito de toxicidade nas concentrações de 450 μM de Fe-EDTA, 200 μM de CuSO_4 e 100 μM de MeJA. Estes resultados demonstram o efeito positivo da elicitação com MeJA, CuSO_4 e Fe-EDTA na produção de betacianina, porém aplicações em altas concentrações são deletérias para o crescimento das plantas.

Palavras-chave: *cultivo in vitro*, plantas medicinais, betalaína, CuSO_4 , Fe-EDTA, metil jasmonato, elicitação.

ABSTRACT

PEROTTI, Janieli Cristina. In vitro multiplication and production of betacyanin in *Alternanthera philoxeroides* grown under the effect of abiotic elicitors. 2010. 63 p. Dissertação (Mestrado) – Post-Graduation Program in Vegetal Physiology. Federal University of Pelotas, Pelotas.

Betacyanins are nitrogen-containing pigments belonging to the class of the Betalains, restricted to species of the Caryophyllales order and some species of fungi. Among the plants that have these pigments there is the *Alternanthera philoxeroides* species, belonging to the Amaranthaceae family. Betacyanins are widely used as additives for food and drugs products because of their antioxidant activity and absence of toxicity, thus becomes important to maximize and standardize this compound production. The jasmonate play a central role in the process of signal transduction regaling defense genes in the plants. Thus they are widely used as stimulating agents for production of a range of secondary metabolites. Manipulation of concentrations of trace elements in the culture medium has also represented a good strategy to increase the production of secondary metabolites in plant tissue culture. Such elements have been considered abiotic elicitor or induction factors that trigger the formation of secondary metabolites. Given the above, we sought to verify the action of abiotic elicitors CuSO₄, Fe-EDTA, and methyl jasmonate (MeJA) in the betacyanin production and the multiplication of plants of *A. philoxeroides* cultured in vitro. For this, nodal shape were inoculated on MS medium basic with different concentrations of CuSO₄ (0; 25; 75; 125; 175; 200 μM), Fe-EDTA (0; 75; 150; 300; 450 μM) and MeJA (0; 0,01; 0,1; 1; 10; 100 μM). The experiments were conducted separately and in each one it was evaluated the number of shoots and buds, length of shoots and roots, fresh weight of shoots and betacyanin content. The elicitors tested had positive effects on betacyanin production, increasing by 60% the level of betacyanin with the addition of CuSO₄, 140% with Fe-EDTA and 300% with MeJA. Low concentrations of Fe-EDTA (25-75 μM) and CuSO₄ (75 μM) stimulated root growth and high concentrations above 75 μM in both elicitors and 10 μM in MeJA significantly decreased plant growth, showing the effect of toxicity concentrations of 450 mM Fe-EDTA, 200 mM of CuSO₄ and 100 mM of MeJA. These results demonstrate the positive effect of elicitation with MeJA,

CuSO₄ and Fe-EDTA in the betacyanin production, but applications in high concentrations are deleterious to the growth of the plant.

Keywords: In vitro culture, medicinal plants, betalains, CuSO₄, Fe-EDTA, methyl jasmonate, elicitation.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO GERAL | 10 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 12 |
| 2.1 Plantas Medicinais | 12 |
| 2.2 <i>Alternanthera philoxeroides</i> | 13 |
| 2.3 Betacianina | 14 |
| 2.4 Cultura de Tecidos Vegetais..... | 15 |
| 2.5 Elicitores | 16 |
| 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 18 |
| ARTIGO 1 –Efeito do CuSO ₄ na multiplicação <i>in vitro</i> e produção de betacianina em <i>Alternanthera philoxeroides</i> (Mart) Griseb..... | 22 |
| INTRODUÇÃO..... | 24 |
| MATERIAL E MÉTODOS..... | 26 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO | 28 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 33 |
| ARTIGO 2 – Avaliações morfológicas e quantificação de betacianina em <i>Alternanthera philoxeroides</i> cultivadas <i>in vitro</i> com altas concentrações de Fe-EDTA..... | 38 |
| RESUMO | 38 |
| ABSTRACT | 39 |
| MATERIAL E MÉTODOS..... | 42 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO | 44 |
| CONCLUSÃO..... | 48 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 48 |
| ARTIGO 3 – Ação do metil jasmonato na multiplicação <i>in vitro</i> e no aumento da produção de betacianina em <i>Alternanthera philoxeroides</i> | 49 |
| RESUMO | 49 |
| ABSTRACT | 50 |
| INTRODUÇÃO..... | 51 |
| MATERIAL E MÉTODOS..... | 52 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO | 54 |
| CONCLUSÕES | 58 |
| REFERÊNCIAS | 59 |

1. INTRODUÇÃO GERAL

A utilização de plantas para fins terapêuticos ocorre há séculos, no entanto, são poucos os avanços para maximizar a produção de plantas medicinais e seus princípios ativos. O Brasil apresenta um grande potencial para a produção de medicamentos, pois é considerado o país com maior diversidade genética do mundo, porém a conversão das plantas e de suas partes, cujo valor medicinal já tenha sido comprovado cientificamente em fármacos para a população, defronta-se com a dificuldade na obtenção da matéria prima com qualidade e quantidade necessária.

Como esses compostos são utilizados em grandes quantidades a produção pelas plantas nem sempre é satisfatória. Os compostos frequentemente estão restritos a uma espécie ou gênero e muitas vezes podem ser ativados somente durante uma determinada fase do crescimento ou um estágio do desenvolvimento vegetal, ou ainda em estações específicas do ano, sob condições de estresse ou de disponibilidade de nutrientes (LOURENÇO, 2003).

A biotecnologia vegetal pode contribuir para reverter esta situação através da cultura de tecidos vegetais, pois se torna possível produzir plantas de interesse em larga escala, aumentar produção dos metabólitos secundários, além de disponibilizar plantas com elevada qualidade genética e fitossanitária evitando assim o extrativismo descontrolado que vem ocorrendo ao longo dos tempos.

Alguns estudos fitoquímicos feitos com espécies do gênero *Alternanthera* demonstraram a presença de flavonóides, antraquinonas, cromocalcóides, betalaínas, saponinas, triterpenos, esteróides, entre outros, responsáveis por várias atividades medicinais (SILVEIRA, 2000; SALVADOR; DIAS, 2004; SILVA et al., 2005).

Betacianinas são pigmentos nitrogenados de coloração vermelho-violeta, pertencentes à classe das betalaínas (STRACK et al., 2003; VOLP et al., 2009). Estes pigmentos têm sido amplamente utilizados como aditivos de produtos alimentícios e medicamentos devido à sua comprovada ação

antioxidante e ausência de toxicidade, desta forma, torna-se importante maximizar e padronizar a produção deste composto.

A presente dissertação está dividida em três artigos, cada artigo referente à ação de um elicitador abiótico na multiplicação *in vitro* e produção de betacianina em *Alternanthera philoxeroides*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plantas Medicinais

Segundo a Organização Mundial de saúde, planta medicinal é qualquer planta que possua em um ou vários de seus órgãos, substâncias usadas com finalidade terapêutica, ou que estas substâncias sejam ponto de partida para a síntese de produtos químicos e farmacêuticos. Estas substâncias são produzidas pelo metabolismo secundário das plantas e, segundo Taiz (2004), apresentam funções ecológicas importantes, pois protegem as plantas contra herbívoros e infecção por microorganismos patogênicos; agem como atrativos para animais polinizadores e dispersores de sementes, bem como, agentes na competição planta-planta.

A utilização de plantas medicinais é uma prática generalizada na medicina popular, é o resultado do acúmulo secular de conhecimentos empíricos sobre a ação dos vegetais, por diversos grupos étnicos. No Brasil, tem origem na cultura dos diversos grupos indígenas que habitavam o país e pela contribuição trazida pelos escravos e imigrantes (SIMÕES et al., 1998).

As plantas medicinais são uma fonte importante de produtos biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos. No entanto, ocorrem algumas dificuldades na obtenção de matéria prima pois, muitas vezes, as espécies medicinais de interesse são coletadas de seu hábitat natural indiscriminadamente, na maioria das vezes sem identificação adequada e não respeitando a época de coleta. As plantas são secas de maneira precária, perdendo as substâncias ativas. Como resultado deste descaso, ocorre a falta de qualidade no produto final adquirido e a quase exaustão dos produtos naturais (FURLAN, 1996). Outra limitação está relacionada à complexidade do processo de avaliação dos produtos naturais pela presença de misturas biológicas de difícil caracterização. Embora muitos compostos derivados de

plantas medicinais possam ser sintetizados em laboratório, tal síntese é freqüentemente tão complexa que os rendimentos são baixos e a produção economicamente inviável. Por outro lado, alguns compostos também originados de plantas nunca foram quimicamente sintetizados (FRANÇA, 2004).

2.2 *Alternanthera philoxeroides*

Existem aproximadamente 80 espécies do gênero *Alternanthera* Forsk, pertencente à família Amaranthaceae, destas, 30 ocorrem no Brasil e dez no Rio Grande do Sul (SIQUEIRA, 1995).

No gênero *Alternanthera* foram encontrados flavonóides, antraquinonas, cromocalcóides, betalaínas, saponinas, triterpenos e esteróides (SILVEIRA, 2000; SALVADOR; DIAS, 2004; SILVA et al., 2005). Devido a sua constituição química estas espécies vêm sendo utilizadas no tratamento de infecções virais, como hepatite, herpes simples, febre hemorrágica e influenza, distúrbios gástricos, hepáticos, renais e do aparelho respiratório, além do uso como agente emoliente, antidiarréico, antiinflamatório, vermífugo, antimicrobiano e analgésico (LAGROTA et al., 1994; CALDERÓN et al., 1997; SOUZA et al., 1998; MACEDO et al., 1999).

A. philoxeroides (Mart) Griseb., conhecida popularmente como erva-de-jacaré, bredo-d'água entre outros, é uma planta perene, anfíbia, cresce abundantemente em diferentes ecossistemas, tanto aquáticos, semi-aquáticos, terrestres e até mesmo extremamente secos, como dunas (GAO et al., 2007). Espécie seletiva higrófita e heliófita é uma erva bastante variável, muitas vezes provida de caule roxo, alcançando comumente 1 m de altura. Sua floração ocorre de dezembro até abril (REITZ, 1972; LORENZI, 2002). Esta espécie nativa da América do Sul é considerada uma erva daninha agressiva, em muitas partes do mundo, devido a sua habilidade de competir com outras plantas nativas e tem se tornado uma ameaça séria para ecossistemas aquáticos (POMELLA, 2007). Sua ocorrência é irregular e descontínua, restringindo-se preferencialmente em solos lodosos de todo o Brasil. Em sua constituição química foram encontrados flavonóides glicosilados, saponinas e

betalaínas conferindo-lhe ação antitumoral e antiviral contra HSV-1, HSV-2, citomegalovírus, vírus do sarampo, vírus MUMPS e HIV (Human-Immunodeficiency-virus) (SI-MAN et al., 1988; FANG et al., 2007; FANG et al. 2009; RATTANATHONGKOM et al., 2009).

2.3 Betacianina

Betalaínas são compostos nitrogenados N-heterocíclicos solúveis em água, localizados nos vacúolos das plantas. São pigmentos que se acumulam nas flores, frutos e ocasionalmente em tecidos vegetais de plantas. Entre as plantas, a ocorrência das betalainas é restrita a 10 famílias da ordem Caryophyllales e podem ser encontradas em alguns gêneros de fungo como a *Amanita*, *Hygrosporus* e *Hygrocybe* (VOLP et al., 2009).

A estrutura química geral das betalaínas contém o ácido betalâmico acompanhado de um radical que pode ser de um simples hidrogênio a um complexo substituinte. A variação desses grupos é em função das diferentes fontes de onde podem ser obtidos esses pigmentos e determinam sua tonalidade e estabilidade. Desta forma, as betalaínas podem ser divididas em dois grupos estruturais: as betacianinas (vermelho violeta), que apresentam como radical glicose ou ácido glucorônico e as betaxantinas (amarelo), que possuem um anel di-hidropirínico. Das 70 betalaínas conhecidas, 50 delas são betacianinas e 20 betaxantinas. As betacianinas podem ainda ser classificadas quimicamente em quatro tipos: betanina, amarantina, gonferina e bougainvilina (STRACK et al., 2003; VOLP et al., 2009).

A cor das betacianinas é semelhante a das antocianinas, assim, as betacianinas foram erroneamente consideradas antocianinas, porém as estruturas químicas das betacianinas e antocianinas são diferentes e elas podem ser facilmente distinguidas pelas seguintes características: (1) as antocianinas geralmente têm absorção máxima de 270-280 nm, onde as betacianinas têm pouca ou nenhuma absorção; (2) as antocianinas são facilmente extraídas por metanol e dificilmente pela água, já as betacianinas são facilmente extraídas pela água e dificilmente por solventes orgânicos; (3) durante a eletroforese em uma solução aquosa fracamente ácida, as

antocianinas movem-se para o ânodo e as betacianinas para o cátodo (WANG et al., 2006).

As betalaínas são incapazes de converter flavona 3,4-diols para antocianidina, ao invés disso elas convertem tirosina via Dopa e uma série de metabólitos intermediários para betacianinas e betaxantinas, sendo assim, as betalaínas têm sido consideradas importantes marcadores quimiotaxonômicos, pois estes pigmentos não tem sido encontrados juntamente com antocianinas na mesma planta (STAFFORD, 1994).

O emprego das betalaínas como aditivo para produtos alimentícios, drogas e cosméticos vem crescendo amplamente, além de apresentar atividade antioxidante é um eficiente colorante natural e apresentar ausência de toxicidade (STRACK et al., 2003; CAI et al., 2005; AZEREDO; 2009; VOLP et al., 2009).

2.4 Cultura de Tecidos Vegetais

As técnicas de cultura de tecidos vegetais podem contribuir para estudos do metabolismo e produção de metabólitos secundários, pois permite interferir nas rotas metabólicas mediante o cultivo de plantas em meio preparado com agentes estressantes, elicitores e mutagênicos, que afetam quantitativa e qualitativamente os princípios ativos, e alteram a composição e/ou o teor destes metabólitos (WANG et al., 2001; KIM et al., 2002; SILVA et al., 2005; WANG et al., 2007).

A cultura de células vegetais constitui uma fonte potencial de síntese de moléculas altamente valiosas às indústrias de alimentos, cosméticos, fármacos e têxteis, as quais têm utilizado as plantas como matéria prima básica para seus produtos. No entanto, a produtividade de compostos fitoterápicos é menor em cultura de células se comparada a tecidos sintetizadores nas plantas. Isto ocorre devido à falta de diferenciação das células em suspensões e cultura de calo em tecidos e órgãos. Acredita-se que isso seja devido à distribuição insuficiente de enzimas necessárias para a síntese e o acúmulo de metabólitos secundários ou, simplesmente, pelo estado de não totipotência das células desenvolvidas em tais culturas (VERPOORTE et al., 2000; BOURGAUD et al.,

2001; RAO; RAVISHANKAR, 2002). Por isso, muitos estudos estão sendo feitos na tentativa de otimizar os meios de crescimento e produção ou ainda selecionando-se linhagens celulares mais produtoras. Além destas outras abordagens como o crescimento de células diferenciadas (cultura de raízes e brotos) e a indução de rotas biossintéticas utilizando-se estimuladores são estratégias que têm mostrado excelentes resultados dentro da cultura de tecidos vegetais (LOURENÇO, 2003).

2.5 Elicitores

Elicitores são compostos ou tratamentos que induzem as plantas a sintetizarem fitoalexinas em níveis elevados, que podem induzir mudanças fisiológicas no organismo. O efeito dos estimuladores depende de muitos fatores, tais como: a especificidade do elicitador, a concentração, o estágio de crescimento da cultura no momento da estimulação, o período de contato da cultura com o estimulador e o tempo de estimulação. Os elicitores podem ser de dois tipos: abióticos, de origem não biológica tais como metais pesados, luz ultravioleta, íons e componentes inorgânicos; ou bióticos, de origem biológica, como material de parede de fungos, bactérias, vírus ou herbívoros, bem como componentes químicos que são liberados no local do ataque do patógeno (LOURENÇO, 2003; ZHAO et al., 2005; VASCONSUELO; BOLAND, 2007).

O mecanismo de ação entre os estimuladores bióticos e abióticos é diferente e complexo, existindo muitas hipóteses com relação à forma de ação de cada tipo. Assim, o efeito de um elicitador sobre as células ou tecidos vegetais não é totalmente conhecido. A ligação do elicitador com os receptores localizados na membrana plasmática sucede a ativação da proteína-G, que por sua vez, media a estimulação da adenilil ciclase e fosfolipase – C. Ocorre o aumento do nível de mensageiros secundários acoplados a ativação de suas quinases alvo e mudanças das concentrações de Ca^{2+} (envolvimento do fluxo de Ca^{2+} pela membrana plasmática ou reservas intracelulares). Como conseqüência, ocorre uma rápida ativação em cascata da proteína quinase que induz mudanças na fosforilação das MAPKs (Proteínas quinases ativadas por mitógeno) e, em alguns casos, sua translocação para o núcleo e, finalmente, a ativação da

transcrição de enzimas que participam das rotas sintéticas de metabólitos secundários (VASCONSUELO; BOLAND, 2007).

Os jasmonatos têm um importante papel no processo de tradução de sinais que regulam os genes de defesa nas plantas. Desta forma, estão sendo amplamente utilizados como agentes estimuladores para a produção de diversos metabólitos secundários (DING et al, 2004; SURESH et al., 2004; CHEN et al, 2006; BAUER et al, 2009).

A manipulação das concentrações dos microelementos no meio de cultura também tem representado uma boa estratégia para aumentar a produção de metabólitos secundários em cultura de tecidos vegetais (TREJO-TAPIA et al., 2001; AKITA et al., 2002; NARULA et al., 2005). Tais elementos têm sido considerados elicitores abióticos ou fatores de indução que desencadeiam a formação de metabólitos secundários.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKITA, T.; HINA, Y.; NISHI, T. New medium composition for high betacyanin production by a cell suspension culture of table beet (*Beta vulgaris* L.).

Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, v. 66, n. 4, p. 902-905, 2002.

AZEREDO, H. M. C. Betalains: properties, sources, applications, and stability – a review. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 44, p. 2365-2376, 2009.

BAUER, N.; KISELJAK, D.; JELASKE, S. The effect of yeast extract and methyl jasmonate on rosmarinic acid accumulation in *Coleus blumei* hairy roots.

Biologia Plantarum, v. 53, n. 4, p. 650-656, 2009.

BOURGAUD, F. et al. Production of plant secondary metabolites: a historical Perspective. **Plant Science**, v. 161, p. 839–851, 2001.

CAI, Y.Z.; SUN, M. CORKE, H. Characterization and application of betalain pigments from plants of the Amaranthaceae. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, p. 370-376, 2005.

CALDERÓN, C. P.; GARCÍA ASSEF, S. B.; FUENTES, L. B. Evaluation of diuretic activity of *Alternanthera pungens* extracts in rats. **Phytotherapy Research**, v. 11, p. 606-608, 1997.

CHEN, H.; JONES, A. D.; HOWE, G. A. Constitutive activation of the jasmonate signaling pathway enhances the production of secondary metabolites in tomato. **Federation of European of Biochemical Societies (FEBS) Letters**, v. 580, p. 2540 - 2546, 2006.

DING, J., et al. Effects of methyl jasmonate with indole-3-acetic acid and 6-benzylaminopurine on the secondary metabolism of cultured *Onosma paniculatum* cells. ***In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant***, v. 40, p. 581-585, 2004.

FANG, J. B. et al. Antitumor constituents from *Alternanthera philoxeroides*. ***Journal of Asian Natural Products Research***, v. 9, n. 6, p. 511-515, 2007.

FANG, J. B. et al. Cytotoxic triterpene saponins from *Alternanthera philoxeroides*. ***Journal of Asian Natural Products Research***, v. 11, n. 3, p. 261-266, 2009.

FRANÇA, S. de C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: ***Farmacognosia: da planta ao medicamento***, 5ª ed., Porto Alegre/Florianópolis; Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004, p. 123-146.

FURLAN, M. R. Aspectos agronômicos em plantas medicinais. In: ***Plantas Mediciniais: arte e ciência – Um guia de estudo interdisciplinar***. São Paulo: UNESP, 1996, p. 157-167.

GAO, J.; QUANG, X.; YIN, L.; HE, G. Isolation of cDNA clones for genes up-regulated in drought-treated *Alternanthera philoxeroides* root. ***Journal Molecular Biology Reports***, v. 35, n. 3, p. 485-488, 2007.

KIM, T. H. et al. Characteristics of aroma-active compounds in the pectin-elicited suspension culture of *Zanthoxylum piperitum* (prickly ash). ***Biotechnology Letters***, v. 24, n. 7, p. 551-556, 2002.

LAGROTA, M. H. C. et al. Inhibitory activity of *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae) against the Herpes simplex virus. ***Phytoterapy Research***, v. 6, p. 358-361, 1994.

LORENZI, H. et al. ***Plantas medicinais no Brasil – nativas e exóticas***, Nova Odessa – São Paulo: Plantarum, 2002. 560p.

LOURENÇO, M. V. Biotecnologia de plantas medicinais: produção de biomoléculas. **Biológico**, v. 65, p. 63-65, 2003.

MACEDO, A. F. et al. Pharmacological and phytochemical studies of callus culture extracts from *Alternanthera brasiliana*. **Pharmazie**, v. 54, n. 1, p. 776-777, 1999.

NARULA, A.; KUMAR, S.; SRIVASTAVA, P. S. Abiotic metal stress enhances diosgenin yield in *Dioscorea bulbifera* L. cultures. **Plant Cell Report**, v. 24, p. 250-254, 2005.

POMELLA, A. W.; BARRETO, R. W.; RAGHAVAN, C. *Nimbya alternantherae* a potential biocontrol agent for alligatorweed, *Alternanthera philoxeroides*. **Journal Biocontrol**, v. 52, n. 2, p. 271-288, 2007.

RAO, S. R.; RAVISHANKAR, G. A. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 101–153, 2002.

RATTANATHONGKOM, A. et al. Evaluation of chikusetsusaponin IVa isolated from *Alternanthera philoxeroides* for its potency against viral replication. **Planta Medica**, v. 75, n. 8, p. 829-835, 2009.

REITZ, P. R. **Amarantáceas: Flora Ilustrada Catarinense**, São Paulo: Atheneu, 1972.

SALVADOR, M. J.; DIAS, D. A. Flavone C-glycosides from *Alternanthera maritima* (Mart.) St. Hil. (Amaranthaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p.107-110, 2004.

SILVA, N. C. B., *et al.* Developmental effects of additional ultraviolet a radiation growth regulators and tyrosine in *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze cultured *in vitro*. **Brazilian Archives of Biology and Technology: An International Journal**, v. 48, n. 5, p. 779-786, 2005.

SILVEIRA, L. M. S. **Caracterização fitoquímica, biológica e mineral de partes aéreas de *Alternanthera tenella* Colla (Amaranthaceae)**, 2000. 134 f. Tese (Mestrado em Química)-Universidade Federal do Maranhão, São Luiz, MA.

SI-MAN, Z. et al. Inhibitor against the human immunodeficiency virus in aqueous extracts of *Alternanthera philoxeroides*. **Chinese Medicinal Journal**, v. 101, p. 816-866, 1988.

SIMÕES. C. M. O. et al. **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**, 5 ed.; Porto Alegre:Ed. Universidade/UFRGS, 1998.

SIQUEIRA, J. C. Fitogeografia das Amaranthaceae Brasileiras. **Pesquisas-Botânica**, v. 45, p. 5-21, 1994/1995.

SOUZA, M. M.; KERN, P.; FLORIANI, A. E. O.; CECHINEL, V. Analgesic properties of a hydro alcoholic extract obtained from *Alternanthera brasiliana*. **Phytotherapy Research**, v. 12, p. 279-281, 1998.

STAFFORD, H. A. Anthocyanins and betalains: evolution of the mutually exclusive pathways. **Plant Science**, v. 101, p. 91-98, 1994.

STRACK, D.; VOGT, T.; SCHLIEMANN, W. Recent advances in betalain research. **Phytochemistry**, v. 62, p. 247-269, 2003.

SURESH, B., et al. Polyamine and methyl jasmonate-influenced enhancement of betalaine production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* grown in a bubble column reactor and studies on efflux of pigments. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 2091-2096, 2004.

TAIZ, L. ; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TREJO-TAPIA, G. et al. Influence of cobalt and other microelements on the production of betalains and the growth of suspension cultures of *Beta vulgaris*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 67, p. 19-23, 2001.

VASCONSUELO, A.; BOLAND, R. Molecular aspects of early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. **Plant Science**, v. 172, p. 861-875, 2007.

VERPOORTE, R. A.; VAN DER HEIJDEN, R.; MEMELLINK, J. Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. **Transgenic Research**, v. 9, p. 323–343; 2000.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; STRINGUETA, P.C. Pigmentos naturais bioativos. **Alimentos e Nutrição**, v. 20, p. 157-166, 2009.

WANG, C. Q. et al. Correlation of tyrosinase activity and betacyanin biosynthesis induced by dark in C3 halophyte *Suaeda salsa* seedlings. **Plant Science**, v. 173, p. 487-494, 2007.

WANG, C. Q. et al. Identification of betacyanin and effects of environmental factors on its accumulation in halophyte *Sueda salsa*. **Journal of Plant Physiology and Molecular Biology**, v. 32, n. 2, p. 195-201, 2006.

WANG, J. W.; ZHANG, Z.; TAN, R. X. Stimulation of artemisin production in *Artemisia annua* hairy roots by the elicitor from the endophytic *Colletotrichum* sp. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 857-860, 2001.

ZHAO, J. T. et al. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 23, p. 283-333, 2005.

ARTIGO 1 – REVISTA BRASILEIRA DE PLANTAS MEDICINAIS

Efeito do CuSO_4 na multiplicação *in vitro* e produção de betacianina em *Alternanthera philoxeroides* (Mart) Griseb.

PEROTTI, J. C.^{1*}; PETERS, J. A.¹; BACARIN, M. A.¹; BRAGA, E. J.B.¹

¹ Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Departamento de Botânica, Pelotas, RS, 960010-900, Brasil

RESUMO: A manipulação da concentração dos microelementos no meio de cultura tem representado uma boa estratégia para aumentar a produção de metabólitos secundários em cultura de tecidos. As betacianinas são pigmentos nitrogenados, restritos às espécies da ordem Caryophyllales, devido à sua comprovada ação antioxidante e ausência de toxicidade, vêm sendo amplamente utilizadas como aditivos de alimentos e fármacos. Este trabalho teve o objetivo de demonstrar a influência do sulfato de cobre na produção de betacianina e na multiplicação de plantas de *Alternanthera philoxeroides* cultivadas *in vitro*. Segmentos nodais foram inoculados em meio MS básico com diferentes concentrações de CuSO_4 (0; 25; 75; 125; 175; 200 μM). Após 35 dias de cultivo foi avaliado o número de brotos e gemas, altura, comprimento das raízes, massa fresca da parte aérea e produção de betacianina. Concentrações acima de 75 μM diminuíram a

* E-mail para correspondência: janieliperotti@yahoo.com.br

altura das plantas, o número de brotos e gemas e o crescimento radicular, enquanto na concentração de 125 μM houve a maior produção de massa fresca. A produção de betacianina aumentou 60% em relação ao controle com 175 μM de CuSO_4 . Ocorreu crescimento das plantas em todas as concentrações de CuSO_4 testadas, com exceção de 200 μM , que foi totalmente tóxica. Estes resultados demonstram o efeito positivo da elicitación com CuSO_4 na produção de betacianina, porém altas concentrações são deletérias para o crescimento das plantas.

Palavras-chave: Estresse abiótico, sulfato de cobre, cultivo *in vitro*, erva-de-jacaré, metabolismo secundário

**Effect of CuSO_4 on *in vitro* propagation and production of betacyanin in
Alternanthera philoxeroides (Mart) Griseb.**

PEROTTI, J. C.^{1*} ; PETERS, J. A.¹; BACARIN, M. A.¹; BRAGA, E. J.B.¹

¹ Federal University of Pelotas, Biology Institute, Botanical Department, Pelotas, RS,
960010-900, Brazil

ABSTRACT: The manipulation of concentration of trace elements in the culture medium has represented a good strategy to increase the production of secondary metabolites in tissue culture. Betacyanins are nitrogen-containing pigments, restricted to species of Caryophyllales order due to their proven antiradical activity and absence of toxicity are widely used as additives for food and drugs. This study aimed to demonstrate the

*E-mail to correspondence: janieliperotti@yahoo.com.br

influence of copper sulphate in the production of betacyanin and the multiplication of plants of *Alternanthera philoxeroides* cultured *in vitro*. Nodal segments were inoculated in basic MS with different concentrations of CuSO₄ (0, 25, 75, 125, 175, 200 µM). After 35 days of culture it was evaluated the number of shoots and buds, height, root length, fresh weight of shoots and production of betacyanin. Concentrations above 75 µM decreased the height of the plant, number of shoots and buds, and root growth, while the concentration of 125 µM resulted in the highest fresh mass production. Betacyanin production increased 60% over control with 175 µM CuSO₄. Plant growth occurred in all tested concentrations of CuSO₄, with the exception of 200 µM which was totally toxic. These results demonstrate the positive effect of elicitation with CuSO₄ in the production of betacyanin, but high concentrations are deleterious to the growth of the plant.

Keywords: Abiotic stress, copper sulfate, *in vitro* culture, alligator weed, secondary metabolism.

INTRODUÇÃO

Com o intuito de aumentar a produtividade de compostos de interesse nos vegetais, diversas técnicas vêm sendo utilizadas, incluindo a seleção de linhagens, engenharia metabólica, otimização das condições de cultivo e o emprego de elicitores (Chen & Chen, 2000). Trabalhos recentes têm demonstrado o efeito de microelementos na morfogênese *in vitro* e na produtividade de metabólitos secundários (Trejo-Tapia et al., 2001; Akita et al., 2002; Bhuiyan & Adachi, 2003; Kumar et al., 2004; Kothari-Chajer et al., 2008).

O cobre é um micronutriente essencial para o desenvolvimento normal das plantas. Uma de suas principais funções é como ativador ou constituinte de enzimas. Ele também atua no transporte de elétrons sendo, portanto, bastante relevante nos processos

fisiológicos de oxirredução. A maior parte do cobre está presente nos cloroplastos, e mais da metade ligado à plastocianina (Prado, 2008).

Tanto o excesso quanto a ausência de cobre inibe o crescimento e prejudica importantes processos celulares como a fotossíntese, a síntese de pigmentos e o transporte de elétrons mitocondrial (Nassar, 2004; Jain et al., 2009).

O íon divalente Cu^{2+} tem demonstrado efeito positivo na produção de alguns metabólitos secundários, entre eles, diogenina em *Dioscorea bulbifera* (Narula et al., 2005), quercetina em *Pluchea lanceolata* (Kumar et al., 2004), cumarina em *Helianthus annuus* (Gutierrez et al. 1995), além de ter aumentado a produção de betacianina em *Beta vulgaris* (Trejo-Tapia et al., 2001) e *Porulaca* sp. cv. 'Jewel' (Bhuiyan & Adachi, 2003).

A concentração dos nutrientes inorgânicos, incluindo o cobre, utilizada no meio em cultura de tecidos vegetais é, na maioria das vezes, baseada nos níveis estabelecidos por Murashige & Skoog (1962) para a cultura de *Nicotiana tabacum*. No entanto, tais concentrações podem não ser a mais adequada para o cultivo de outras espécies.

Alternanthera philoxeroides, conhecida popularmente como brejo-d'água ou erva-de-jacaré (alligatorweed), pertencente à família Amaranthaceae, é uma espécie nativa da América do Sul. Os extratos desta planta apresentam flavonóides glicosilados, saponinas e betalaínas, sendo utilizada na medicina popular contra alergia e na medicina tradicional como diurética, antipirética e em tratamentos de feridas e úlceras; apresenta comprovada ação antitumoral, antiviral contra HSV-1, HSV-2, citomegalovírus, vírus do sarampo, vírus da cachumba, vírus da dengue, hantavíruses e HIV (Human-Immunodeficiency-virus) (Si-Man et al., 1988; Jiang et al., 2005; Vendruscolo & Menstz, 2006; Liu et al., 2007; Fang et al., 2007; Rattanathongkom et al., 2009a; Rattanathongkom et al., 2009b).

As betacianinas são pigmentos nitrogenados, de coloração vermelho-violeta, classificadas quimicamente em quatro tipos: betanina, amarantina, gonferina e

bougainvilina (Volp et al., 2009). Estes pigmentos são pertencentes, juntamente com as betaxantinas, à classe das betalaínas, sendo amplamente utilizados como aditivo de produtos alimentícios. A tirosinase ou polifenol oxidase cataliza a hidroxilação da tirosina para dihidroxifenilalanina (DOPA) e a subsequente oxidação de DOPA na rota de biogêneses das betalaínas (Wang et al., 2007).

A cultura de células vegetais vem sendo amplamente utilizada para a produção de compostos de interesse às indústrias de alimentos, cosméticos e fármacos. Mesmo apresentando resultados satisfatórios, a produtividade destes compostos é menor em cultura de células se comparada a tecidos sintetizadores nas plantas. Isto ocorre devido à falta de diferenciação das células em suspensão e cultura de calo em tecidos e órgãos (Verpoorte et al., 2000; Bougaud et al., 2001). Desta forma torna-se vantajoso a utilização de células diferenciadas para o cultivo *in vitro*.

Tendo em vista que a tirosina trata-se de uma enzima cúprica e que o cobre pode exercer efeitos positivos na multiplicação de plantas e no aumento da produtividade de metabólitos secundários, este trabalho teve o objetivo de demonstrar a influência do sulfato de cobre na produção de betacianina e na multiplicação de plantas de *A. philoxeroides* cultivadas *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Fonte dos explantes

As plantas de *Alternanthera philoxeroides* foram coletadas pela bióloga Silvia Rubin no município de Rio Grande – Rio Grande do Sul, identificadas pela bióloga Élen Nunes Garcia e suas excisas foram depositadas no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul.

As plantas coletadas foram cultivadas em casa de vegetação e estabelecidas *in vitro* em meio MS (Murashige & Skoog, 1962). Para o experimento com diferentes concentrações de CuSO_4 foram utilizados como explantes segmentos nodais de aproximadamente 1 cm de comprimento com duas gemas, obtidos das plantas pré-estabelecidas *in vitro*.

Meio e condições de cultivo

Seis concentrações (0; 25; 75; 125; 175; 200 μM) de sulfato de cobre foram adicionadas separadamente em meio básico MS com 30 g L^{-1} de sacarose e 100 mg L^{-1} de mio-inositol, sem adição de reguladores de crescimento. O pH do meio foi ajustado para 5,8 e após foi acrescentado 7 g L^{-1} de agar. Os frascos contendo meio de cultura foram vedados com papel alumínio e autoclavados por 20 minutos a uma temperatura de 121° C à pressão de 1,05 kg cm^{-2} .

Os explantes foram inoculados nos meios de cultura em câmara de fluxo laminar em condições assépticas. Após, os frascos com os explantes foram colocados em sala de crescimento, onde permaneceram por 35 dias sob fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de 48 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Aos 35 dias de cultivo foi avaliado o número de gemas e brotos por planta, altura, comprimento médio das raízes, porcentagem de enraizamento e massa fresca da parte aérea.

Quantificação de betacianina

Após 35 dias de cultivo, a parte aérea das plantas de *A. philoxeroides* foi separada do sistema radicular para análise das betacianinas. O material vegetal foi macerado em 5 mL de água destilada e após, centrifugado a 15790 rpm, a 4°C por 25 minutos. A quantificação de betacianinas foi realizada em espectrofotômetro Ultrospec 2100 pro da Amersham Bioscience®, de acordo com a metodologia descrita por Cai et al. (1998) com

algumas adaptações. A concentração de betacianina foi calculada e expressada como amarantina pela seguinte fórmula:

$$\text{Concentração de amarantina} = (A_{536} - A_{650}) \times P.M. \times V \times FD \times 100 / \epsilon \times MF$$

(mg Amarantina /100g de massa fresca)

onde ϵ é o coeficiente de absorção de amarantina ($5,66 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$), A_{536} representa a absorbância a 536 nm para a amarantina e A_{650} absorbância a 650 para clorofila, P.M. é o peso molecular ($726,6 \text{ g mol}^{-1}$), V é o volume de extração (5 ml), FD é o fator de diluição e MF é a massa fresca das amostras. Os resultados foram expressos em mg de amarantina por 100g MF⁻¹.

Modelo experimental e análise estatística dos dados

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com seis tratamentos (concentrações de sulfato de cobre), cada tratamento contendo 5 repetições, sendo cada uma representada por um frasco contendo cinco explantes. Os resultados foram submetidos à análise de variância e regressão polinomial com o auxílio do software estatístico Winstat (Machado & Conceição, 2002). Foram realizadas análises de correlação entre as variáveis morfológicas e a produção de betacianina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 35 dias de cultivo ocorreu 100% de formação de brotos a partir dos segmentos nodais inoculados em meio MS com as diferentes concentrações de sulfato de cobre. Porém, concentrações acima de 75 μM diminuíram a formação de brotos por explante (**Erro! Fonte de referência não encontrada. A**).

Entre as concentrações de CuSO_4 testadas, o máximo número de gemas (11,4) e altura (8,4 cm) das plantas foi registrado em 75 μM (**Erro! Fonte de referência não encontrada. B e C**), em concentrações superiores a esta ocorreu uma visível diminuição

nas médias das duas variáveis analisadas, sendo a concentração de 200 μM totalmente inibitória para o crescimento em altura das plantas.

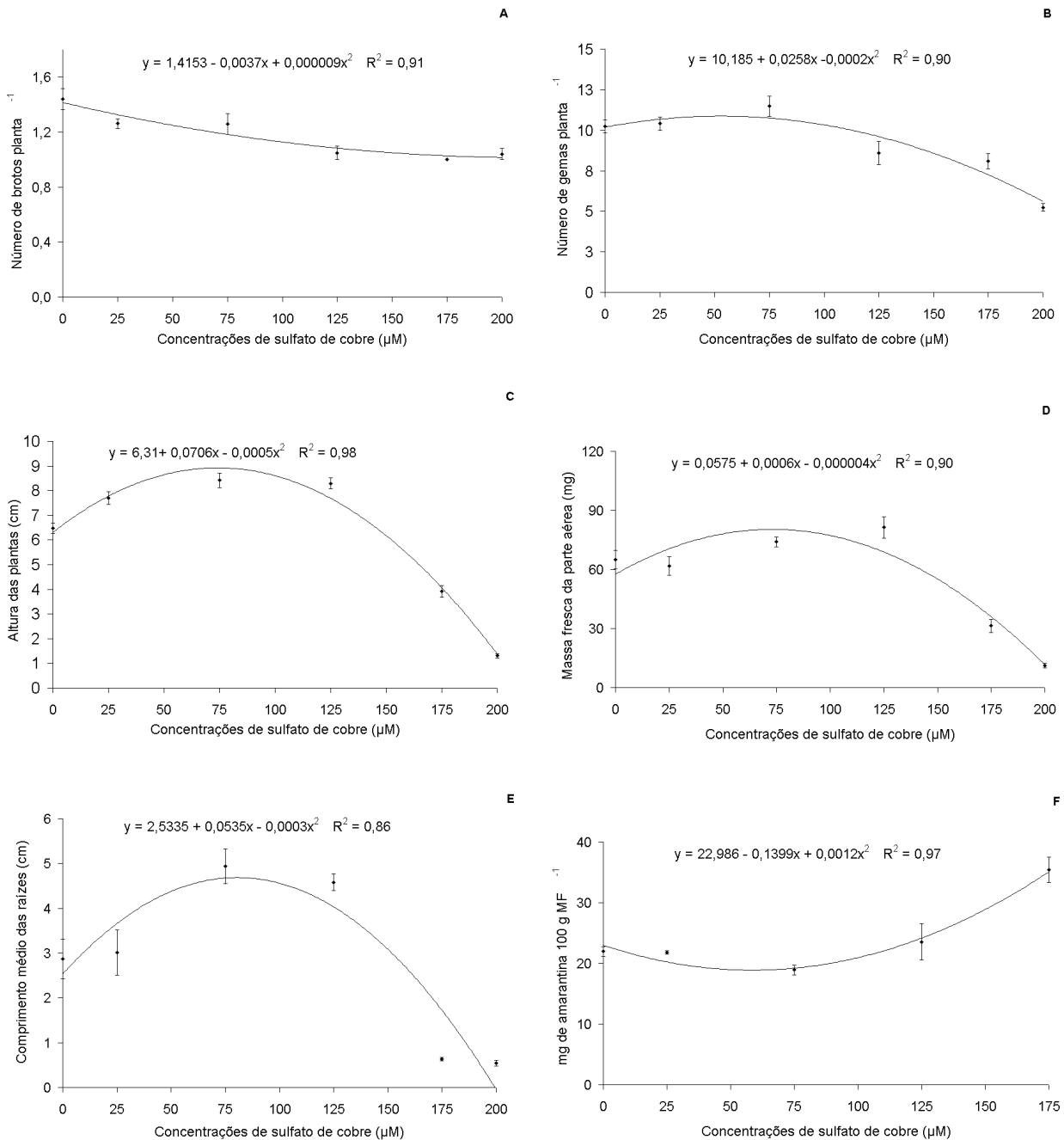


FIGURA 1. Número de brotos (A), número de gemas (B), altura (C), MF (massa fresca) da parte aérea (D), comprimento das raízes (E) e na produção de betacianina (F) em plantas de *Alternanthera philoxeroides* cultivadas in vitro por 35 dias em meio de cultura com diferentes concentrações de CuSO_4 . As barras verticais representam o erro padrão da média de cinco repetições

Narula et al. (2005), avaliando o efeito de diferentes concentrações de CuSO_4 nas respostas morfogênicas de segmentos nodais de *Dioscorea bulbifera* observaram que a

concentração de 75 μM de CuSO_4 foi favorável para o crescimento de brotos e número de gemas, concentrações acima de 75 μM provocaram uma diminuição do número de brotos por segmento nodal.

Joshi & Kothari (2007), avaliando a diferenciação e alongamento de brotos de *Capsicum annuum* a partir de explantes cotiledonares, sob o efeito de diferentes níveis de CuSO_4 , também verificaram um aumento significativo do número e comprimento dos brotos por explante com a adição de 30 vezes a concentração normal do CuSO_4 no meio MS.

O aumento da concentração de CuSO_4 até 125 μM promoveu um incremento da massa fresca da parte aérea (**Erro! Fonte de referência não encontrada.D**), apresentando associação linear positiva com a altura das plantas (TABELA 1). Tais resultados não foram observados em *Dioscorea bulbifera*, onde concentrações acima do controle promoveram diminuição da massa fresca, até mesmo na concentração de 75 μM onde os brotos apresentaram maior comprimento (Narula et al., 2005). No entanto, o aumento de 50 vezes a concentração de CuSO_4 no meio MS em *Paspalum scrobiculatum* e cinco vezes em *Stevia rebaudiana*, promoveram um significativo aumento na biomassa dos calos e brotos das respectivas plantas (Kothari-Chajer et al., 2008; Jain et al., 2009).

TABELA 1. Análise de correlação entre as variáveis morfológicas e a produção de betacianina após tratamento com diferentes concentrações de sulfato de cobre em plantas de *Alternanthera philoxeroides* cultivadas *in vitro* por 35 dias

| | NB | A | MFPA | CR | PB |
|------|---------|---------|---------------|---------|----------------|
| NG | -0,4149 | 0,5086 | 0,4718 | 0,5097 | -0,6391 |
| NB | - | -0,8554 | -0,8089 | -0,7494 | 0,7924 |
| A | - | - | 0,8850 | 0,8652 | -0,8021 |
| MFPA | - | - | - | 0,8252 | -0,7817 |
| CR | - | - | - | - | -0,6931 |

NG = número de gemas, NB = número de brotos, A = altura, MFPA = massa fresca da parte aérea, CR = comprimento radicular, PB = produção de betacianina

O cobre é constituinte e ativador de várias enzimas envolvidas no transporte de elétrons e na biossíntese de proteínas e carboidratos (Niedz & Evens, 2007), podendo justificar, desta forma, o efeito do cobre no aumento significativo da biomassa.

O efeito do cobre foi bastante visível no comprimento das raízes. Observou-se um estímulo no crescimento radicular até 75 μM e um efeito deletério com o aumento das concentrações (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**E). Plantas expostas às concentrações de 175 e 200 μM tiveram uma diminuição de aproximadamente quatro vezes o comprimento radicular, além disso, ocorreu engrossamento e diminuição de ramificações no sistema radicular (FIGURA 2). Tais efeitos também foram observados em *Musa* sp., onde a total inibição da rizogênese ocorreu na concentração de 100 μM (Nassar, 2004).



FIGURA 2. Plantas de *Alternanthera philoxeroides* cultivadas em meio MS com a adição de 175 μM de sulfato de cobre por 35 dias

Llorens et al. (2000), estudando o efeito do aumento da concentração de cobre em *Vitis vinifera*, verificaram que os níveis de cobre aumentam tanto nas folhas como nas raízes após o estresse, mas em uma maior concentração nas raízes. Isto sugere a ocorrência de um mecanismo de imobilização neste órgão, podendo ser esta a razão para o forte efeito das altas concentrações de cobre no sistema radicular.

Prado (2008) também enfatizou que a redução do sistema radicular é um bom indicativo de toxicidade de cobre, ocorrendo ainda redução da ramificação e

engrossamento das raízes devido a danos na permeabilidade da membrana, como pode ser observado neste trabalho.

A adição de CuSO_4 no meio de cultura em concentrações maiores que as originais tem apresentado efeitos positivos na produção de metabólitos secundários. Em *Dioscorea bulbifera*, 75 μM de CuSO_4 promoveu um aumento significativo no rendimento de diosgenina (Narula et al., 2005). Os níveis de quercetina também aumentaram após a adição de 150 μM de CuSO_4 em brotos de *Plunchea lanceolata* e 100 μM de CuSO_4 aumentou significativamente o conteúdo de lepidina em *Lepidium sativum* (Saba et al., 2000).

Trejo-Tapia et al. (2001) verificaram que o aumento em cinco vezes a concentração de Cu^{2+} em meio B5 estimulou a produção de betalaínas em *Beta vulgaris*, no entanto, Akita et al. (2002) observaram que a omissão do cobre no meio de cultura não afetou a produção de betacianina nesta mesma espécie. Bhuiyan & Adachi (2003), com a adição de 20 μM de CuSO_4 , tiveram um aumento de 30% na produção de betacianina em *Portulaca*.

Neste trabalho foi observado, a partir da concentração de 125 μM de CuSO_4 , um incremento na produção de betacianina (**Erro! Fonte de referência não encontrada.F**), apresentando um aumento de 59% o teor deste pigmento na concentração 175 μM em relação ao controle (TABELA 2).

TABELA 2. Produção de betacianina em plantas de *Alternanthera philoxeroides* cultivadas *in vitro* por 35 dias em meio de cultura com diferentes concentrações de CuSO_4 em relação ao controle (0,1 μM de CuSO_4)

| Concentração de CuSO_4 (μM) | Conteúdo de betacianina (mg de amarantina 100 g MF^{-1}) | Conteúdo de betacianina em relação ao controle (x controle) |
|---|--|---|
| 0 (controle) | 22 | 1,00 |
| 25 | 22 | 1,00 |
| 75 | 19 | 0,86 |
| 125 | 24 | 1,09 |
| 175 | 35 | 1,59 |

A análise de correlação demonstrou, com exceção do número de brotos por explante, associação linear negativa entre a concentração de betacianina e as variáveis morfológicas analisadas (TABELA 1).

O incremento da produção de betacianina obtido neste trabalho deve estar relacionado ao aumento da atividade de alguma enzima envolvida na rota metabólica de biossíntese deste pigmento que, de alguma forma, tenha sido influenciada pela maior disponibilidade de cobre. Como o sulfato de cobre é um elemento constituinte da enzima tirosinase, a qual cataliza a hidroxilação da tirosina para DOPA (dihidroxifenilalanina) e a subsequente oxidação de DOPA na rota de biossíntese de betalainas (Steiner et al., 1999), este aumento da síntese pode estar relacionada ao efeito positivo do íon Cu^{+2} na atividade desta enzima.

A partir dos dados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que altas concentrações de sulfato de cobre estimulam a biossíntese de betacianinas, porém apresentam efeitos deletérios para o crescimento das plantas de *A. philoxeroides*. A utilização do cultivo *in vitro* de tecidos diferenciados em meio semi-sólido, ao invés da técnica de cultura celular em meio líquido (mais usual para produção de compostos de interesse) foi favorável para a produção de betacianina para a espécie em estudo, apresentando a vantagem do menor tempo para a obtenção deste composto, pois dispensa-se o período necessário para a indução de calos adequados a suspensão celular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKITA, T.; HINA, Y.; NISHI, T. New medium composition for high betacyanin production by a cell suspension culture of table beet (*Beta vulgaris* L.). **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 66, n. 4, p. 902-905, 2002.

BHUIYAN, N. H.; ADACHI, T. Stimulation of betacyanin synthesis through exogenous methyl jasmonate and other elicitors in suspension-cultured cells of *Portulaca*. **Journal Plant Physiology**, v. 160, p. 1117-1124, 2003.

BOURGAUD, F. et al. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective.

Plant Science, v. 161, p. 839-851, 2001.

CAI, Y. et al. Characterization and quantification of betacyanin pigments from diverse *Amaranthus* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 6, p. 2063-2070, 1998.

CHEN H.; CHEN, F. Effects of yeast elicitor on the grown and secondary metabolism of a high-tanshinone-producing line of the Ti transformed *Salvia miltiorrhiza* cells in suspension culture. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 837-840, 2000.

FANG, J. B. et al. Antitumor constituents from *Alternanthera philoxeroides*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 9, n. 6, p. 511-515, 2007.

JAIN, P.; KACHHWAHA, S. L.; KOTHARI, S. L. Improved micropropagation protocol and enhancement in biomass and chlorophyll content in *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni by using high copper levels in the culture medium. **Scientia Horticulturae**, v. 119, p. 315-319, 2009.

JIANG, W.; LUO, X.; KUANG, S. Effects of *Alternanthera philoxeroides* Griseb. against dengue virus *in vitro*. **Journal of First Military Medical University**, v. 25, n. 4, p. 454-456, 2005.

JOSHI, A. KOTHARI, S. L. High copper levels in the medium improves shoot bud differentiation and elongation from the cultured cotyledons of *Capsicum annuum* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 88, p. 127-133, 2007.

KOTHARI-CHAJER, A.; SHARMA, M. Micronutrient optimization results into highly improved *in vitro* plant regeneration in Kodo (*Paspalum scrobiculatum* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 94, p. 105-112, 2008.

KUMAR, S., et al. In vitro propagation of *Plunchea lanceolata*, a medicinal plant, and effect of heavy metals and different aminopurines on quercetin content. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 40, p. 171-176, 2004.

LIU, Y. et al. Separation and anti-hantaan virus activity of extracts from *Alternanthera philoxeroides* *in vitro* and *in vivo*. **Wuhan University Journal of Natural Sciences**, v. 12, n. 6, p. 1143-1147, 2007.

LLORENS, N. et al. Effects of copper exposure upon nitrogen metabolism in tissue cultures *Vitis vinifera*. **Plant Science**, v. 160, p. 159-163, 2000.

MACHADO, A.; CONCEIÇÃO, A. R. Programa estatístico WinStat Sistema de Análise Estatístico para Windows. Versão 2.0. Pelotas: UFPel, 2002.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-97, 1962.

NARULA, A.; KUMAR, S.; SRIVASTAVA, P. S. Abiotic metal stress enhances diosgenin yield in *Dioscorea bulbifera* L. cultures. **Plant Cell Rep**, v. 24, p. 250-254, 2005.

NASSAR, A. H. Effect of some copper compounds on rhizogenesis of micropropagated banana shoots. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 6, n. 3, p. 552-556, 2004.

NIEDZ, R.; EVENS, T. J. Regulating plant tissue growth by mineral nutrition. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 43, p. 370-381, 2007.

PRADO, R. de M. **Nutrição de plantas**, Ed. UNESP, São Paulo, 407 p., 2008.

RATTANATHONGKOM, A. et al. Evaluation of chikusetsu saponin IVa isolated from *Alternanthera philoxeroides* for its potency against viral replication. **Planta Medica**, v. 75, n. 8, p. 829-835, 2009.

RATTANATHONGKOM, A. et al. Inhibitory effect on nitric oxide production of RAW 264.7 macrophage cell of na active compound from *Alternanthera philoxeroides*. **Khon Kaen University Reserch Journal**, v. 9, n. 3, p. 9-16, 2009.

SABA, D. P.; IQBAL, M.; SRIVASTAVA, P. S. Effect of ZnSO₄ and CuSO₄ on regeneration and lepidine content in *Lepidium sativum* L. **Biologia Plantarum**, v. 41, n. 2, p. 253-256, 2000.

SI-MAN, Z.; et al. Inhibitor against the human immunodeficiency virus in aqueous extracts of *Alternanthera philoxeroides*. **Chinese Medicinal Journal**, v. 101, p.816-866, 1988.

STEINER, U. et al. Tyrosinase involved in betalain biosynthesis of higher plants. **Planta**, v. 208, p. 114-124, 1999.

TREJO-TAPIA, G. et al., Influence of cobalt and other microelements on the production of betalains and the growth of suspension cultures of *Beta vulgaris*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 67, p.19-23, 2001.

VENDRUSCULO, G. S.; MENTZ L. A. Levantamento etnobotânico das plantas utilizadas como medicinais por moradores do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia, Série Botânica**, v. 61, n.1-2, p. 83-103, 2006.

VERPOORTE, R. A. et al. Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. **Transgenic Research**, v. 9, p. 323-343; 2000.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; STRINGUETA, P. C. Pigmentos naturais bioativos. **Alimentos e Nutrição**, v. 20, p. 157-166, 2009.

WANG, C. Q. et al. Correlation of tyrosinase activity and betacyanin biosynthesis induced by dark in C3 halophyte *Suaeda salsa* seedlings. **Plant Science**, v. 173, p. 487-494, 2007.

ARTIGO 2 – PLANT CELL CULTURE & MICROPROPAGATION

AVALIAÇÕES MORFOLÓGICAS E QUANTIFICAÇÃO DE BETACIANINA EM *ALTERNANTHERA PHILOXEROIDES* CULTIVADAS *IN VITRO* COM ALTAS CONCENTRAÇÕES DE FE-EDTA

**Janieli Cristina Perotti¹, José Antonio Peters², Marcos Antonio Bacarin²,
Eugenia Jacira Bolacel Braga²**

RESUMO

O ferro é um micronutriente essencial para processos fisiológicos vitais nas plantas, pois atua na ativação de enzimas ou como constituinte de proteínas. Baseado nos resultados satisfatórios obtidos em outras espécies no aumento da produção de metabólitos secundários e na multiplicação de plantas, o efeito do Fe-EDTA foi avaliado em *Alternanthera philoxeroides* quanto à produção de betacianina e sua influência nas características morfológicas de plantas cultivadas *in vitro*. Segmentos nodais foram inoculados em meio MS básico com diferentes concentrações (0; 75; 150; 300 e 450 μM) de Fe-EDTA. Aos 35 dias de cultivo, foi avaliado o número de brotos e gemas, comprimento de brotos e raiz, massa fresca

¹ Mestre - Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Departamento de Botânica - Pelotas, RS – CEP 354-960010-900, Brasil – janieliperotti@yahoo.com.br

² Doutor - Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Departamento de Botânica - Pelotas, RS – CEP 354-960010-900, Brasil

da parte aérea e teor de betacianina. O Fe-EDTA não alterou a massa fresca da parte aérea, o número e comprimento dos brotos formados até a concentração de 300 μM , no entanto, ocorreu um leve incremento no comprimento das raízes nas concentrações de 25 e 75 μM e a partir da concentração de 150 μM o comprimento radicular foi significativamente reduzido. A concentração de 450 μM foi totalmente tóxica para o crescimento das plantas. A produção de betacianina aumentou mais de 100% na concentração de 300 μM em relação ao controle. O aumento na produção de betacianina e o favorável crescimento das plantas observado neste trabalho demonstra o efeito positivo exercido pelo ferro, concluindo-se que a elicitação com Fe-EDTA é favorável em *A. philoxeroides*.

Termos para indexação: Betalaína, ferro, elicitor, multiplicação, erva-de-jacaré.

MORFOLOGICAL EVALUATIONS AND BETACYANIN QUANTIFICATION IN ALTERNANTHERA PHILOXEROIDES CULTIVATED *IN VITRO* WITH HIGH FE-EDTA CONCENTRATIONS

**Janieli Cristina Perotti³, José Antonio Peters², Marcos Antonio Bacarin²,
Eugenia Jacira Bolacel Braga⁴**

ABSTRACT

¹ Master – Federal University of Pelotas, Biology Institute, Botanical Department- Pelotas, RS – Zip Code 354-960010-900, Brazil – janieliperotti@yahoo.com.br

⁴ Doctor – Federal University of Pelotas, Biology Institute, Botanical Department- Pelotas, RS – Zip Code 354-960010-900, Brazil

Iron is a trace element essential for vital physiological processes in plants because it acts on the activation of enzymes or as a constituent of proteins. Based on the satisfactory results obtained in other species to increase the production of secondary metabolites and plant multiplication, it was evaluated the effect of Fe-EDTA in *Alternanthera philoxeroides* to the increasing of betacyanin accumulation and its influence on morphological traits of plants grown in vitro. Nodal segments were inoculated in basic MS with different concentrations (0, 75, 150, 300 and 450 μM) of Fe-EDTA. At 35 days of culture the number of shoots and buds, length of shoot and root, fresh weight of shoots and content betacyanin were evaluated. The Fe-EDTA did not alter the fresh weight of shoots, number and length of shoots up to a concentration of 300 μM , however, there was a slight increase in root length at concentrations of 25 and 75 μM and from the concentration 150 μM the root length was significantly reduced. The concentration of 450 μM was completely toxic to the growth of the plant. Betacyanin production increased over 100% at concentration of 300 μM compared to control. Increased production of betacyanin and favorable plant growth observed in this study demonstrates the positive effect exerted by iron, concluding that the elicitation with Fe-EDTA is favorable in *A. philoxeroides*.

Index terms: Betalains, iron, elicitor, multiplication, alligator weed

INTRODUÇÃO

As betalaínas são pigmentos nitrogenados, solúveis em água, que compreendem as betacianinas (coloração vermelho-violeta) e as betaxantinas

(coloração amarela). Sua ocorrência é restrita à ordem Caryophyllales e a algumas espécies de fungos (VOLP et al., 2009). As betacianinas são divididas quimicamente em betanina, amarantina, gonferina e bougainvilina, e tais pigmentos têm sido utilizados como aditivo alimentício devido sua coloração intensa, apresentando um ótimo poder tintorial, ausência de toxicidade e potencial antioxidante (STRACK et al., 2003; CAI et al., 2005; AZEREDO; 2009; VOLP et al., 2009).

Alternanthera philoxeroides (Amaranthaceae) é uma planta nativa da América do Sul, conhecida popularmente como erva-de-jacaré e bredo-d'água que apresenta diversas propriedades medicinais. É utilizada como diurética, antipirética, antiviral, antitumoral, no tratamento de feridas e úlceras. Tais propriedades são atribuídas a sua constituição química que além de flavonóides glicosilados e saponinas, apresenta betacianinas responsáveis pela coloração roxa de seu caule (SI-MAN et al., 1988; JIANG et al., 2005; VENDRUSCOLO & MENSTZ, 2006; LIU et al., 2007; FANG et al., 2007; RATTANATHONGKOM et al, 2009a; RATTANATHONGKOM et al., 2009b).

O aumento da produção de compostos químicos de interesse à indústria de alimentos e fármacos é de grande valia, tornando-se alvo de diversas pesquisas na atualidade. Entre as alternativas para maximizar a produção de metabólitos secundários, destaca-se a cultura de tecidos vegetais, tornando-se possível interferir nas rotas metabólicas mediante o cultivo de plantas em meio preparado com agentes estressantes, elicitores e mutagênicos, que afetam quantitativamente e qualitativamente os princípios ativos, e alteram a composição e teor destes metabólitos (WANG et al., 2001; KIM et al., 2002; SILVA et al., 2005). A cultura de células vegetais constitui uma fonte potencial para a produção de compostos de interesse, no entanto, a produtividade destes compostos é menor em cultura de

células e calos em comparação à planta intacta. Isto ocorre devido a distribuição insuficiente de enzimas necessárias para a síntese e o acúmulo destes metabólitos ou simplesmente, pelo estado de não totipotência das células desenvolvidas em tais culturas (VERPOORTE et al., 2000; BOURGAUD et al., 2001).

A manipulação das concentrações dos micronutrientes no meio de cultura tem representado uma boa estratégia para aumentar a produção de metabólitos secundários em cultura de tecidos vegetais e tais elementos têm sido considerados elicitores abióticos ou fatores de indução. O ferro é um micronutriente essencial para várias reações metabólicas nos vegetais, é importante na biossíntese de clorofila, proteínas, DNA, formação de hormônios e atua ainda, como ativador e constituinte de várias enzimas, desta forma, ele tem influenciado respostas morfológicas e metabólicas nas plantas (PRADO, 2008). Altas concentrações de Fe-EDTA aumentaram a produção de betacianina em *Beta vulgaris* e *Potulaca* sp. (AKITA et al., 2000; TREJO-TAPIA et al., 2001; BHUIYAN & ADACHI, 2003). O ferro também influenciou o estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Hibiscus rosa-sinensis*, *Rosa hybrida*, apresentando resultados satisfatórios com o aumento de sua concentração (VAN DER SALM et al., 1994; ZAWADZKA; ORLIKOWSKA, 2006; CHRISTENSEN et al., 2008).

Baseado nos resultados satisfatórios obtidos em outras espécies, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da adição do Fe-EDTA quanto ao aumento da produção de betacianina e sua influência nas características morfológicas de plantas de *A. philoxeroides* cultivadas *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

Foram utilizadas como explantes, para a instalação do experimento com Fe-EDTA, segmentos nodais de aproximadamente 1 cm provenientes de plantas de *A. philoxeroides* pré-estabelecidas em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962).

Efeito do Fe-EDTA

Cinco concentrações (0; 75; 150; 300 e 450 μM) de Fe-EDTA foram adicionadas em meio MS básico sem reguladores de crescimento. O pH do meio foi ajustado para 5,8 e após, acrescentado 7 g L^{-1} de agar. Os frascos contendo meio de cultura foram vedados com papel alumínio e autoclavados por 20 minutos a uma temperatura de 121° C a pressão de 1,05 kg cm^{-2} .

Os explantes foram inoculados nos meios de cultura em câmara de fluxo laminar em condições assépticas. Após, os frascos com os explantes foram colocados em sala de crescimento, onde permaneceram por 35 dias sob fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de 48 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com temperatura de 25 \pm 2°C.

Aos 35 dias de cultivo foram avaliados o número de gemas número e comprimento dos brotos, comprimento das raízes e massa fresca da parte aérea. Também foi feita a quantificação de betacianina na parte aérea das plantas.

O material vegetal foi macerado em 5 ml de água destilada e após, centrifugado a 15790 rpm, a 4°C por 25 minutos. A quantificação foi realizada em espectrofotômetro Ultrospec 2100 Pro da Amersham Biosciences®, de acordo com a metodologia descrita por Cai et al. (1998) com algumas modificações. A concentração de betacianina foi calculada e expressada como amarantina pela seguinte fórmula:

$$\text{Concentração de amarantina} = (A_{536} - A_{650}) \times \text{P.M.} \times V \times \text{FD} \times 100 / \epsilon \times \text{MF}$$

(mg Amarantina /100g de massa fresca)

onde ϵ é o coeficiente de absorção de amarantina ($5,66 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$), A_{536} representa a absorbância a 536 nm para a amarantina e A_{650} absorbância a 650 para clorofila, P.M. é o peso molecular ($726,6 \text{ g mol}^{-1}$), V é o volume de extração (5 ml), FD é o fator de diluição e MF é a massa fresca das amostras. Os resultado foram expressos em mg de amarantina por 100g MF⁻¹.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos (concentrações de Fe-EDTA), cada tratamento contendo cinco repetições, sendo cada uma representada por um frasco contendo cinco explantes. Os resultados foram comparados estatisticamente, submetidos à análise de variância, regressão polinomial e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro, com auxílio do software estatístico Winstat (MACHADO & CONCEIÇÃO, 2002).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Concentrações de Fe-EDTA inferiores a 450 μM adicionadas no meio de cultura não alteraram a taxa de multiplicação dos segmentos nodais de *A. philoxeroides*. Concentrações de ferro, superiores a original no meio MS e inferiores a 450 μM , também não alteraram o número e comprimento dos brotos formados, e a massa fresca da parte aérea das plantas (Tabela 1). No entanto, o comprimento das raízes foi alterado com aumento da concentração de Fe-EDTA, demonstrando um leve incremento no comprimento das raízes nas concentrações de 25 e 75 μM

enquanto a partir da concentração de 150 μM o comprimento radicular foi significativamente reduzido (Tabela 1).

Tabela 1. Respostas morfogênicas de plantas de *Alternanthera philoxeroides* cultivadas em meio MS com diferentes concentrações de Fe-EDTA

| Resposta média | Concentrações de Fe-EDTA (μM) | | | | |
|----------------|--|---------|--------|---------|--------|
| | 0 | 25 | 75 | 150 | 300 |
| NG | 8,1 c | 8,7 abc | 8,3 bc | 9,15 ab | 9,6 a |
| NB | 1,37 a | 1,24 a | 1,19 a | 1,34 a | 1,24 a |
| CB | 6,8 a | 7,2 a | 7,4 a | 4,6 a | 4,8 a |
| CR | 2,8 ab | 3,3 a | 3,1 a | 1,7 b | 1,8 b |
| MFPA | 57 a | 57 a | 45 a | 48 a | 58 a |

*Médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância

** NG número de gemas, NB número de brotos, CB comprimento dos brotos (cm), CR comprimento das raízes (cm), MFPA massa fresca da parte aérea (mg)

A concentração de 450 μM foi tóxica inibindo totalmente o crescimento das plantas. Altas concentrações de Fe-EDTA (150 e 200 μM) em *Citrullus lanatus* também provocaram visíveis alterações nas plantas. Thomas et al. (2000) observaram a ocorrência de um aumento significativo do teor de clorofila a e b, e no número de nós. A taxa de propagação também melhorou muito em relação ao tratamento controle (100 μM de Fe-EDTA), no entanto, concentrações acima de 200 μM provocaram diminuição no crescimento em altura das plantas.

Assim como observado em *Citrullus lanatus*, as plantas de *A. philoxeroides* apresentaram aumento significativo do número de gemas por planta com o aumento das concentrações de Fe-EDTA, obtendo-se a maior média de gemas (9,6) em 300 μM (tabela 1). Concentrações de 75-300 μM de Fe-EDTA causaram um menor crescimento dos brotos de *A. philoxeroides*, no entanto, tais valores não diferiram significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O efeito positivo do ferro no desenvolvimento vegetal também foi demonstrado em outras espécies. Estudando a influência do Fe-EDTA e Fe-EDDHA

no estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Hibiscus rosa-sinensis*, *Rosa hybrida* e cultivares de *Rubus* sp., pesquisadores observaram um aumento significativo no conteúdo de clorofila, na área foliar, no número, crescimento e massa seca dos brotos formados com o aumento da concentração de ambos quelatos de ferro, no entanto, o Fe-EDDHA foi mais eficiente que Fe-EDTA (VAN DER SALM et al., 1994; ZAWADZKA & ORLIKOWSKA, 2006; CHRISTENSEN et al., 2008). Segundo Van der Salm et al. (1994), o Fe-EDDHA é mais foto estável que o Fe-EDTA, desta forma, os íons de Fe tornam-se indisponíveis devido à degradação do EDTA pela luz, podendo ser esta a explicação para os resultados superiores obtidos com Fe-EDDHA.

O efeito do aumento da concentração de Fe-EDTA na produção de betacianina em *A. philoxeroides* está demonstrado na Figura 1. Após 35 dias de cultivo ocorreu um incremento significativo do teor de betacianina, proporcional às concentrações de ferro, onde a produção deste pigmento aumentou mais de 100% na concentração de 300 µM em relação ao controle (Tabela 2).

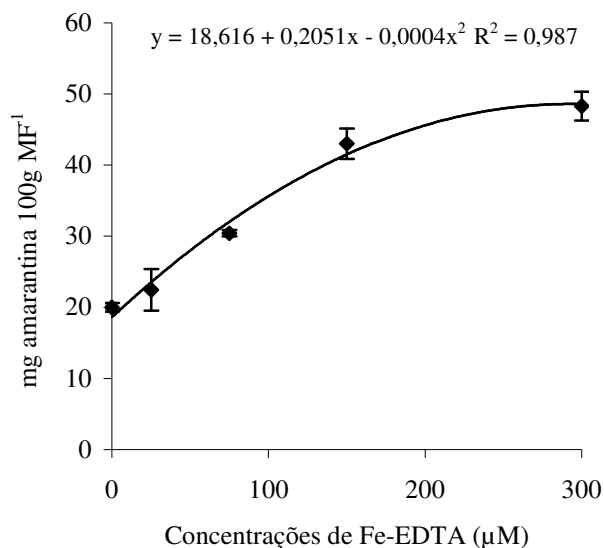


Figura 3. Produção de betacianina em plantas de *Alternanthera philoxeroides* cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de Fe-EDTA
Barras verticais representam o erro padrão da média de cinco repetições

Tabela 2. Efeito do Fe-EDTA no conteúdo de betacianina em *Alternanthera philoxeroides* cultivadas *in vitro*

| Concentração de Fe-EDTA (µM) | Conteúdo de betacianina (mg amaranтина 100 g MF ⁻¹) | Aumento do conteúdo de betacianina em relação ao controle (X controle) |
|------------------------------|---|--|
| 0 | 20,02 c | 1,0 |
| 25 | 22,48 bc | 1,1 |
| 75 | 30,41 b | 1,5 |
| 150 | 43,01 a | 2,15 |
| 300 | 48,30 a | 2,4 |

*Médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Akita et al. (2000), estudando o efeito de Fe-EDTA na produção de betacianina em cultura de células em suspensão de *Beta vulgaris*, observaram que a deficiência de ferro no meio de cultura não alterou o crescimento celular, no entanto, afetou drasticamente a produção de betacianina. O máximo rendimento de betacianina foi obtido em 2 mM de Fe²⁺, concentração 20 vezes maior que a normal no meio MS. Trejo-tapia et al. (2001), estudando a influência de microelementos no crescimento celular e produção de betacianina em beterraba, obtiveram resultados

diferentes. Com o aumento de cinco vezes (500 μM) a concentração original de Fe-EDTA no meio de cultura, tais autores não observaram nenhum efeito no crescimento celular e no teor de betacianina. Por outro lado, Bhuiyan & Adachi (2003) aumentaram 50% o conteúdo de betacianina em cultura de células em suspensão de *Portulaca* sp. Cv. 'Jewel' com 100 μM de Fe-EDTA. Os mesmos autores já haviam observado respostas positivas no aumento de betacianina em meio semi-sólido para calos suplementado com Fe-EDTA.

O ferro atua como constituinte de proteínas e ativador enzimático (PRADO, 2008). A enzima tirosinase, pertencente a um grupo de proteínas cúpricas, está especificamente envolvida na biossíntese de betalaínas (STEINER et al., 1999) e sua ativação ocorre pelo íon Fe^{2+} (YAMAMOTO et al., 2001). Desta forma, o aumento da produção de betacianina e o adequado desenvolvimento das plantas obtida neste trabalho, pode ser justificada pelo efeito positivo exercido pelo ferro.

CONCLUSÃO

Nas condições que foi desenvolvido este trabalho conclui-se que a elicitação com Fe-EDTA promove efeitos benéficos no crescimento das plantas de *A. philoxeroides* e maior produção de betacianina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKITA, T.; HINA, Y.; NISHI, T. Production of betacyanins by a cell suspension culture of table beet (*Beta vulgaris* L.). **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 64, n. 9, p. 1807-1812, 2000.

AZEREDO, H. M. C. betalains: properties, sources, applications, and stability – a review. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 44, p. 2365-2376, 2009.

BHUIYAN, N. H.; ADACHI, T. Stimulation of betacyanin synthesis through exogenous methyl jasmonate and other elicitors in suspension-cultured cells of *Portulaca*. **Journal Plant Physiology**, v. 160, p. 1117-1124, 2003.

BOURGAUD, F. et al. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, v. 161, p. 839-851, 2001.

CAI Y. Z.; SUN, M. CORKE, H. Characterization and application of betalain pigments from plants of the Amaranthaceae. **Trends in food science & technology**, v. 16, p. 370-376, 2005.

CAI, Y. et al. Characterization and quantification of betacyanin pigments from diverse *Amaranthus* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 6, p. 2063-2070, 1998.

CHRISTENSEN, B., et al. In vitro culture of *Hibiscus rosa-sinensis* L.: Influence of iron, calcium and BAP on establishment and multiplication. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 93, p. 151-161, 2008.

FANG, J. B. et al. Antitumor constituents from *Alternanthera philoxeroides*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 9, n. 6, p. 511-515, 2007.

FANG, J. B. et al. Cytotoxic triterpene saponins from *Alternanthera philoxeroides*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 11, n. 3, p. 261-266, 2009.

JIANG W.; LUO, X.; KUANG, S. Effects of *Alternanthera philoxeroides* Griseb against dengue virus *in vitro*. **Journal of First Military Medical University**, v. 25, n. 4, p. 454-456, 2005.

KIM, T. H. et al. Characteristics of aroma-active compounds in the pectin-elicited suspension culture of *Zanthoxylum piperitum* (prickly ash). **Biotechnology Letters**, v. 24, n. 7, p. 551-556, 2002.

KUMAR, S., et al. In vitro propagation of *Plunchea lanceolata*, a medicina plant, and effect of heavy metals and different aminopurines on quercetin content. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 40, p. 171-176, 2004.

LIU, Y. et al. Separation and anti-hantaan virus activity of extracts from *Alternanthera philoxeroides* *in vitro* and *in vivo*. **Wuhan University Journal of Natural Sciences**, v. 12, n. 6, p. 1143-1147, 2007.

MACHADO, A.; CONCEIÇÃO, A. R. Programa estatístico WinStat Sistema de Análise Estatístico para Windows. Versão 2.0. Pelotas: UFPel, 2002.

MURASHIGE, T. ; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-97, 1962.

NARULA, A.; KUMAR, S.; SRIVASTAVA, P. S. Abiotic metal stress enhances diosgenin yield in *Dioscorea bulbifera* L. cultures. **Plant Cell Rep**, v. 24, p. 250-254, 2005.

PRADO, R. de M. **Nutrição de plantas**, Ed. UNESP, São Paulo, 407 p., 2008.

RATTANATHONGKOM, A. et al. Evaluation of chikusetsusaponin IVa isolated from *Alternanthera philoxeroides* for its potency against viral replication. **Planta Medica**, v. 75, n. 8, p. 829-835, 2009.

RATTANATHONGKOM, A. et al. Inhibitory effect on nitric oxide production of RAW 264.7 macrophage cell of an active compound from *Alternanthera philoxeroides*. **Khon Kaen University Reserch Journal**, v. 9, n. 3, p. 9-16, 2009.

SI-MAN, Z., et al. Inhibitor against the human immunodeficiency virus in aqueous extracts of *Alternanthera philoxeroides*. **Chinese Medicinal Journal**, v. 101, p. 816-866, 1988.

SILVA, N. C. B., et al. Developmental effects of additional ultraviolet a radiation growth regulators and tyrosine in *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze cultured *in vitro*. **Brazilian Archives of Biology and Technology: An International Journal**, v. 48, n. 5, p. 779-786, 2005.

STEINER, U. et al. Tyrosinase involved in betalain biosynthesis of higher plants. **Planta**, v. 208, p. 114-124, 1999.

STRACK, D.; VOGT, T.; SCHLIEMANN, W. Recent advances in betalain research. **Phytochemistry**, v. 62, p. 247-269, 2003.

THOMAS, P.; MYTHILI, J. B.; SHIVASHANKARA, K. S. Effects of photo-oxidative loss of FeNa₂EDTA and of higher iron supply on chlorophyll content, growth and propagation rate in triploid watermelon cultures. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 36, p. 537-542, 2000.

TREJO-TAPIA, G., et al. Influence of cobalt and other microelements on the production of betalains and the growth of suspension cultures of *Beta vulgaris*, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 67, p.19-23, 2001.

VAN DER SALM, T. P. M., et al., Importance of the iron chelate formula for micropropagation of *Rosa hybrida* L. 'Moneyway'. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 37, p. 73-77, 1994.

VENDRUSCULO, G. S.; MENTZ L. A. Levantamento etnobotânico das plantas utilizadas como medicinais por moradores do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia, Série Botânica**, v. 61, n.1-2, p. 83-103, 2006.

VERPOORTE, R. A.; VAN DER HEIJDEN, R.; MEMELLINK, J. Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. **Transgenic Research**, v. 9, p. 323-343, 2000.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; STRINGUETA, P. C. Pigmentos naturais bioativos. **Alimentos e nutrição**, v. 20, p. 157-166, 2009.

WANG, J. W.; ZHANG, Z.; TAN, R. X. Stimulation of artemisin production in *Artemisia annua* hairy roots by the elicitor from the endophytic *Colletotrichum* sp. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 857-860, 2001.

YAMAMOTO K. et al. Isolation and purification of tyrosine hydroxylase from callus cultures of *Portulaca grandiflora*. **Plant Cell Physiology**, v. 42, p. 969-975, 2001.

ZAWADZKA, M.; ORLIKOWSKA, T. The influence of FeEDDHA in red raspberry cultures during shoot multiplication and adventitious regeneration from leaf explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 85, p. 145-149, 2006.

ARTIGO 3 – CIÊNCIA RURAL

Ação do metil jasmonato na multiplicação *in vitro* e no aumento da produção de betacianina em *Alternanthera philoxeroides*

Action of methyl jasmonate on multiplication *in vitro* and on the increasing of betacyanin production in *Alternanthera philoxeroides*

**Janieli Cristina Perotti ¹, José Antonio Peters ¹, Marcos Antonio Bacarin ¹,
Eugenia Jacira Bolacel Braga ¹**

RESUMO

Aplicações exógenas de metil jasmonato (MeJA) induzem o aumento transiente dos níveis endógenos de jasmonato e ocasionam a ativação transcricional de genes envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários, além de influenciarem nas características fisiológicas e morfológicas das plantas. Com o objetivo de verificar a influência do MeJA na produção de betacianina e na multiplicação *in vitro* de *Alternanthera philoxeroides*, concentrações crescentes de MeJA (0; 0,01; 0,1; 1; 10; 100 µM) foram adicionadas ao meio básico MS. Após 35 dias de cultivo, foi avaliado o número de brotos e gemas, altura, comprimento radicular e teor de betacianina. A concentração de 10 µM diminuiu significativamente o número de brotos, o comprimento das raízes, a altura e a massa fresca da parte aérea das plantas em relação ao controle e a concentração de 100 µM foi

¹ Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Departamento de Botânica - Pelotas, RS – CEP 354-960010-900, Brasil – janieliperotti@yahoo.com.br

totalmente tóxica para o crescimento das plantas. Por outro lado, a maior produção de betacianina ocorreu na concentração de 100 μM , concentrações inferiores a esta não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle. Os resultados deste estudo demonstram que o metil jasmonato aumenta a biossíntese de betacianina em *Alternanthera philoxeroides*, porém concentrações acima de 10 μM apresentam efeito tóxico para o crescimento das plantas.

Palavras-chave: Elicitor, cultivo *in vitro*, betalainas, erva-de-jacaré plantas medicinais.

ABSTRACT

Exogenously methyl jasmonate (MeJA) has induced a transient increase of endogenous jasmonate levels and induced the transcriptional activation of genes involved in the biosynthesis of secondary metabolites, and influence on morphological and physiological characteristics of plants. Aiming to determine the effect of MeJA for the enhancement of betacyanin accumulation and *in vitro* multiplication of *Alternanthera philoxeroides*, different concentrations of MeJA (0, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 μM) were added to the standard MS medium. After 35 days of culture, we evaluated the number of shoots and buds, height, root length and content betacyanin. The concentration of 10 μM compared to control significantly decreases the number of shoots, root length, height and fresh weight of the shoots and the concentration of 100 μM was completely toxic to plant growth. Moreover, the enhancement of betacyanin accumulation occurred at a concentration of 100 μM , concentrations below this do not show any significant differences compared to control. The results of this study demonstrate that methyl jasmonate increases the

biosynthesis of betacyanin in *A. philoxeroides*, but concentrations above 10 μ M have a toxic effect on the growth of the plant.

Keywords: Elicitor, in vitro culture, betalains, alligator weed, medicinal plants

INTRODUÇÃO

Alternanthera philoxeroides (Mart.) Griseb., conhecida popularmente como erva-de-jacaré, pertencente a família Amaranthaceae, é uma planta nativa da América do Sul, perene, anfíbia, pois cresce abundantemente em diferentes ecossistemas, tanto aquáticos, semi-aquáticos, terrestres e até mesmo extremamente secos, como dunas (GAO et al., 2007). Estudos fitoquímicos desta espécie demonstraram a presença de flavonóides glicosilados, saponinas e betalaínas, conferindo-lhe ação antiviral, antitumoral, diurética, antipirética, no tratamento de feridas e úlceras (JIANG et al., 2005; VENDRUSCOLO & MENSTZ, 2006; LIU et al., 2007; FANG et al., 2007; FANG et al., 2009; RATTANATHONGKOM et al., 2009a; RATTANATHONGKOM et al., 2009b).

As plantas produzem uma ampla variedade de metabólitos secundários em resposta a estresses bióticos e abióticos, e o ácido jasmônico e metil jasmonato (MeJA) são moléculas sinalizadoras que regulam a expressão de genes de defesa em resposta a estes estresses (KIM et al., 2006).

O MeJA exerce diferentes efeitos fisiológicos e bioquímicos nas plantas, incluindo a inibição da germinação de sementes, do crescimento das raízes e de calos, promove a senescência de frutas e folhas, a degradação da clorofila, inibição da fotossíntese e o aumento da atividade respiratória (PÉREZ et al., 1997; ROSSATO et al., 2002; ANANIEVA et al., 2004; NORASTEHNIA et al., 2007).

O crescimento radicular de *Allium cepa* e a germinação de *Zea mays* foram nitidamente diminuídos após adição de MeJA (MAKSYMIEC & KRUPA, 2007; NORASTEHNIA et al., 2007). Em *Onosma paniculatum* foi observado crescimento das células e aumento da produção de chiconina, em *Nicotiana tabacum* ocorreu aumento da atividade mitótica, porém, a formação de brotos diminuiu significativamente (DING et al., 2004; CAPITANI et al., 2005). Em *Eluetherococcus senticosus* ocorreu diminuição da biomassa, porém o MeJA estimulou a biossíntese de eleuteroside e ácido clorogênico (SHOHAEL et al., 2007). A produção de ácido rosmárico, ácido cafeico, eugenol e linalol, assim como a atividade antioxidante também aumentaram com a adição de MeJA em *Ocimum basilicum*, antocianina em *Crassula multicava* e cafeoilputrescina em *Lycopersicum esculentum* (SANIEWSKI et al., 2004; KIM et al., 2006; CHEN et al., 2006).

O aumento da síntese de betacianina, que é um pigmento nitrogenado de grande importância medicinal, foi estimulado pela aplicação de MeJA em *Beta vulgaris* e *Portulaca* sp. (BHUIYAN & ADACHI, 2003; STRACK et al., 2003; SURESH et al., 2004; CAI et al., 2005; AZEREDO, 2009; VOLPE et al., 2009).

Com o intuito de aumentar a produção de betacianina em plantas de *A. philoxeroides*, este trabalho teve o objetivo de demonstrar a influência do MeJA na produção de betacianina e na multiplicação *in vitro* desta espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Plantas de *Alternanthera philoxeroides*, estabelecidas *in vitro* em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), foram utilizadas como doadoras de explantes, sendo cada explante um segmento nodal de aproximadamente 1 cm de comprimento, com duas gemas.

Seis concentrações de metil jasmonato (0; 0,01; 0,1; 1; 10; 100 μM) filtrado foram adicionadas ao meio MS básico após autoclavagem por 20 minutos a uma temperatura de 121° C a pressão de 1,05 kg cm^{-2} .

Os explantes foram inoculados em condições assépticas nos meios de cultura em câmara de fluxo laminar. Após, os frascos com os explantes foram colocados em sala de crescimento, sob fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de 48 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com temperatura de 25+2°C.

Aos 35 dias de cultivo foram avaliados número de gemas e brotos por planta, altura, comprimento médio das raízes, massa fresca e teor de betacianina da parte aérea.

Para a realização da análise das betacianinas a parte aérea das plantas de *A. philoxeroides* foi separada do sistema radicular. O material vegetal foi macerado em 5 ml de água destilada e após, centrifugado a 15790 rpm, a 4°C por 25 minutos. A quantificação de betacianinas foi realizada em espectrofotômetro Ultrospec 2100 Pro da Amersham Biosciences®.

A concentração de betacianina foi calculada e expressada como amarantina, de acordo com a metodologia descrita por Cai et al. (1998) com algumas modificações pela seguinte fórmula:

$$\text{Concentração de amarantina} = (A_{536} - A_{650}) \times \text{P.M.} \times V \times \text{FD} \times 100 / \epsilon \times \text{MF}$$

(mg Amarantina /100g de massa fresca)

onde ϵ é o coeficiente de absorção de amarantina ($5,66 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$), A_{536} representa a absorbância a 536 nm para a amarantina e A_{650} absorbância a 650 para clorofila, P.M. é o peso molecular ($726,6 \text{ g mol}^{-1}$), V é o volume de extração (5 ml), FD é o fator de diluição e MF é a massa fresca das amostras. Os resultado foram expressos em mg de amarantina por 100 g MF⁻¹.

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, com seis tratamentos (concentrações de metil jasmonato), cada tratamento contendo cinco repetições, sendo cada uma representada por um frasco contendo cinco explantes. Os resultados dos tratamentos foram comparados estatisticamente, submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro, com auxílio do software estatístico Winstat (Machado; Conceição, 2002). Também foram realizadas análises de correlação entre as variáveis morfológicas e a produção de betacianina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As concentrações de metil jasmonato (MeJA) testadas afetaram as características morfológicas avaliadas nas plantas de *A. philoxeroides*. Foi observado um efeito negativo das altas concentrações de MeJA no crescimento das plantas, sendo a concentração de 100 μM totalmente tóxica. As maiores médias de número de brotos (1,5), comprimento das raízes (4,6 cm) e altura das plantas (8,3cm) foram obtidas no tratamento controle, com ausência de MeJA (Figura 4A – D).

Em *Nicotiana tabacum*, o MeJA induziu a redução da organogênese, segundo CAPITANI et al. (2005), concentrações de 1 e 10 μM causaram a diminuição no número de brotos por explante em comparação ao controle, no entanto, estimulou a atividade mitótica e a expansão celular.

No presente trabalho a concentração de 10 μM diminuiu significativamente o número de brotos (Figura 4A), o comprimento das raízes (Figura 4B), a altura (Figura 4 C) e a massa fresca da parte aérea (Figura 1 D) das plantas em relação ao controle.

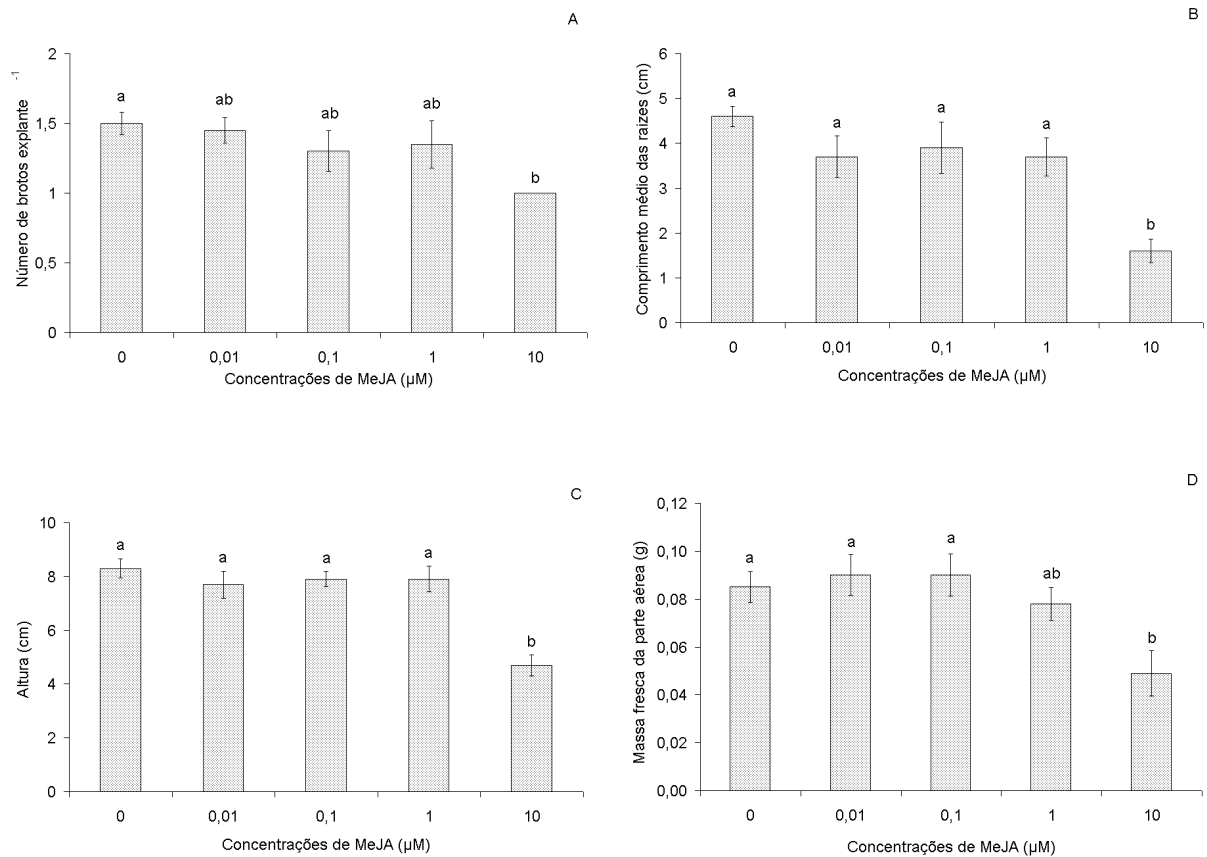


Figura 4. Número de brotos (A), comprimento médio das raízes (B), altura (C) e massa fresca da parte aérea (D) das plantas de *Alternanthera philoxeroides* cultivadas *in vitro* por 35 dias na presença de diferentes concentrações de MeJA

Barras verticais representam o erro padrão da média de cinco repetições, médias acompanhadas de diferentes letras são significativamente diferentes pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro

MAKSYMIEC & KRUPA (2007) também observaram a ação negativa do MeJA para o crescimento radicular, raízes de *Allium cepa* diminuíram nitidamente (78%) após a exposição de 50 µM deste regulador de crescimento.

Tratamento com 50 µM de MeJA não tiveram efeito significativo no crescimento radicular de *Zea mays*, porém em maiores concentrações, o comprimento das raízes foi significativamente reduzido (NORASTEHNIA et al., 2007).

Aplicações de MeJA afetaram a biomassa de embriões de *Eleutherococcus senticosus* mantidos em suspensão por seis semanas em biorreator. A massa

fresca, massa seca e a taxa de crescimento apresentaram uma diminuição inversamente proporcional a concentração de MeJA, sendo observado respectivamente em 400 μM uma diminuição de 5,6, 3,8 e 4,5 vezes menos que o controle (SHOHAEL et al., 2007). Células em suspensão de *Portulaca* sp. cv. 'Jewel', também tiveram uma diminuição na taxa de crescimento a partir de 1 μM de MeJA (BHUIYAN & ADACHI, 2003).

Aplicações exógenas de jasmonato estimulam a biossíntese de vários metabólitos secundários em suspensão celular e plantas intactas. Tal situação pode ser observada neste trabalho, onde a produção de betacianina foi estimulada pela adição de MeJA na concentração de 100 μM (Figura 5). Concentrações menores (0,01 – 10 μM) não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle (Tabela 1).

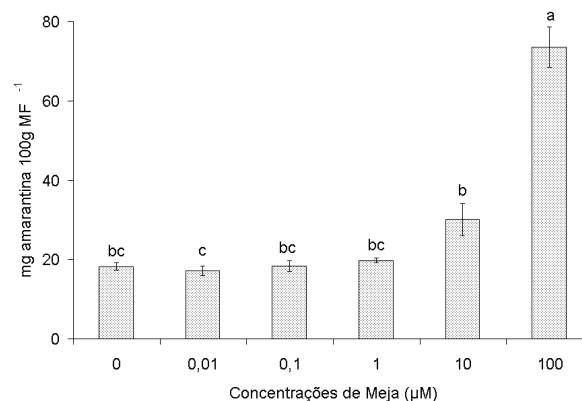


Figura 5. Concentração de betacianina em plantas de *Alternanthera philoxeroides* cultivadas *in vitro* por 35 dias sob diferentes concentrações de MeJA. Barras verticais representam o erro padrão da média de cinco repetições, médias acompanhadas de diferentes letras são significativamente diferentes pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 1. Produção de betacianina em plantas de *Alternanthera philoxeroides* cultivadas *in vitro* por 35 dias sob diferentes concentrações de MeJA em relação ao controle (X controle)

| Concentração de MeJA (μM) | Teor de betacianina (mg amarantina 100g MF ⁻¹) | Produção de betacianina em relação ao controle (x controle) |
|--|--|---|
| 0 | 18,26 | 1,0 |
| 0,01 | 17,14 | 0,9 |
| 0,1 | 18,30 | 1,0 |
| 1 | 19,75 | 1,0 |
| 10 | 30,07 | 1,6 |
| 100 | 73,56 | 4,0 |

No entanto, é importante salientar que a concentração de 100 μM de MeJA foi totalmente tóxica para o crescimento das plantas, portanto, a quantificação de betacianina neste tratamento foi feita apenas com os explantes iniciais, mantidos por 35 dias nesta concentração.

A análise de correlação também demonstrou que a maior produção de betacianina ocorreu quando o crescimento das plantas foi reduzido, o que pode ser visto pela associação linear negativa entre a produção de betacianina e as variáveis morfológicas analisadas (

Tabela 2).

Tabela 2. Correlação entre a produção de betacianina e as variáveis morfológicas analisadas em *Alternanthera philoxeroides* após 35 dias de cultivo em diferentes concentrações de MeJA

| | NB | CB | MFPA | CR | PB |
|------|--------|--------|--------|--------|---------|
| NG | 0,8079 | 0,3297 | 0,5328 | 0,4104 | -0,4421 |
| NB | - | 0,4410 | 0,5925 | 0,4527 | -0,4785 |
| CB | - | - | 0,6380 | 0,5072 | -0,7002 |
| MFPA | - | - | - | 0,7596 | -0,8302 |
| CR | - | - | - | - | -0,6985 |

NG = número de gemas, NB = número de brotos, CB comprimento dos brotos, MFPA = massa fresca da parte aérea, CR = comprimento radicular, PB = produção de betacianina.

BHUIYAN & ADACHI (2003) obtiveram aumento na produção de betacianina em *Portulaca* sp. com a adição de MeJA na concentração de 0,1 μM ; 100 μM de MeJA prejudicou a biossíntese de betacianina, tendo resultados inferiores ao tratamento controle.

Altos níveis de MeJA (70-100 μM) resultaram no maior conteúdo de betacianina produzido nas raízes de *Beta vulgaris* após 15 dias de cultivo; aos 20

dias de cultivo a maior produção do pigmento foi obtida na concentração de 40 μM com biossíntese de 1,35 maior que o controle (SURESH et al., 2004).

O MeJA também apresentou resultados satisfatórios na produção de outros metabólitos secundários. A concentração de 0,5 μM de MeJA aumentou em três vezes o acúmulo de antocianina em relação ao controle em células de *Vaccinium pahalae* cultivados em suspensão (FANG et al., 1999). SANIEWISKI et al. (2004) também aumentaram a síntese de antocianina em caules de *Crassula multicava* com a adição de MeJA.

Embriões somáticos de *Eleutherococcus senticosus* cultivados em biorreator com 200 μM de MeJA apresentaram um aumento de sete vezes a produção de euterosídes totais e quatro vezes de ácido clorogênico em relação ao controle (SHOHAEL et al., 2007).

A biossíntese do ácido rosmárico também foi estimulada por MeJA em raízes de *Coleus blumei* (BAUER et al., 2009) e plantas de *Ocimum basilicum* aumentaram a atividade antioxidante de 2-3 vezes após o aumento da concentração de ácido rosmário, ácido cafeico, eugenol e linolol estimulados pelo MeJA (KIM et al., 2006).

A partir dos dados apresentados neste trabalho pode-se perceber visivelmente o efeito de aplicações exógenas de MeJA nas características morfológicas e na produção de betacianina em plantas de *A. philoxeroides*.

CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo demonstram que o metil jasmonato aumenta a biossíntese de betacianina em *Alternanthera philoxeroides*, mas apresenta efeito tóxico para o crescimento das plantas. Desta forma, novos experimentos devem ser

conduzidos visando otimizar a taxa de multiplicação e crescimento das plantas com a maximização da produção de betacianina.

REFERÊNCIAS

ANANIEVA, K. I., et al. Methyl jasmonate down-regulates endogenous cytokinin levels in cotyledons of *Cucurbita pepo* (zucchini) seedlings. **Physiologia Plantarum**, v. 122, p. 496-503, 2004.

BAUER, N.; KISELJAK, D.; JELASKA, S. The effect of yeast extract and methyl jasmonate on rosmarinic acid accumulation in *Coleus blumei* hairy roots. **Biologia Plantarum**, v. 53, p. 650-656, 2009.

BHUIYAN, N. H.; ADACHI, T. Stimulation of betacyanin synthesis through exogenous methyl jasmonate and other elicitors in suspension-cultured cells of *Portulaca*. **Journal Plant Physiology**, v. 160, p. 1117-1124, 2003.

CAI, Y. Z.; SUN, M. CORKE, H. Characterization and application of betalain pigments from plants of the Amaranthaceae. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, p. 370-376, 2005.

CAI, Y. et al. Characterization and quantification of betacyanin pigments from diverse *Amaranthus* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 6, p. 2063-2070, 1998.

CAPITANI, F. et al. Methyl jasmonate disrupts shoot formation in tobacco thin cell layers by over-inducing mitotic activity and cell expansion. **Planta**, v. 220, p. 507-519, 2005.

CHEN, H.; JONES, A. D.; HOWE, G. A. Constitutive action of the jasmonate signaling pathway enhances the production of secondary metabolites in tomato. **FEBS letters**, v. 580, p. 2540-2546, 2006.

DING, J. et al. Effects of methyl jasmonate with indole-3-acetic acid and 6-benzylaminopurine on the secondary metabolism of cultured *Onosma paniculatum* cells. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 40, p. 581-585, 2004.

FANG, J. B. et al. Antitumor constituents from *Alternanthera philoxeroides*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 9, n. 6, p. 511-515, 2007.

FANG, J. B. et al. Cytotoxic triterpene saponins from *Alternanthera philoxeroides*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 11, n. 3, p. 261-266, 2009.

FANG, Y.; SMITH, M. A. I.; PEPIN, M. F. Effects of exogenous methyl jasmonate in elicited anthocyanin-producing cell cultures of ohelo (*Vaccinium phalae*). **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 35, p. 106-113, 1999.

GAO, J.; QUANG, X.; YIN, L.; HE, G. Isolation of cDNA clones for genes up-regulated in drought-treated *Alternanthera philoxeroides* root. **Journal Molecular Biology Reports**, v. 35, n. 3, p. 485-488, 2007.

JIANG, W.; LUO, X.; KUANG, S. Effects of *Alternanthera philoxeroides* Griseb against dengue virus *in vitro*. **Journal of First Military Medical University**, v. 25, n. 4, p. 454-456, 2005.

KIM, H. J. et al. Effect of methyl jasmonate on secondary metabolites of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 2327-2332, 2006.

LIU, Y. et al. Separation and anti-hantaan virus activity of extracts from *Alternanthera philoxeroides* *in vitro* and *in vivo*. **Wuhan University Journal of Natural Sciences**, v. 12, n. 6, p. 1143-1147, 2007.

MAKSYMIEC, W.; KRUPA, Z. Effects of methyl jasmonate and excess copper on root and leaf growth. **Biologia Plantarum**, v. 51, n. 2, p. 322-326, 2007.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-97, 1962.

NORASTEHNIA, A.; SAJEDI, R. H.; NOJAVAN-ASGHRI, M. Inhibitory effects of methyl jasmonate on seed germination in maize (*Zea mays*): effect on α – amylase activity and ethylene production. **General and Applied Plant Physiology**, v. 33, p. 13-23, 2007.

PÉREZ, A. G., et al. Effect of methyl jasmonate on *in vitro* strawberry ripening. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 3733-3737, 1997.

RATTANATHONGKOM, A. et al. Evaluation of chikusetsusaponin IVa isolated from *Alternanthera philoxeroides* for its potency against viral replication. **Planta medica**, v. 75, n. 8, p. 829-835, 2009.

RATTANATHONGKOM, A. et al. Inhibitory effect on nitric oxide production of RAW 264.7 macrophage cell of na active compound from *Alternanthera philoxeroides*. **Khon Kaen University Reserch Journal**, v. 9, n. 3, p. 9-16, 2009.

ROSSATO, L. et al. Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle: effects of methyl jasmonate on nitrate uptake, senescence, growth and VSP accumulation. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1131-1141, 2002.

SANIEWSKI, M.; HORBOWIEZ, M.; PUCHALSKI, J. Induction of anthocyanins accumulation by methyl jasmonate in shoot of *Crassula multicaeva*. **Second European Allelopathy Symposium: “Allelopathy – from understanding to application”**, Pulawy, Polonia, p. 10, 2004.

SHOHAEL, A. M. Methyl jasmonate induced overproduction of eleutheresides in somatic embryos of *Eleutherococcus senticosus* cultured in bioreactors. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 633-637, 2007.

SI-MAN, Z., et al. Inhibitor against the human immunodeficiency virus in aqueous extracts of *Alternanthera philoxeroides*. **Chinese Medicinal Journal**, v. 101, p. 816-866, 1988.

STRACK, D.; VOGT, T.; SCHLIEMANN, W. Recent advances in betalain research.

Phytochemistry, v. 62, p. 247-269, 2003.

SURESH, B. et al. Polyamine and methyl jasmonate-influenced enhancement of betalaine production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* grown in bubble column reactor and studies on efflux of pigments. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 2091-2096, 2004.

VENDRUSCULO, G. S.; MENTZ L. A. Levantamento etnobotânico das plantas utilizadas como medicinais por moradores do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia, Série Botânica**, v. 61, n.1-2, p. 83-103, 2006.

VOLP, A.C.P.; RENHE, I.R.T.; STRINGUETA, P.C. Pigmentos naturais bioativos.

Alimentos e Nutrição, v. 20, p. 157-166, 2009.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)