

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA VEGETAL



Dissertação

COMPOSTOS BIOATIVOS INDUZIDOS POR ELICITORES EM
Alternanthera sessilis

CRISTINI MILECH

PELOTAS, 2016

CRISTINI MILECH

COMPOSTOS BIOATIVOS INDUZIDOS POR ELICITORES EM
Alternanthera sessilis

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 Fisiologia Vegetal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eugenia Jacira Bolacel Braga

Coorientadora: Dr^a Alírcia Moraes Kleinowski

Pelotas, 2016

Dados de catalogação na fonte:
Maria Beatriz Vaghetti Vieira – CRB 10/1032
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

M642c Milech, Cristini
 Compostos bioativos induzidos por elicitores em
 Alternanthera sessilis / Cristini Milech. – 80f. – Dissertação
 (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vege-
 tal. Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pe-
 lotas, 2016. – Orientador Eugenia Jacira Bolacel Braga; co-
 orientador Alírcia Moraes Kleinowski.

 1.Biologia. 2.Fisiologia vegetal. 3.Violácea. 4.Elicitores.
 5.Metabólitos secundários. 6.Plantas medicinais. I.Braga,
 Eugenia Jacira Bolacel. II.Kleinowski, Alírcia Moraes. III. Títu-
 lo

CDD: 633.88

Banca Examinadora:

Dr^a. Eugenia Jacira Bolacel Braga (Orientadora)

Dr^a. Márcia Vaz Ribeiro

Dr. Márcio Paim Mariot

À mulher mais maravilhosa do mundo: minha mãe
Dedico

Agradecimentos

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos que me possibilitou retornar ao mundo acadêmico.

À Universidade Federal de Pelotas, em especial ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal.

A minha orientadora Eugenia Jacira Bolacel Braga, por acreditar em mim e me dar a oportunidade de usufruir de seus conhecimentos, bem como por ter investido no meu retorno.

A minha mãe Velma Buttow Milech, a melhor do mundo, por estar sempre presente e acreditar em mim e a meu Pai Gilberto Milech.

As minhas irmãs Letícia, Lenízia e Vanessa que completam o meu mundo e com quem divido minhas alegrias e tristezas.

Aos meus sobrinhos e afilhados que tornam minha vida mais colorida e alegre.

A minha companheira de todos os dias e testemunha de todos os meus estudos, minha gatinha, gorda.

As minhas amigas e amigos de fora do programa que compreenderam minha ausência quando a mesma foi necessária.

As minhas amigonas e parceiras Simone Ribeiro Lucho e Lissane Valério Borges Rodrigues, obrigada por tudo meninas, amo vocês.

À Alícia Moraes Kleinowski, pela atenção, ensinamentos e paciência e, cujo auxílio foi imprescindível para a realização deste trabalho.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, do Laboratório de Fisiologia Molecular e do Programa de Fisiologia Vegetal, pelos ótimos momentos de convivência, alegrias, aprendizado e descontração.

Aos demais professores do Programa que me auxiliaram na busca pelo conhecimento e, também, a todos àqueles com quem convivi durante este tempo e que contribuíram de alguma forma no meu aprendizado.

E por último, mas não menos importante, aos percalços da vida, que nos fazem mais fortes.

RESUMO

MILECH, Cristini. **Compostos bioativos induzidos por elicitores em *Alternanthera sessilis***. 2016, 80f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

Métodos alternativos que possam influenciar as diferentes vias biossintéticas das plantas para melhorar a produção de fitoquímicos de interesse estão sendo cada vez mais estudados. O uso de elicitores, em cultura de tecidos, é um destes métodos. Elicitores são fatores físicos, químicos ou biológicos, que são capazes de desencadear respostas fisiológicas ou morfológicas nas plantas. Dentre os compostos produzidos pelas plantas, os pigmentos, como as betalaínas, por serem naturais e apresentarem funções antioxidantes, vêm recebendo destaque tanto pela indústria alimentícia, como farmacêutica. A espécie *Alternanthera sessilis* produz estes pigmentos, porém a demanda por esta quantidade é muito alta, sendo necessário otimizar a produção deste composto. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o uso de elicitores químicos, através do Metiljasmonato, em sistema de hidroponia e uso de elicitores físicos, através de diferentes qualidades de luz em cultura de calos na espécie *A. sessilis*. No experimento de elicitação em sistema de hidroponia, plantas oriundas do cultivo *in vitro* e *ex vitro* sofreram elicitação com 100 μM de Metiljasmonato (MeJa), por 48 horas. Em seguida foi realizada a extração de RNA, quantificação de clorofilas, betalaínas e flavonoides. No experimento de indução de calos e elicitação com diferentes qualidades de luzes, explantes foliares e internodais foram colocados em meio MS com diferentes reguladores de crescimento, por 20 dias no escuro e 10 dias na luz. Os meios que se mostraram mais eficientes na formação de calos foram repetidos e acrescidos de meio de indução de betacianina (MIB) e estes permaneceram por 40 dias em cultivo sob as diferentes qualidades de luz (branca, azul, vermelha e escuro). Ao término do período foram quantificados betalaínas e flavonoides. No experimento de elicitação com MeJa em hidroponia, o tempo de 48 horas não foi capaz de alterar significativamente os parâmetros avaliados, porém em relação ao tipo de cultivo, plantas *ex vitro* tiveram um incremento significativo em relação à amarantina e betanina, comparada a de origem *in vitro*. No segundo experimento de indução de calos o tratamento que se mostrou mais propício à formação de calos e consequente indução de betalaínas foi a combinação do meio contendo 1,5 mg L^{-1} de 2,4-D e 2,0 mg L^{-1} de BAP e a luz azul, dobrando os teores de betalaínas. Conclui-se que a elicitação química por MeJa não foi capaz de alterar quantitativamente os parâmetros avaliados no tempo de exposição de 48 horas e que a elicitação física pela luz em calos é um sistema eficiente de reprogramação metabólica nas plantas, já que a luz azul em conjunto com o meio de cultivo adequado é capaz de otimizar a produção de metabólitos de interesse comercial.

Palavras-chave: Violácea, elicitores, metabólitos secundários, plantas medicinais

ABSTRACT

MILECH, Cristini. **Bioactive compounds induced by elicitors in *Alternanthera sessilis***. 2016. 79p. Dissertation (Masters) – Graduation Program in Vegetal Physiology. Federal University of Pelotas, Pelotas, 2016.

Alternative methods that may affect different biosynthetic pathways of plants to improve the production of phytochemicals of interest are increasingly being studied. Use of elicitors, in tissue culture, is one of these methods. Elicitors are physical, chemical or biological factors that are capable of eliciting physiological or morphological responses on plants. Among the compounds produced by plants, pigments, such as betalains because they are natural and present antioxidant functions, have received attention by both the food industry, such as pharmaceuticals. The species *Alternanthera sessilis* produces these pigments, though the demand for this quantity is too high, it is necessary to optimize production of this compound. Therefore, the objective of this study was to evaluate the use of chemical elicitors, by methyl jasmonate, in hydroponics system and use of physical elicitors, through different qualities of light in callus culture in the species *A. sessilis*. In the elicitation experiment in hydroponics system, plants grown *in vitro* and *ex vitro* culture suffered elicitation with 100 mM of methyljasmonate (MeJA), for 48 hours. It then carried the RNA extraction, quantification of chlorophylls, betalains and flavonoids. In callus induction and elicitation experiment with different lights, leaf explants and internodal were placed on MS medium with different growth regulators, for 20 days in the dark and 10 days in the light. The means which were more effective in callus formation were repeated and added half betacyanin induction (MIB) and they remained for 40 days in culture under different light qualities (white, blue, red and dark). At the end of the period they were quantified betalains and flavonoids. In the experiment elicitation with MeJa in hydroponics, the time of 48 hours was not able to significantly change the parameters evaluated, but in relation to the type of crop, *ex vitro* plants had a significant increase in relation to amarantin and betanin, compared to original *in vitro*. In the second experiment callus induction treatment which was more conducive to the formation of callus and subsequent induction betalains was the combination of medium containing 1,5 mg L⁻¹ 2,4-D and 2,0 mg L⁻¹ BAP and blue light, doubling the betalains contents. It can be concluded that chemical elicitation by MeJa, was not able to quantitatively change the parameters evaluated in time of 48 hours exposure and physical elicitation by light callus is an efficient metabolic reprogramming in plants, since light blue together with appropriate growth medium, is able to optimize the production of commercially important metabolites.

Key-words: Violacea, elicitors, secondary metabolites, medicinal plants.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1	Rota de biossíntese das betalaínas proposto por Khan; Giridhar (2015).....	19
Figura 2	Fórmula estrutural do elicitor Metiljasmonato (MeJa).....	22
Figura 3	Sistema de cultivo hidropônico contendo Metiljasmonato nas concentrações de 0 (controle) e 100 μ M, em plantas de <i>Alternanthera sessilis</i> oriundas do cultivo <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i>	25
Figura 4	Gel de RNA total obtido de plantas de <i>Alternanthera sessilis</i> obtidas do cultivo <i>in vitro</i> e mantidas em hidroponia na presença de Metiljasmonato (MeJa) na concentração de 0 (controle) e 100 μ M por 48 horas com diferentes protocolos de extração (A); Representação do gel de RNA obtido pelo BioAnalyzer (B). 1-2-3- Controle – PureLink; 4-5-6- Controle Trizol; 7-8-9- Plantas elicitadas com MeJa – PureLink; 10-11-12- Plantas elicitadas com MeJa – Trizol.....	33
Figura 5	Eletoferograma das amostras de RNA, indicando os valores respectivos de RNA Total Íntegro (RIN), e os picos. 1-2-3- Controle – PureLink; 4-5-6- Controle Trizol; 7-8-9- Plantas elicitadas com MeJa – PureLink; 10-11-12- Plantas elicitadas com MeJa – Trizol.....	35
Figura 6	Teor de amarantina presente na parte aérea de plantas de <i>Alternanthera sessilis</i> oriundas do cultivo, <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i> , e mantidas em hidroponia na presença de Metiljasmonato (MeJa), na concentração de 0 (controle) e 100 μ M, por 48 horas. Médias seguidas por letras maiúsculas distintas diferem entre si em relação ao tipo de origem de cultivo, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0.05$).....	37
Figura 7	Teor de betanina presente na parte aérea de plantas de <i>Alternanthera sessilis</i> oriundas do cultivo, <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i> , e mantidas em hidroponia na presença de Metiljasmonato (MeJa), na concentração de 0 (controle) e 100 μ M, por 48 horas. Médias seguidas por letras maiúsculas distintas diferem entre si em relação ao tipo de cultivo de origem de acordo com o teste de Tukey ($p < 0.05$).....	39
Figura 8	Teor de miraxantina, betanidina, quercetina, clorofila a, b e total, presente na parte aérea de plantas de <i>Alternanthera sessilis</i> oriundas do cultivo, <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i> , e mantidas em hidroponia na presença de Metiljasmonato (MeJa), na concentração de 0	

	(controle) e 100 μ M, por 48 horas. * NS: Não significativo.....	41
Figura 9	Índice de balanço de nitrogênio, clorofilas e flavonoides de plantas de <i>Alternanthera sessilis</i> oriundas do cultivo, <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i> , e mantidas em hidroponia na presença de Metiljasmonato (MeJa), na concentração de 0 (ausência) e 100 μ M, por 48 horas.....	43

CAPÍTULO II

Figura 1	Pigmentação dos calos de <i>Alternanthera sessilis</i> oriundos dos meios de cultivo de calos (MIC) 11 (1,5 mg L ⁻¹ 2,4-D + 1,5 mg L ⁻¹ BAP), 12 (1,5 mg L ⁻¹ 2,4-D + 2,0 mg L ⁻¹ BAP), 15 (2,0 mg L ⁻¹ 2,4-D + 1,5 mg L ⁻¹ BAP) e 16 (2,0 mg L ⁻¹ 2,4-D + 2,0 mg L ⁻¹ BAP) e após transferidos para Meio Indutor de Betacianina (MIB) respectivamente, de explantes internodais (A) e foliares (B) em meio de indução de betacianina (MIB) após 40 dias de cultivo.....	58
Figura 2	Teor de flavonoides presente nos calos de plantas de <i>Alternanthera sessilis</i> , após a elicitação em diferentes qualidades de luz. M1- (1,5 mg L ⁻¹ 2,4-D + 1,5 mg L ⁻¹ BAP), M2 (1,5 mg L ⁻¹ 2,4-D + 2,0 mg L ⁻¹ BAP), M3 (2,0 mg L ⁻¹ 2,4-D + 1,5 mg L ⁻¹ BAP) e M4 (2,0 mg L ⁻¹ 2,4-D + 2,0 mg L ⁻¹ BAP). Médias seguidas por letras maiúsculas distintas diferem entre si em relação ao tipo de qualidade de luz frente aos meios, médias seguidas por letras minúsculas distintas comparam meio de cultivo em relação à determinada luz de acordo com o teste de Tukey (p<0.05).....	60
Figura 3	Teor de amarantina presente nos calos de plantas de <i>Alternanthera sessilis</i> , após a elicitação em diferentes qualidades de luz. M1- (1,5 mg L ⁻¹ 2,4-D + 1,5 mg L ⁻¹ BAP), M2 (1,5 mg L ⁻¹ 2,4-D + 2,0 mg L ⁻¹ BAP), M3 (2,0 mg L ⁻¹ 2,4-D + 1,5 mg L ⁻¹ BAP) e M4 (2,0 mg L ⁻¹ 2,4-D + 2,0 mg L ⁻¹ BAP). Médias seguidas por letras maiúsculas distintas diferem entre si em relação ao tipo de qualidade de luz frente aos meios, médias seguidas por letras minúsculas distintas comparam meio de cultivo em relação à determinada luz, de acordo com o teste de Tukey (p<0.05).....	61
Figura 4	Teor de betanidina presente nos calos de plantas de <i>Alternanthera sessilis</i> , após a elicitação em diferentes qualidades de luz. M1- (1,5 mg L ⁻¹ 2,4-D + 1,5 mg L ⁻¹ BAP), M2 (1,5 mg L ⁻¹ 2,4-D + 2,0 mg L ⁻¹ BAP), M3 (2,0 mg L ⁻¹ 2,4-D + 1,5 mg L ⁻¹ BAP) e M4 (2,0 mg L ⁻¹ 2,4-D + 2,0 mg L ⁻¹ BAP). Médias seguidas por letras maiúsculas distintas diferem entre si em relação ao tipo de qualidade de luz frente aos meios, médias seguidas por letras minúsculas distintas comparam meio de cultivo em relação à determinada luz, de	

	acordo com o teste de Tukey ($p < 0.05$).....	62
Figura 5	Teor de betanina presente nos calos de plantas de <i>Alternanthera sessilis</i> , após a elicitação em diferentes qualidades de luz. M1- (1,5 mg L ⁻¹ 2,4-D + 1,5 mg L ⁻¹ BAP), M2 (1,5 mg L ⁻¹ 2,4-D + 2,0 mg L ⁻¹ BAP), M3 (2,0 mg L ⁻¹ 2,4-D + 1,5 mg L ⁻¹ BAP) e M4 (2,0 mg L ⁻¹ 2,4-D + 2,0 mg L ⁻¹ BAP). Médias seguidas por letras maiúsculas distintas diferem entre si em relação ao tipo de qualidade de luz frente aos meios, médias seguidas por letras minúsculas distintas comparam meio de cultivo em relação à determinada luz de acordo com o teste de Tukey ($p < 0.05$).....	63
Figura 6	Teor de miraxantina presente nos calos de plantas de <i>Alternanthera sessilis</i> , após a elicitação em diferentes qualidades de luz. M1- (1,5 mg L ⁻¹ 2,4-D + 1,5 mg L ⁻¹ BAP), M2 (1,5 mg L ⁻¹ 2,4-D + 2,0 mg L ⁻¹ BAP), M3 (2,0 mg L ⁻¹ 2,4-D + 1,5 mg L ⁻¹ BAP) e M4 (2,0 mg L ⁻¹ 2,4-D + 2,0 mg L ⁻¹ BAP). Médias seguidas por letras maiúsculas distintas diferem entre si em relação ao tipo de qualidade de luz frente aos meios, médias seguidas por letras minúsculas distintas comparam meio de cultivo em relação à determinada luz, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0.05$).....	64
Figura 7	Aspecto e pigmentação dos calos após a elicitação pela luz. (A) calo não desenvolvido com explante internodal; (B) calo internodal formado parcialmente; (C) calo foliar M2 no escuro; (D) calo foliar M2 no azul; (E) calo foliar M2 no vermelho; (F) calo foliar M2 no branco.....	66

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1	Média geral dos parâmetros avaliados em plantas de <i>Alternanthera sessilis</i> , oriundas do cultivo, <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i> , e mantidas em hidroponia na presença de Metiljasmonato (MeJa), na concentração de 0 (controle) e 100 µM, por 48 horas.....	42
----------	--	----

CAPÍTULO II

Tabela 1	Porcentagem de formação de calos, coloração e aspecto dos calos oriundos de explantes foliares de <i>Alternanthera sessilis</i> , após 20 dias no escuro e 10 dias com fotoperíodo de 16 h de luz, em temperatura de ± 23 °C.....	56
Tabela 2	Porcentagem de formação de calos, coloração e aspecto dos calos oriundos de explantes foliares de <i>Alternanthera sessilis</i> , após 20 dias no escuro e 10 dias com fotoperíodo de 16 h de luz, em temperatura de ± 23 °C.....	57

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	13
CAPÍTULO I - BIOSÍNTESE DE MOLÉCULAS BIOATIVAS EM <i>Alternanthera sessilis</i> COM METILJASMONATO EM SISTEMA HIDROPÔNICO	17
1 INTRODUÇÃO	17
2 MATERIAL E MÉTODOS	23
2.1 Obtenção do material vegetal	23
2. 2 Extração do RNA	25
2.2.1 Protocolo com <i>Purelink</i>	26
2.2.2 Protocolo com Trizol	27
2.2.3 Protocolo com lítio	28
2.3 Variáveis analisadas	29
2.3.1 Quantificação de amarantina	29
2.3.2 Quantificação de betanidina e betanina	30
2.3.3 Quantificação de betaxantinas	30
2.3.4 Análises de flavonoides totais	30
2.3.5 Análises de clorofilas a, b e total	31
2.3.6 Índice de clorofila, flavonoides, e Índice de Balanço do Nitrogênio (IBN)	31
2.4 Análise estatística	32
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
3.1 RNA	32
3.2 Quantificação das variáveis	35
4 CONCLUSÃO	46

CAPÍTULO II - PRODUÇÃO DE BETALAÍNAS E FLAVONOIDES EM CALOS DE <i>Alternanthera sessilis</i> SOB DIFERENTES LUZES	47
1 INTRODUÇÃO	47
2 MATERIAL E MÉTODOS	50
2.1 Obtenção do material vegetal	50
2.2 Indução de calo	51
2.3 Indução de betacianinas pela luz	52
2.4 Análises de flavonoides totais	52
2.5 Quantificação de amarantina	53
2.6 Quantificação de betanidina e betanina total	53
2.7 Quantificação de betaxantinas	53
2.8 Análise estatística	54
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4 CONCLUSÃO	67
CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
REFERÊNCIAS	69

INTRODUÇÃO GERAL

Desde a antiguidade as plantas são conhecidas e exploradas pelo homem para uso em sua alimentação e saúde, o que não se sabia é que os benefícios que elas forneciam se devem, principalmente, devido à presença de proteínas, carboidratos, fitoquímicos, como alcaloides, pigmentos (clorofila, antocianinas, betalaínas), flavonoides, polifenóis, entre outros (KHAN et al., 2012).

Muitos avanços foram realizados em relação ao estudo das propriedades medicinais e nutricionais das plantas que propiciaram avanços tecnológicos permitindo, por exemplo, a fabricação de vários medicamentos, contudo, é grande a parcela da população que não tem acesso a estes e faz uso da medicina popular como fonte primária de cuidados à saúde (YADAV et al., 2015).

De acordo com a ONU, cerca de 80 % da população mundial ainda faz uso de plantas medicinais para o tratamento de doenças e, além disso, o apelo ao uso de produtos naturais nos últimos tempos, também aumentou, fazendo com que a busca por compostos naturais que possam ser utilizados para a fabricação de cosméticos e medicamentos tenha se acentuado (DEBNATH et al., 2014).

Dentre os mais variados gêneros de plantas medicinais, utilizados na medicina popular, o gênero *Alternanthera*, pertencente à família Amaranthaceae, se destaca, por possuir uma ampla variedade de compostos fitoquímicos, como betalaínas, fenóis entre outros (HUNDIWALE et al., 2012; TANVEER et al., 2013).

A família Amaranthaceae compreende cerca de 170 gêneros e 2000 espécies, ocorrendo no Brasil 20 gêneros nativos e aproximadamente 100 espécies. Muitas destas espécies são utilizadas na medicina popular ou como ornamentais, sendo comumente encontradas em ambientes abertos, porém algumas são encontradas no interior de florestas (LORENZI, 2008).

Alternanthera sessilis L. conhecida popularmente como violácea, planta originária da América do Sul, porém bem distribuída no mundo, se desenvolve em locais alagados, planaltos e em diferentes tipos de solo (SINGH et al., 2009; MEHMOOD et al., 2014). É uma erva perene de folhas simples e flores brancas (NIRAMAITHI et al., 2013). O nome popular desta espécie advém da pigmentação roxa intensa que a mesma apresenta em seu caule e folhas em razão da presença de betalaínas (KAVITHA et al., 2010).

As betalaínas são consideradas pigmentos naturais de plantas e quanto a sua estrutura dividem-se em dois grupos, as betacianinas (compostos vermelhos ao vermelho violeta) e as betaxantinas (compostos de coloração amarela) (CAI et al., 2005). Esses pigmentos foram descobertos pela primeira vez no suco de beterraba (*Beta vulgaris* L.) no século XIX (LEE et al., 2014).

As betacianinas podem ser classificadas por sua estrutura química em quatro tipos: betanina, amarantina, gonferina e bougainvilina. Até o momento são descritos aproximadamente 50 tipos de betacianinas (VOLP; RENHE; STRINGUETA, 2009).

Dentre as betalaínas que apresentar a coloração amarela, podem-se citar as betaxantinas, miraxantinas e 2-descarboxi betanidina (KHAN; GIRIDHAR, 2015).

Fontes de pigmentos naturais vêm sendo investigadas como substituto à corantes artificiais, uma vez que estes a utilização destes estão associados a problemas de saúde (ZUH et al., 2008). Neste contexto, estudos com as betalaínas se tornam cada vez mais promissores, pois além de serem usadas como corantes naturais, são consideradas fortes antioxidantes e o uso regular destes compostos na alimentação pode fornecer proteção contra desordens relacionadas com o estresse oxidativo em seres humanos (ZHU et al., 2008).

Vários estudos sugerem o uso de *A. sessilis* no auxílio do tratamento de diversas doenças, como diabetes, doenças cardiovasculares, dores de cabeça, confirmando seu uso tradicional pela medicina popular (SINGH et al., 2009; QUIN et al., 2010; BORAH et al., 2011; ANITHA; KANIMOZHI, 2012; SARAVANAM et al., 2013; HOSSAIN et al., 2014).

Algumas espécies da família Amarantaceae, caracterizadas pela presença de betalaínas e flavonoides, pertencentes ao gênero *Alternanthera*, como *Alternanthera tenella*, já estão sendo utilizadas como modelos biológicos para estudos sobre a fisiologia do seu metabolismo secundário, tanto na produção como no armazenamento e aproveitamento dessas moléculas naturais (TANVEER et al., 2013; KLEINOWSKI et al., 2014).

A beterraba, *Beta vulgaris*, é ainda hoje a matéria prima mais popular para a extração de betalaínas, tornando-se de extrema importância o estudo de outras espécies que sejam capazes de fornecer estes pigmentos (KHAN; GIRIDHAR, 2015).

Com o intuito de aumentar a produtividade de compostos vegetais de interesse, diversas técnicas vêm sendo utilizadas, incluindo a seleção de linhagens,

a engenharia metabólica, a otimização das condições de cultivo e o emprego de elicitores (PEROTTI et al., 2010).

Neste sentido, ferramentas biotecnológicas, em especial a cultura de células e tecidos, pode ser uma alternativa a essas tecnologias clássicas que apresentam produção industrial limitada pelo meio ambiente ou influências geográficas (RAO; RAVISHANKAR, 2002; GARCIA-GONZALES et al., 2010).

A micropropagação representa uma alternativa viável para a rápida propagação de grande quantidade de clones em um espaço pequeno, além da conservação de germoplasma. Plantas aromáticas e medicinais são geralmente coletadas nos seus habitats naturais, o que agride o meio ambiente, podendo causar a extinção de espécies (DEBNATH et al., 2006). Este é o caso de *A. sessilis*, por ser usada pela medicina popular em vários países ela está desaparecendo de seu habitat natural, sendo a propagação *in vitro* uma ferramenta muito útil na conservação, propiciando também mais estudos sobre esta espécie (GNANARAJ et al., 2011; PREETHA et al., 2013).

Esta técnica permite a multiplicação de novas plantas, o melhoramento de plantas convencionais e também fornecer um número suficiente de mudas para o plantio de uma espécie que não consegue produzir sementes ou não responde bem à reprodução vegetativa (KUMARASWAMY; ANURADHA, 2010).

O cultivo *in vitro* pode ser utilizado para a produção em grande escala de compostos bioativos, para serem utilizados como: fitoterápicos, produtos farmacêuticos, aditivos alimentares e cosméticos; e esta produção deve ser incentivada devido à sua importância científica, econômica e ecológica (SALVADOR et al., 2009).

O cultivo de plantas em meios contendo elicitores tem sido apontado como estimulador da biossíntese de metabólitos secundários, incluindo terpenos, flavonoides, alcaloides, betacianinas e fenilpropanoides, entre outros (ZHAO et al., 2005, KLEINOWSKI et al., 2014). Além disso, o uso de elicitores altera as rotas metabólicas, afetando qualitativamente e quantitativamente as moléculas bioativas produzidas (DJILIANOV et al., 2005).

Elicitores são produtos químicos ou biológicos, provenientes das mais diversas formas que são capazes de induzir alterações morfológicas ou fisiológicas no organismo em estudo (ZHAO et al., 2005; RUIZ-GARCIA; GÓMEZ-PLAZA, 2013).

Neste sentido, o presente trabalho teve por objetivo estudar métodos de indução de aumento da biossíntese de moléculas bioativas, com uso de elicitor em sistema de hidroponia, em plantas de *A. sessilis* oriundas de cultivos *ex vitro* e *in vitro* e, avaliar meios de cultivo para a indução de calos *in vitro* e posterior indução de biossíntese de bioativos sob diferentes qualidades de luz, nessa mesma espécie.

CAPÍTULO I

BIOSSÍNTESE DE MOLÉCULAS BIOATIVAS EM *Alternanthera sessilis* COM METILJASMONATO EM SISTEMA HIDROPÔNICO

1 INTRODUÇÃO

As plantas apresentam uma via metabólica primária, onde são produzidos compostos como açúcares, proteínas, lipídeos, RNA, DNA, entre outros e a via secundária, na qual há produção de compostos chamados metabólitos secundários. Os metabólitos secundários de plantas podem ser definidos como compostos que têm um papel importante na interação da planta com o seu ambiente, sendo produzidos para atrair polinizadores e dispersar sementes, como sinais de comunicação entre plantas e microrganismos simbióticos ou para proteção contra a luz UV e outros estresses físicos (WINK et al., 2008).

Aproximadamente 20 % do carbono fixado pelas plantas é canalizado pela via do chiquimato, além de desempenhar um papel significativo no fornecimento de metabólitos primários esta via também é fundamental no metabolismo secundário, já que ela fornece as vias de síntese dos três aminoácidos aromáticos: triptofano, tirosina e fenilalanina (RUSSELL; DUTHIE, 2011).

As betalaínas, são um grupo de metabólitos secundários nitrogenados, derivados da L-tirosina, são pigmentos vegetais hidrofílicos, armazenados no vacúolo e empregados como corantes alimentícios, exibindo vasta gama de atividades biológicas desejáveis, incluindo antioxidantes, anti-inflamatórios, hepatoprotetores e propriedades anticancerígenas (GEORGIEV et al., 2008).

Antes de 1957, as mesmas eram consideradas antocianinas nitrogenadas, entretanto, a cristalização da betanina e a hidrólise da betanidina e subsequente isolamento de indicaxantina, evidenciaram que estes eram uma classe diferente de pigmentos (KHAN; GIRIDHAR, 2015).

Betalaínas estão presentes exclusivamente na ordem Caryophyllales, substituindo as antocianinas. Acredita-se que na pré-história, estes pigmentos coexistiam e durante a evolução, algumas enzimas de síntese de antocianinas foram perdidas e esta ordem evoluiu a formação de pigmentos para sua proteção através de outra rota metabólica (GANDIA-HERRERO et al., 2005).

Khan; Giridhar (2015) dizem que esta semelhança também pode ser explicada, a partir de análises de hegemonia em que L-DOPA dioxigenase, enzima responsável pela clivagem do anel aromático, que leva a formação do ácido betalâmico, precursor de muitas betalaínas, possui semelhança a enzimas da rota de antocianinas.

As betalaínas são encontradas nas mais diferentes partes das plantas, como folhas e tubérculos e também em algumas sementes, como em *Chenopodium quinoa* (PAVOKOVIC; KRSNIK-RASOL, 2011; TANG et al., 2015).

A rota de biossíntese das betalaínas (figura 1) é dependente da ação de três enzimas principais, duas oxidases: tirosina hidroxilase e 4,5 DOPA-estradiol-oxigenase. A outra enzima é responsável pela transferência de resíduos de glicose a betanidina glicosiltransferase. Estas enzimas são a chave para a transcrição dos produtos desta rota nas plantas (GANDÍA-HERRERO; GARCÍA-CARMONA, 2013).

Para pesquisas relacionadas ao conteúdo de betalaínas é fundamental o conhecimento dos genes envolvidos na rota de biossíntese das mesmas, para avaliar o que está sendo expresso, sendo necessário a extração de RNA e síntese de cDNA (SEPÚLVEDA-JIMENEZ et al., 2005; SEKIGUCHI et al., 2010; SUZUKI et al., 2014; KHAN; GIRIDHAR, 2015).

Diferentes metodologias para extração de RNA são propostas, em razão de que cada planta possuir uma série de compostos que podem interferir no isolamento do material, bem como a idade da planta e a parte utilizada para extração (JOHNSON et al., 2012).

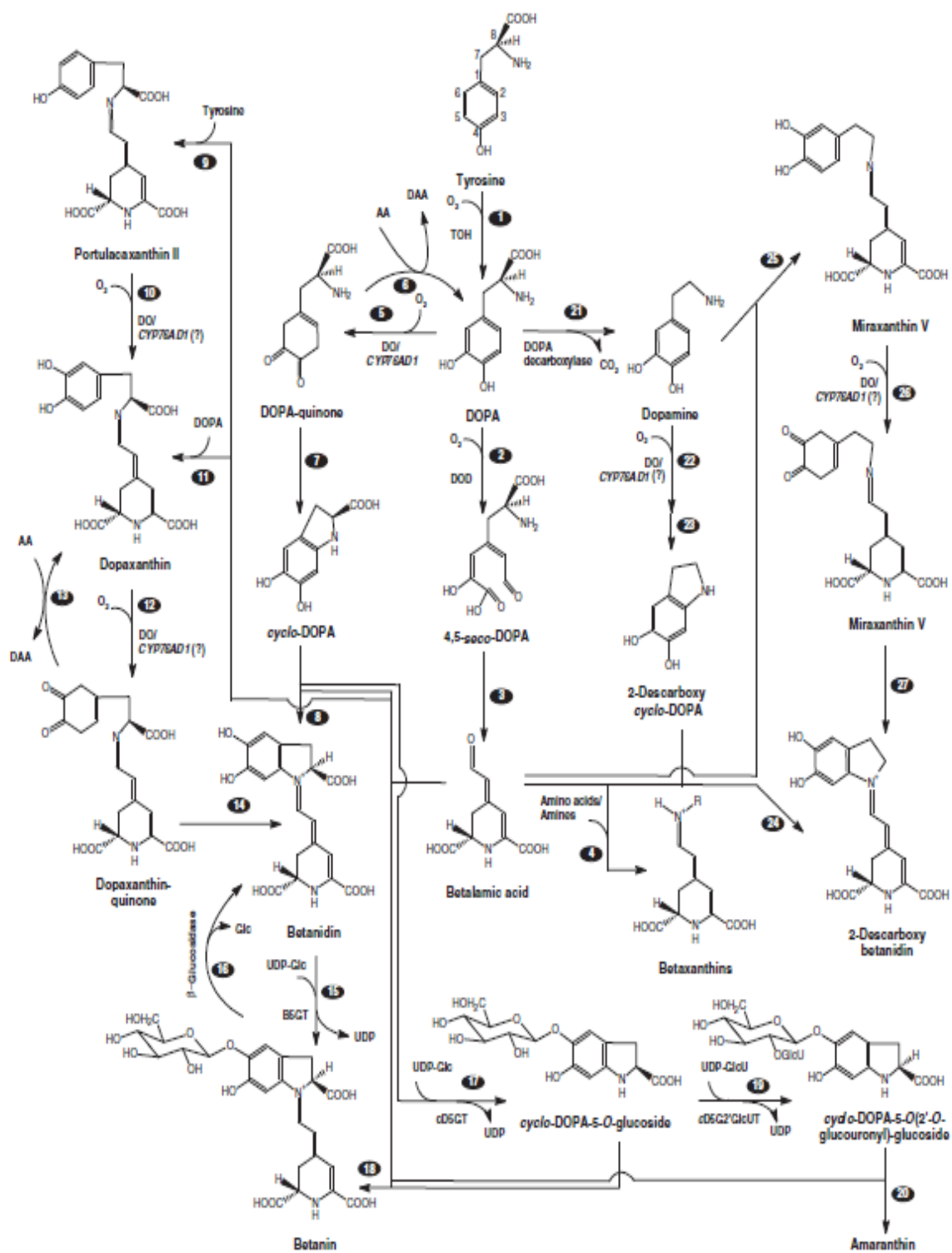


Figura 1 - Rota de biossíntese das betalínas proposto por Khan; Giridhar (2015).

A biossíntese das betalaínas é influenciada por uma série de fatores ambientais como a luz, raios ultravioletas, além de estresses bióticos e abióticos. Estudos demonstraram que a luz branca aumenta a biossíntese através de uma maior expressão da enzima DOPA-dioxigenase, porém, o modo de interação destes agentes com a enzima ainda não é conhecido (HATLESTAD et al., 2015).

Existe um grande interesse no estudo dos compostos antioxidantes, como as betacianinas e os compostos fenólicos, por serem substâncias que em pequenas quantidades podem prevenir e apresentar alto potencial terapêutico de doenças causadas por radicais livres, tais como: artrite, choque hemorrágico, doenças cardíacas, catarata, disfunções cognitivas, envelhecimento e câncer (NOGUCHI et al., 2000).

A produção de radicais livres nos sistemas biológicos resulta no stress oxidativo. Esses radicais livres são capazes de oxidar biomoléculas celulares como os ácidos nucleicos (DNA e RNA), proteínas, lipídeos e carboidratos (BORAH et al., 2011).

A espécie *Alternanthera sessilis* é constituída de vários compostos químicos como flavonoides, fenóis, ácidos graxos, betacaroteno, proteínas, esteróis e outros fitoquímicos que a tornam potencial antioxidante, bem como potencial fonte de betacianinas (SINGH et al., 2009; QUIN et al., 2010; BALAKRISHNAN et al., 2013).

Esta espécie é muito comum na medicina tradicional da China, Taiwan e Índia. Foi descoberta pela medicina Ayurvédica, é utilizada para o tratamento de vários tipos de problemas de saúde, como indigestão, febre, doenças da pele, bronquite, náuseas, antídoto contra picada de cobra, anemia, gonorreia, doenças do fígado, dores de cabeça, asma, hepatite, entre outras (GNANARAJ et al., 2011; ANITHA; KANIMOZHI, 2012; HOSSAIN et al., 2014).

Em razão da gama de possibilidades de usos terapêuticos que esta planta oferece, estudos se fazem necessário, porém, na natureza, em razão da variação nas condições ambientais que ocorrem durante o crescimento das plantas, ocorre uma flutuação na produção de substâncias ativas, bem como na concentração de extratos obtidos a partir delas. Desta forma, estratégias biotecnológicas, como o cultivo *in vitro*, podem auxiliar no cultivo destas plantas, com a finalidade de diminuir estas flutuações externas e com isso tentar uma padronização na produção de compostos ativos (PÉREZ-ALONSO et al., 2014).

A produção comercial de pigmentos naturais ainda é muito restrita devido à escassez de quantidade significativa de matéria fresca altamente pigmentada, falta de métodos simples e eficazes de extração e purificação destes produtos (KHAN; GIRIDHAR, 2015).

O cultivo *in vitro* pode ser um aliado nesta produção comercial já que ele permite utilizar técnicas que possam otimizar a produção destes pigmentos nas plantas, através de alterações nas rotas de biossíntese através do uso de elicitores (agentes químicos e estressantes), para incrementar as rotas metabólicas afetando qualitativamente e quantitativamente as moléculas bioativas produzidas (DJILIANOV et al., 2005; JIAO et al., 2016).

Segundo Prasad et al. (2012) o cultivo hidropônico melhora a qualidade de matéria-prima, já que a planta fica livre de contaminantes do solo, e facilita a aplicação de elicitores bióticos ou abióticos para aumentar a expressão de uma rota metabólica de interesse, podendo ser um complemento ao cultivo *in vitro*.

Os nutrientes essenciais podem ser fornecidos por meio das soluções hidropônicas, permitindo rápido crescimento e produção de matéria-prima de qualidade. Além disso, o ambiente protegido possibilita o controle do desenvolvimento das plantas e da solução nutritiva durante o cultivo (SANTOS, 2000).

Elicitores são compostos ou estímulos químicos, físicos ou biológicos, que aumentam a produção de metabólitos secundários em plantas cultivadas. São classificados como bióticos e abióticos, sendo que os primeiros têm origem biológica, derivados de patógenos ou da própria planta e os elicitores abióticos não tem origem biológica e são agrupados em fatores físicos e compostos químicos (VERPOORTE, 2005; VASCONSUELO; BOLAND, 2007). Estes estímulos, tanto bióticos quanto abióticos vêm sendo amplamente empregados em cultura de tecidos vegetais, com o intuito de maximizar a produção de compostos químicos de interesse.

A aplicação de elicitores, em concentrações adequadas, induz ou mediam sinais que conduzem a produção de metabólitos secundários. A aplicação destes compostos químicos eliciadores desencadeia a ativação de vários genes nas plantas. Como resultado ocorre a síntese e o acúmulo de metabólitos secundários (fitoalexinas e compostos fenólicos), macromoléculas estruturais (calose, lignina e glicoproteína rica em hidroxiprolina) (DANNER et al., 2008; ALAMINO et al., 2013).

O ácido jasmônico, forma fisiologicamente ativa do jasmonato, tem papel importante na cascata de eventos que ocorre no processo de indução, causando direta ou indiretamente, o acúmulo de metabólitos secundários (GUNDLACH et al., 1992).

Ácido jasmônico é um fitormônio capaz de regular uma ampla variedade de processos fisiológicos na planta, desde crescimento, reprodução e defesa. Originalmente foi identificado como um metabólito secundário presente nas flores do Jasmim. Metiljasmonato (MeJa) (figura 2) é um composto volátil derivado do ácido jasmônico que vem sendo utilizado em vários estudos como elicitador (SANIEWSKI et al., 2003; MANDAL, 2010; GEYTER et al., 2012; DANAEE et al., 2015).

Estudos de perfil de transcritos do genoma demonstram que o tratamento com ácido jasmônico desencadeia uma extensa reprogramação transcricional do metabolismo. A expressão de genes que codificam enzimas envolvidas em uma determinada via metabólica secundária, exibe muitas vezes uma regulação mais marcada após a elicitação (GEYTER et al., 2012). Esta descoberta tem incentivado a busca de mais substâncias capazes de ativar a expressão de rotas metabólicas de interesse comercial e por isso também se optou pela escolha deste elicitador.

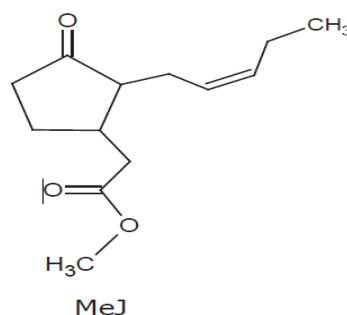


Figura 2 - Fórmula estrutural do elicitador Metiljasmonato (MeJa).

Em razão da baixa produção de betacianinas naturais, bem como pouco estudo em relação ao potencial da *A. sessilis* em relação à produção deste pigmento e de outros metabólitos de interesse, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do elicitador metiljasmonato em sistema de hidroponia, comparando plantas

oriundas do cultivo *in vitro* e plantas *ex vitro* e verificar desta forma o impacto deste elicitor quantitativamente em relação aos níveis de betalaínas, flavonoides e clorofilas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do material vegetal

Para iniciar a micropropagação, plantas oriundas da casa de vegetação serviram de doadoras de explantes, de onde se coletou ápices que foram previamente desinfestadas, através da lavagem com detergente comercial, enxaguadas com água em abundância e cinco lavagens com água destilada. Após, na capela de fluxo laminar, os explantes foram imersos em água destilada e três gotas de tween® por 15 minutos e, em seguida foi feita a lavagem dos mesmos com água destilada e esterilizada por três vezes. Na sequência os mesmos foram expostos ao cloreto de mercúrio 0,5 % por dois minutos e mais cinco enxagues com água destilada e esterilizada.

Após a desinfestação, os explantes representados por um segmento de ramo de 1 cm contendo duas gemas, foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Este meio foi previamente preparado com 100 mg L⁻¹ de mioinositol, 30 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de ágar, seu pH foi ajustado para 5,8, antes da adição do ágar e, posteriormente, os tubos contendo meio foram esterilizados em autoclave por 20 minutos, 121 °C e 1,05 kg cm⁻².

Os explantes foram inoculados em frascos contendo o meio MS semi sólido, e estes frascos foram colocados na sala de crescimento e permaneceram com temperatura média de 23 ± 2 °C, por aproximadamente 28 dias sob fotoperíodo de 16 h e densidade de fluxo de fótons de 48 µmol m⁻² s⁻¹.

Após 30 dias de cultivo *in vitro*, as plantas foram retiradas do meio de cultura e suas raízes lavadas em água, para retirada dos resíduos de meio de cultura, sendo transferidas para bandejas plásticas (20 x 7 x 3 cm), contendo substrato vermiculita. A irrigação das plantas foi realizada a cada dois dias com água e a cada três dias com solução nutritiva de Hoagland (HOAGLAND; ARNON, 1938), meia

força, até que completassem 30 dias em sala de crescimento sob fotoperíodo e temperatura controlados. Esta etapa foi necessária para preparar as plantas para a hidroponia em casa de vegetação.

Para a obtenção de plantas *ex vitro*, foram utilizadas plantas da casa de vegetação, em que a parte apical foi excisada para servir de propágulo para estaquia em bandejas plásticas com substrato vermiculita. As mesmas foram irrigadas com sistema de irrigação e solução de Hoagland, meia força, a cada três dias. As plantas permaneceram na casa de vegetação por aproximadamente 30 dias.

Posteriormente, as plantas oriundas dos cultivos, *in vitro* e *ex vitro*, foram transferidas para um sistema hidropônico de fluxo contínuo com raízes flutuantes e cultivadas com solução nutritiva de Hoagland, meia força, por dois dias para aclimação das raízes ao sistema, conforme mostra a figura 3. Como tratamento controle utilizou-se a solução de Hoagland, meia força, e para o tratamento com elicitor, a mesma solução adicionada de 100 μ M de MeJa.

Cada tratamento foi composto por quatro repetições, representadas cada uma por um vaso contendo quatro plantas de *A. sessilis*, ou seja, quatro unidades experimentais por repetição. Os tratamentos foram relacionados à exposição dessas plantas a 100 μ M do fitohormônio MeJa e ao controle sem exposição ao hormônio. O experimento foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 2, sendo dois tipos de cultivos de origem (*in vitro* e *ex vitro*) e dois tipos de solução (presença e ausência de MeJa).

Ao final de 48 horas de exposição ao MeJa foram realizadas as leituras de índice de clorofila, flavonoides, balanço de nitrogênio, coleta de amostras, parte apical de todas unidades experimentais, para extração de RNA e análise do perfil de transcritos. O material restante das coletas das amostras foi armazenado em ultrafreezer a – 80 °C até a realização das análises fitoquímicas.

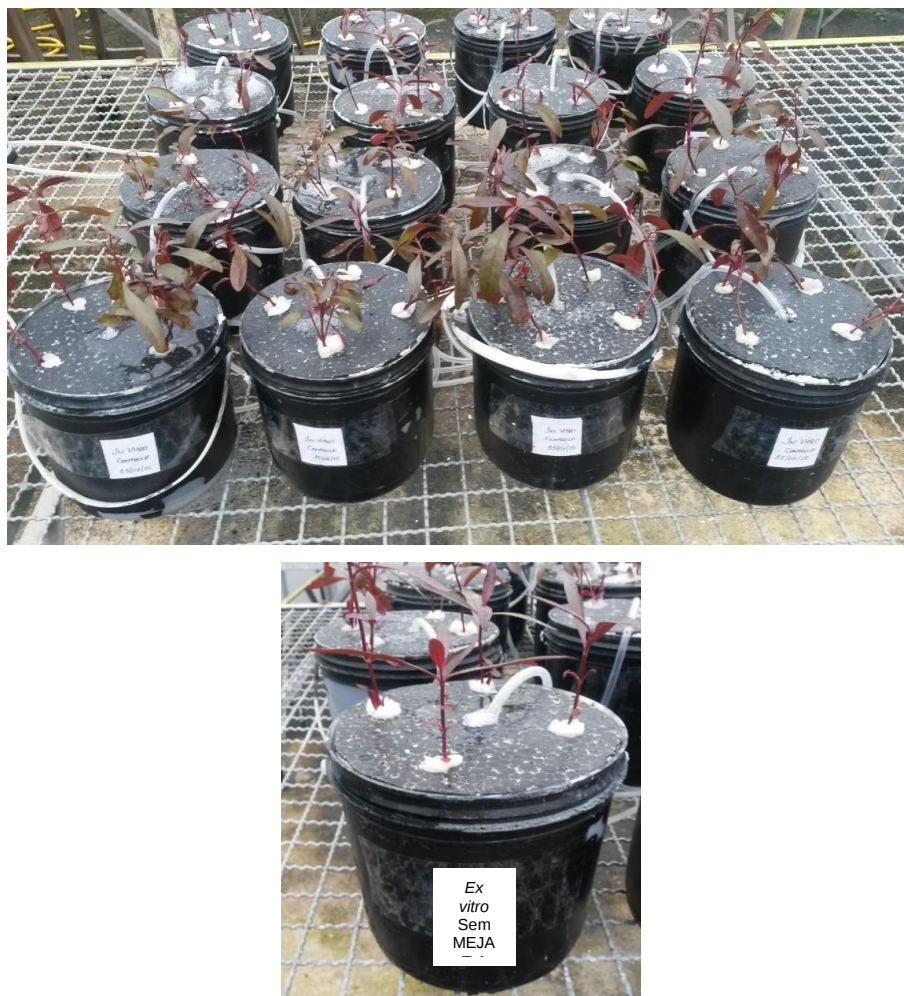


Figura 3 - Sistema de cultivo hidropônico contendo Metiljasmonato nas concentrações de 0 (controle) e 100 μ M, em plantas de *Alternanthera sessilis* oriundas do cultivo *in vitro* e *ex vitro*.

2.2 Extração do RNA

Âpices caulinares, com aproximadamente 100 mg, foram coletados de plantas jovens, oriundas do sistema hidropônico, após 48 h de exposição ao MeJa. As amostras foram identificadas e armazenadas em ultrafreezer a -80°C . Após o congelamento, com auxílio de nitrogênio líquido, cadinho e pistilo, as amostras foram maceradas até a obtenção de um pó. Este macerado foi utilizado para a extração de RNA total, através de três protocolos distintos: *PureLink*, Trizol e Lítio para verificar qual mais adequado para esta espécie.

2.2.1 Protocolo com *PureLink*

O macerado foi transferido para um microtubo de 1,5 mL onde se acrescentou 500 µL de *pureLink*, homogeneizou-se e os mesmos foram mantidos durante 5 minutos à temperatura ambiente na horizontal. Em seguida os mesmos foram centrifugados por 15 minutos a 12.000 g em temperatura ambiente para limpar a solução.

O sobrenadante foi transferido para um novo tubo autoclavado, onde se adicionou 0,1 mL de uma solução de NaCl 5 M ao extrato. Após uma homogeneização manual foram adicionados 0,3 mL de clorofórmio, nova homogeneização manual e centrifugação a 4 °C por 10 minutos a 12.000 g para separar as fases. Ao final, se fez a transferência da fase superior aquosa para um novo tubo. A esta fase aquosa foi adicionada um volume igual de isopropanol, homogeneizou-se e os mesmos permaneceram à temperatura ambiente por 10 minutos.

Na sequência foram centrifugados a 4 °C por 10 minutos a 12.000 g. O sobrenadante foi descartado e ao *pellet*, foi adicionado 1 mL de etanol 75 %. O novo homogeneizado foi para centrifuga a temperatura ambiente por 3 minutos a 12.000 g. Descartou-se o sobrenadante e foi realizada nova centrifugação por 1 minuto nas mesmas condições. O líquido residual foi retirado com auxílio de uma micropipeta e as amostras permaneceram em câmara de fluxo até secarem. Ao final foram adicionados 30 µL de água DEPC 0,01 %, autoclavada, para dissolver o RNA. Homogenizou-se em agitador magnético e as amostras ficaram *overnight* a – 80 °C.

No dia seguinte foi avaliada a integridade do RNA através do gel de agarose 1,5 % e mensurado a concentração e a pureza. Para o gel foram utilizados 2 µL de RNA mais 5 µL de tampão de carga (*Blue juice*) e como branco apenas água. A migração do RNA no gel de agarose foi feita sob tensão de 100 V por 60 minutos (Figura 4).

A concentração e pureza do RNA foram mensuradas em espectrofotômetro, NanoDrop ND-1000® (GE Healthcare™), nos comprimentos de onda de 230, 260, 280 e 320 nm. Para a avaliação da pureza, são observadas as relações entre as absorbâncias A260/280, que indicam possíveis contaminações com polissacarídeos ou polifenóis. Para considerar as amostras isentas de contaminação esses valores

devem se situar entre 2.1 e 1.8. Em relação à concentração, o valor obtido foi expresso em $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$.

2.2.2 Protocolo com Trizol

Aproximadamente 100 mg de amostras foram maceradas conforme item 2.2, e transferidas para tubos de 2 mL, previamente esterilizados. Na sequência foi adicionado 1 mL do reagente Trizol e após homogeneização, os tubos permaneceram a temperatura ambiente por cinco minutos. Foi acrescentado 0,2 mL de clorofórmio, agitaram-se os tubos e os mesmos permaneceram mais 3 minutos a temperatura ambiente. Em seguida foram centrifugados a 12.000 g por 10 minutos a 4 °C.

Após, a mistura ficou separada em três partes no fundo do tubo: uma fase avermelhada (fenol mais clorofórmio), uma interfase, e uma fase aquosa superior. Esta fase superior foi transferida para um novo tubo, pois é nesta que está contida o RNA de interesse. Na sequência, adicionou-se 0,5 mL de álcool isopropílico, onde permaneceram por 10 minutos a temperatura ambiente, e após centrifugados a 12.000 g por 10 minutos a 4 °C.

O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 1 mL de etanol 75 % e, após homogeneização em agitador magnético e na centrifuga a 7.500 g por cinco minutos, o líquido residual foi retirado com auxílio de uma micropipeta e as amostras permaneceram em câmara de fluxo até secarem. Ao final, foram adicionados 30 μL de água DEPC 0,01 % autoclavada para dissolver o RNA. Homogeneizou-se em agitador magnético e as amostras ficaram *overnight* a - 80 °C.

No dia seguinte foi avaliada a integridade do RNA através do gel de agarose 1,5 % e mensurado a concentração e a pureza. Para o gel foram utilizados 2 μL de RNA mais 5 μL de tampão de carga (*Blue juice*) e como branco apenas água. A migração do RNA no gel de agarose foi feita sob tensão de 100 V por 60 minutos (Figura 4).

A concentração e pureza do RNA foram mensuradas em espectrofotômetro, NanoDrop ND-1000® (GE Healthcare™), nos comprimentos de onda de 230, 260, 280 e 320 nm. Para a avaliação da pureza, são observadas as relações entre as absorbâncias A260/280, que indicam possíveis contaminações com polissacarídeos ou polifenóis. Para considerar as amostras isentas de contaminação esses valores

devem se situar entre 2.1 e 1.8. Em relação à concentração, o valor obtido foi expresso em $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$.

2.2.3 Protocolo com Lítio

Foi macerado aproximadamente 250 mg de folhas jovens em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. Este pó foi transferido para microtubos de 2 mL onde adicionou-se 900 μL de tampão de extração previamente aquecido a 65 °C, homogeneizou-se em agitador magnético e os tubos foram incubados por 30 minutos a 65 °C, sendo que neste período foram feitas várias homogeneizações manuais.

As amostras permaneceram em temperatura ambiente até resfriar e na sequência foram adicionados 900 μL de clorofórmio isoamílico (24:1). As amostras foram centrifugadas a 16.000 g durante 15 minutos a 4 °C e ao retirar da centrífuga o sobrenadante foi transferido para um tubo novo e novamente centrifugado a 16.000 g por 15 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. O volume de clorofórmio isoamílico (24:1), deve ser igual ao volume de sobrenadante recuperado, nova centrifugação a 16.000 g por 10 minutos a 4 °C, transferir o sobrenadante novamente para um novo tubo e adicionar cloreto de Lítio em uma concentração final de 3 M, foi colocado 180 μL para 600 μL de sobrenadante que se recuperou. Foi misturado por inversão e os mesmos permaneceram precipitando a - 20 °C *overnight*.

No dia seguinte os tubos foram centrifugados a 21.000 g durante 30 minutos a 4 °C, e o sobrenadante descartado. O precipitado foi dissolvido em 500 μL de tampão TE mais SDS 1% e Cloreto de sódio 1 M, previamente aquecidos a 65 °C. Foi adicionado 500 μL de clorofórmio isoamílico (24:1) e centrifugado a 16.000 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado de 0,7 volumes de isopropanol e novamente centrifugada a 21.000 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 500 μL de etanol 75 % gelado, novamente foi centrifugado a 16.000 g por 10 minutos a 4 °C e, o sobrenadante descartado. Após as amostras atingirem a temperatura ambiente e secarem, o *pellet* foi dissolvido com 40 μL de água DEPC.

Após foi avaliada a integridade do RNA através do gel de agarose 1,5 % e mensurado a concentração e a pureza. Para o gel foram utilizados 2 μL de RNA mais 5 μL de tampão de carga (*Blue juice*) e como branco apenas água. A migração do RNA no gel de agarose foi feita sob tensão de 100 V por 60 minutos (Figura 4).

A concentração e pureza do RNA foram mensuradas em espectrofotômetro, NanoDrop ND-1000® (GE Healthcare™), nos comprimentos de onda de 230, 260, 280 e 320 nm. Para a avaliação da pureza, são observadas as relações entre as absorbâncias A260/280, que indicam possíveis contaminações com polissacarídeos ou polifenóis. Para considerar as amostras isentas de contaminação esses valores devem se situar entre 2.1 e 1.8. Em relação à concentração, o valor obtido foi expresso em $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$.

Ao final do processo de extração com os distintos protocolos, as amostras que apresentaram melhores resultados de concentração e razão A260/A280 nm foram encaminhadas para sequenciamento e para obtenção de RNA total íntegro (RIN) através de eletroferograma com o equipamento Bioanalyzer.

2.3 Variáveis analisadas

2.3.1 Quantificação de amarantina

Para a extração de amarantina foram utilizadas 125 mg de massa fresca, as quais foram maceradas em almofariz com tampão fosfato 10 mM, pH 6,0, acrescido de 10 mM de ascorbato de sódio. O homogeneizado foi filtrado em gaze e centrifugado a 10.000 g, por 20 minutos a 4 °C (GANDIA-HERRERO et al., 2005). A concentração de amarantina foi determinada levando-se em consideração o coeficiente de extinção molar $\epsilon = 56600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, em um comprimento de onda de 536 nm e o resultado foi expresso em mg de amarantina por 100 gramas de massa fresca.

2.3.2 Quantificação de betanidina e betanina

A extração da betanidina e betanina foi realizada com dois tipos diferentes de tampão extrator. Para betanidina foi utilizado tampão acetato de sódio 10 mM e metanol (70/30 %), e acrescido a essa solução, ascorbato de sódio numa concentração de 10 mM (pH 5,0) e para betanina a extração foi efetuada utilizando-se tampão fosfato de potássio 10 mM, acrescido de ascorbato de sódio 10 mM (pH 6,0), sem adição de solvente orgânico.

Para as duas análises foram utilizadas 125 mg de massa fresca, que foram maceradas em almofariz e o extrato filtrado em gaze e centrifugado a 10.000 g, por 20 minutos a 4 °C como descrito por Gandia-Herrero et al. (2005).

O coeficiente de extinção molar utilizada para o cálculo de betanidina foi de $\epsilon = 54000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e para betanina de $\epsilon = 65000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, em um comprimento de onda de 536 nm. Os resultados foram expressos em miligrama de betanidina em 100 gramas de massa fresca e miligramas de betanina em 100 gramas de massa fresca. As leituras foram feitas em espectrofotômetro UV/VIS modelo Ultrospec 7000 - GE Healthcare.

2.3.3 Quantificação de betaxantinas

Para a extração de betaxantinas foram utilizadas 125 mg de massa fresca, as quais foram maceradas em almofariz com tampão fosfato 10 mM, pH 6,0, acrescido 10 mM de ascorbato de sódio. O homogeneizado foi filtrado em gaze e centrifugado a 10.000 g, por 20 minutos, a 4 °C (GANDIA-HERRERO et al., 2005). A concentração de betaxantina foi determinada levando-se em consideração o coeficiente de extinção molar para miraxantina $\epsilon = 48000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, em um comprimento de onda de 480 nm e o resultado foi expresso em mg de miraxantina por 100 gramas de massa fresca.

2.3.4 Análises de flavonoides totais

A concentração de flavonoides totais foi determinada em 125 mg de massa fresca e a extração foi feita utilizando-se como tampão extrator acetato/metanol. Foi

realizada espectrofotometria de varredura, na faixa de 230 a 800 nm, para identificação do comprimento de onda mais adequado para o método, através do qual plotou-se a curva de calibração padrão, que variou entre 0,1 a 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de quercetina, em tampão acetato/metanol (70/30 %, v/v), possibilitando o cálculo das concentrações de flavonoides nas amostras que foram computadas e expressas em μmol de quercetina por grama de massa fresca. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro, em 330 nm.

2.3.5 Análise de Clorofilas *a*, *b* e total

A análise de clorofilas foi realizada utilizando-se 150 mg de parte aérea macerada em gral com auxílio de 5 mL de acetona 80 % refrigerada, após maceração a amostra passou por filtração em papel filtro e as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 645 e 663 nanômetros. Para cálculo da quantidade de clorofila *a* e *b* e clorofila total, empregou-se as seguintes equações: Clorofila *a* = $(12,25 A_{663}) - (2,79 A_{645})$; Clorofila *b* = $(21,50 A_{663}) - (5,10 A_{665})$; Clorofila total = $(7,15 A_{663}) + (18,71 A_{645})$, conforme Moraes et al. (2012).

2.3.6 Índice de clorofila, flavonoides, e índice de balanço do nitrogênio (IBN)

O índice de clorofila (Chl), flavonoides (Flv) e índice de balanço de nitrogênio (NBI) foram aferidos com auxílio de clorofilômetro (modelo Dualex FORCE-A, Orsay, France), a partir da média das leituras das quatro plantas em cada repetição. O índice de Flv foi deduzido a partir de propriedades de absorção UV de flavonoides. Esta abordagem está relacionada à técnica de fluorescência utilizando dois comprimentos de onda de excitação: no comprimento de onda de UV (375 nm), absorvido por flavonoides, localizado principalmente na epiderme, sem ser absorvido antes de atingir a clorofila no mesofilo. A relação entre Chl/Flv permite a estimativa do índice de IBN, quando uma planta está sob condições ótimas (1), ela favorece o metabolismo primário e a síntese de proteínas (moléculas contendo nitrogênio) contendo clorofila e de alguns flavonoides (compostos secundários baseados em carbono). Ao contrário, no caso de deficiência de nitrogênio, a planta direciona seu metabolismo para uma produção elevada de flavonoides (ABDALLAH, 2012).

2.4 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro por meio do Programa Estatístico Winstat 1.0 (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2007).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 RNA

Após avaliação dos géis e da razão de absorbância A260/280 e da concentração do RNA, foi possível observar que o protocolo mais eficiente para extração de RNA desta espécie, foi o que utilizou o reagente concert *PureLink*, já que neste protocolo os resultados de concentração foram mais próximos a 500 ng μL^{-1} , número este considerado satisfatório, segundo Nagashima et al. (2013), e a razão de A260/280 foi de 1,92 até 2,02.

O isolamento de quantidade suficiente de ácidos nucleicos é um pré-requisito para a condução de estudos analíticos de genética, biologia molecular e outras investigações fisiológicas que ocorrem nas plantas (HU et al., 2010).

O protocolo que utilizou o Lítio não teve formação de *pellet* e consequentemente não apareceram bandas no gel de agarose, por isso o mesmo não aparece na figura 4, o que indicou ausência de ácidos nucleicos na amostra. Já o protocolo com Trizol teve como concentração média de RNA 200 ng μL^{-1} e razão A260/280 1,56, número considerado baixo segundo Brasileiro; Carneiro (1998). Ainda segundo estes autores esta razão pode ser explicada pela presença de contaminantes como fenóis ou de pigmentos, como é o caso da *A. sessilis*.

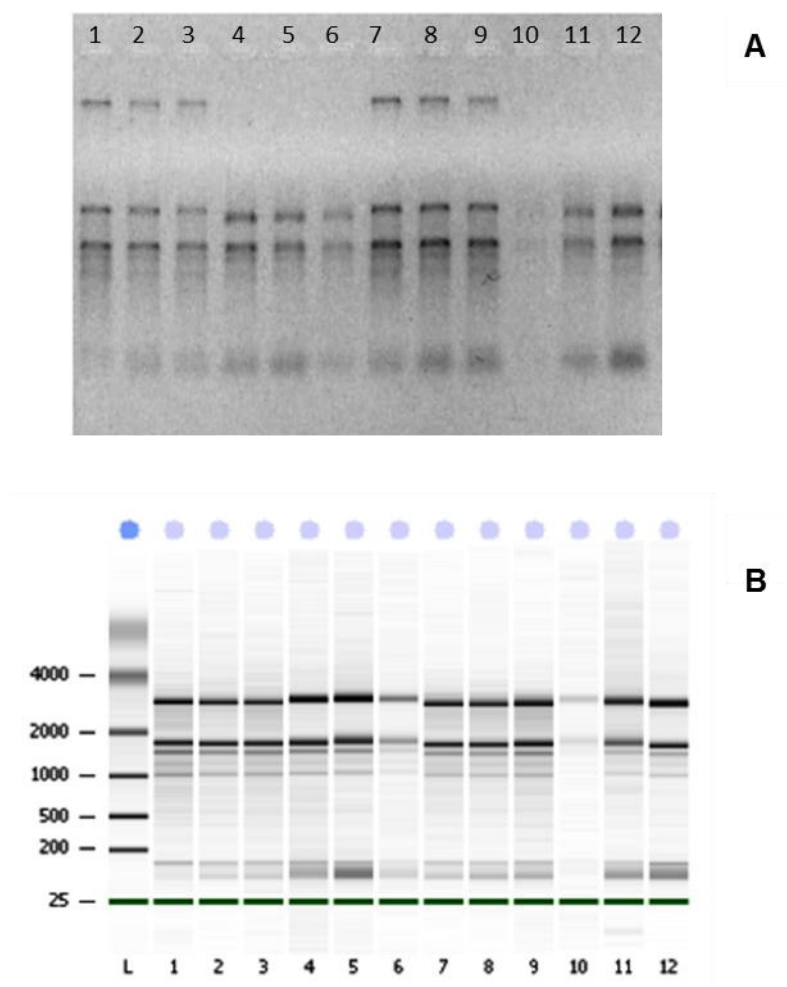


Figura 4 - Gel de RNA total obtido de plantas de *Alternanthera sessilis* obtidas do cultivo *in vitro* e mantidas em hidroponia na presença de Metiljasmonato (MeJa) na concentração de 0 (controle) e 100 μ M por 48 horas com diferentes protocolos de extração (A); Representação do gel de RNA obtido pelo BioAnalyzer (B). 1-2-3- Controle – PureLink; 4-5-6- Controle Trizol; 7-8-9- Plantas elicidadas com MeJa – PureLink; 10-11-12- Plantas elicidadas com MeJa - Trizol. Cada amostra foi feita em triplicata.

Os resultados diferem de Li et al. (2015)^b que, estudando a transcrição de genes sob condições de déficit de potássio em *Alternanthera philoxeroides*, utilizaram o reagente Trizol para a extração de RNA total, bem como Casique-Arroyo et al. (2014) que fizeram uso deste mesmo reagente para extração do RNA de *Amaranthus hypochondriacus*, ambas espécies filogeneticamente próximas a *A. sessilis*, porém menos pigmentadas que a espécie em estudo.

Nagashima et al. (2013) e Mertz et al. (2009) obtiveram melhores resultados de extração de RNA em seus estudos com o reagente *PureLink*, que é o mais indicado para extração de amostras com altas concentrações de polifenóis e como

demonstrado neste trabalho o mais indicado para espécies com grande quantidade de pigmento.

Após a extração o RNA das plantas cultivadas *in vitro*, que apresentaram melhores resultados nos géis de agarose, concentração e razão de A260/280nm foram enviados para sequenciamento (RNA seq). O sequenciamento do RNA permitirá um conhecimento mais preciso dos genes que atuam na rota de biossíntese das betalaínas, possibilitando, desta forma, uma manipulação no sentido de incrementar a obtenção dos metabólitos de interesse. Os resultados do sequenciamento não são demonstrados neste trabalho. A amostra *in vitro* foi escolhida em razão da necessidade de se conhecer mais sobre as possíveis alterações que este tipo de cultivo associado a uma elicitación, pode acarretar na transcrição gnômica.

A figura 5 mostra os eletroferogramas, que é um gráfico representativo dos dados genéticos das amostras, através dos quais, é possível se obter a quantidade de RNA íntegro (RIN) presente, bem como avaliar possíveis problemas no sequenciamento, quando há pico sobreposto ou ausência deles. Este eletroferograma é obtido pelo mesmo equipamento que realiza a leitura do sequenciamento do RNA e o processa.

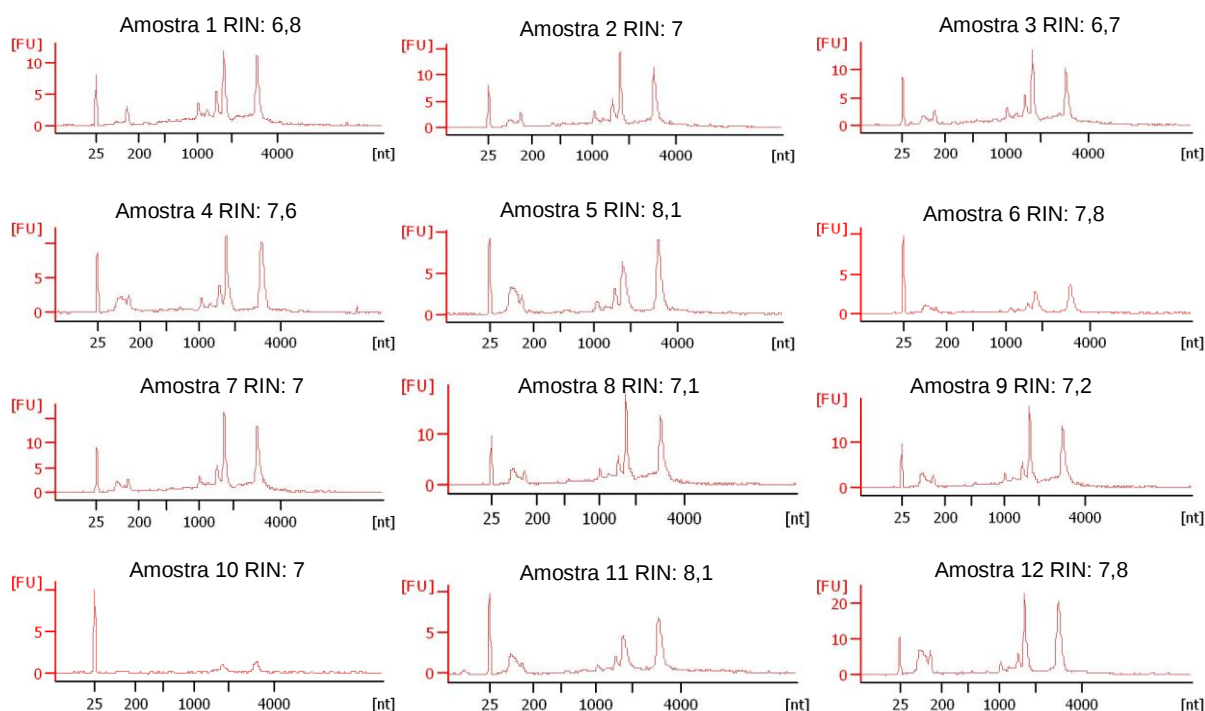


Figura 5 - Eletroferograma das amostras de RNA, indicando os valores respectivos de RNA Total Íntegro (RIN), e os picos. 1-2-3- Controle – *PureLink*; 4-5-6- Controle - Trizol; 7-8-9- Plantas elicidadas com MeJa – *PureLink*; 10-11-12- Plantas elicidadas com MeJa - Trizol.

De acordo com Li et al. (2014) o valor de referência para RNA totalmente íntegro é 10 e para RNA degradado é 2. Os valores de RIN para as amostras variaram entre 6,7 a 8,1 e não houve sobreposição de picos, indicando que é possível fazer o sequenciamento deste material para posterior avaliação das sequências.

3.2 Quantificação das variáveis

Após a extração de RNA, foi realizada a extração para a quantificação de betalaínas e flavonoides. Conforme descrito por Gandia-Herrera et al. (2007), as betalaínas sofrem degradação pela ação da luz e do pH, por isso que para a extração e quantificação destes pigmentos foi utilizado tampões adequados e a extração foi feita ao abrigo da luz e as amostras protegidas em papel alumínio até quantificação.

Em razão desta baixa estabilidade das betalaínas, estudos têm sido feitos com o intuito de aumentar a vida útil destes pigmentos, sendo que a substância que apresentou melhores resultados até o momento foi o ácido ascórbico, por isso o uso do mesmo no processo de extração para quantificação (KHAN; GIRIDHAR, 2014).

O MeJa é um regulador de crescimento endógeno associado à inibição do crescimento e envelhecimento celular, e muito utilizado em processos de elicitação em plantas (PEROTTI et al., 2010; LAMBERT et al., 2011; CHEN et al., 2015; DANAEE et al., 2015). Segundo Gharechahi et al. (2013) a aplicação exógena de MeJa resulta em um estresse oxidativo na planta, ocorrendo assim a ativação das rotas de biossíntese dos compostos antioxidantes, porém o contato dele por longo períodos pode causar toxidez na planta, prejudicando o crescimento e desenvolvimento da planta, bem como prejudicar o acúmulo de moléculas de interesse, principalmente em sistemas fechados, como em frascos de cultivo *in vitro* (BHUIYAN; ADACHI, 2003).

Uma alternativa para amenizar este tipo de problema na estratégia de elicitação de betacianinas, através do MeJa, é o sistema de hidroponia com raízes flutuantes em plantas inteiras, como o utilizado por Kleinowski (2015) e empregado neste trabalho.

Abeyasinghe et al. (2014) constataram que plantas de *Acmella oleracea* cultivadas sob sistema hidropônico apresentaram aumento de metabólitos secundários.

A análise referente à quantificação de amarantina demonstrou que a interação entre o MeJa e o pré-cultivo não alterou significativamente este parâmetro, porém plantas oriundas de cultivo *ex vitro*, isoladamente, apresentaram uma quantidade média de 80,59 mg de amarantina por 100 gramas de massa fresca, quantidade significativamente maior que de plantas oriundas do cultivo *in vitro*, que apresentaram média de 69,11 mg de amarantina por 100 g de massa fresca (Figura 6).

A concentração de amarantina encontrada neste trabalho está de acordo com o encontrado por Kleinowski (2015), que ao avaliar os compostos presentes em outras espécies do gênero *Alternanthera* por cromatografia líquida de alta eficiência, obteve resultados semelhantes, bem como Reis et al. (2015).

Perotti et al. (2010), testou diferentes concentrações (0; 0,01; 0,1; 1; 10; e 100 µM) de MeJa em plantas de *A. philoxeroides* cultivadas *in vitro*, por 35 dias e

constatou que a concentração de 100 μM foi capaz de quadruplicar os teores deste pigmento em caules desta espécie, o que não foi observado neste trabalho.

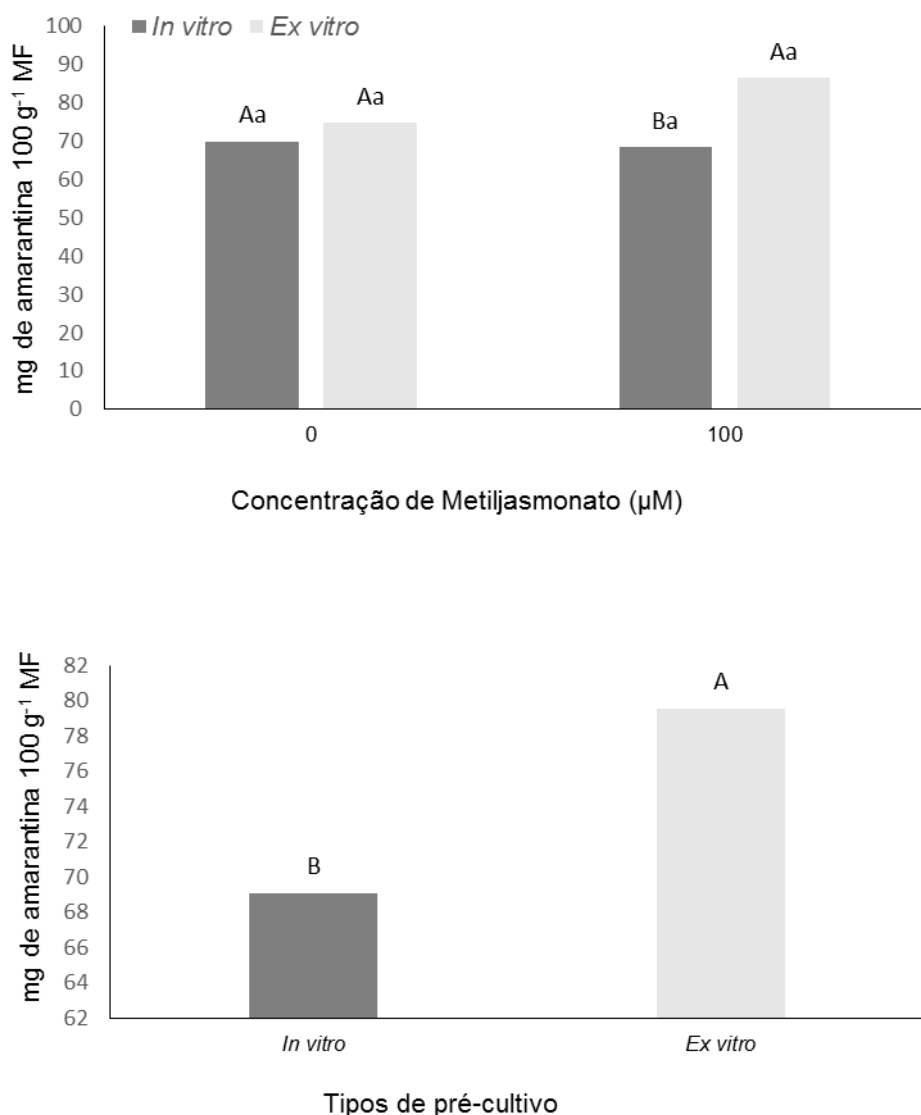


Figura 6 - Teor de amarantina presente na parte aérea de plantas de *Alternanthera sessilis* oriundas do cultivo, *in vitro* e *ex vitro*, e mantidas em hidroponia na presença de Metiljasmonato (MeJa), na concentração de 0 (controle) e 100 μM , por 48 horas. Médias seguidas por letras maiúsculas distintas diferem entre si em relação ao tipo de origem de cultivo, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0.05$).

Através da análise de variância foi possível observar que os valores obtidos para a betanina apresentaram diferença significativa em relação ao tipo de cultivo e não em relação à presença do elicitor (Figura 7). Plantas oriundas do cultivo *in vitro*

apresentaram média de 27, 79 mg de betanina por 100 g de massa fresca enquanto as oriundas do cultivo *ex vitro* apresentaram 32,39 mg de betanina por 100 g de massa fresca.

Este resultado difere de Reis et al. (2015) que obteve valores próximos a 60 mg de betanina por 100 g de massa fresca em plantas de *A. sessilis* oriundas de cultivo *in vitro*.

Nos teores de betanina e amarantina, segundo a avaliação estatística, o elicitor não foi capaz de alterar significativamente as concentrações deste composto.

Segundo Shin et al. (2013), embora o cultivo *in vitro* ofereça uma série de vantagens, como rápida multiplicação independente da sazonalidade, plantas desprovidas de contaminantes, plantas homogêneas geneticamente, não se pode negar que existam algumas questões que prejudicam quando a mesma sai da condição *in vitro* para a aclimação, como a baixa concentração de CO₂ nos frascos, baixa densidade de fluxo de fótons, que podem levar a alterações morfológicas e fisiológicas na planta, que poderia explicar a quantidade menor de parâmetros como os de betanina em plantas oriundas deste tipo de cultivo.

Embora o sistema de hidroponia ofereça vantagens em relação à captação de nutrientes, plantas *in vitro* apresentam algumas características morfológicas distintas as plantas *ex vitro* que podem afetar os processos metabólicos da planta, prejudicando a biossíntese de alguns compostos (PRASAD et al., 2012).

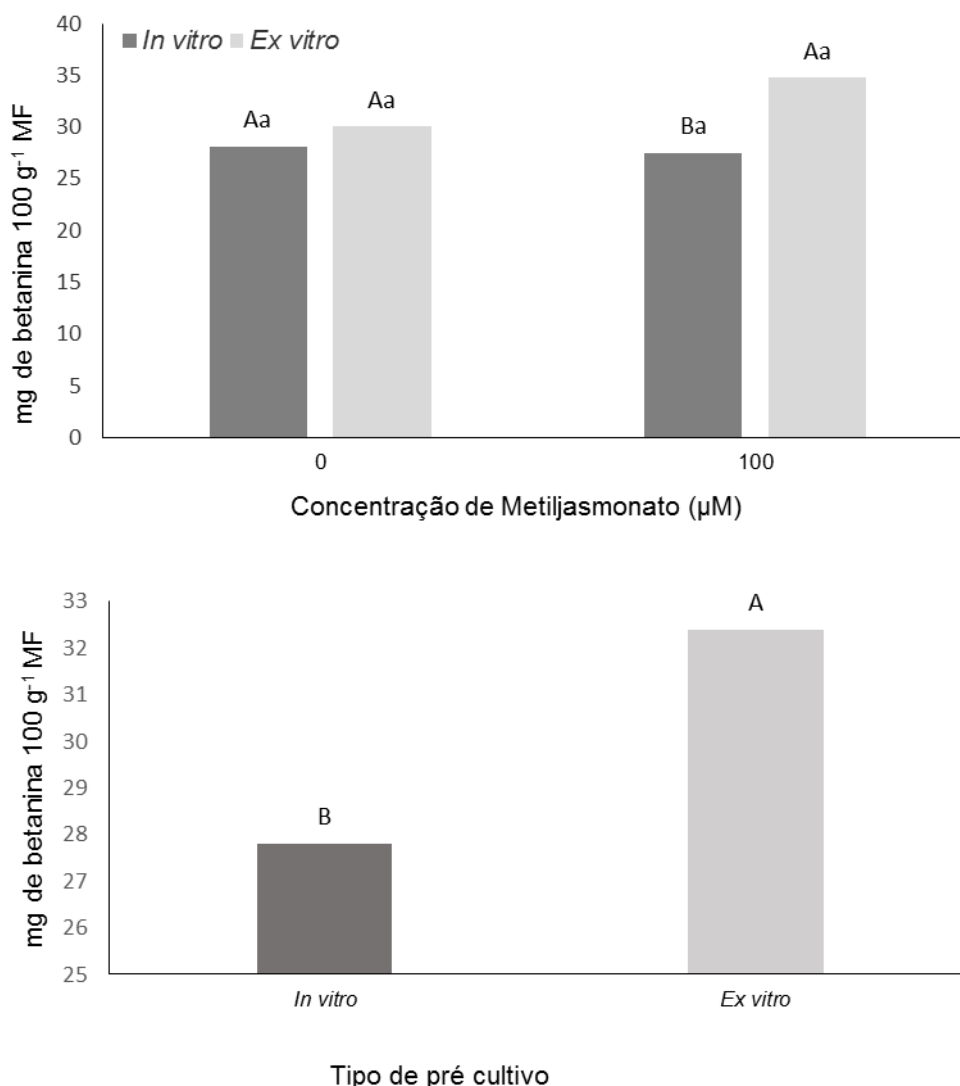


Figura 7 - Teor de betanina presente na parte aérea de plantas de *Alternanthera sessilis* oriundas do cultivo, *in vitro* e *ex vitro*, e mantidas em hidroponia na presença de Metiljasmonato (MeJa), na concentração de 0 (controle) e 100 µM, por 48 horas. Médias seguidas por letras maiúsculas distintas diferem entre si em relação ao tipo de cultivo de origem de acordo com o teste de Tukey ($p < 0.05$).

Com relação à betanidina e betaxantina, a elicitação e o tipo de cultivo, não foram capazes de alterar significativamente estes compostos (Figura 8).

A média de betanidina foi de 24,36 mg de betanidina por 100 g de massa fresca em plantas de cultivo *in vitro* e 25,68 mg de betanidina por 100 g de massa fresca em *ex vitro*. Para betaxantina os valores obtidos foram de 12,03 mg de miraxantina por 100 g de massa fresca em plantas de cultivo *in vitro* e 12,16 mg de miraxantina por 100 g de massa fresca em *ex vitro*. As médias totais estão indicadas na tabela 1.

Estes valores são inferiores aos encontrados por Reis et al. (2015), que obtiveram médias de 36 mg de betanidina por 100 g de massa fresca e 20 mg de miraxantina por 100 g de massa fresca, em plantas de cultivo *in vitro* desta espécie. Entretanto, os resultados obtidos para estes parâmetros foram semelhantes aos encontrados por Klein (2014) que obteve valores médios de 27 mg de betanidina 100 g⁻¹ MF e 10 mg de miraxantina 100 g⁻¹ MF em plantas controle do estudo de avaliação de elicitação por radiação em plantas desta espécie.

O teor de flavonoides presente nas plantas também não foi alterado significativamente perante os tratamentos, como mostra tabela 1 e figura 8. A diferença entre a concentração de plantas *in vitro* e *ex vitro* foi de 0,3 µmol de quercetina por 100 g de massa fresca.

Castro et al. (2016) observaram um maior índice de compostos fenólicos em calos de *Byrsonima verbascifolia* em comparação às plantas oriundas do cultivo *ex vitro*. Estes resultados também foram obtidos por Al-Jibouri et al. (2016), em que através da elicitação com uso dos aminoácidos prolina, glutamina, triptofano e fenilalanina, obtiveram uma concentração bem maior em calos oriundos de *Verbascum thapsus*, do que na planta mãe.

A Ordem a qual pertence esta família não produz antocianinas, o que nos leva a concluir que a produção de flavonoides também possa ser prejudicada, já que a rota metabólica de biossíntese das mesmas é feita a partir do aminoácido fenilalanina (Gandia-Herrero et al., 2005).

Kleinowski (2015), avaliando os diferentes compostos presentes em espécies do gênero *Alternanthera*, não detectou a presença de flavonoides em análise cromatográfica.

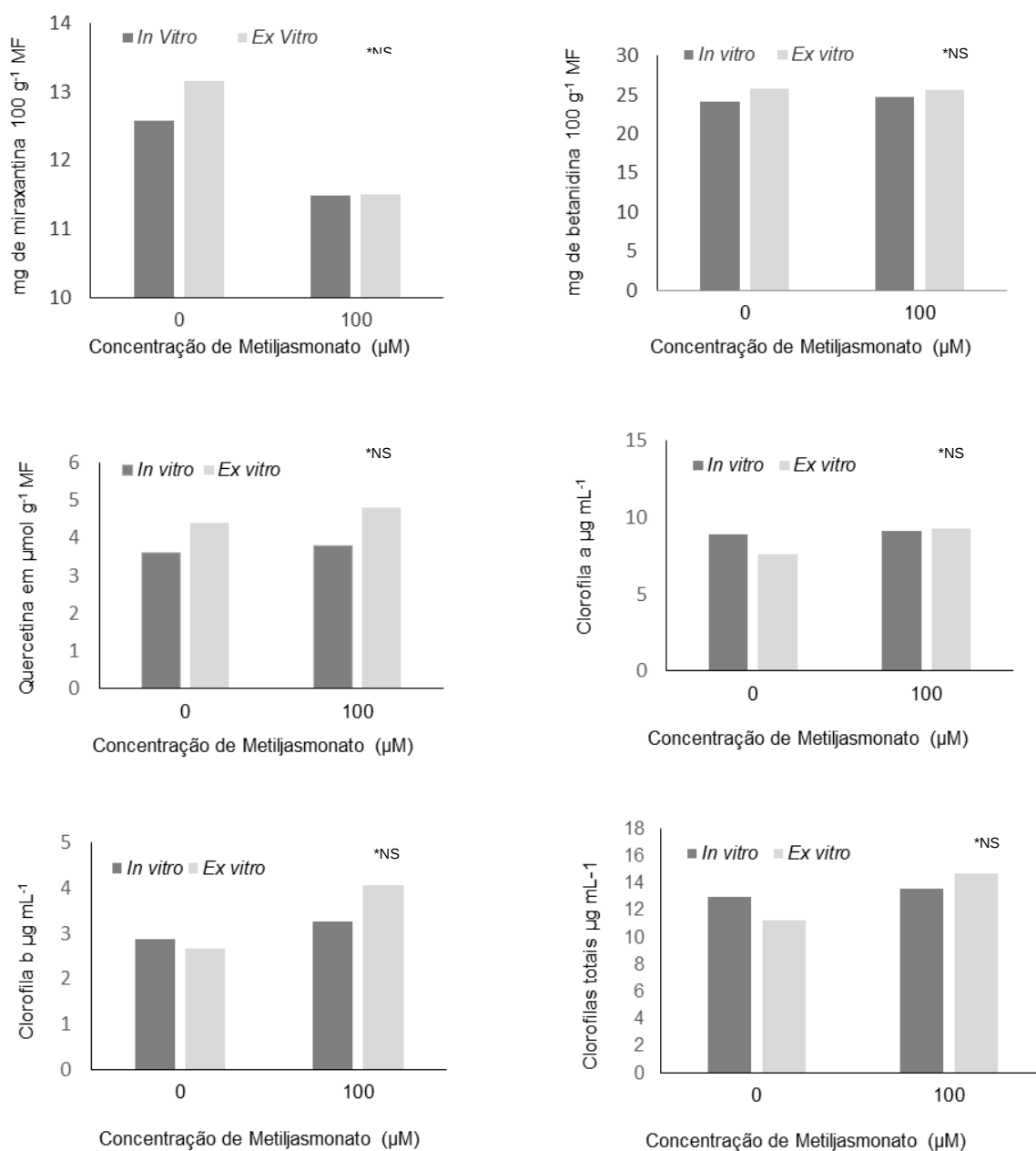


Figura 8 - Teor de miraxantina, betanidina, quercetina, clorofila *a*, *b* e total, presente na parte aérea de plantas de *Alternanthera sessilis* oriundas do cultivo, *in vitro* e *ex vitro*, e mantidas em hidroponia na presença de Metiljasmonato (MeJa), na concentração de 0 (controle) e 100 μM , por 48 horas. * NS: Não significativo.

Plantas oriundas de cultivo *in vitro* podem sofrer alterações em razão do sombreamento e qualidade da luz o que pode afetar a capacidade fotossintética da mesma, alterando seu metabolismo. De acordo com Karpinski et al. (2013), alterações na intensidade e qualidade da luz afetam a homeostase da planta que

desencadeia uma série de reações do sistema imune e com isso alteraria a produção dos metabólitos secundários, não sendo possível confirmar se a planta *in vitro* seria mais eficiente na produção de metabólitos em razão de elicitação ou pelo prejuízo de seu fotossistema.

Os resultados para quantificação das clorofilas *a*, *b* e totais (Tabela 1 e Figura 8), não mostraram diferenças significativas em relação ao tipo de cultivo e elicitação, demonstrando que a capacidade fotossintética das mesmas não foram afetadas. Segundo Martinazzo et al. (2007), estes são os mais importantes pigmentos que absorvem luz nas membranas dos tilacóides, sendo um dos fatores ligados à eficiência fotossintética de plantas, ao crescimento e adaptabilidade a diversos ambientes. A combinação das clorofilas (*a* e *b*) e dos pigmentos acessórios capacita as plantas a captarem a maior parte de energia disponível da luz solar. A molécula de clorofila presente nos cloroplastos absorve essa energia, ativando o sistema fotossintético (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Tabela 1 - Média geral dos parâmetros avaliados em plantas de *Alternanthera sessilis*, oriundas do cultivo, *in vitro* e *ex vitro*, e mantidas em hidroponia na presença de Metiljasmonato (MeJa), na concentração de 0 (controle) e 100 µM, por 48 horas

PARÂMETROS	MÉDIA GERAL*	UNIDADE DE MEDIDA
Betaxantina	12,18	mg de miraxantina 100 g ⁻¹ MF
Betanidina	25,02	mg de betanidina 100 g ⁻¹ MF
Flavonoides	4,15	µmol de quercetina 100 g ⁻¹ MF
Clorofila a	8,71	µg mL ⁻¹
Clorofila b	3,21	µg mL ⁻¹
Clorofila total	13,11	µg mL ⁻¹

*A média geral leva em consideração a soma dos valores obtidos isolados das plantas *ex vitro* e *in vitro* que não tiveram diferenças significativas.

De acordo com Moreira et al. (2011), o índice de balanço de nitrogênio permite avaliar o estado nutricional da planta. De acordo com os resultados mostrados na figura 9 é possível observar que os tratamentos apresentaram valores próximos em todas as variáveis, fato este considerado de extrema importância para a avaliação dos resultados, já que se o estado nutricional ou o prejuízo do sistema fotossintético fossem discrepantes o experimento poderia ser inviabilizado.

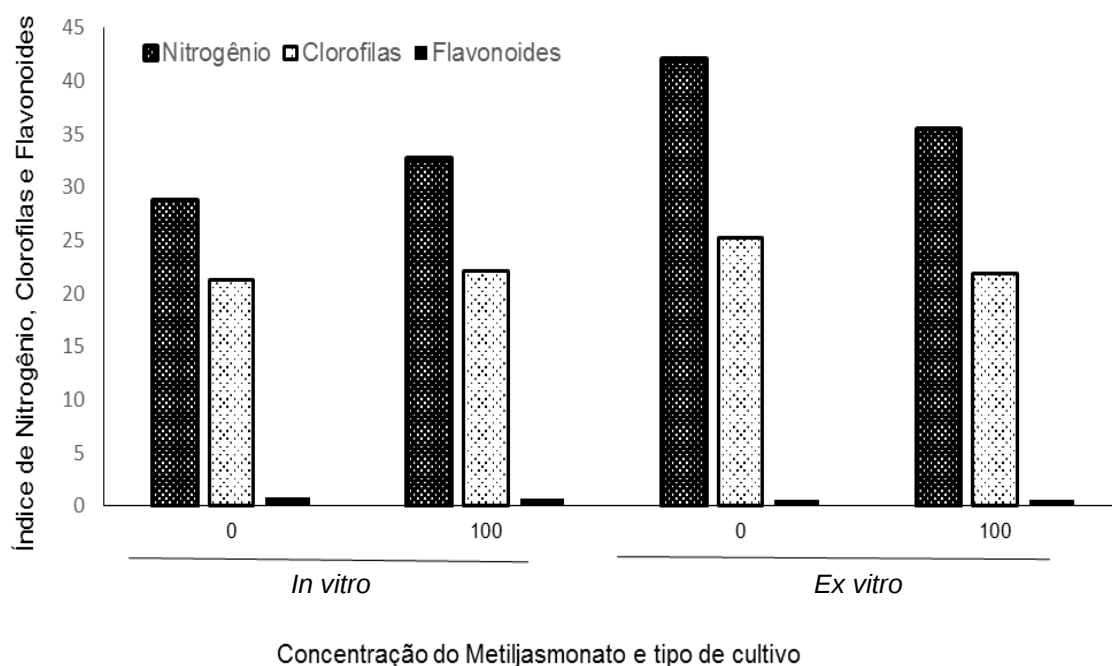


Figura 9 - Índice de balanço de nitrogênio, clorofilas e flavonoides de plantas de *Alternanthera sessilis* oriundas do cultivo, *in vitro* e *ex vitro*, e mantidas em hidroponia na presença de Metiljasmonato (MeJa), na concentração de 0 (ausência) e 100 μM , por 48 horas.

Todos os resultados demonstraram que a eliciação não foi capaz de alterar significativamente os parâmetros avaliados neste experimento. A escolha da concentração do elicitador foi realizada com base em estudos anteriores que indicam que a concentração de 100 μM de MeJa potencializa rotas do metabolismo secundário, como o observado por Cao et al. (2012).

Kleinowski (2015), em experimentos de hidroponia com espécies do gênero *Alternanthera*, também utilizou esta concentração e obteve incremento nos teores de amarantina.

Segundo Chen et al. (2015) a concentração de 100 μM de MeJa é a mais utilizada para induzir a produção de metabólitos secundários, porém a resposta em relação a esta concentração varia conforme o órgão exposto, bem como o tempo. Concentrações entre 100 e 200 μM de MeJa também se mostraram mais eficientes no aumento dos níveis de expressão de genes da rota de produção de tanshinone em 48 horas após a aplicação em cultivo *in vitro* de raízes de *Salvia castenea* (LI et al., 2015)^a.

Kim et al. (2011) constataram que no tratamento de raízes de *Bupleurum falcatum* com 5 e 20 μM de MeJa por 24 horas e 96 horas, não houve uma expressão significativa dos genes responsáveis pela biossíntese de triterpenos e fitoesterol. O mesmo pode ter ocorrido para este experimento, em relação aos compostos avaliados, sendo necessário um tempo maior de elicitação para ativar a expressão de genes e consequente síntese das betalaínas.

Lambert et al. (2011) citaram vários trabalhos que utilizaram o MeJa como elicitor para incremento da produção de saponinas e observaram que o incremento em relação ao tempo de exposição depende de onde o elicitor foi colocado, em folhas a resposta nos níveis chegou a 36 dias, já em raízes foi de 24 horas.

Para melhor compreender estas alterações no metabolismo da planta e como fatores externos podem atuar na mesma é fundamental o conhecimento dos transcritos, já que desta forma se pode avaliar quais enzimas são mais ou menos atuantes, o que está sendo expresso e como se pode otimizar a produção de determinada rota de interesse, justificando a necessidade da continuação deste trabalho.

Em algumas espécies a expressão da enzima CYP76AD1, que está ligada a formação do ciclo-DOPA, precursor de betanina e betanidina é menor. Poucos estudos com relação à bioinformática, com a finalidade de identificar características como, identidade de sequências, estrutura, localização e regulação das enzimas da rota das betalaínas, foram publicadas (KHAN; GIRIDHAR, 2015).

A metilação do DNA ou o rearranjo de genes desempenha um papel chave na biossíntese de betalaínas em células cultivadas, estudos demonstram que reguladores sintéticos como 2,4 D e citocinina podem ocasionar estas mudanças afetando a rota de forma a aumentar a produção de betalaínas, já o AIA está associado à diminuição. Betalaínas e AIA competem por transdução de sinal, pois segundo Khan; Giridhar (2015), as betalaínas inibem a enzima AIA oxidase, já o 2,4 D aumenta a expressão da tirosina e com isso pode aumentar a síntese.

A expressão das enzimas tirosina hidroxilase e DOPA dioxigenase e sua regulação, frente aos estresses bióticos e abióticos ainda precisa ser melhor elucidada (HATLESTAD et al., 2015).

Estudos de expressão gênica em calos de *Saueda salsa* forneceram evidências de que a regulação da rota pode ser alterada por estresse ambiental, eles detectaram um aumento da concentração de betalaínas em resposta à

aplicação exógena de reguladores de crescimento, e este aumento foi correlacionado ao aumento de transcritos (ZHAO et al., 2011).

Segundo Bonaldo et al. (2005) a ativação de mecanismos de defesa e consequente alteração no metabolismo vegetal está relacionada a respostas pelo tratamento com elicitores, porém esta alteração é dependente do tempo do tratamento com o indutor. Namdeo (2007), em seus estudos com *Catharanthus roseus*, demonstrou que a elicitação por 48 horas foi a que apresentou incremento nos alcaloides, e que em 96 horas houve decréscimo em relação ao controle.

Hammond-kosak; Jones (2000) relataram que o tratamento de plantas com elicitores desencadeia a ativação da transcrição de genes relacionados à defesa da planta, abertura de canais de íons, modificação de fosforilação de proteínas e ativação de enzimas pré-formadas que irão realizar modificações nos metabolismos primários e secundários.

Espera-se que a elicitação gere uma reprogramação transcricional que culmine em alterações metabólicas favoráveis ao incremento das betalaínas. No entanto, acredita-se que a expressão de genes pode ter sido influenciada pelo tempo de elicitação, porém não houve tempo hábil na formação das moléculas em estudo e com isso os parâmetros não foram alterados significativamente. Os dados sobre expressão só poderão ser discutidos após a obtenção da biblioteca de RNA.

Observou-se que no tempo de 48 horas de elicitação não houve alterações significativas nos parâmetros avaliados neste trabalho, porém em relação ao tipo de pré-cultivo, plantas que não passaram pelo cultivo *in vitro*, tiveram alteração significativa nos teores de amarantina e betanina, conforme demonstra as figuras 6 e 7, respectivamente.

4 CONCLUSÃO

A elicitação por metiljasmonato em sistema de hidroponia pelo período de 48 horas em plantas de *A. sessilis* oriundas de cultivo *in vitro* e *ex vitro*, não foi capaz de alterar a produção de betalaínas e flavonoides. A análise dos transcritos permitirá uma avaliação mais detalhada desta rota de biossíntese, possibilitando avaliar diferentes metodologias para a otimização da produção dos metabólitos de interesse.

CAPÍTULO II

PRODUÇÃO DE BETALAÍNAS E FLAVONOIDES EM CALOS DE *Alternanthera sessilis* SOB DIFERENTES QUALIDADES DE LUZES

1 INTRODUÇÃO

A suplementação do meio de cultivo com reguladores de crescimento é um dos principais fatores que interferem a micropropagação. O BAP (6-benzilaminopurina) e CIN (Cinetina) têm sido as fontes de citocininas mais utilizadas, pois são fitohormônios associados ao crescimento e desenvolvimento das plantas, participando no controle da divisão celular (ASAMAR et al., 2011; KAKANI et al., 2011).

Outro regulador sintético muito utilizado na cultura de tecidos é a auxina, sendo um dos representantes o Ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4 D), cujo propósito de seu uso é o alongamento celular, a expansão dos tecidos e divisão celular (formação de calo) (MORAIS, 2012).

A concentração dos diferentes tipos de reguladores e o tipo de meio de cultura permite um significativo aumento na produção de biomassa e no acúmulo de metabólitos secundários (RODRIGUÉZ-SAHAGÚN et al., 2012; CARVALHO, 2013).

A cultura de células de plantas e de calos é uma importante estratégia para bioprospecção de produtos naturais (SALVADOR et al., 2009). As culturas de calos consistem em células vegetais com certo grau de diferenciação, que podem ser induzidas em resposta a estímulos organogénéticos, utilizando distintos reguladores de crescimento e condições ambientais e, em geral, apresentam forma e tamanhos variados e paredes celulares com certo grau de espessamento (CARVALHO et al., 2011).

Nos primórdios da biologia vegetal, o termo calo era utilizado para se referir a um acúmulo de células, resultante de ferimentos. Atualmente, a mesma palavra é usada de forma mais ampla para designar uma massa celular desorganizada (IKECUCHI; SUGIMOTO; IKKAIKEUCHI, 2013).

O processo de indução de calos envolve grandes mudanças na expressão de genes por alterar o nível de diferenciação celular e desdiferenciação (TARIQ et al., 2014).

A luz é um dos fatores ambientais mais importantes para as plantas, é fonte energética e afeta o crescimento e o desenvolvimento da mesma, no entanto o excesso de luz pode resultar no acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs). Este acúmulo de EROs gera desordens na planta, podendo levá-la à morte desta forma, as plantas evoluíram e desenvolveram mecanismos de proteção, como os pigmentos (antocianinas, carotenoides, betalaínas) (CHEN et al., 2013).

Desde antes de Cristo há relatos de normas para coleta de material vegetal em relação ao período do dia ou estação do ano, indicando que os antigos já tinham conhecimento de que havia uma interação entre os fatores externos e os processos fisiológicos e bioquímicos das plantas capazes de alterar a quantidade do metabólito de interesse (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Estresses abióticos, como radiação, seca e hipóxia, estão associados a um incremento no conteúdo de amaranina nas plantas, embora ainda tenham mais estudos associados às antocianinas e carotenoides, assim, acredita-se que este pigmento também esteja associado à proteção das células vegetais sob tais condições (CHEN et al., 2013).

A iluminação afeta na acumulação de metabólitos secundários, uma vez que em excesso causa estresse na planta e ativa os sistemas antioxidantes para proteger a planta contra a ação de espécies reativas de oxigênio que podem levar a planta à morte. Dentre os antioxidantes, podemos citar compostos fenólicos, flavonoides e as betalaínas. O sistema de proteção antioxidante pode ser enzimático e não enzimático, sendo que eles funcionam em conjunto para proteção da planta (TARIQ et al., 2014).

Tariq et al. (2014) reforçam que, deste modo, o cultivo *in vitro* pode incrementar os níveis de antioxidantes, uma vez que é possível controlar a fonte luminosa e com isso estimular a planta a produzir metabólitos secundários.

As principais vantagens da produção dos metabólitos secundários em cultura de tecidos incluem a restrição da sazonalidade, confiabilidade e previsibilidade da produção e isolamento mais rápido e eficiente do composto alvo (GONÇALVES; ROMANO, 2013).

A crescente demanda por produtos naturais faz com que o cultivo *in vitro* continue sendo uma estratégia de estudo de acumulação de metabólitos de interesse, junto com a biotecnologia permite que sejam feitas alterações no metabolismo e na genética da planta, para tentar otimizar a produção (CHAWLA et al., 2002; GONÇALVES; ROMANO, 2013).

Morfina, codeína, digoxina, colchicina são alguns dos exemplos de compostos extraídos das plantas que até hoje movimentam o mercado bilionário farmacêutico e por vezes as substâncias sintéticas não apresentaram a mesma eficácia e especificidade, por isso, pesquisas com produtos naturais vem ganhando cada vez mais destaque (NAMDEO, 2007).

Outro exemplo que vem recebendo destaque no mercado farmacêutico são as betalaínas, pigmentos naturais derivados da Tirosina e que estão presentes em plantas da ordem Caryophyllales (GANDIA-HERRERO et al., 2005).

Dentro desta ordem se destaca, como grande produtora de betalaínas, a família Amaranthaceae e dentro desta, espécies do gênero *Alternanthera* como a *Alternanthera sessilis* (TOMEI, 2008).

A preferência pelo uso de pigmentos oriundos dos vegetais como colorantes naturais, na formulação de alimentos e medicamentos, aumentou muito devido à desconfiança dos consumidores para com os corantes fabricados sinteticamente, além de uma clara preferência da população pelos possíveis benefícios dos produtos naturais (SAKUTA, 2014).

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi utilizar o cultivo *in vitro* para a produção de calos de *Alternanthera sessilis* crescidos sob diferentes combinações de reguladores de crescimento e qualidades de luz, com a finalidade de avaliar se estes fatores são capazes de incrementar a produção de betalaínas.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do material vegetal

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas pertencente ao Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), no município do Capão do Leão/RS.

Inicialmente, foram coletados ramos de *A. sessilis* das plantas matrizes, cultivadas na casa de vegetação, que continham gemas axilares, para realizar microestaquia em vermiculita com a finalidade de obter novas plantas com índice menor de contaminação. Após aproximadamente 30 dias, foram escolhidas as plantas que apresentaram maior formação de brotos para realizar a micropropagação.

Para iniciar a micropropagação, microestacas das plantas oriundas da vermiculita foram previamente desinfestadas, através da lavagem com detergente comercial, enxague com água em abundância e cinco lavagens em água destilada. Após, na capela de fluxo laminar, as microestacas foram desinfestadas com uma lavagem com água destilada e três gotas de tween® por 15 minutos em seguida foi realizada a lavagem dos mesmos, com água destilada e esterilizada, por três vezes e na sequência os mesmos foram expostos ao cloreto de mercúrio por dois minutos e mais cinco enxagues em água destilada e esterilizada.

Após a desinfestação, os explantes, compostos de microestacas, de aproximadamente 1 cm de comprimento, contendo duas gemas, foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com 100 mg L⁻¹ de mioinositol, 30 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,8, antes da adição do ágar e, posteriormente, os tubos contendo meio foram esterilizados em autoclave por 20 minutos, 121 °C e 1,05 kg cm⁻².

Os explantes foram inoculados nos tubos de ensaio contendo meio de cultura em câmara de fluxo laminar, os quais permaneceram em sala de crescimento com temperatura média de 23±2 °C, por aproximadamente 28 dias sob fotoperíodo de 16 h e densidade de fluxo de fótons de 48 μmol m⁻²s⁻¹. Ao término deste período, as plantas que se desenvolveram nos tubos de ensaio serviram de explante para o experimento dos calos.

2.2 Indução de calo

Para a indução de calo foi utilizado o meio MS, preparado conforme descrito anteriormente, em placas de Petri, sendo que o meio MS foi suplementado com 2,4-D, nas concentrações de 0,0; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L⁻¹ e, BAP nas concentrações de 0,0; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L⁻¹, totalizando 16 tipos de meios de cultivo. Além desses, foram testadas combinações de 2,4 D (2 mg L⁻¹) x AIA (0,25; 0,50; 0,75 e 1,0 mg L⁻¹), totalizando quatro tipos de meio. O meio que foi utilizado como controle foi o MS, sem adição de fitorreguladores. Como explantes, foram utilizados folhas e segmentos internodais do cultivo *in vitro*, sendo cinco explantes por placa, inoculados em capela de fluxo laminar com três repetições por tratamento.

As placas de Petri foram mantidas no escuro, a 25 ± 2 °C por 28 dias e depois transferidas para a luz por aproximadamente 10 dias. Transcorrido o tempo, foram avaliadas quais concentrações de reguladores se mostraram mais eficientes para o desenvolvimento dos calos.

Foi avaliada a porcentagem de calos formados no meio indutor de calos (MIC), bem como a coloração e o aspecto dos calos no meio indutor de betacianinas (MIB) e os meios com os reguladores que se mostraram mais eficientes para a formação de calos foram utilizados para repetir o experimento e após transferir para meio de indução de betacianina (MIB) nas diferentes qualidades de luz.

2.3 Indução de betacianinas pela luz

Os calos que proliferaram rapidamente e uniformemente foram transferidas para placas com meio MS acrescido de 0,5 mg L⁻¹ de Thidiazuron (TDZ) e 1,0 mg L⁻¹ de ácido naftaleno acético (ANA), 0,5 mg L⁻¹ de adenina e 3 mg L⁻¹ de ácido ascórbico (AA), conhecido como meio MIB – Meio de indução de betacianina (ZHAO et al., 2010), Após a passagem dos calos para as placas contendo o meio MIB, estas foram distribuídas nas distintas qualidades de luz, com temperatura de 25 ± 2 °C pelo período aproximado de 40 dias na câmara de crescimento.

As distintas qualidades de luz foram fornecidas por três tipos de lâmpada: luz branca (fluorescentes tubulares - Sylvania® - 40 W, luz azul (fluorescente azul compacta - Taschibra® - 14 W, com pico de emissão de 470 nm) e luz vermelha

(fluorescente compacta vermelha -G-light®- 15 W, com pico de emissão de 660 nm). As densidades de fluxo de 29 fótons para as luzes branca, azul e vermelha, medidas com luxímetro (Hansatech® Quantum Sensor QSRED) foram 25, 12 e 22 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente. As placas que foram expostas ao escuro, permaneceram na incubadora. Todos os tratamentos foram feitos em triplicata para cada qualidade de luz.

2.4 Análises de flavonoides totais

A concentração de flavonoides totais foi determinada através da massa fresca dos calos obtidos em cada tratamento. A extração foi feita utilizando-se como tampão extrator acetato/metanol. Foi realizada espectrofotometria de varredura, na faixa de 230 a 800 nm, para identificação do comprimento de onda mais adequado para o método, através do qual plotou-se a curva de calibração padrão, que variou entre 0,1 a 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de quercetina, em tampão acetato/metanol (70/30 %, v/v), possibilitando o cálculo das concentrações de flavonoides nas amostras que foram computadas e expressas em μmol de quercetina por grama de massa fresca. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro, em 330 nm.

2.5 Quantificação de amarantina

Para a extração de amarantina foi utilizada a massa fresca dos calos obtidos em cada tratamento, os quais foram macerados em almofariz com tampão fosfato 10 mM, pH 6,0, acrescido de 10 mM de ascorbato de sódio. O homogeneizado foi filtrado em gaze e centrifugado a 10.000 g, por 20 minutos, a 4 °C, de acordo com Gandia-Herrero et al. (2005). A concentração de amarantina foi determinada levando-se em consideração o coeficiente de extinção molar $\epsilon = 56600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, em um comprimento de onda de 536 nm. O resultado foi expresso em mg de amarantina por 100 gramas de massa fresca.

2.6 Quantificação de betanidina e betanina total

A extração das betanidina e betanina foi realizada com dois tipos diferentes de tampão extrator com a massa fresca dos calos. Para betanidina foi utilizado tampão acetato de sódio 10 mM e metanol (70/30 %), e acrescido a essa solução, ascorbato de sódio numa concentração de 10 mM (pH 5,0). Para betanina a extração foi efetuada utilizando-se tampão fosfato de potássio 10 mM, acrescido de ascorbato de sódio 10 mM (pH 6,0), sem adição de solvente orgânico. Para as duas análises foram utilizadas massa fresca dos calos, que foram maceradas em almofariz e o extrato filtrado em gaze e centrifugado a 10.000 g, por 20 minutos, a 4 °C como descrito por Gandia-Herrero et al. (2005). O coeficiente de extinção molar utilizada para o cálculo de betanidina foi de $\epsilon = 54000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e para betanina de $\epsilon = 65000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, em um comprimento de onda de 536 nm. Os resultados foram expressos em miligrama de betanina em 100 gramas de massa fresca. As leituras foram feitas em espectrofotômetro UV/VIS modelo Ultrospec 7000, marca Ge Healthcare.

2.7 Quantificação de betaxantinas

Para a extração de betaxantinas foi utilizada a massa fresca dos calos, as quais foram maceradas em almofariz com tampão fosfato 10 mM, pH 6,0, acrescido de 10 mM de ascorbato de sódio. O homogeneizado foi filtrado em gaze e centrifugado a 10.000 g, por 20 minutos, a 4 °C (GANDIA-HERRERO et al., 2005). A concentração de betaxantina foi determinada levando-se em consideração o coeficiente de extinção molar para miraxantina $\epsilon = 48000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, em um comprimento de onda de 480 nm. O resultado foi expresso em mg de miraxantina por 100 gramas de massa fresca.

2.8 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro por meio do Programa Estatístico Winstat 1.0 (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2007).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As técnicas de cultura de tecidos, entre elas a formação de calos, são muito utilizadas como um método alternativo para a produção e acúmulo de metabólitos secundários (AL-JIBOURI et al., 2016).

Para a indução de calogênese na espécie *A. sessilis*, foram utilizadas distintas combinações de reguladores de crescimento ao meio MS, estas combinações foram chamadas de meio indutores de calogênese (MIC), (Tabela 1 e 2). Foi possível observar que a associação entre uma auxina e uma citocinina apresentou os melhores índices de indução de calos (100 %), enquanto que o uso de duas auxinas combinadas (2,4 D e AIA), em explantes internodais, não formou calos e em explantes foliares a porcentagem de formação de calos foi menor que 50 %, corroborando com o exposto em Taiz e Zeiger, (2009), que justifica que para a formação de calos é necessário a associação entre citocinina e auxina.

Quanto à presença de coloração rósea, no meio indutor de betacianinas (MIB), (Figura 1), importante indicativo da presença de betalaínas, em explantes foliares, os meios que se destacaram na formação de cor foram 11, 12, 13, 14, 15 e 16, indicando que a concentração de $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D, sem associação a citocinina, não é capaz de estimular a síntese de coloração, porém a concentração de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ foi capaz de induzir cor sozinha ou associada. Já nos explantes internodais, a associação entre auxina e citocinina se mostrou essencial para o surgimento da cor, visto que somente nos meios 11, 12, 15 e 16 foi possível observar a presença de coloração, sendo necessária concentrações de auxina e citocinina entre $1,5$ e $2,0 \text{ mg L}^{-1}$. Os calos com pigmentações verdes indicam presença de clorofila, cuja síntese é diretamente influenciada pela luz (FUKUDA et al., 2008).

A auxina 2,4-D sozinha ou combinada com citocininas, como o BAP, é muito utilizada para estimular a formação de calos, no entanto a concentração destes reguladores deve ser definida para cada espécie (CASTRO et al., 2016). Em pesquisa feita por Trejo-Tapia et al. (2008) a concentração de 1 mg L⁻¹ de 2,4-D em *Beta vulgaris*, associada a 1 mg L⁻¹ de CIN produziu calos em explantes foliares com alta concentração de betalaínas. Já Dalila et al. (2013) avaliando a formação de calos com *Barringtonia racemosa* observaram que os melhores resultados foram obtidos com a concentração de 1,5 mg L⁻¹ de 2,4-D em conjunto com citocinina nas concentrações de 0,5 a 1 mg L⁻¹.

Naz; Khatoon (2014) acreditam que o 2,4-D possui maior mobilidade, e taxas menores de oxidação e conjugação, por isso ele seria mais eficiente para a promoção de calos em relação ao AIA ou ANA, este fato justifica os resultados obtidos neste trabalho.

Outro fator relevante em relação à cultura de calos é o aspecto dos mesmos. Calos muito friáveis acumulam água e tendem a sofrer oxidação mais rápida, calos compactos são mais desejáveis. Dentre os meios estudados que apresentaram pigmentação, em ambos explantes, somente o meio 13 apresentou formação de calos friáveis. Portanto, levando-se em consideração estes três aspectos, os meios que foram utilizados para a continuidade do experimento, nas diferentes luzes, foram os meios 11, 12, 15 e 16, enquanto que o meio 14 foi desconsiderado em razão de não ter apresentado coloração rósea no explante internodal no MIB.

Tabela 1 - Porcentagem de formação de calos, coloração e aspecto dos calos oriundos de explantes foliares de *Alternanthera sessilis*, após 20 dias no escuro e 10 dias com fotoperíodo de 16 h de luz, em temperatura de $\pm 23^\circ\text{C}$

Meio de Indução	% de formação de calos (MIC)	Cor (MIB)	Aspecto
Meio 1 (sem regulador)	0	-	-
Meio 2 (1,0 BAP + 0,0 2,4 D)	0	-	-
Meio 3 (1,5 BAP + 0,0 2,4 D)	0	-	-
Meio 4 (2,0 BAP + 0,0 2,4 D)	0	-	-
Meio 5 (1,0 2,4-D + 0,0 BAP)	0	-	-
Meio 6 (1,0 2,4-D + 1, 0 BAP)	50	Negro	Compacto
Meio 7 (1,0 2,4-D + 1,5 BAP)	66,7	Negro	Compacto
Meio 8 (1,0 2,4-D + 2,0 BAP)	100	Verde	Compacto
Meio 9 (1,5 2,4-D + 0,0 BAP)	91,6	Verde	Friável
Meio 10 (1,5 2,4-D + 1,0 BAP)	91,6	Marrom	Compacto
Meio 11 (1,5 2,4-D + 1,5 BAP)	58,3	Levemente róseo	Compacto
Meio 12 (1,5 2,4-D + 2,0 BAP)	91,6	Levemente róseo	Compacto
Meio 13 (2,0 2,4-D + 0,0 BAP)	100	Levemente róseo	Friável
Meio 14 (2,0 2,4-D + 1,0 BAP)	100	Levemente róseo	Compacto
Meio 15 (2,0 2,4-D + 1,5 BAP)	100	Levemente róseo	Compacto
Meio 16 (2,0 2,4-D + 2,0 BAP)	100	Levemente róseo	Compacto
Meio 17 (2,0 2,4-D + 0,25 AIA)	0	-	-
Meio 18 (2,0 2,4-D + 0,50 AIA)	8,3	Marrom	Compacto
Meio 19 (2,0 2,4-D + 0,75 AIA)	50	Marrom	Compacto
Meio 20 (2,0 2,4D + 1,0 AIA)	16,6	Marrom	Compacto

*Os dados mostram a média das triplicatas.

Tabela 2 - Porcentagem de formação de calos, coloração e aspecto dos calos oriundos de explantes internodais de *Alternanthera sessilis*, após 20 dias no escuro e 10 dias com fotoperíodo de 16 h de luz, em temperatura de $\pm 23^\circ\text{C}$

Meio de Indução	% de formação de calos (MIC)	Cor (MIB)	Aspecto
Meio 1 (sem regulador)	0	-	-
Meio 2 (1,0 BAP + 0,0 2,4-D)	0	-	-
Meio 3 (1,5 BAP + 0,0 2,4-D)	0	-	-
Meio 4 (2,0 BAP + 0,0 2,4-D)	0	-	-
Meio 5 (1,0 2,4-D + 0,0 BAP)	0	-	-
Meio 6 (1,0 2,4-D + 1, 0 BAP)	0	-	-
Meio 7 (1,0 2,4-D + 1,5 BAP)	0	-	-
Meio 8 (1,0 2,4-D + 2,0 BAP)	91,6	Negro	Compacto
Meio 9 (1,5 2,4-D + 0,0 BAP)	8,6	Verde	Compacto
Meio 10 (1,5 2,4-D + 1,0 BAP)	100	Branco	Compacto
Meio 11 (1,5 2,4-D + 1,5 BAP)	75	Levemente róseo	Compacto
Meio 12 (1,5 2,4-D + 2,0 BAP)	100	Levemente róseo	Compacto
Meio 13 (2,0 2,4-D + 0,0 BAP)	75	Marrom	Compacto
Meio 14 (2,0 2,4-D + 1,0 BAP)	91,6	Marrom	Compacto
Meio 15 (2,0 2,4-D + 1,5 BAP)	100	Levemente róseo	Compacto
Meio 16 (2,0 2,4-D + 2,0 BAP)	100	Levemente róseo	Compacto
Meio 17 (2,0 2,4-D + 0,25 AIA)	0	-	-
Meio 18 (2,0 2,4-D + 0,50 AIA)	0	-	-
Meio 19 (2,0 2,4-D + 0,75 AIA)	0	-	-
Meio 20 (2,0 2,4D + 1,0 AIA)	0	-	-

*Os dados mostram a média das triplicatas.

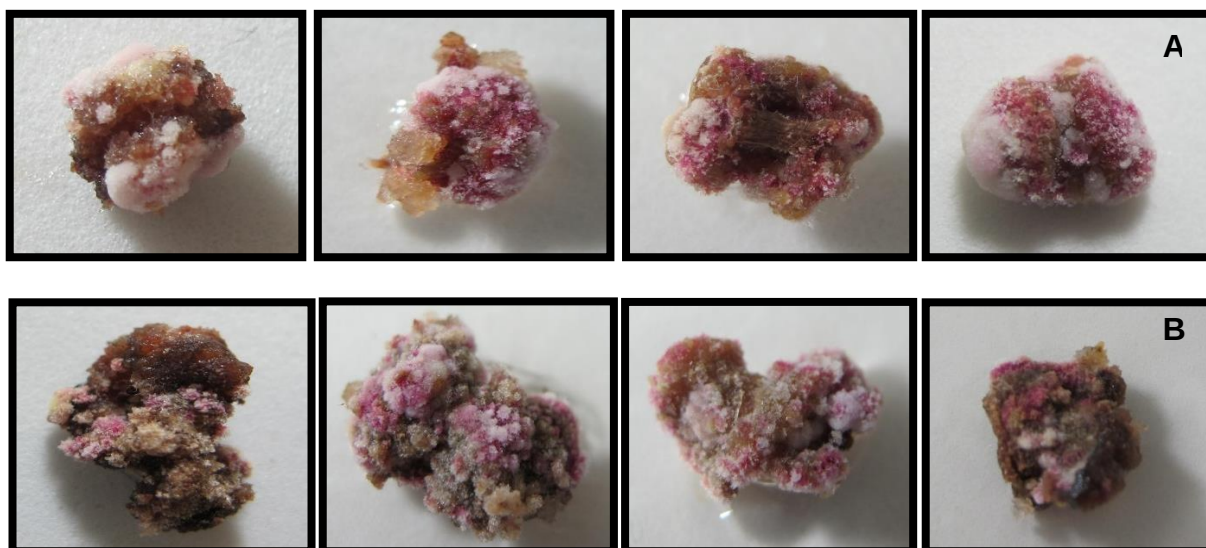


Figura 1 - Pigmentação dos calos de *Alternanthera sessilis* oriundos dos meios de cultivo de calos (MIC) 11 (1,5 mg L⁻¹ 2,4-D + 1,5 mg L⁻¹ BAP), 12 (1,5 mg L⁻¹ 2,4-D + 2,0 mg L⁻¹ BAP), 15 (2,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 1,5 mg L⁻¹ BAP) e 16 (2,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 2,0 mg L⁻¹ BAP) e após transferido para Meio Indutor de Betacianinas (MIB) respectivamente, de explantes internodais (A) e foliares (B) em meio de indução de betacianina (MIB) após 40 dias de cultivo.

Os meios contendo as concentrações de reguladores de crescimento que apresentaram melhor desenvolvimento de calos e formação de pigmentos foram repetidos e passaram a ser denominados M1 (1,5 mg L⁻¹ 2,4-D + 1,5 mg L⁻¹ BAP); M2 (1,5 mg L⁻¹ 2,4-D + 2,0 mg L⁻¹ BAP); M3 (2,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 1,5 mg L⁻¹ BAP) e M4 (2,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 2,0 mg L⁻¹ BAP). As placas contendo os meios, permaneceram pelo período de 20 dias no escuro e 10 sob fotoperíodo de 16/8 h e, após esse período, o material foi transferido para meio MIB e expostos às distintas qualidades da luz (escuro, vermelha, azul e branca) onde permaneceram por mais 40 dias.

De acordo com Ahmad et al. (2015) a elicitação tem sido uma das melhores estratégias, utilizadas nos últimos tempos, para otimizar a produção de metabólitos secundários desejáveis, sendo a luz um dos mais importantes, já que além de afetar o desenvolvimento e a morfologia, pode ativar rotas de defesa. Assim se fez a escolha por diferentes qualidades de luz para a elicitação dos calos de *A. sessilis* neste trabalho.

De acordo com Das et al. (2013) o tipo de explante é fator determinante na cultura de calos e o mais eficiente, para o desenvolvimento do calo, pode variar entre as espécies.

O explante internodal não apresentou um desenvolvimento de calos homogêneo nas repetições, conforme mostra figura 7, em todos os tratamentos de qualidade de luz. Este resultado difere de Reis (2013) que obteve formação de calos mais homogêneos em explantes internodais do que foliares em plantas de *A. brasiliensis* expostas ao meio MIB e de Biswas et al. (2013) que também obteve melhores resultados com explantes internodais de *Amaranthus tricolor*. Os resultados deste trabalho estão de acordo com Singh et al. (2009), que trabalhando com esta espécie, também obtiveram o melhor resultado na formação de calo utilizando explantes foliares e 2,4-D na concentração de 1 mg L⁻¹ em conjunto com 1 mg L⁻¹ de BAP.

A quantificação de betalaínas e flavonoides foi realizada com explantes foliares, com dois tampões distintos fosfato pH 6,0 e acetato pH 5,0, já que as betalaínas são solúveis em água e o pH 6,0 favorece sua estabilidade e o pH 5,0 facilita a extração de betanidina (GANDIA-HERRERO et al., 2005; 2007; 2013).

Os resultados para concentração de flavonoides presente em calos de *A. sessilis* (Figura 2) demonstra que houve interação entre os tratamentos luz e meio de cultivo, sendo possível observar que a luz azul associada ao meio de cultivo M2 apresentou os resultados mais significativos, chegando a uma média de 9,32 µmol de quercetina por 100 g de massa fresca de calo, quantidade esta superior ao encontrado por Reis (2013), em plantas *in vitro*, desta espécie, elicitadas pela luz, em que a luz azul também promoveu um incremento significativo deste parâmetro.

Estes resultados também estão de acordo com Nascimento et al. (2013), que observaram um aumento acentuado de flavonoides em *Kolonchoe pinnata* quando as mesmas foram expostas a luz azul.

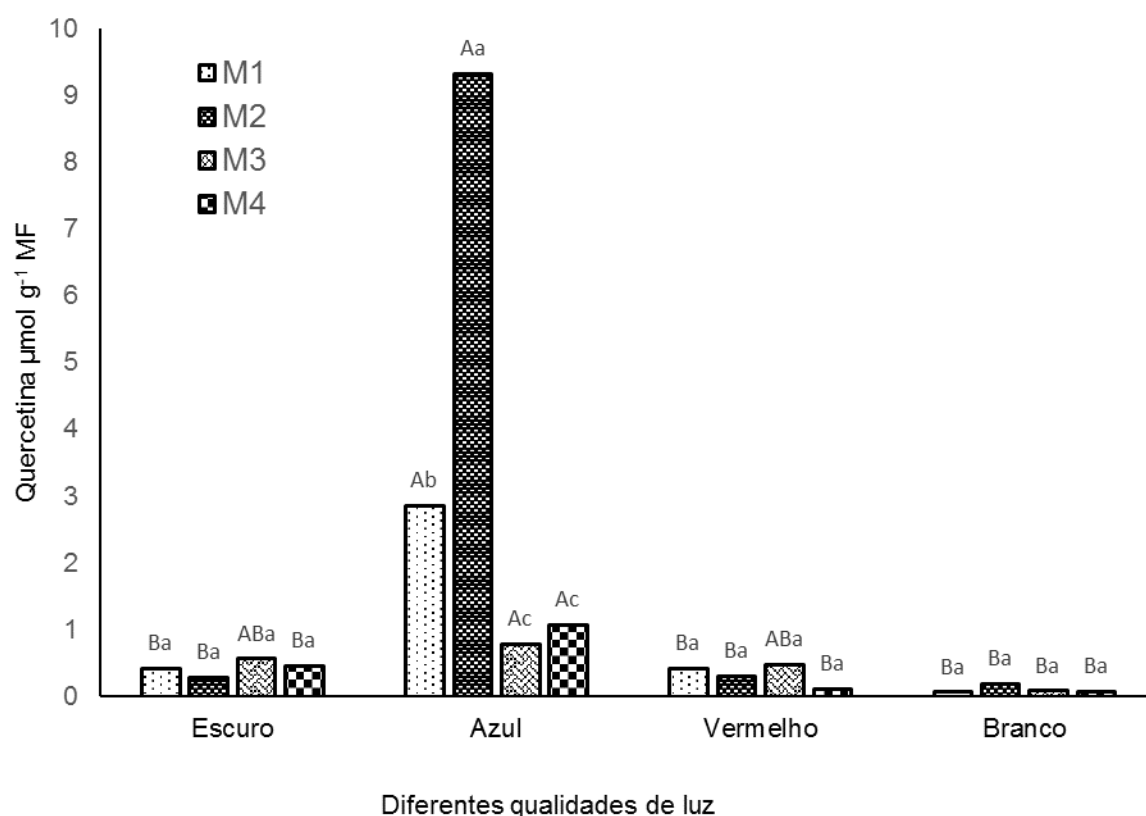


Figura 2 - Teor de flavonoides presente nos calos de plantas de *Alternanthera sessilis*, após a elicitação em diferentes qualidades de luz. M1- ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D + $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ BAP), M2 ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D + $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ BAP), M3 ($2,0 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D + $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ BAP) e M4 ($2,0 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D + $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ BAP). Médias seguidas por letras maiúsculas distintas diferem entre si em relação ao tipo de qualidade de luz frente aos meios, médias seguidas por letras minúsculas distintas comparam meio de cultivo em relação à determinada luz de acordo com o teste de Tukey ($p < 0.05$).

O teor de amarantina também foi significativamente maior no conjunto meio M2 e luz azul, chegando a um valor de $147,6 \text{ mg}$ de amarantina em 100 g de massa fresca de calo (Figura 3). Este valor se mostrou bem mais elevado em comparação a estudos anteriores que utilizaram elicitores para incremento deste pigmento em espécies do gênero *Alternanthera* (Perotti et al., 2010; Reis et al., 2015).

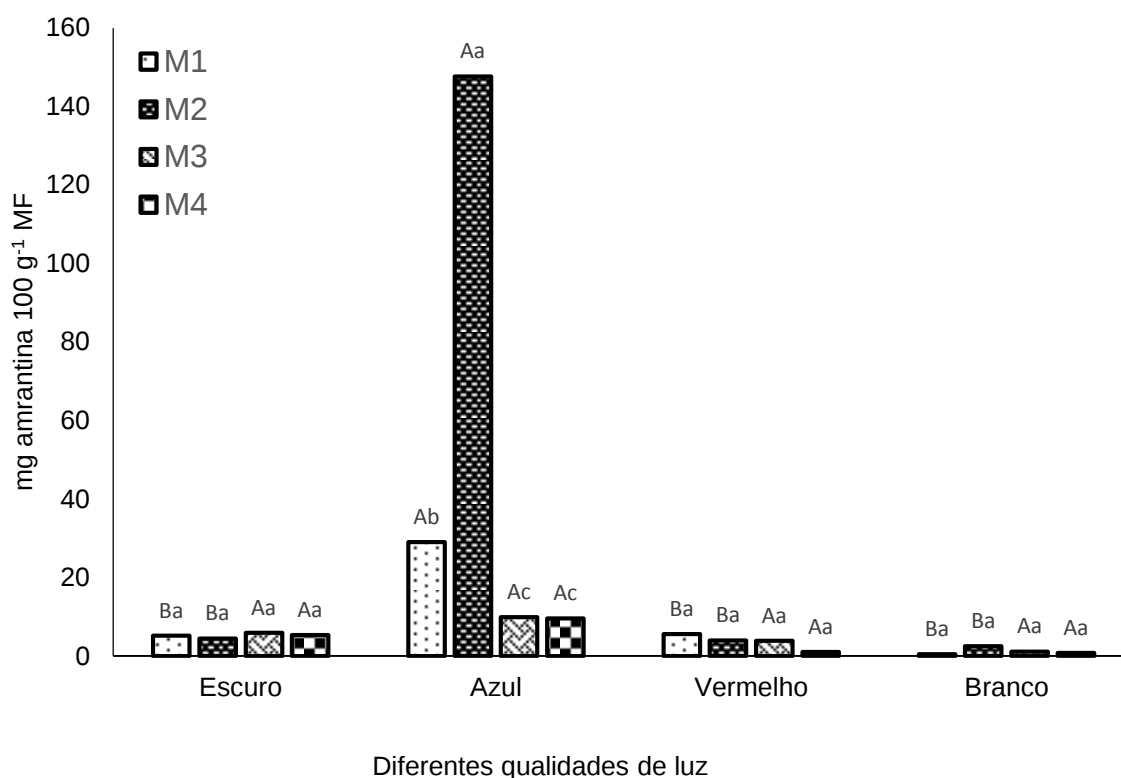


Figura 3 - Teor de amarantina presente nos calos de plantas de *Alternanthera sessilis*, após a elicitação em diferentes qualidades de luz. M1- (1,5 mg L⁻¹ 2,4-D + 1,5 mg L⁻¹ BAP), M2 (1,5 mg L⁻¹ 2,4-D + 2,0 mg L⁻¹ BAP), M3 (2,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 1,5 mg L⁻¹ BAP) e M4 (2,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 2,0 mg L⁻¹ BAP). Médias seguidas por letras maiúsculas distintas diferem entre si em relação ao tipo de qualidade de luz frente aos meios, médias seguidas por letras minúsculas distintas comparam meio de cultivo em relação à determinada luz, de acordo com o teste de Tukey (p<0.05).

A concentração de betanidina no M2 em conjunto com a luz azul apresentou como média 71,42 mg de betanidina em 100 g de massa fresca de calo, resultado este, significativamente maior que os demais (Figura 4).

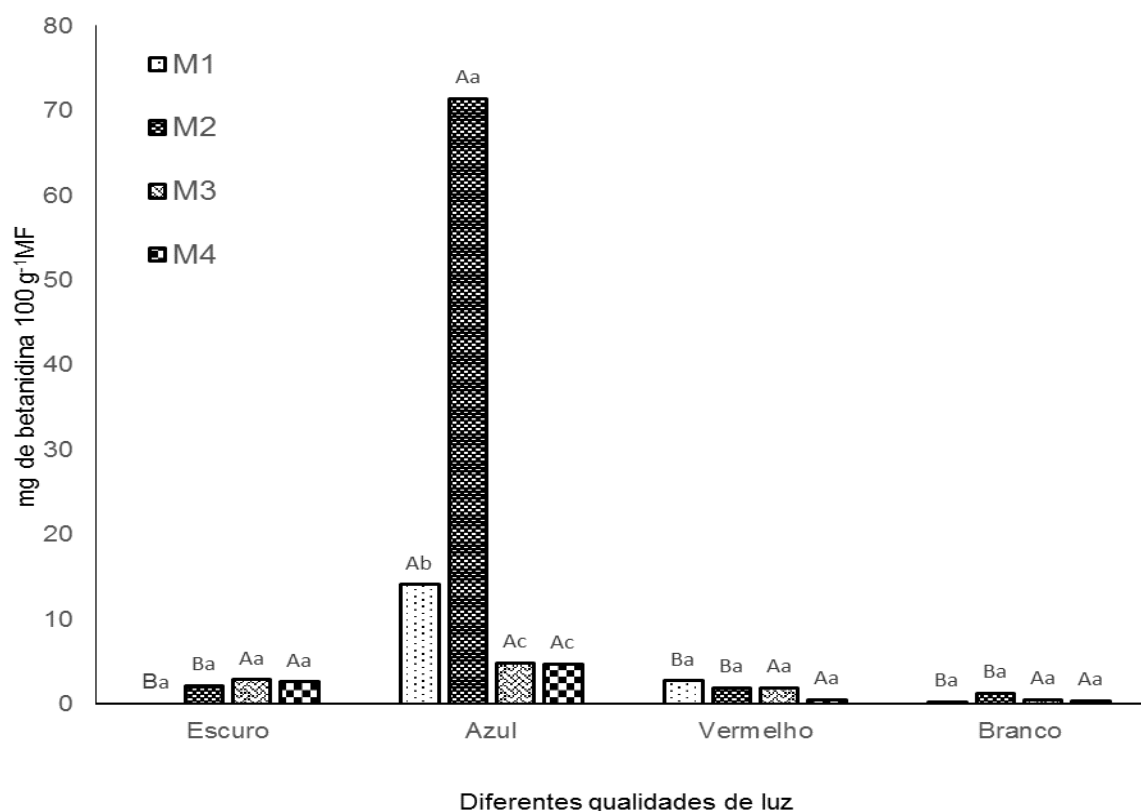


Figura 4 - Teor de betanidina presente nos calos de plantas de *Alternanthera sessilis*, após a elicitação em diferentes qualidades de luz. M1- ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D + $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ BAP), M2 ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D + $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ BAP), M3 ($2,0 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D + $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ BAP) e M4 ($2,0 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D + $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ BAP). Médias seguidas por letras maiúsculas distintas diferem entre si em relação ao tipo de qualidade de luz frente aos meios, médias seguidas por letras minúsculas distintas comparam meio de cultivo em relação à determinada luz, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0.05$).

Os resultados de betanina também foram significativamente maiores na associação entre o meio M2 e a luz azul com média de $59,34 \text{ mg}$ de betanina por 100 g de massa fresca de calo (Figura 5). Estes resultados diferem de Reis et al. (2015), que obteve melhores respostas em relação a betanina quando as plantas de *A. sessilis* e *A. brasiliana* foram expostas a luz vermelha.

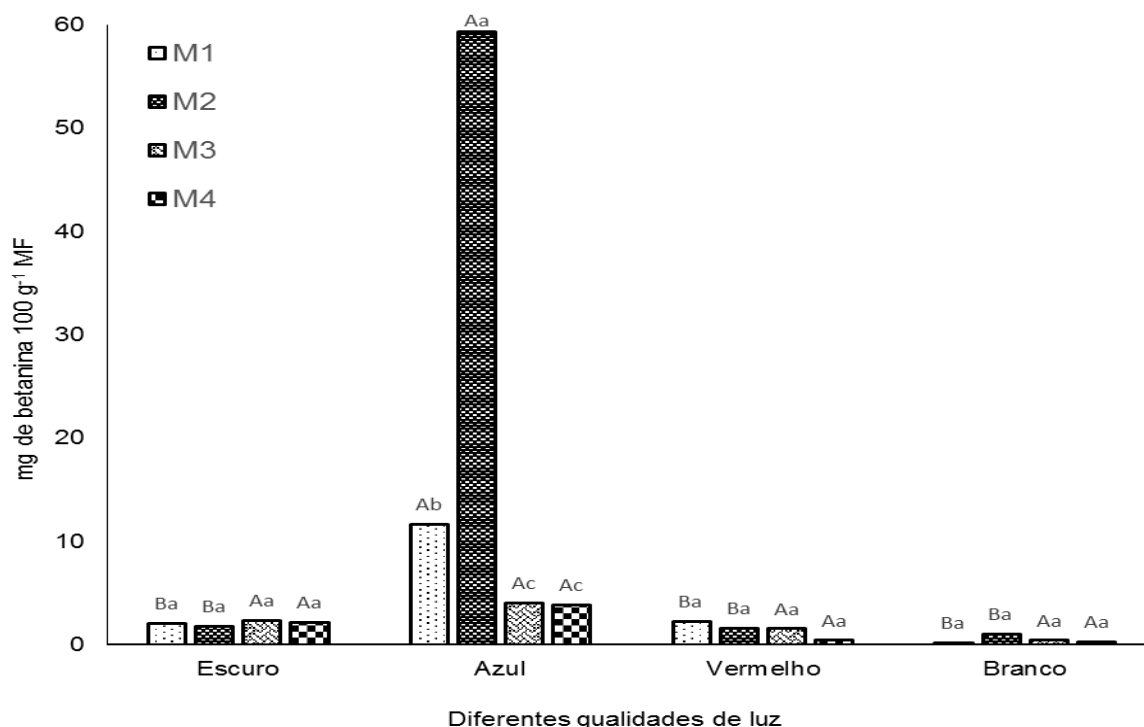


Figura 5 - Teor de betanina presente nos calos de plantas de *Alternanthera sessilis*, após a elicitação em diferentes qualidades de luz. M1- ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D + $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ BAP), M2 ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D + $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ BAP), M3 ($2,0 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D + $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ BAP) e M4 ($2,0 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D + $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ BAP). Médias seguidas por letras maiúsculas distintas diferem entre si em relação ao tipo de qualidade de luz frente aos meios, médias seguidas por letras minúsculas distintas comparam meio de cultivo em relação à determinada luz de acordo com o teste de Tukey ($p < 0.05$).

Para os teores de betaxantina (Figura 6) foi possível observar, através dos dados estatísticos, que a interação entre o meio e a luz azul não foi significativa, sendo significativos apenas os parâmetros isolados. Os meios de cultivo denominados M1 e M2 foram mais eficientes na produção de betaxantinas.

Quanto à qualidade de luz, a luz azul foi significativamente melhor, tendo proporcionado um incremento de até 10 vezes no teor de miraxantina em comparação com o tratamento branco. Bhuiyan et al. (2002), avaliando culturas celulares do gênero *Portulaca sp.* também observaram incremento deste parâmetro quando as plantas foram expostas à luz azul.

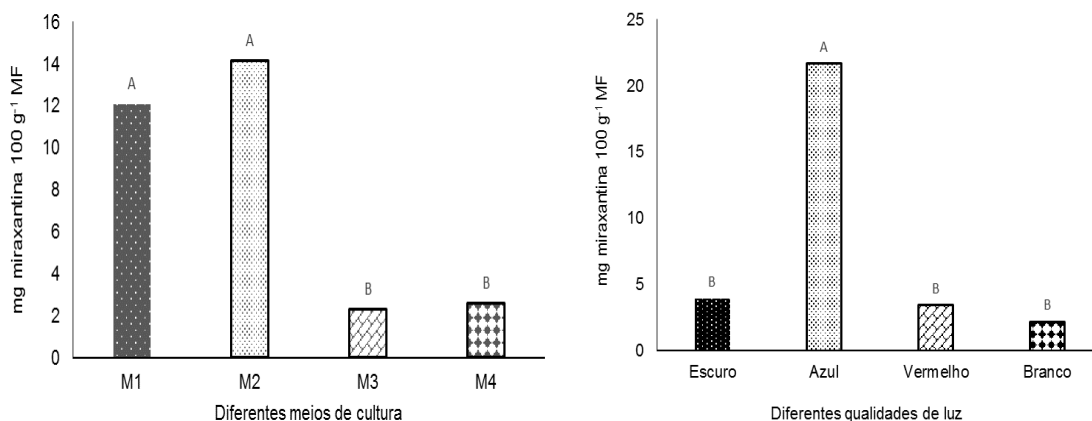


Figura 6 - Teor de miraxantina presente nos calos de plantas de *Alternanthera sessilis*, após a eliciação em diferentes qualidades de luz. M1 (1,5 mg L⁻¹ 2,4-D + 1,5 mg L⁻¹ BAP), M2 (1,5 mg L⁻¹ 2,4-D + 2,0 mg L⁻¹ BAP), M3 (2,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 1,5 mg L⁻¹ BAP) e M4 (2,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 2,0 mg L⁻¹ BAP). Médias seguidas por letras maiúsculas distintas diferem entre si em relação ao tipo de qualidade de luz frente aos meios, médias seguidas por letras minúsculas distintas comparam meio de cultivo em relação à determinada luz, de acordo com o teste de Tukey (p<0.05).

A luz é um fator fundamental para as plantas, pela ação direta ou indireta na regulação de seu crescimento e desenvolvimento. As respostas da planta não dependem apenas de ausência ou presença de luz, mas também da variação em quantidade e qualidade luminosa (MORINI; MULEO, 2003).

Segundo Goudriaan (2016), luz é o termo que se refere à radiação visível que é comum à radiação fotossinteticamente ativa, que compreende a faixa entre 400 e 700nm, onde se enquadram as cores vermelha e azul, utilizadas neste experimento, e que segundo Taiz; Zeiger (2013) são as cores absorvidas pelas plantas, ao contrário da verde que é refletida.

Luca et al. (2001), avaliando o efeito de diferentes espectros de luz sobre crescimento e desenvolvimento de plantas de *A. brasiliana* L., observaram que a luz azul estimulou a formação de um número maior de folhas.

Analisando o efeito da luz sobre a produção de betacianinas em *Mesembryanthemum crystallinum*, Vogt et al. (1999) verificaram que um aumento no fluxo de fótons proporcionou um incremento na quantidade de betacianinas, sendo possível observar a olho nu que folhas mais jovens tinham uma coloração roxa mais intensa do que o controle e das que permaneceram sobre densidade de fluxos menores.

Segundo Cao et al. (2012), a luz estaria atuando a nível de formação da porção diihropiridina das betalaínas, o cromóforo, responsável pela formação da cor e, portanto, a ausência dela poderia prejudicar a biossíntese.

O fato de os calos expostos na luz, neste experimento, apresentarem a menor concentração de betalaínas pode ser justificado pelo estudo de Hatlestad et al. (2015) que afirmam que a luz seria responsável por degradar as betalaínas já formadas, porém seria fundamental para dar início à biossíntese, já que a luz branca atuaria na enzima DOPA-dioxigenase no início da rota.

Lee et al. (2014) em seus estudos com cultivo de beterrabas em casa de vegetação observaram que o acúmulo de betalaínas era menor se comparado às beterrabas cultivadas em campo, provavelmente pelo déficit de fluxo de fótons que a casa de vegetação impõe. Os autores acreditam que a luz não seja o fator limitante, na síntese de betalaínas, mas que uma associação com outros fatores, pode alterar a quantidade de produto formado.

Esta associação entre distintos fatores corrobora os resultados obtidos neste trabalho em que incrementos significativos nas betacianinas foram obtidos com o meio de cultivo M2 com concentração de 1,5 mg L⁻¹ de 2,4-D, 2,0 mg L⁻¹ BAP associado a luz azul.

Wang; Liu (2016) relatam em seu estudo com *Saueda salsa* um incremento de betacianinas no escuro e que, provavelmente, a sinalização para desencadear este incremento, tenha sido o acúmulo de espécies reativas de oxigênio. Ramakrishna; Ravishankar (2011), em suas revisões sobre o efeito de fatores abióticos no aumento dos metabólitos secundários, citam vários trabalhos que comprovaram que diferentes cores e espectros estão associados à produção de metabólitos de interesse, e também sugerem que a produção de espécies reativas de oxigênio estaria induzindo as rotas de antioxidantes, como as betalaínas.

As diferentes qualidades de luz podem gerar o desequilíbrio da planta e formar as espécies reativas de oxigênio e podem ter sido a causa deste aumento acentuado de betacianinas em resposta à luz azul associada ao meio M2, já que as betacianinas são consideradas antioxidantes. Além disso, segundo Eckert; Kaldenhoff (2001) a luz azul é importante em processos como a síntese de pigmentos e enzimas

Darko et al. (2014) relataram que a luz artificial pode comprometer o sistema, causando fotoinibição, com isso diminuindo o fornecimento de esqueletos de carbono e podendo assim diminuir também os metabólitos secundários.

Yu et al. (2005), estudando o efeito de diferentes cores de luz no crescimento da biomassa e na síntese de ginsenosídeos em culturas de raiz de ginseng (*Panax ginseng*), constataram que a luz fluorescente vermelha estimulou o crescimento e a formação dos ginsenosídeos. Já Macedo et al. (2004), em estudos com *A. brasiliense*, obtiveram melhores resultados em acúmulo de biomassa nas luzes azul e branca.

Ahmad et al. (2015) analisando calos de *Stevia ribaudiana* e o efeito de diferentes cores no incremento de metabólitos secundários nestes, observaram que as luzes vermelha e azul foram eficientes, pois aumentaram significativamente compostos fenólicos em relação ao controle.

Lage et al. (2015), enfatizam que as suspensões de células e os calos são consideradas as mais eficientes técnicas biotecnológicas para a produção *in vitro* de metabólitos especiais, favorecendo a formação de um sistema mais homogêneo com elevada proliferação celular.

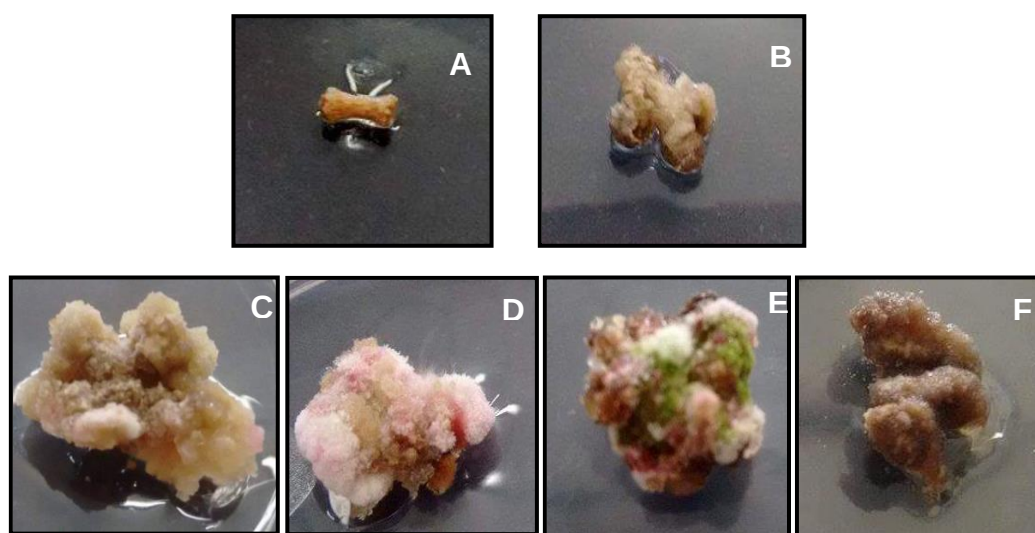


Figura 7 - Aspecto e pigmentação dos calos após a elicitação pela luz. (A) calo não desenvolvido com explante internodal; (B) calo internodal formado parcialmente; (C) calo foliar M2 no escuro; (D) calo foliar M2 no azul; (E) calo foliar M2 no vermelho; (F) calo foliar M2 no branco.

4 CONCLUSÃO

A elicitação de calos de *Alternanthera sessilis* por qualidade de luz associada a reguladores de crescimento adequado se mostrou uma metodologia eficiente para o incremento das betalaínas e flavonoides. A luz azul em conjunto com o meio de indução de betacianina (MIB) mais a concentração de reguladores de crescimento de 1,5 mg L⁻¹ de 2,4-D e 2,0 mg L⁻¹ de BAP foi capaz de incrementar a produção de betacianinas e flavonoides.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo indicam estratégias de cultivo de *Alternanthera sessilis* que possam otimizar a produção de metabólitos de interesse, como o caso de pigmentos betalâmicos e flavonoides. Trabalhos que explorem metodologias de indução de biossíntese de metabólitos secundários são cada vez mais necessários, visto que a demanda por este tipo de fitoquímico tem aumentado nos últimos anos. Conhecer a fisiologia da planta, a rota de biossíntese das betalaínas e a interação da planta com determinado elicitor, auxilia no sucesso da obtenção dos resultados. Este trabalho demonstrou que a luz azul em conjunto com reguladores de crescimento adequado, no cultivo de calos, é uma alternativa para a obtenção de teores elevados de betalaínas e flavonoides para a espécie *Alternanthera sessilis*, já o sistema de hidroponia com elicitação por metiljasmonato no período de 48 horas não foi capaz de prover aumento destes compostos, sendo necessários mais estudos em relação ao tempo de exposição ou até outros elicitores. Outro aspecto relevante é que pesquisas moleculares são fundamentais para um conhecimento mais aprofundado e preciso das rotas de biossíntese e, através deste trabalho, será possível conhecer o perfil transcriptômico desta espécie.

REFERÊNCIAS

- ABEYSINGHE, D. C.; WIJERATHNE, S. M. N. K.; DHARMADASA, R. M. Secondary metabolites contents and antioxidant capacities of *Acmella Oleraceae* grown under different growing systems. **Wourld journal of agricultural research**, v. 2, n. 4, p. 163-167, 2014.
- ABDALLAH, F. B.; GOFFART, J. P. Potential indicators based on leaf flavonoids content for the evaluation of potato crop nitrogen status. In: **11th ICPA Indianapolis Mi USA**: p. 1-18, 2012.
- AHMAD, N.; RAB, A.; AHMAD, N. Light-induced biochemical variations in secondary metabolites production and antioxidant activity in callus cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert.). **Journal of Photochemistry and Photobiology**, p. 1-24, 2015.
- AL-JIBOURI, A. M. J.; ABED, A. S.; ALI, AJ. A.; MAJEED, D. M. Improvement of phenols production by amino acids in callus cultures of *Verbascum thapsus* L. **American Journal of Plant Sciences**, v. 7, p. 84-91, 2016.
- ALAMINO, D. A.; CABRAL, V. B.; MOESES ANDRIGO DANNER, M. A.; MARCHESE, J. A. Indução a resistência à podridão-amarga em maçãs pelo uso de eliciadores em pós colheita. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 3, p. 249-254, 2013.
- ANITHA, R.; KANIMOZHI, S. Pharmacognostic evaluation of *Alternanthera sessilis* (L.) R. Br. Ex. DC. **Pharmacognosy Journal**, v.4, n. 28, 2012.
- ASAMAR, S. A.; RESENDE, R. F.; ARARUNA, E. C.; MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q. Citocininas na multiplicação *in vitro* de hortelã-pimenta (*Mentha x Piperita* L.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v. 13, n. 1, p. 533-538, dez. 2011.
- BALAKRISHNAN, B.; AYYAVOO, J.; SADAYAN, P.; ABIMANNAN, A. Evaluation of antioxidant activity of *Clitoria ternatea* and *Alternanthera sessilis* plants extracts using model system for yeast cells. **African Journal of Basic e Applied Sciences**, v. 5, n. 3, p. 134-138, 2013.
- BHUIYAN, N. H.; MURAKAMI, K.; ADACHI, T. Variation in betalain content and factors affecting the biosynthesis in *Portulaca* sp. 'Jewel' cell cultures. **Plant Biotechnology**, v.19, p. 369- 376, 2002.
- BISWAS, M.; DAS S. S.; DEY, S. Establishment of a stable *Amaranthus tricolor* callus line for production of food colorant. **Food Science and Biotechnology**, v. 22, p.1-8, 2013.
- BONALDO, S. M. et al. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. In: CAVALCANTE, L. S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 11-28.

BORAH, A.; YADAV, R. N. S.; UNNI, B.G. *In vitro* antioxidant and free radical scavenging activity of *Alternanthera sessilis*. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 2, n. 6, p. 1502-1506, 2011.

BRASILEIRO, A. C.; CARNEIRO, V. T. Manual de transformação genética de plantas. Brasília: **Embrapa-SPI/Cenargen**, 309 p. 1998.

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

CAI, Y.; SUN, M.; WU, H.; HUANG, R.; CORKE, H. Characterization and quantification of betacyanin pigments from diverse *Amaranthus* species. **J Agric Food Chem**, V. 46, p. 2063-2070, 1998.

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

CAO, S.; LIU, T.; JIANG, Y.; HE, S.; HARRISON, D. K.; JOYCE, D.C. The effects of host defence elicitors on betacyanin accumulation in *Amaranthus mangostanus* seedlings. **Food Chemistry**, v. 134, p.1715–1718, 2012.

CARVALHO, A. A. Influência de diferentes fatores na micropropagação e na análise de compostos voláteis *in vitro* de *Chenopodium ambiosioides* L. Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Produção vegetal da Universidade Federal de Lavras, 2013.

CARVALHO, A .C. P. P.; BRAGA, E. J. B.; LEMOS, E. P. P.; SOUZA, F. V. D.; PETERS, J. A.; WILLADINO, L.; CÂMARA, T. R. Glossário de cultura de tecidos de plantas. **Plant Cell Culture Micropropagation**, Lavras, v.7, n.1, p. 30-60, 2011.

CASIQUE-ARROYO, G.; MARTINEZ-GALLARDO, N.; VARA, L. G.; DE´LANO-FRIER, J. P. Betacyanin Biosynthetic Genes and Enzymes Are Differentially Induced by abiotic Stress in *Amaranthus hypochondriacus*. **Plos One**, v. 9, n. 6, p. 1-19, 2014.

CASTRO, A. H. F.; BRAGA, K. Q. B.; DE SOUSA, F. M.; COIMBRA, M. C.; CHAGAS, R. C. R. Callus induction and bioactive phenolic compounds production from *Byrsonima verbascifolia* (L.) DC. (Malpighiaceae). **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 1, p. 143-151, 2016.

CHAWLA, H. S. Introduction to plant biotechnology. **Science Publishers INC**, New Hampshire, United States of America. pp. 528, 2002.

CHEN, F. M.; RATHINAM, X.; DANIAL, M.; LAM, C. K.; QUI, M. H.; SUBRAMANIAM, S. Efeccts of methyl-jasmonate on 9-methoxycanthin-6-one content in *Eurycoma longifolia* (Tongkat Ali) root culture. **Park Journal of Botany**, v. 47, n. 3, p. 897-904, 2015.

CHEN X.; SHAO, L.; SONG, LI.; CHEN, YJ.; PENG, CL.; ZHANG, Q. Amaranthine plays an important role in photoprotection for *Alternanthera sessilis* under

photooxidative stress. **Biotechnology e Biotechnology Equipment**, v. 27, n. 3, p. 3791-3797, 2013.

DALILA, Z. D.; JAAFAR, H.; MANAF, A. Effects of 2,4-D and kinetin on callus induction of *Barringtonia racemosa* leaf and endosperm explants in different types of basal media. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 12, n. 1, p. 21-27, 2013.

DANAEE, M.; FARZINEBRAHIMI, R.; KADIR, M. A.; SINNIH, U. R.; MOHAMAD, R.; TAHA, R. M. Effects of MeJa and SA elicitation on secondary metabolic activity, antioxidant content and callogenesis in *Phyllanthus pulcher*. **Brazilian Journal Botany**, DOI 10.1007/s40415-015-0140-3, 2015.

DANNER, M.A.; SASSO, S. A. Z.; MEDEIROS, J. G. S.; MARCHESE, J. A.; SÉRGIO MIGUEL MAZARO, M. Indução de resistência à podridão-parda em pêssegos pelo uso de eliciadores em pós-colheita. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p.793-799, 2008.

DARKO, E.; HEYDARIZADEH, P.; SCHOEFS, B.; SABZALIAN, M. R. Photosynthesis under artificial light: the shift in primary and secondary metabolism. **Philosophical Transation of the Royal Society**, v. 369, p. 1-8, 2014.

DAS D.; BORUA, P.K. *In vitro* propagation of *Alternanthera sessilis* L. from internode explant. **British Biotechnology Journal**, v. 4, n. 1, 2014.

DAS, J.; MAO, A. A.; HANDIQUE, P. J. Callus-mediated organogenesis and effect of growth regulators on production of different valepotriates in Indian valerian (*Valeriana jatamansi* Jones.). **Acta Physiology Plant**, v. 35, p. 55-63, 2013.

DEBNATH, M; NANDI, M.; BISWAS, M. A critical pharmacognostic evaluation and preliminary phytochemical investigation of *Alternanthera sessilis* (L.) R. BR. Leaves. **Indian Journal of Pharmaceutical Science e Research**, v. 4, n. 2, p. 71-74, 2014.

DEBNATH, M.; MALIK, C. P.; BISEN, P. S. Micropropagation: a tool for the production of high quality plant-based medicines. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 33-49, 2006.

DJILIANOV, D.; GENOVA, G.; PARVANOV, D.; ZAPRYANOVA, N.; KONSTANTINOVA, T.; ATANASSSOV, A. *In vitro* culture of the resurrection plant *Haberlear rhodopensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.80, p.115-118, 2005.

ECKERT, M.; KALDENHOFF, R. Light-induced stomatal movement of selected *Arabidopsis thaliana* mutants. **Journal of experimental Botany**, v. 51, p. 1435-1442, 2001.

FUKUDA, N.; FUJITA, M.; UHTA, Y.; SOSE, S.; NISHIMURA, S.; EZARA, H. Directional blue light irradiation triggers epidermal cell elongation of abaxial side resulting in inhibition of leaf epinasty in geranium under red light condition. **Scientia Horticulturae**, v. 115, n. 2, p. 176-182, 2008.

GANDIA-HERRERO, F.; ESCRIBANO, J.; GARCIA –CARMONA, F. Betaxanthins as substrates for tyrosinase. An approach to the role of tyrosinase in the biosynthetic pathway of betalains. **Plant Physiology**, v. 138, p. 421-432, 2005.

GANDÍA-HERRERO, F.; ESCRIBANO, J.; GARCÍA-CARMONA, F. Characterization of the activity of tyrosinase on betanidin. **Journal Agriculture Food and Chemistry**, v. 55, p.1546-1551, 2007.

GANDÍA-HERRERO, F.; GARCÍA-CARMONA, F. Biosynthesis of betalains: yellow and violet plant pigments. **Trends in plant science**, v. 18, n. 6, p. 334-341, 2013.

GARCIA-GONZALEZ, R.; QUIROZ, K.; CARRASCO, B.; CALIGARI, P. Plant tissue culture: current status, opportunities and challenges. **Ciencia e Investigación Agraria**, Santiago, v. 37, n. 3, p. 5-30, 2010.

GEYTER, N.; GHOLAMI, A.; GOORMACHTIG, S.; GOOSSENS, A. Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism. **Trends in Plant Science**, v. 17, n. 6. P. 349-359, 2012.

GEORGIEV, V.; ILIEVA, M.; BLEY, T.; PAVLOV, A. Betalain production in plant *in vitro* systems. **Acta Physiol Plant**, v.30, p. 581-593, 2008.

GHARECHAH, J.; KHALILI, M.; HASANLOO, T.; SALEKDEH, G. H. An integrated proteomic approach to decipher the effect of methyl jasmonate elicitation on the proteome of *Silybum marianum* L. hairy roots. **Plant physiology and Biochemistry**, v. 70, p. 115-122, 2013.

GNANARAJ, W. E.; ANTONIMASY, A.; MARIMUTHU, J.; MARAPPAMPALAYAM, S. K.; SELVAN, N. Micropropagation of *Alternanthera sessilis* (L.) using shoot and nodal segments. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 3, p. 206-212, 2011.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GONÇALVES, S.; ROMANO, A. In vitro culture of lavenders (*Lavandula* spp.) and the production of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 166-174, 2013.

GOUDRIAAN, I. Light distribution. In: Canopy photosynthesis: from basics to applications, 1 ed, 2016, p. 3-21.

GUNDLACH, H.; MULLER, M.J; KUTCHAN, T.M.; ZENK, M.H. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor induced plant cell cultures. **Plant Biology**, v.89, p.2386-2393, 1992.

HAMMOND-KOSACK, K.; JONES, J. D. G. Responses to plant pathogens. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant, 2000. p. 1102-1156.

HATLESTAD, G.J.; AKHAVAN, N.A.; SUNNADENIYA, R.M.; ELAM, L.; CARGILE, S.; HEMBD, A.; GONZALEZ, A.; MCGRATH, J.M.; LLOYD, A.M. The beet Y locus

encodes an anthocyanin MYB-like protein that activates the betalain red pigment pathway. **Nature Genetics**, v. 47, p. 92–96, 2015.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricult. Experiment**, v.347, 1938.

HOSSAIN, A. I.; FAISAL, M.; RAHMAN, S.; JAHAN, R.; RAHMATULLAH, M. A preliminary evaluation of antihyperglycemic and analgesic activity of *Alternanthera sessilis* aerial parts. **BMC Complementary e Alternative Medicine**, v. 14: 169, 2014.

HU, L.; WANG, Z.; DU, H.; HUANG, B. Differential accumulation of dehydrins in response to water stress for hybrid and common Bermuda grass genotypes differing in drought tolerance. **Journal Plant Physiology**, v.167, p.103-109, 2010.

HUNDIWALE, J. C.; AVINASH, C. P.; MOHAN, V, K. PATIL, D. A. A. A current on photopharmacology of the genus *Alternanthera*. **Journal of Pharmacy Research**, v. 5, n.4, p. 1924-1929, 2012.

IKKAIKEUCHI, M; SUGIMOTO, K; IWASE, A. Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression. **The plant cell**, v. 25, p. 3159-3173, 2013.

JIAO, J.; GAI, QY.; WANG W.; MI, YG.; FU, YJ.; W. Enhanced astragaloside production and transcriptional responses of biosynthetic genes in *Astragalus membranaceus* hairy root cultures by elicitation with methyl jasmonate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 105, p. 339-346, 2016.

JOHNSON, M. T. J.; CARPENTER, E. J.; TIAN, Z.; BRUSKIEWICH, R.; BURRIS, J. N.; CARRIGAN, C. T.; CHASE, M. W.; CLARKE, N. D.; COVSHOFF, S.; DEPAMPHILLIS, C. W.; EDGER, P. P.; GOH, F. Evaluating methods for isolating total RNA and predicting the success of sequencing phylogenetically diverse plant transcriptomes. **Plos one**, v. 7, n. 11, p. 1-12, 2012.

KAKANI, A.; PENG, Z. ARR5 and ARR6 mediate tissue specific cross-talk between auxin and cytokinin in *Arabidopsis*. **American Journal of Plant Sciences**, v. 2, n. 4, p. 549-553, 2011.

KHAN, M. I.; HARSHA, P. S. C.; GIRIDHAR, S. P.; RAVISHANKAR, G. A. Pigment identification, antioxidant activity, and nutrient composition of *Tinospora cordifolia* (willd.) Miers ex hook. F e thoms fruit. **International Journal Food and Science Nutricion**, v.62, p.239–249, 2011.

KHAN, M. I.; SRI HARSHA, P. S. C.; GIRIDHAR, P.; RAVISHANKAR, G. A. Pigment identification, nutritional composition, bioactivity, and *in vitro* cancer cell cytotoxicity of *Rivina humilis* L berris, potential source of betalains. **LWT – Food Science and Technology**, v. 47, p. 315-323, 2012.

KHAN, M. I.; GIRIDHAR, P. Plants betalains: chemistry and biochemistry. **Phytochemistry**, v. 117, p. 267-295, 2015.

KARPIŃSKI, S.; SZECHYŃSKA-HEBDA, M.; WITUSZYŃSKA, W.; BURDIK, P. Light acclimation, retrograde signalling, cell death and immune defences in plants. **Plant, Cell & Environmental**, v.36, p. 736–744. doi:10.1111/pce.12018, 2013.

KAVITHA, M. S.; SELVAN, N.; WESELY, E. G.; JOHNSON, M. *In vivo* and *in vitro* anti-bacterial efficacy of *Alternanthera sessilis* (Linn.). **International Journal of Pharmacology – Research e Development**, v. 2, n. 10, 2010.

KIM, Y. S.; CHO, J. H.; PARK, S.; JUNG-YEON HAN, JY.; BACK, K.;CHOI, YE. Gene regulation patterns in triterpene biosynthetic pathway driven by overexpression of squalene synthase and methyl jasmonate elicitation in *Bupleurum falcatum*. **Planta**, v. 233, p. 343-355, 2011.

KLEIN, F. R. S. Alterações bioquímicas em espécies do gênero *Alternanthera* quando expostas a radiação UV-B e UV-C. Dissertação de Mestrado do Programa De Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Brasil, 2014.

KLEINOWSKI, A. M.; RODRIGUES, I. C. S.; RIBEIRO, M. V.; EINHARDT, A. M.; PETERS, J. A.; BRAGA, E. J. B. Pigment production and growth of *Alternanthera* plants cultured *in vitro* in the presence of tyrosine. **Brazilian Archives of Biology and technology**, v. 57, p. 253-260, 2014.

KLEINOWSKI, A. M. Estudos fisiológicos e purificação de amarantina em plantas do gênero *Alternanthera*. Tese de Doutorado do Programa De Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Brasil, 2015.

KUMARASWAMY, M; ANURADHA, M. Micropropagation of *Pogostemon cablin* Benth through direct regeneration for production of true to type plants. **Plant Tissue Culture Biotechnology**, v.20, p.81-89, 2010.

LAGE, D. A.; TIRADO, M. S.; VANICORE, S. R.; SABINO, K. C. C.; ALBARELLO, N. Production of betalains from callus and cell suspension cultures of *Pereskia aculeata* Miller, an unconventional leafy vegetable. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, n. 122, p. 341-350, 2015.

LAMBERT, E.; FAIZAL, A.; GEELEN, D. Modulation of triterpene saponin production: In vitro cultures, elicitation, and metabolic engineering. **Appl Biochemistry and Biotechnology**, v 164, p. 220-237, 2011.

LEE, E. J.; AN, D.; NGUYEN, C. T. T.; PATIL, S. B.; KIM, J.; KIL SUN YOO, K. S. Betalain and betaine composition of greenhouse- or field-produced beetroot (*Beta vulgaris* L.) and Inhibition of HepG2 Cell Proliferation. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, p. 1324-1331, 2014.

LI, B^a; WANG, B.; LI, H.; PENG, L.; RU, M.; LIANG, S.; YAN, X.; ZHU, Y. Establishment of *Salvia castanea* Diels f. tomentosa Stib. Hairy root cultures and the promotion of tanshinone accumulation and gene expression with Ag⁺, methyl jasmonate, and yeast extract elicitation. **Protoplasma**, DOI 10.1007/s00709-015-0790-9, 2015.

LI, L.^b; XU, L.; WANG, X.; PAN, G.; LU, L. *De novo* characterization of the alligator weed (*Alternanthera philoxeroides*) transcriptome illuminates gene expression under potassium deprivation. **Journal of Genetics**, v. 94, n. 1, p. 95-104, 2015.

LI, L. W.; LI, M. J.; PAN, L. Y.; HUANG, B. K.; CHU, Q. C.; YE, J. N. Study on electrochemical profiles of Valeriana medicinal plants by capillary electrophoresis. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 69, n. 2, p. 179-186, 2014.

LORENZI, H.; SOUZA, V. C. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. Instituto Plantarum, 2ª edição, 2008.

LUCA, R. L.; MACEDO, A. F.; CECHINEL, V. F.; LAGE, C. L. S.; ESQUIBEL, M. A. Ação de diferentes faixas do espectro luminoso na otimização da produção de *Alternanthera brasiliana* L., uma planta medicinal. In: **Encuentro Latinoamericano De Biotecnología Vegetal**, v. 4, 2001, Goiânia-GO. Anais.Goiânia: Redbio, 2001. 6p.

MACEDO, A. F.; LAGE, C. L.; ESQUIBEL, M. A.; SOUZA, M. M.; SILVA, K. L.; NIERO, R.; CECHINEL-FILHO, V. Preliminary phytochemical and pharmacological studies on plantlets of *Alternanthera brasiliana* cultured under different spectral quality of lights. **Acta Farm. Bonaerense**, v.23, p.515-519, 2004.

MACHADO, A.; CONCEIÇÃO, A. R. Programa estatístico WinStat - Sistema de Análise Estatístico para Windows. Versão 1.0. **Universidade Federal de Pelotas**, 2007.

MANDAL, S. Induction of phenolics, lignin and key defense enzymes in eggplant (*Solanum melongena* L.) roots in response to elicitors. **African Journal of Biotechnology**, v. 47, p. 8038-8047, 2010.

MARTINAZZO, E. G.; ANESE, S.; WANDSCHEER, A. C. D.; PASTORINI, L. H. Efeito do sombreamento sobre o crescimento inicial e teor de clorofila foliar de *Eugenia uniflora* Linn (Pitanga) – Família Myrtaceae. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 162-164, 2007.

MEHMOOD, A.; TANVEER, A.; NADEEM, M. A.; ZAHIR, Z.A. Comparative allelopathic potencial of metabolites of two *Alternanthera* species against germination and seedling growht of rice. **Planta daninha** v. 32, n.1, p. 1-10, 2014.

MERTZ, L.M.; HENNING, F.A.; ZIMMER, P.D. cDNA-AFLP na identificação de genes relacionados a qualidade fisiológica. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 2, p.48-53, 2009.

MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q.; SILVA, S. M.; RESENDE, R. F.; SILVA, A. S. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 14, n.1, p. 110-121, 2012.

MORAES, D. M.; BANDEIRA, J. M.; MARINI, P.; LIMA, M. G. S.; MENDES, C. R. **Práticas Laboratoriais em Fisiologia Vegetal**. 1ª.ed. Cópias Santa Cruz, Pelotas, Brasil. p. 162, 2012.

MOREIRA, M. A.; FONTES, P. C. R.; CECOM, P. R.; ARAÚJO, R. F. Seleção de índices para o diagnóstico do estado de nitrogênio de batata-semente básica. **Acta scientiarum**, v. 33, p. 335-340, 2011.

MORINI, S.; MULEO, R. Effects of light quality on micropropagation of woody species. In: JAIN, S.M.; ISHII, K. Micropropagation of woody trees and fruits. Dordrecht, **Kluwer Academic Publishers**, p. 3-35, 2003.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n.5, p.473-497, 1962.

MURUGAN, S. B.; RESHMA, A.; DEEPIKA, R.; BALAMURAGAN, S.; SATHISHKUMAR, R. Antioxidant capacities of *Amaranthus tristis* and *Alternanthera sessilis*: a comparative study. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 30, p. 2230-2235, 2013.

NAGASHIMA, A. I.; HENNING, L. M. M.; PODANOSQUI, A. M. P.; MOREIRA, R. M. P.; HENNING, A. F. Comparação de protocolos para extração de RNA de tegumentos de sementes de soja. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 3, p. 178-181, 2013.

NAMDEO, A. G. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. **Pharmacognosy reviews**, v. 1, n. 1, p. 68-79, 2007.

NASCIMENTO, L. B.; LEAL-COSTA, M. V.; COUTINHO, M. A.; MOREIRA, S.; LAGE, C. L.; COSTA, S. S. TAVARES, E. S. Increased antioxidant activity and changes in phenolic profile of *Kalanchoe pinnata* (Lamarck) Persoon (Crassulaceae) specimens grown under supplemental blue light. **Photochemistry and Photobiology**, v. 89, n. 2, p. 391-399, 2013.

NAZ, S.; KHATOON, K. The effect of auxins on callus induction in *Achyranthes aspera*. **Park. Journal Botany**, v. 46, n. 6, p. 2203-2207, 2014.

NETO L. G.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 3, n. 2, p. 374-381, 2007.

NIRAIMATHI, K. L.; SUDHA, V.; LAVANYA, R.; BRINDHA, P. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Alternanthera sessilis* (Linn.) extract and their antimicrobial, antioxidant activities. **Colloids and surface B: Biointerfaces**, v. 102, p. 288-291, 2013.

NOGUCHI, N. E.; NISHINO, K.; NIKI, E. Assesment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, (4), p. 503-515, 2010.

PAVOKOVIC, D.; KRSNIK-RASOL, M. Complex biochemistry and biotechnological production of betalains. **Food Technology and Biotechnology**, v. 49, p. 145–155, 2011.

PEROTTI, J. C.; RODRIGUES, I. S, C.; KLEINOWSKI, A. M; RIBEIRO, M. V.; EINHARDT, A. M.; PETERS, J. A.; BACARIN, M. A.; BRAGA, E. J. B. Produção de betacianina em erva-de-jacaré cultivada *in vitro* com diferentes concentrações de sulfato de cobre. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 9, p. 1874-1880, 2010.

PÉREZ-ALONSO, N. L.; LABRADA, F. A.; PÉREZ, A. C.; PÉREZ, A. P.; SOSA, R.; ANGEL MOLLINEDA, A.; GONZÁLEZ, E. J. Estimulación de cardenólidos en brotes de *Digitalis purpurea* L. cultivados *in vitro* mediante elicitores. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 16, n. 1, p. 51-61, 2014.

PRASAD, A.; PRAGADHEESH, V. S.; MATHURA, A.; SRIVASTAVA, N. K.; SINGH, M.; MATHURA, A. K. Growth and centelloside production in hydroponically established medicinal plant *Centella asiatica* (L.). **Industrial Crops and Products**, v. 35, p. 309-312, 2012.

PREETHA, D.; MAHALAKSHMI, K.; BHAKYALAKSHMI, M. *In vitro* propagation of *Alternanthera versicolor* (Linn.) – A medicinal herb. **International Journal of Engineering Science and Technology**, v. 5, n. 1, 2013.

QUIN, Y.; JI, X.; LIU, H.; WU, H.; YANG, W. Size control over spherical silver nanoparticles by ascorbic acid reduction. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 372, n. 1, p. 172-176, 2010.

RAMAKRISHNA, A.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signaling and Behavior**, v. 6, n. 11, p. 1720-1731, 2011.

REIS, A. **Síntese de betalainas induzida pela luz em espécies do gênero *Alternanthera***. Dissertação de Mestrado do Programa De Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Brasil, 2013.

REIS, A.; KLEINOWSKI, A. M.; KLEIN, F. R. S.; TELLES, R. T.; AMARANTE, L.; BRAGA, E. J. B. Light quality on the *In vitro* growth and production of pigments in the genus *Alternanthera*. **Journal of Science and Biotechnology**, v. 18, n. 5, p. 349-357, 2015.

RODRÍGUEZ-SAHAGÚN, A. et al. Plant cell and tissue culture as a source of secondary metabolites. In: ORHAN, I.E. **Biotechnological Production of Plant Secondary Metabolites**. (1st ed.). Turkey: Bentham Books, 2012, p.3-20.

RUIZ-GARCÍA, Y.; GÓMEZ-PLAZA, E. Elicitors: A tool for improving fruit phenolic content. **Agriculture**, v. 3, p. 33-52, 2013.

RUSSELL, W.; DUTHIE, G. Influences of food constituents on gut health plant secondary metabolites and gut health: the case for phenolic acids. **Proceedings of the Nutrition Society**. V. 70, p. 389-396, 2011.

SALVADOR, M. J.; PEREIRA, P. S.; FRANÇA, S. C.; CANDIDO, R. C. ; ITO, I. Y.; DIAS, A. D. Bioactive chemical constituents and comparative antimicrobial activity of callus culture and adult plant extracts from *Alternanthera tenella*. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung**, v.64, p. 373- 381, 2009.

SAKUTA, M. Diversity in plant red pigments: anthocyanins and betacyanins **Plant Biotechnol Rep.**, v.8, p.37–48, 2014.

SANIEWSKI, M.; HORBOWICZ, M.; PUCHALSKI, J.; UEDA J. Methyl jasmonate stimulates the formation and the accumulation of anthocyanin in *Kalanchoe blossfeldiana*. **Acta physiology plant.** v. 25, p. 143-149, 2003.

SANTOS, O.S. (Ed.). Cultivo sem solo: hidroponia. Santa Maria: UFSM/CCR, 2000. 107p.

SARAVANAN, P.; SATHISH K. S.; VIJAY S. Evaluation of antioxidant and thrombolytic potential of *Alternanthera sessilis*. **Journal and Environmental Science, Toxicology and Food Farmacology**, v. 2, n. 3, 2013.

SEKIGUCHI, H.; OZEKI, Y.; SASAKI, N. *In vitro* synthesis of betaxanthins using recombinant DOPA 4, 5-dioxygenase and evaluation of their radical-scavenging activities. **Journal Agriculture, Food and Chemistry**, v. 58, p. 12504-12509, 2010.

SEPÚLVEDA-JIMÉNEZ, G.; RUEDA-BENITEZ, P.; PORTA, H.; ROCHA-SOSA, M. A red beet (*Beta vulgaris*) UDP-glucosyltransferase gene induced by wounding, bacterial infiltration and oxidative stress. **Journal Experimental Botany**, v. 56, p.605–611, 2005.

SHIN, K. S.; PARK, S. Y.; PAEK, K.Y. Sugar metabolism photosynthesis and growth of *in vitro* plantelets of *Doritachopsis* und controlled micoenvironmental conditions. **In vitro Cell Dev. Biol. – Plant**, v. 49, p. 445-454, 2013.

SINGH, A.; KANDASAMANY, T.; ODHAV, B. *In vitro* propagation of *Alternanthera sessilis* (sessile joyweed), a famine food plant. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 21, p. 5691-5695, 2009.

SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symp. Soc. Exp. Biol.** v.11, p. 118–130, 1957.

SUZUKI, M.; MIYAHARAA, T.; TOKUMOTOB, H.; HAKAMATSUKAB, T.; GODAC, Y.; OZEKIA, Y.; SASAKIA, N. Transposon-mediated mutation of CYP76AD3 affects betalain synthesis and produces variegated flowers in four o'clock (*Mirabilis jalapa*). **Journal of Plant Physiology**, v. 171, p.1586–1590, 2014.

TANG, Y.; LI, X.; ZHANG, B.; CHEN, P. X.; LIU, R.; TSAO, R. Characterization of phenolics, betanins and antioxidant activities in seeds of three *Chenopodium quinoa* Willd. genotypes. **Food Chemistry**, v. 166, p.380–388, 2015.

TANVEER, A.; KHALIQ, A.; SIDDIQUI, M. H. A Rewiew on genus *Alternanthera* weeds implications. **Journal Weed Science and Research**, v. 19, n.1, p. 53-58, 2013.

TARIQ, U.; ALI, M.; ABBASI, H. B. Morphogenic and biochemical variations under different spectral lights in callus cultures of *Artemisia absinthium* L. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 130, p. 264-271, 2014.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Trad. SANTARÉM, E. R. et al. 4. ed. UFV, p.220, 2009.

TREJO-TAPIA G.; BALCAZAR-AGUILAR J. B.; MARTÍNEZ-BONFIL, B.; SALCEDO-MORALES G.; JARAMILLO-FLORES, M.; ARENAS-OCAMPO, M. L.; JIMÉNEZ-APARICIO, A. Effect of *screening* and subculture on the production of betaxanthins in *Beta vulgaris* L. var. 'Dark Detroit' callus culture. **Innovative Food Science and Emergent Technology**, v.9, p. 32–36, 2008.

TOMEI, R. R. **Prospecção de antioxidantes em *Alternanthera marítima* (planta in natura e obtida por cultura de células), Brasil**. 2008. 123f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba.

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

VERPOORTE, R.A. et al. Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. **Transgenic Research**, v.9, n.4-5, p.323-343, 2005.

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

VOGT, T.; IBDAH, M.; SCHMIDT, J.; WRAY, V.; NIMTZ, M.; TRACK, D. Light-induced betacyanin and flavonol accumulation in bladder cells of *Mesembryanthemum crystallinum*. **Phytochemistry**, v. 52, p. 583-592, 1999.

WANG, C.-Q.; WANG, B.-S. Ca²⁺-Calmodulin is involved in betacyanin accumulation induced by dark in C3 halophyte *Suaeda salsa*. **Journal Integrate of Plant Biology**, v. 49,p. 1378–1385, 2007.

WANG, C. Q.; LIU, T. Cryptochrome 2 is involved in betacyanin decomposition induced by blue light in *Suaeda salsa*. **Functional Plant Biology**, v. 33, p. 697–70, 2016.

WINK, M. Plant secondary metabolism: diversity, function and its evolution. **Natural Products Communications**, v.3, n.8, p.1205-1216, 2008.

WINK, M. Modes of Action of herbal medicines and plant secondary metabolites. **Medicines**, n. 2, p. 251-286, 2015.

YADAV, D. K.; JHARIYA, M. K.; KUMAR, A.; SINHA, S. Documentation and ethnobotanical importance of plants found in Sarguja district. **Journal of Plant Development Sciences**, v. 7, n. 5, p. 439-446, 2015.

YU, K. W.; MURTHY, H. N.; HAHN, E.J.; PAEK, K. Y. Ginsenoside production by hairy root cultures of *Panax ginseng*: influence of temperature and light quality. **Biochemistry Engineering Journal**, v. 23, p. 53–56, 2005.

ZHAO, J. T.; DAVIS, L. C.; VERPOORTE, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v.23, p.283-333, 2005.

ZHAO, S.-Z.; SUN, H.-Z.; GAO, Y.; SUI, N.; WANG, B.-S. Growth regulator induced betacyanin accumulation and dopa-4,5-dioxygenase (DODA) gene expression in

euhalophyte *Suaeda salsa* calli. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant** v.47, p. 391–398, 2011.

ZHU, F.; YI-ZHONG, C.; SUN, M.; CORKE, H. Influence of Amaranthus betacyanin pigments on the physical properties and color of wheat flours. **Journal Agriculture, Food and Chemistry**, v. 56, p. 8212-8217, 2008.