ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO DE CALOGÊNESE IN VITRO EM *IRESINE HERBSTII*

LUCIANA MARIN FONSECA[1]; LILIANE SILVEIRA VARNES[2]; LAURA LUZ NUNES[3], CHRISLAINE YONARA SCHOENHALS RITTER[4]; MARCELO NOGUEIRA DO AMARAL[5] EUGENIA JACIRA BOLACEL BRAGA[6]

1Universidade Federal de Pelotas – flucianamarin@gmail.com
2Universidade Federal de Pelotas – liliane.varnes@outlook.com
3Universidade Federal de Pelotas – lauraluznunes22@gmail.com
4Universidade Federal de Pelotas- chrislaineritter@hotmail.com
5Universidade Federal de Pelotas- theoamaral@hotmail.com
6Universidade Federal de Pelotas- jacirabraga@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Iresine herbstii* é pertencente à família Amaranthaceae e à ordem Caryophyllales (DIPANKAR et al., 2011; AL-FARTOSY et al., 2015), conhecida popularmente como Coração magoado ou simplesmente Iresine (ARAGÃO,2017). É uma herbácea perene, podendo medir até 1,5 m, muito utilizada como ornamental devido ao seu formato que lembra um “coração”. A espécie *I. herbstii* é utilizada como um aditivo da Ayahuasca, como ingrediente da decocção de São Pedro, devido a propriedades alucinógenas (DE FEO, 2003; AL-FARTOSY et al., 2015; IJIOMA et al., 2017). Essas propriedades permitem a interação com o sistema nervoso central, podendo ser de grande interesse para o desenvolvimento de medicamentos para o tratamento de doenças neurológicas como o mal de Parkinson e a esquizofrenia (NENCINE et al., 2006).

Outros usos medicinais da Iresine são para o tratamento de eczemas, feridas, espinhas, e outras infecções de pele, também como agente anticancerígeno, agente antimicrobiano, anti-inflamatório e relaxante (CAI et al., 2003; DE FEO, 2003; SCHMIDT et al., 2009; CHAUDURY; SEVENAN, 2012; IJIOMA et al., 2017; NEAMSUVAN; RUANGRIT, 2017;). Essas propriedades só são possíveis devido a existência de fitoquímicos, que pertencem a diferentes classes de moléculas. Um dos mais importantes compostos são as betalaínas, pigmentos com alta atividade antioxidante, sendo importante para a indústria farmacêutica e alimentícia.

A cultura de tecidos de plantas é um conjunto de técnicas que permite o cultivo de plantas ou parte delas in vitro, em um ambiente estéril e totalmente controlado (CARVALHO et al., 2006; RIBEIRO; BASTOS, 2008). Neste ambiente, o meio de cultivo deve fornecer nutrientes para o desenvolvimento da planta e resposta in vitro desejada. A esse meio de cultivo podem ser adicionados reguladores de crescimento, que podem promover diferentes respostas morfogênicas, como a desdiferenciação de tecidos vegetais, promovendo a formação de uma massa de células indiferenciada – o calo (CARVALHO et al., 2006; SIDHU, 2011).

Diante disso o presente trabalho teve como objetivo obter um protocolo de calogênese para *I. herbstii* a partir de diferentes meios de cultivo de calos (MIC) e fontes de explantes, podendo servir como ponto de partida para a determinação de condições necessárias para a obtenção de calos e posteriormente de pigmentos betalâmicos, visto que não há qualquer protocolo para calogênese na espécie.

2. METODOLOGIA

Para a indução de calos, serviram como explantes entrenós e folhas de *I. herbstii* já previamente estabelecidas in vitro. Esses explantes foram cortados em segmentos de aproximadamente 1 cm, para serem inoculados nas placas contendo os diferentes meios de cultivo. Foram testados treze meios de indução de calos (MIC) com uma auxina sintética, o 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético), nas concentrações de 0; 1,0; 1,5 e 2,0 µM, junto de uma citocinina sintética, o BAP (6-benzilaminopurina), nas concentrações de 0; 1,0; 1,5 e 2,0 µM, como mostra a Tabela 1, combinados com as fontes de explante.

Tabela 1. Concentrações de 2,4-D e BAP que constituem cada tratamento utilizado para o meio de indução de calos (MIC).

Tratamento	[2,4-D mg L^{-1}]	[BAP mg L^{-1}]
1	0,0	0,0
2	1,0	0,0
3	1,0	1,0
4	1,0	1,5
5	1,0	2,0
6	1,5	0,0
7	1,5	1,0
8	1,5	1,5
9	1,5	2,0
10	2,0	0,0
11	2,0	1,0
12	2,0	1,5
13	2,0	2,0

Os MIC foram preparados em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), contendo as respectivas concentrações dos reguladores de crescimento. Em seguida, seguiram para autoclavagem por 20 minutos e após a esterilização, levados ao fluxo laminar, onde eram vertidos em placas de Petry. Estas foram divididas em duas porções, onde os explantes eram inoculados, com cinco unidades de cada tipo de explante, totalizando dez explantes por placa.

Posteriormente, as placas foram levadas para a sala de crescimento, onde permaneceram no escuro por cerca de 30 dias, na temperatura de 25±2 ºC. Ao final desse período, foi avaliado o percentual de indução de calos de cada tratamento e em cada tipo de explante. O delineamento do experimento foi inteiramente casualizado, com esquema fatorial duplo (13 MICs x 2 fontes de explante).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da análise estatística, foi posssível observar que os dois fatores analisados interagem entre si, sendo assim, para cada fonte de explante, um determinado MIC se mostra mais eficiente para a indução de calos.

Os melhores meios para indução de calos nos entrenós, como é possível ver foram: Tratamento 8 (meio MS acrescido de 1,5 mg L^{-1} de 2,4-D e 1,5 mg L^{-1} de BAP), que induziu 80% de calos nos entrenós; tratamento 7 (1,5 mg L^{-1} de 2,4-D + 1,0 mg L^{-1} de BAP) que induziu calos em 75% dos explantes e tratamento 2 (1,0 mg L^{-1} de 2,4-D + 0,0 mg L^{-1} de BAP), que formou calos em 75% dos entrenós.

Para as folhas, os melhores meios de indução de calos foram o tratamento 2 (1,5 mg L^{-1} de 2,4-D e 0,0 mg L^{-1} de BAP) que induziu calos em 65% dos explantes e o tratamento 6 (1,0 mg L^{-1} de 2,4-D e 0,0 mg L^{-1} de BAP), onde ocorreu calogênese em 46% dos explantes. É possível observar o percentual de calos induzidos por cada MIC em cada fonte de explante na Figura 1. Dentre as duas fontes de explantes utilizadas, a maior taxa de calogênese foi obtida pelos entrenós.

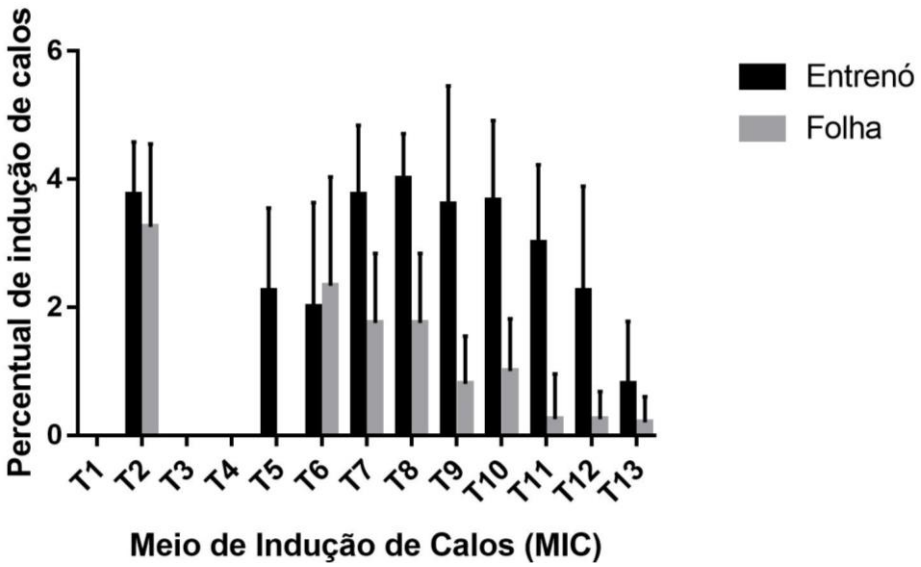

Figura 1. Percentagem de indução de calos de diferentes meios de indução de calos (MIC) quando entrenós e folhas de *Iresine herbstii* são utilizadas como fonte de explante.

No estudo conduzido por Reis et al. (2017) um resultado similar ao resultado obtido no presente estudo foi alcançado, utilizando a concentração de 1,0 mg L^{-1} de

BAP e 1,0 mg L^{-1} de 2,4-D em *Alternanthera brasiliana*, onde foram induzidos calos em 100% dos entrenós ao fim de 30 dias.

Já no estudo de Milech et al. (2017) foram utilizadas altas concentrações de 2,4-D e BAP para indução de calos em *Alternanthera sessilis* e a combinação desses dois fitohormônios foi eficaz para para calogênese tanto quando utilizado entrenós, ou quando folhas eram utilizadas como fontes de explantes. Isso consolida o presente estudo, onde apesar de serem diferentes os MICs para indução de calos em folhas e em entrenós, foi possível obter calos nas duas fontes de explantes de *I. herbstii.*

4. CONCLUSÕES

A partir desse trabalho, foi possível obter um protocolo de calogênese in vitro para *Iresine herbstii,* sendo um trabalho inédito com a presente espécie em estudo in vitro.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAGÃO, SCV. **Triagem fitoquímica e avaliação da toxicidade do extrato bruto das folhas de *Iresine herbstii***. 2017.

CAI, Y; SUN, M; CORKE, H. Identification and distribution of simple and acylated betacyanins in the Amaranthaceae. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 4, p. 1971-1978, 2001.

CARVALHO, JMFC. et al. Considerações gerais sobre organogênese**. Embrapa Algodão-Documentos (INFOTECA-E),** 2006.

DE FEO, V. Ethnomedical field study in northern Peruvian Andes with particular reference to divination practices. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 85, n. 2-3, p. 243-256, 2003.

DIPANKAR, C.; MURUGAN, S.; DEVI, P. Review on medicinal and pharmacological properties of *Iresine herbstii*, *Chrozophora rottleri* and *Ecbolium linneanum*. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 8, n. 5S, 2011.

MILECH, C.; LUCHO, S. R.; KLEINOWSKI, A. M.; DUTRA, D. B.; SOARES, M. M.; BRAGA, E. J. B. Production of pigments in *Alternanthera sessilis* calli mediated by plant growth regulators and light**. Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 39, n. 3, p. 381-388, 18 set. 2017.

MURASHIGE, T; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, p. 473- 497, 1962.

NENCINI, Cet al. Affinity of *Iresine herbstii* and *Brugmansia arborea* extracts on different cerebral receptors. **Journal of ethnopharmacology**, v. 105, n. 3, p. 352-357, 2006.

REIS, A et al. Indução de calo e quantificação de betacianina por HPLC / MS-MS em *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze. **Hoehnea**, São Paulo, v. 44, n. 1, pág. 90-95, março de 2017.

RIBEIRO, J. M.; BASTOS, D. C. Biorreatores: aspectos gerais e sua utilização para cultura de tecidos vegetais. **Embrapa Semiárido-Documentos (INFOTECA-E**), 2008.