

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia
Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas



Trabalho de Conclusão de Curso

Micropropagação, tolerância à salinidade e análise de betacianina em plantas de *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze, cultivadas *in vitro*

Isabel Corrêa da Silva Rodrigues

Pelotas, 2010

ISABEL CORRÊA DA SILVA RODRIGUES

Micropropagação, tolerância à salinidade e análise de betacianina em plantas de *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze, cultivadas *in vitro*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

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

Co-orientador: Prof. Dr. José Antonio Peters

Pelotas, 2010

Dados de catalogação na fonte:

Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

R696m Rodrigues, Isabel Corrêa da Silva

Micropropagação, tolerância à salinidade e análise de betacianina em plantas de *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze, cultivadas *in vitro* / Isabel Corrêa da Silva Rodrigues ; orientador Eugenia Jacira Bolacel Braga ; co-orientador Jose Antonio Peters. – Pelotas, 2010. – 41f. : il. color. – Monografia (Conclusão de curso). Instituto de Biologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2010.

1.Biologia. 2.Fisiologia vegetal. 3.Estresse salino. 4. Metabólitos secundários. 5. Plantas medicinais.

Banca Examinadora:

Dr. José Antonio Peters (Co-orientador)

Msc. Márcia Vaz Ribeiro

Dr. Sidnei Deuner

Dr^a. Elizete Beatriz Radmann (Suplente)

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Elcar e Tomaz, minhas irmãs, Tatiana e Luciana e ao meu sobrinho Henrique, pelo amor e amizade que sempre me proporcionaram, por compreender minha ausência em alguns momentos em que me dediquei exclusivamente à conclusão deste trabalho.

A minha orientadora Eugenia, por toda dedicação, confiança e por todo tempo que cedeu para a elaboração deste trabalho.

Ao professor Peters pela co-orientação e ao professor Sidnei pelas horas investidas na realização dos cortes anatômicos.

As minhas amigas de infância, Anna Amélia, Cynthia e Renata por fazerem parte da minha vida porque “amigas nunca se separam, apenas seguem caminhos diferentes”.

Aos “legais”, Carolina, Otávio e Thairize por todas as risadas e momentos de descontração e cumplicidade.

A todos os amigos que já fizeram ou ainda fazem parte do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, em especial a Márcia, Janieli, Alírcia e Andersom por toda ajuda e companheirismo.

E, por fim, agradeço a Deus por nos dar a vida.

Resumo

RODRIGUES, Isabel Corrêa da Silva. **Micropropagação, tolerância à salinidade e análise de betacianina em plantas de *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze cultivadas *in vitro***. 2009. 38f.. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação)-Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de estabelecer um protocolo eficaz para multiplicação *in vitro* de *A. brasiliana* e investigar a resposta dessa planta quando submetida a estresse salino. Plantas de *A. brasiliana* foram estabelecidas *in vitro* a partir de segmentos nodais em tubos de ensaio contendo meio MS, sem regulador de crescimento. As plantas permaneceram em câmara de crescimento por 15 dias, com temperatura de $25^{\circ}\text{C}\pm 2$ e fotoperíodo de 16 horas. Posteriormente, segmentos nodais oriundos dessas plantas foram usados como explantes e inoculados em diferentes meios de cultura: MS, WPM e B5, permanecendo em sala de crescimento por 45 dias. Após este período explantes de *A. brasiliana* foram inoculados em meio MS acrescido de diferentes concentrações de BAP (0; 1; 2,5; 5; 10 e $15\mu\text{M}$), onde permaneceram pelo mesmo período. Em meio MS livre de reguladores de crescimento foram acrescidos concentrações crescentes de NaCl (0, 10, 20, 50, 100 e 200mM). Após 45 dias, metade das plantas deste experimento foram aclimatizadas em casa de vegetação e a outra metade foi utilizada para análise fitoquímica, sendo quantificada betacianina, através de espectrofotometria. Foram retiradas folhas de cada tratamento para realização dos cortes anatômicos com auxílio de micrótomo. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo os tratamentos dos dois primeiros experimentos compostos por cinco repetições, representadas por um frasco contendo quatro explantes. O experimento do estresse salino foi formado por doze repetições de cada tratamento, contendo quatro explantes em cada frasco. Os resultados foram submetidos à análise de variância, regressão polinomial e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Não houve diferença estatística entre as variáveis analisadas em função dos meios testados, já a adição de BAP ao meio MS apresentou efeito negativo sobre as variáveis analisadas, inibindo o crescimento radicular e não aumentando significativamente o número de brotações. As plantas de *A. brasiliana* mostraram-se tolerantes ao NaCl até a concentração de 100mM. A concentração de 10mM apresentou os maiores valores para altura, número de folhas e raízes e comprimento radicular. As plantas apresentaram 100% de sobrevivência quando aclimatizadas, resultando no sucesso dessa etapa. Observou-se aumento da concentração de betacianina e da espessura do limbo à medida que aumentaram as concentrações de NaCl no meio de cultura. Conclui-se que o meio MS é o mais indicado para micropropagação de *A. brasiliana in vitro*, sem necessidade da adição de citocinina BAP para melhorar a resposta de multiplicação. As plantas apresentam tolerância a concentrações altas de NaCl no meio de cultura, e aumento na síntese de betacianina e da espessura do limbo foliar, mediante o estresse. Essa resposta sugere que essa planta possa ser utilizada na recuperação de dunas e nas indústrias farmacêuticas, alimentícias e de cosméticos devido a presença de betacianinas, um composto de ampla ação e interesse medicinal.

Palavras-chave: Estresse salino. Metabólitos secundários. Plantas medicinais. Amaranthaceae. Dunas.

Abstract

RODRIGUES, Isabel Corrêa da Silva. **Micropropagation, salt tolerance and analysis of betacyanin plants *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze cultured *in vitro***. 2009. 38f.. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação)-Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

This work was carried out to establish an effective protocol for *in vitro* multiplication of *A. brasiliana* and investigate the response of this plant when subjected to salt stress. Plants *A. brasiliana* were established *in vitro* from nodal segments in test tubes containing MS medium without growth regulator. The plants remained in a growth chamber for 15 days at 25 ± 2 ° C and a photoperiod of 16 hours. Later, the nodal segments coming from these plants were used as explants and inoculated in different culture media: MS, WPM and B5, where they remained in a growth chamber for 45 days. After this period, explants of *A. brasiliana* were inoculated on MS medium supplemented with different concentrations of BAP (0, 1, 2.5, 5, 10 and 15 μ M), where they remained the same period. MS medium free of growth regulators were added increasing concentrations of NaCl (0, 10, 20, 50, 100 and 200mM). After 45 days, half the plants of this experiment was acclimatized in a greenhouse and the other half was for phytochemical analysis to quantify betacyanin by spectrophotometry. Leaves were taken from each treatment to achieve the cuts with the aid of anatomical plate. The experimental design was completely randomized and the treatments of the first two experiments consisting of five replicates, represented by a bottle containing four explants. The salt stress experiment consisted of twelve replicates of each treatment, containing four explants in each jar. The results were submitted to analysis of variance, polynomial regression and the averages compared by Tukey test at 5% probability of error. There was no statistical difference between variables with means tested, since the addition of BAP to MS medium has negative effects on the variables analyzed, inhibiting root growth and not significantly increasing the number of shoots. Plants of *A. brasiliana* were tolerant to NaCl concentrations of up to 100mM. The concentration of 10 mM showed the highest values for height, number of leaves and roots and root length. The plants showed 100% survival rate when acclimatized, resulting in the success of this step. There was an increase in the concentration of betacyanin and the blade thickness with increasing the concentration of NaCl in the culture medium. We conclude that the MS is the most suitable for micropropagation of *A. brasiliana in vitro* without the addition of cytokinin to improve the response of multiplication. The plants have tolerance to high concentrations of NaCl in the culture medium, and increased synthesis of betacyanin and the thickness of the leaf through the stress. This response suggests that this plant is indicated for use in land reclamation and in the pharmaceutical, food and cosmetics that the synthesis of betacyanin, composed of a wide action and medical interest.

Keywords: Salt stress. Secondary metabolites. Medicinal plants. Amaranthaceae. Dunes.

Sumário

1 Introdução	8
2 Objetivos	10
2.1 Objetivo geral	10
2.2 Objetivos específicos	10
3 Revisão de literatura	11
3.1 Utilização de plantas medicinais	11
3.2 Estudos com o gênero <i>Alternanthera</i>	11
3.3 Espécie em estudo	12
3.4 Cultura de Tecidos e Micropropagação	13
3.5 Salinidade.....	14
4 Material e Métodos	16
4.1 Estabelecimento <i>in vitro</i>	16
4.2 Meios de cultivo para multiplicação <i>in vitro</i>	17
4.3 Utilização da citocinina BAP	17
4.4 Estresse salino	18
4.5 Aclimatização	18
4.6 Quantificação de betacianina	18
4.7 Cortes anatômicos	19
4.8 Delineamento experimental.....	19
5 Resultados e Discussão	19
5.1 Meios de cultivo para multiplicação <i>in vitro</i>	19
5.2 Utilização da citocinina BAP.....	20
5.3 Estresse salino	22
5.4 Aclimatização	26
5.5 Quantificação de betacianina	27
5.6 Cortes anatômicos	27
6 Conclusões.....	30
Referências Bibliográficas	31

1 Introdução

A utilização de plantas medicinais no contexto mundial é expressiva, visto que dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) relatam que cerca de 80% da população utiliza-se da prática de curar-se através dos extratos de plantas ou de seus princípios ativos (LUCCA, 2004).

A procura pelas plantas medicinais, para utilização e comércio, tem aumentado a cada dia, por ser mais econômica, na maioria das vezes mais eficaz e com efeitos colaterais menores que os de remédios sintéticos (GALDINO, 2006). No Brasil, o uso cada vez mais crescente, vem aumentando o consumo dessa forma de terapia, crescendo cerca de 15% ao ano, enquanto o crescimento anual de medicamentos sintéticos gira em torno de 3 a 4% (SIMÕES et al., 2005).

Os efeitos medicinais ou tóxicos destas plantas, geralmente estão relacionados aos metabólitos secundários, aonde pertencem substâncias como taninos, lactonas, sesquiterpenos, entre outros (ZANETTI, 2002).

Muitas espécies são utilizadas tradicionalmente para a cura de diversas enfermidades, tornando-se potenciais modelos para a síntese de novos fármacos. Porém, a demanda excessiva por certos recursos naturais ocasiona a escassez destes, fazendo com que muitas espécies, por serem exploradas, sem nenhuma restrição, se extingam do nosso ecossistema. (SILVA; BUITRON; OLIVEIRA, 2001).

O gênero *Alternanthera* (Amaranthaceae), tem sido reconhecido pelas suas propriedades farmacológicas, pois foram identificados compostos biologicamente ativos, entre eles os triterpenóides (saponinas), compostos fenólicos e pigmentos da classe betalaínas - betacianinas e betaxantinas (SALVADOR; DIAS, 2004).

Os pigmentos da classe betalaína, como as betacianinas que dão a coloração arroxeada e as betaxantinas que dão a coloração amarelada, foram identificados e o interesse por esses pigmentos cresceu desde que sua atividade anti-radical foi caracterizada, e passou a ser amplamente utilizada como aditivo para produtos alimentícios, fármacos e cosméticos devido as suas propriedades colorantes naturais e ausência de toxicidade (DORNENBURG; KNORR, 1996).

Alternanthera brasiliensis, conhecida como penicilina ou terramicina, possui atividade analgésica (MACEDO et al., 1999) e atividade antiproliferativa de linfócitos (BROCHADO et al., 2003), sendo encontrada no Brasil, nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul (PEREIRA et al., 2007), ocupando dunas internas ou

planícies (Resolução CONAMA, 1999).

Estudos fitoquímicos revelaram a presença de terpenos, esteróides e compostos fenólicos, confirmando a presença de fitosterol e β -sitosterol, que juntos com outros compostos podem justificar a atividade analgésica (SANTOS et al., 1995).

Estudos anatômicos realizados por Betoni et al. (2006) relataram a presença de tricomas tectores pluricelulares e a presença de drusas. Tanto a seção paradérmica adaxial como a abaxial apresentam estômatos predominantemente diacíticos (Pereira, 2007).

Técnicas de cultura de tecidos apresentam vantagens sobre o cultivo de plantas inteiras, como na produção de substâncias químicas de valor, principalmente quando o material vegetal manipulado tem alto crescimento e elevado acúmulo de metabólitos (BOLTA et al., 2000).

A adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura é uma importante forma de reproduzir o que ocorre naturalmente nas plantas, onde combinações destas substâncias podem proporcionar melhor crescimento e desenvolvimento do explante (ANDRADE, 2006). As citocininas, como a sintética benzilaminopurina (BAP) participa da superação da dominância apical e na indução da proliferação de gemas axilares, sendo considerada muito eficaz para a multiplicação de diversas espécies e indução de gemas adventícias (JESUS et al., 2002).

A propagação *in vitro* tem sido muito útil na produção de plantas homogêneas, com alta qualidade sanitária, isentas de vírus, além de ser uma ferramenta importante para a manutenção e o intercâmbio de germoplasma (RIBEIRO et al., 2007, SILVA et al., 2007). Além disso, as técnicas de cultura *in vitro* têm sido extensivamente usadas não somente pela rápida propagação clonal, mas também para o estudo de mecanismos de tolerância à salinidade de muitas espécies como possibilidade de serem utilizadas na recuperação de solos degradados.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Estudar aspectos da micropropagação de *A. brasiliiana* e investigar a resposta dessa planta quando submetida ao estresse salino *in vitro* e seus efeitos após aclimatização.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Testar três diferentes meios para a multiplicação *in vitro*.

2.2.2 Verificar o efeito da citocinina, benzilaminopurina (BAP) na otimização da produção de brotos.

2.2.3 Avaliar a resposta morfológica de plantas cultivadas na presença de diferentes concentrações de NaCl.

2.2.4 Analisar quantitativamente a produção de compostos secundários em plantas submetidas ao estresse salino.

2.2.5 Verificar a porcentagem de sobrevivência dessas plantas quando aclimatizadas em casa de vegetação.

2.2.6 Observar e comparar estruturas anatômicas relacionadas à tolerância à salinidade em plantas submetidas e não submetidas ao estresse.

3 Revisão de literatura

3.1 Utilização de plantas medicinais

O uso de plantas medicinais é uma forma de tratamento muito antiga, relacionada aos primórdios da medicina e fundamentada no acúmulo de informações por sucessivas gerações (BRASIL, 2006).

O emprego de plantas medicinais na recuperação da saúde tem evoluído ao longo dos tempos, desde as formas mais simples utilizadas pelo homem das cavernas, buscando na natureza recursos para melhorar sua condição de vida, aumentando assim suas chances de sobrevivência, até as formas mais sofisticadas empregadas pelo homem moderno. Em ambos os casos o que é percebido é a existência de “algo”, com propriedade de provocar reações benéficas no organismo, resultando na recuperação da saúde (LORENZI; MATOS, 2008).

Durante séculos têm-se buscado nas plantas medicinais alternativas para o tratamento de diversas doenças, inclusive as dermatológicas (RASKIN et al., 2002), principalmente naquelas que apresentam processos cicatriciais de difícil resolução. (HSU, 2005). Na Antigüidade, de forma empírica, já eram conhecidas algumas propriedades medicinais atribuídas às flores da *Calendula officinalis* L., popularmente conhecida como calêndula (ALONSO, 1998).

Com os avanços científicos, esta prática milenar cedeu espaço aos medicamentos sintéticos, entretanto, o alto custo destes fármacos e seus efeitos colaterais contribuíram para o ressurgimento da fitoterapia (OLIVEIRA; AMARAL; CASALI, 2001).

3.2 Estudos com o gênero *Alternanthera*

A família Amaranthaceae compreende cerca de 170 gêneros e 2000 espécies, ocorrendo 20 gêneros nativos e 100 espécies no Brasil. Muitas destas espécies são utilizadas como ornamentais ou na medicina popular, sendo comumente encontradas em ambientes abertos, porém algumas espécies são encontradas no interior de florestas (SOUZA; LORENZI, 2005).

Estudos realizados por Marchioretto et al. (2008) mostram que o Rio Grande do Sul apresenta 11 gêneros e 43 espécies de plantas dessa família, sendo o gênero

Alternanthera o mais representativo, com 11 espécies.

Plantas desse gênero são conhecidas por possuírem propriedades antimicrobianas e antivirais e em algumas espécies deste gênero tem sido reportada a inibição da atividade linfocitária, propriedades antivirais e hepatoprotetoras e atividade analgésica (FERREIRA et al., 2003). Possuem compostos biologicamente ativos conhecidos, entre eles betalaínas (betacianinas e betaxantinas), ecdisteróides, flavonóides, saponinas e triterpenos (FERREIRA; DIAS, 2000). Estudos etnofarmacológicos relataram atividades antiviral, antimicrobiana, hepatoprotetora, antifúngica, antidiarréico e analgésica de extratos de plantas desse gênero, como *Alternanthera brasiliana*, *Alternanthera philoxeroides*, *Alternanthera sessilis* e *Alternanthera tenella*.

3.3 Espécie em estudo

A espécie *A. brasiliana* é popularmente conhecida como penicilina, terramicina, doril ou carrapichinho, sendo uma planta herbácea perene, de base lenhosa atingindo até 120 cm de altura (LORENZI; MATOS, 2008). É amplamente encontrada nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul (PEREIRA et al., 2007), e além de ser cultivada como ornamental pelo colorido arroxeadado de suas folhas é utilizada na medicina popular (LORENZI; MATOS, 2008), onde a infusão de suas folhas é utilizada como digestiva, depurativa e diurética e a maceração da planta inteira é utilizada contra a prisão de ventre (MORS; RIZZINI; PEREIRA, 2000).

Estudos *in vitro* com *A. brasiliana* confirmaram a presença de flavonóides como o canferol (Brochado et al., 2003), terpenos, esteróides, compostos fenólicos e pigmentos da classe betalaína (Ferreira; Dias, 2000).

Os pigmentos da classe betalaína são pigmentos naturais de importância quimiotaxonômica tipicamente associados com plantas da ordem Cariofilales. Dentre esses pigmentos estão as betacianinas, que são compostos glicosilados e derivam das agliconas betanidina e isobetanidina (CASTELLAR et al., 2003) e dão a coloração arroxeadada e as betaxantinas que dão a coloração amarelada. O interesse por esses pigmentos cresceu desde que sua atividade anti-radical foi caracterizada, passando a ser amplamente utilizada como aditivo para produtos alimentícios, fármacos e cosméticos devido as suas propriedades colorantes naturais e ausência

de toxicidade (DÖRNENBURG; KNORR, 1996; STRACK et al., 2003).

Análises anatômicas, desta espécie, realizadas por Delaporte et al. (2002) revelaram a presença de folhas anfiestomáticas, com tricomas tectores ornamentais, sendo observado alterações na disposição e no tamanho dos feixes vasculares na nervura principal, apresentando tecido esclerenquimático no pólo floemático. Tanto a seção paradérmica adaxial como a abaxial apresentam estômatos predominantemente diacíticos (PEREIRA, 2007).

Conforme Resolução 261-CONAMA (1999) esta planta está classificada como vegetação de dunas internas e planícies, podendo desenvolver-se sobre dunas móveis, semifixas ou fixas, além de ocorrer em planícies arenosas após a praia ou associadas a dunas e lagunas, recebendo menor ou nenhuma influência marítima. Desta forma, sendo uma planta potencialmente tolerante ao sal, pode ser uma cultura alternativa para ser utilizada em solos salinizados.

3.4 Cultura de Tecidos e Micropropagação

A cultura de tecidos vegetais compreende um conjunto de técnicas que tem como princípio o isolamento de um explante, que é a parte excisada (célula, tecido ou um órgão) e seu cultivo sob condições de plena assepsia, em um meio nutritivo artificial (COSTA, 2006).

A demanda das indústrias de medicamentos e cosméticas por compostos presentes em plantas é crescente, acarretando no aumento da busca de matérias de alta qualidade, o que pode ser obtido pela micropropagação *in vitro*. Atualmente, um grande número de pesquisas tem sido realizadas com o intuito de estudar estratégias para a propagação de plantas medicinais, tendo em vista a viabilização de plantios comerciais e também a otimização da produção de metabólitos secundários (OKSMAN-CALDENTEY; INZÉ, 2004).

Em plantas medicinais, a micropropagação auxilia na produção de mudas homogêneas e de qualidade, na conservação do germoplasma, além de auxiliar na seleção e melhoramento de genótipos com potencial para ser utilizados pela indústria farmacêutica (RAO; RAVISHANKAR, 2002).

Esta técnica permite um rápido aumento no número de plantas geneticamente idênticas partindo de plantas selecionadas, permite a produção de mudas durante o ano todo, a formação de plantas com elevada qualidade sanitária e, ainda, auxilia na

propagação de plantas cujas sementes têm baixo poder germinativo (SERAFINI; BARROS; AZEVEDO, 2001).

Em muitas culturas o crescimento e a proliferação de brotos *in vitro* a partir de gemas axilares são maximizados pela incorporação de citocininas ao meio nutritivo (GEORGE, 1996). As citocininas são muito importantes na regulação do crescimento e da morfogênese, pois estimulam a divisão das células, a indução e a proliferação de brotações (HOWELL; LALL; CHE, 2003). Meios acrescidos de BAP, uma citocinina sintética, têm sido muito utilizados no cultivo *in vitro* de espécies da família Amaranthaceae (BENNICI et al., 1997).

O estoque de plantas *in vitro* permite um fluxo contínuo de produção em todas as épocas do ano, e possibilita a produção de plântulas a partir de órgãos já desenvolvidos o que, em geral, não é conseguido em condições naturais de campo (KITTO, 1997).

Além disso, as técnicas de cultura *in vitro* têm sido extensivamente usadas não somente pela rápida propagação clonal, mas também para o estudo de mecanismos de tolerância à salinidade de muitas espécies como possibilidade de serem utilizadas na recuperação de solos degradados (MACÊDO et al., 2003).

Devido ao alto custo das práticas de recuperação de solos salinizados e do tempo exigido para sua execução, torna-se necessária a identificação e a seleção de culturas e cultivares tolerantes à salinidade para serem introduzidas nessas áreas salinizadas (TÁVORA; FERREIRA; HERNANDEZ, 2001).

Elicitores bióticos e abióticos (como NaCl) vêm sendo amplamente empregados em cultura de tecidos vegetais, com o intuito de maximizar a produção de compostos químicos de interesse. A submissão de plantas a estresses salinos, tem sido apontada como estimulador da biossíntese de metabólitos secundários incluindo terpenos, flavonóides, alcalóides, betacianinas e fenilpropanóides, entre outros (BHUIYAN; ADACHI, 2003; ZHAO et al., 2005).

3.5 Salinidade

As comunidades vegetais ocorrentes em dunas litorâneas são caracterizadas por tolerarem altos níveis de salinidade, deficiência hídrica e de nutrientes, ampla variação de umidade e temperatura, além de injúrias causadas pelos fortes ventos (MAUN, 1994).

Durante o processo evolutivo, as plantas desenvolveram mecanismos de resposta aos diversos tipos de estresses sejam eles bióticos, como ataque de patógenos, ou abióticos como os estresses ambientais. As respostas de defesa iniciam com a percepção do estresse, seguido do desencadeamento de uma cascata de eventos moleculares que é finalizada em vários níveis de respostas fisiológicas e metabólicas podendo tornar a planta resistente ao estresse (MARGIS-PINHEIRO et al., 1999).

Essas plantas capazes de tolerar ambientes salinos são denominadas halófitas e ocupam, em geral, locais pobres em nutrientes e submetidos à forte luminosidade (DICKISON, 2000). Sob tais condições estas espécies podem apresentar alterações morfológicas como redução do crescimento, aumento da suculência; ou fisiológicas, como diminuição na condutância estomática e do crescimento e acúmulo de solutos orgânicos no citoplasma, tais como, sorbitol, polióis, prolina, betaína, entre outros (HASEGAWA et al., 2000; KOYRO, 2006).

Os fatores que atuam na tolerância a esses altos níveis de salinidade são freqüentemente dependentes da complexidade anatômica e fisiológica da planta (SHANNON, 1997).

Além da escassez de informações sobre estratégias adaptativas, a ênfase maior dos trabalhos sobre salinidade é destinada a plantas de interesse econômico, como, por exemplo, os trabalhos com *Oriza sativa* L. (BENITEZ et al., 2008), *Solanum lycopersicum* L. (SAM et al., 2003) e *Triticum aestivum* L. (HU; FROMM; SCHMIDHALTER, 2005). Sobre as espécies nativas ocorrentes em dunas litorâneas pouco é conhecido, onde se destacam os trabalhos realizados com espécies de Poaceae (MARTINS; MACHADO; ALVES, 2008).

O ambiente dunal tem despertado interesse científico por abrigar espécies endêmicas (FEEMA, 1988) que atuam na rápida colonização das dunas e na fixação do sedimento, reduzindo assim os danos causados pela erosão (MATIAS; NUNES, 2001; CORDEIRO, 2005) e pelo relevante papel ecológico desempenhado pelas espécies na preservação da morfologia costeira (CORDAZZO; SEELINGER, 2003; CORDEIRO, 2005).

Os solos são considerados salinos quando a concentração de sais é igual ou excede a 0,5%, e correspondem a aproximadamente 6% da superfície dos continentes, estes ocorrem em regiões onde a precipitação é menor que a evaporação, nas porções tropicais costeiras que apresentam grande aporte de sais

oriundos do mar (LARCHER, 1995), ou ainda, quando intensamente utilizados pela agricultura (KOYRO, 2006).

A salinidade do solo (HOULE et al., 2001) e o borrifo marinho (CHEPLICK; DEMETRI, 1999) são condições ambientais que podem prejudicar a germinação das sementes e impedir o estabelecimento de plântulas de dunas (CORDAZZO, 1999), reduzir o tamanho da planta, sua capacidade reprodutiva e o tamanho das sementes (CHEPLICK; DEMETRI, 1999). Desta forma, a concentração de NaCl no substrato pode atuar seletivamente, determinando o estabelecimento de plântulas e sobrevivência em áreas costeiras (CORDAZZO, 1999).

A alta salinidade diminui o potencial de água no substrato e deste modo restringe a água e nutrientes para absorção pelas raízes, além de poder causar descontrole iônico e toxicidade nas plantas (HOULE et al., 2001) podendo também influenciar no estabelecimento de espécies em função de diferentes respostas aos fatores abióticos (NOE; ZEDLER, 2000).

Estudos envolvendo estratégias de sobrevivência sob salinidade têm sido realizados no mundo todo, considerando-se o interesse no reconhecimento das estruturas morfo-anatômicas que permitem a determinadas espécies a ocupação de regiões extremamente salinas (COSTA et al., 2003).

O interesse pela fisiologia do estresse e seus efeitos no conteúdo de metabólitos secundários em plantas, em parte é explicado pela necessidade de se conhecer as possíveis adaptações que podem ocorrer no metabolismo desses compostos, maximizando a produção de constituintes ativos de plantas medicinais e condimentares (DIXON; PAIVA, 1995; VERPOORTE et al., 1999).

4 Material e Métodos

4.1 Estabelecimento *in vitro*

Para a realização deste experimento foram utilizadas plantas de *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze, provenientes de Joinville/SC, e devidamente identificadas no Herbário Pel do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pelotas, pelas biólogas Elen Nunes e Silvia Rubin, com auxílio da bibliografia técnica especializada (SIQUEIRA, 2002). Um exemplar do genótipo foi incorporado ao acervo do referido herbário como testemunha, sob o número PEL-24.531. As

plantas foram mantidas em casa de vegetação até formarem novas brotações para serem estabelecidas *in vitro*. Estas foram levadas para o laboratório, lavadas com água corrente, imersas em álcool 70% por 2 minutos e lavadas com água autoclavada três vezes. Posteriormente foram colocadas em hipoclorito de sódio 1% com três gotas de tween por 20 min, sob agitação mecânica, e enxaguadas três vezes com água destilada autoclavada novamente, para posterior inoculação no meio de cultivo.

Segmentos nodais de aproximadamente 1,0cm, contendo duas gemas, foram seccionados das brotações e inoculados individualmente, em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio de cultura, constituído da concentração de sais e vitaminas do MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), adicionado de 100mg L⁻¹ de mio-inositol, 30g L⁻¹ de sacarose, 7g L⁻¹ de ágar, sendo o pH ajustado para 5,8 antes da adição do ágar. Os explantes foram acondicionados em sala de incubação com temperatura de 25 ± 2°C, permanecendo por três dias no escuro e, após, transferidos para luz, onde permaneceram submetidos a 16 horas de fotoperíodo, sob densidade de fluxo de fótons de 48µmoles m⁻² s⁻¹, por 15 dias.

4.2 Meios de cultivo para multiplicação *in vitro*

Para testar a capacidade de multiplicação *in vitro*, foram utilizados três meios de cultura, MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), Woody Plant Medium - WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980) e B5 (GAMBORG; MILLER; OJIMA, 1968). Todos os meios tiveram a adição de 30g L⁻¹ de sacarose e 100mg L⁻¹ de mio-inositol e o pH ajustado para 5,8 antes da adição de 7g L⁻¹ de agar.

4.3 Utilização da citocinina BAP

Após a escolha do meio mais indicado para a multiplicação foi testada a adição da citocinina benzilaminopurina (BAP), nas concentrações de 0; 1; 2,5; 5; 10 e 15µM, com a finalidade de aumentar o número de brotações. A citocinina foi adicionada ao meio MS, contendo 30g L⁻¹ de sacarose e 100mg L⁻¹ de mio-inositol. Os meios tiveram seu pH ajustados para 5,8 antes da adição do ágar na concentração de 7g L⁻¹.

4.4 Estresse salino

A tolerância ao estresse salino foi avaliada em plantas cultivadas *in vitro*, em meio MS suplementado de diferentes concentrações de NaCl (0, 10, 20, 50, 100 e 200mM) sendo mantida nas mesmas condições conforme os experimentos acima descritos.

4.5 Aclimatização

Na fase de aclimatização, as plantas oriundas dos tratamentos *in vitro* suplementado com NaCl, enraizadas e não-enraizadas, tiveram a vedação de seus frascos perfurada e foram mantidas desta forma pelo período de três dias em sala de incubação. Posteriormente, essas plantas foram lavadas para a retirada do meio de cultura aderido e transferidas para o substrato Plantmax ®. As plantas que não estavam enraizadas, antes da transferência, foram mantidas por cinco minutos em AIB (ácido indol 3-butírico) na concentração de 250mg L⁻¹ e junto com as demais foram mantidas em casa de vegetação com umidade relativa de 70% e temperatura entre 25 e 30°C, por 30 dias.

4.6 Quantificação de betacianina

A determinação quantitativa de betacianinas por espectrofotometria, foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Cai et al. (1998), onde a parte aérea foi macerada com celite e acrescida de 10mL de água. O extrato obtido foi colocado em centrífuga a 1668 rpm a 4°C por 25min, então foi realizada a leitura em espectrofotômetro do sobrenadante. A quantificação das betacianinas total foi obtida através da absorbância de 536nm e 650nm. A concentração de betacianina foi determinada levando em consideração o coeficiente de extração molar para amarantina ($5,66 \times 10^4$).

4.7 Cortes anatômicos

Folhas de seis repetições por tratamento foram coletadas e conservadas em álcool 70% , para análise anatômica de *A. brasiliana*.

Foram realizados cortes longitudinais com auxílio de micrótomo manual, os quais foram clarificados com hipoclorito de sódio a 20%, por cerca de 1min e lavados com água destilada. As lâminas foram montadas com safra-blau (safranina - azul de astra) para visualização das estruturas presentes no limbo e na nervura central.

4.8 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo os tratamentos dos dois primeiros experimentos compostos por cinco repetições, representadas por um frasco contendo quatro explantes. O experimento do estresse salino foi formado por doze repetições de cada tratamento, contendo quatro explantes em cada frasco. Ao final de cada experimento foi avaliado número de folhas, altura, número de brotos e número e comprimento da raiz. No processo de aclimatização foram utilizados seis repetições do experimento do estresse salino e foi avaliada porcentagem de sobrevivência por tratamento e porcentagem de enraizamento das plantas não-enraizadas submetidas ao AIB.

Os resultados foram submetidos à análise de variância, regressão polinomial e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, com auxílio do software WINSTAT (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2002).

5 Resultados e Discussão

5.1 Meios de cultivo para multiplicação *in vitro*

Para as variáveis número de folhas, brotos, raízes, altura e comprimento da raiz não houve diferença significativa em relação aos meios testados. As maiores médias para número de folhas (9,70), altura (4,34cm) e de brotos (1,66) foram obtidas nas plantas cultivadas em meio B5 e número (5,61) e comprimento médio (4,06 cm) de raízes nas plantas mantidas em meio MS (Tabela 1).

Tabela 1- Média do número de folhas, brotos e raízes, altura e comprimento de raízes de *Alternanthera brasiliana*, cultivadas em três meios de cultura: MS, WPM e B5, por 45 dias

Meios	nº folhas	altura	nº brotos	nº raíz	comp. de raiz
B5	9,70 a	4,34 a	1,66 a	5,04 a	3,64 a
MS	9,25 a	3,14 a	1,64 a	5,61 a	4,06 a
WPM	9,21 a	3,46 a	1,27 a	5,49 a	3,02 a

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste de Tukey.

Os meios de cultura MS, WPM e B5 proporcionaram resultados estatisticamente iguais, por isso optou-se pela utilização do MS por ser o de emprego mais amplo na cultura de tecidos. Thorpe; Harray; Kumar (1994) revisaram os meios de cultura utilizados para espécies de diferentes gêneros. Alguns desses meios foram especificamente formulados para fornecer os requisitos particulares à espécie em estudo, como o meio básico de cultura de Murashige e Skoog – MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), desenvolvido inicialmente para tecido medular de *Nicotiana tabacum* L. Hoje é um dos meios mais utilizados tanto para a micropropagação quanto para outras técnicas de cultura de tecidos (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998).

Corroborando com os resultados obtidos neste trabalho com *A. brasiliana*, Costa et al. (2007) observaram que os meios de cultura MS, WPM e B5 proporcionaram resultados estatisticamente iguais para multiplicação *in vitro* de *Lippia sidoides*, e também optaram pela utilização do meio MS.

5.2 Utilização da citocinina BAP

A utilização de concentrações crescentes de BAP não proporcionou um aumento significativo no número de brotos (Figura 1), permanecendo as médias próximas ao controle (1,81).

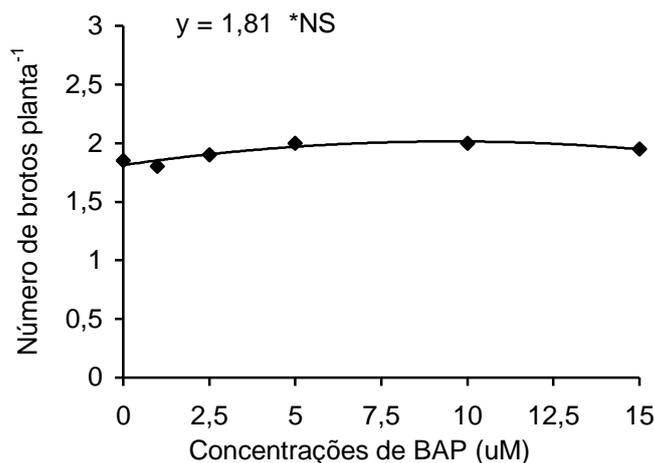


Figura 1- Número de brotos por plantas de *Alternanthera brasiliana*, cultivadas *in vitro*, em meio MS acrescido de diferentes concentrações de BAP, por 45 dias.

Entretanto, para as demais variáveis, a ausência de BAP incrementou significativamente o número de folhas, raiz, altura e comprimento radicular (Tabela 2). Juliani et al. (1999), em estudos com *Lippia junelliana* (Mold.) Tronc., também obtiveram maior média para o altura da parte aérea em MS na ausência de fitorreguladores.

Tabela 2. Média das variáveis número de folhas e raízes, altura e comprimento radicular de *A. brasiliana*, cultivadas em meio MS com seis concentrações de BAP, por 45 dias.

Meios	nº folhas	altura	nº raiz	comp. raiz
MS	10.81 a	3.38 a	3.70 a	4.12 a
MS + 1µM BAP	8.10 b	1.40 b	0.00 b	0.00 b
MS + 2.5µM BAP	8.14 b	1.24 bc	0.00 b	0.00 b
MS + 5µM BAP	7.83 b	1.12 bc	0.00 b	0.00 b
MS + 10µM BAP	7.33 b	0.68 c	0.00 b	0.00 b
MS + 15µM BAP	6.59 b	0.56 c	0.00 b	0.00 b

* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste de Tukey.

A adição de BAP no meio de cultura levou a inibição do crescimento radicular e diminuição da parte aérea nas plantas de *A. brasiliana*. Este resultado vem corroborar com o estudo realizado por Luca et al. (2001), que utilizaram a mesma espécie e observaram que a maior taxa de multiplicação foi obtida cultivando-a em meio livre de fitorreguladores. Em estudos com abacaxizeiro, os tratamentos que não utilizaram BAP no meio de cultivo estimularam o enraizamento e um maior

crescimento dos explantes, sem, contudo, induzirem a proliferação de brotos (ARAÚJO; SIQUEIRA, CECON, 2008).

Conforme Jesus et al. (2002) o BAP estimula maior produção de parte aérea, mas seu excesso pode ser tóxico e se caracteriza pela falta de alongamento da parte aérea e produção de calos, o que foi evidenciado nesse trabalho (Figura 2).

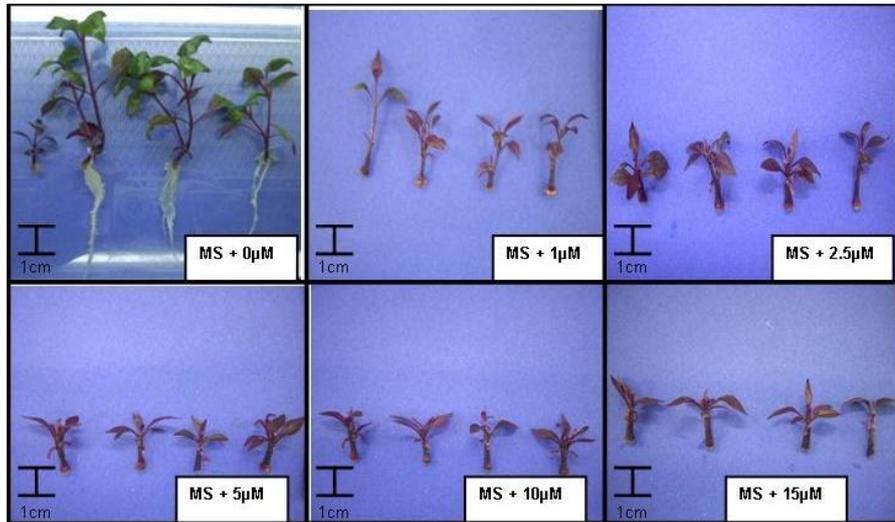


Figura 2- Planta de *Alternanthera brasiliana* cultivadas *in vitro* em meio MS com diferentes concentrações de BAP, por 45 dias.

5.3 Estresse salino

O número de brotos foi gradualmente aumentado de 0,0164 unidades, conforme as concentrações de NaCl foram elevadas (Figura 3).

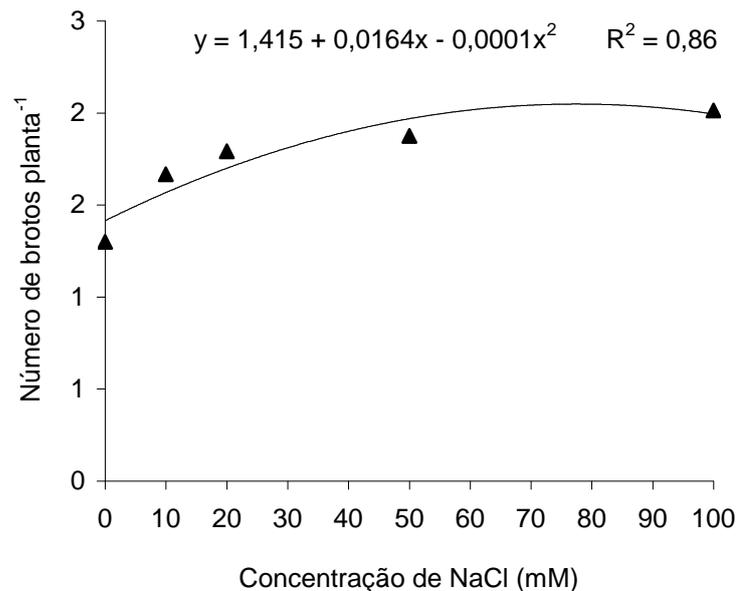


Figura 3- Número de brotos por plantas de *Alternanthera brasiliana*, cultivadas *in vitro* em meio MS, com diferentes concentrações de NaCl, por 45 dias.

Similar a outras espécies de plantas de dunas, tais como *Spartina ciliata*, *Blutaparon portulacoides*, *Cakile maritima* (CORDAZZO, 1994), *A. brasiliana* apresentou uma significativa redução na altura (Figura 4), conforme aumentou a concentração de NaCl (exceto na concentração de 10mM), porém tolerando (sobrevivendo) até 100mM de NaCl, concentração esta, maior que a concentração natural encontrada no substrato das dunas costeiras do sul do Brasil. Esta diminuição do tamanho das plantas em resposta ao aumento da salinidade do substrato comumente é observada em plantas de dunas (CORDAZZO; SEELINGER, 2003).

Quando as plantas se desenvolvem sob condições de salinidade, um dos sintomas mais característicos é a inibição, pelos sais, do crescimento (CORDEIRO, 2001). Esta inibição de crescimento, de acordo com Munns (2002), ocorre pela redução da habilidade das plantas absorverem água, sofrendo assim uma série de alterações metabólicas semelhantes às de plantas submetidas ao estresse hídrico.

Segundo Cordeiro (2001) as plantas mantidas em condições de alta salinidade precisam realizar um ajuste osmótico, gastando a energia que em condições normais seriam utilizadas para o crescimento e também os sais aumentam a pressão osmótica da solução do solo fazendo com que a disponibilidade de água para as plantas diminua, provocando deficiência de água, o

que afeta seu crescimento.

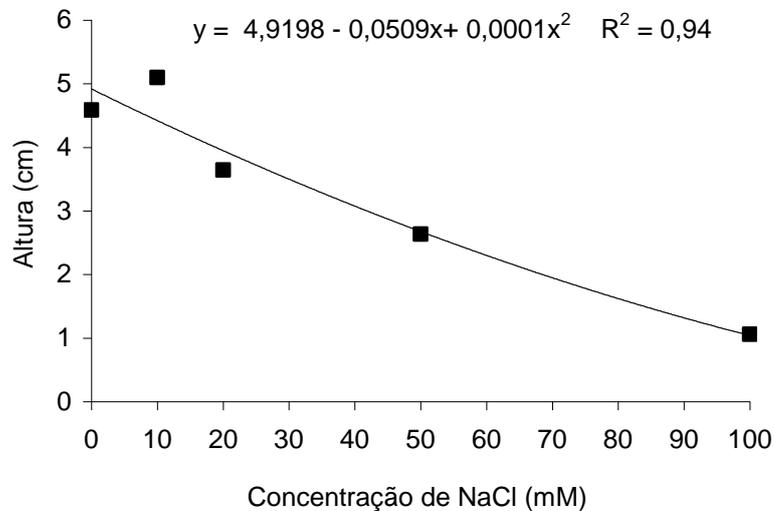


Figura 4- Altura de plantas de *Alternanthera brasiliana* cultivadas *in vitro*, em meio MS, com diferentes concentrações de NaCl, por 45 dias.

Maior número de raízes foi observado nas plantas cultivadas em meio livre de cloreto de sódio (7,57), e a diminuição destas foi proporcional ao aumento de NaCl (Figura 5). O comprimento médio das raízes apresentou um incremento em relação ao controle (5,29cm) quando as plantas foram cultivadas no meio de cultura contendo 10mM de NaCl (5,89cm), porém nas concentrações mais elevadas ocorreu um decréscimo, conforme o aumento da concentração (Figura 6).

Fernandes et al. (2003), no estudo sobre diferentes concentrações de salinidade no crescimento de *Bactris gasipaes* Kunth, verificaram que o sistema radicular foi a parte da planta mais afetada pela salinidade, diferentemente do que ocorre na maioria das espécies, em que a parte aérea é mais sensível ao estresse salino do que a raiz.

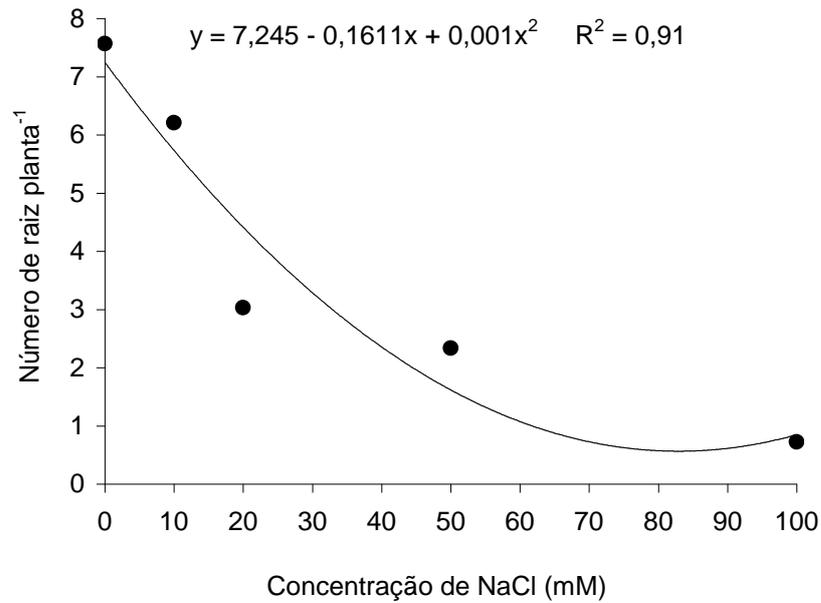


Figura 5- Número de raízes por plantas de *Alternanthera brasiliana* cultivadas *in vitro*, em meio MS, com diferentes concentrações de NaCl, por 45 dias.

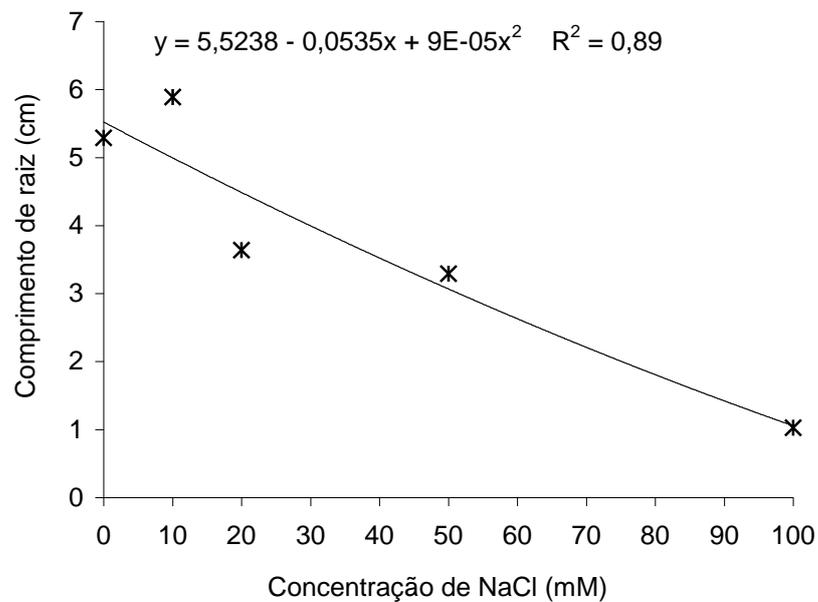


Figura 6- Comprimento das raízes em plantas de *Alternanthera brasiliana* cultivadas *in vitro*, em meio MS, com diferentes concentrações de NaCl, por 45 dias.

A maior concentração utilizada de NaCl (200mM) foi deletéria para as plantas, não ocorrendo o desenvolvimento do explante (Figura 7).



Figura 7- Plantas de *Alternanthera brasiliana* cultivadas *in vitro*, em meio MS, com 200mM de NaCl, por 45 dias.

5.4 Aclimatização

O processo de aclimatização das plantas foi bem sucedido apresentando 100% de sobrevivência para todos os tratamentos (Tabela 2), portanto as plantas produzidas podem ser diretamente plantadas em substratos e levadas para casa de vegetação, sem precisar passar pelo processo de enraizamento *in vitro*. Grigoriadou; Maloupa (2008) obtiveram resultado semelhante com a espécie *Crithmum maritimum* L., uma planta medicinal, também tolerante ao estresse salino, sendo encontrada em regiões marítimas.

Em relação ao enraizamento *ex vitro* das plantas que não possuíam raiz, foi observado uma porcentagem de 75,7% de enraizamento considerando todas as plantas de todos os tratamentos (Tabela 2).

Tabela 2- Porcentagens de sobrevivência e enraizamento de plantas aclimatizadas em casa de vegetação por 30 dias

Tratamento	% de sobrevivência	% de enraizamento sem AIB	% de enraizamento com AIB
MS	100	100	-
MS + 10 mM	100	80	100
MS + 20 mM	100	68,8	100
MS + 50 mM	100	18,8	77
MS + 100 mM	100	13,3	53,9

5.5 Quantificação de betacianina

Plantas submetidas ao estresse salino apresentaram aumento da concentração do pigmento betacianina conforme ocorreu o aumento da concentração de NaCl. Esse pigmento pertence ao metabolismo secundário e participa da resposta de defesa da planta (Figura 8).

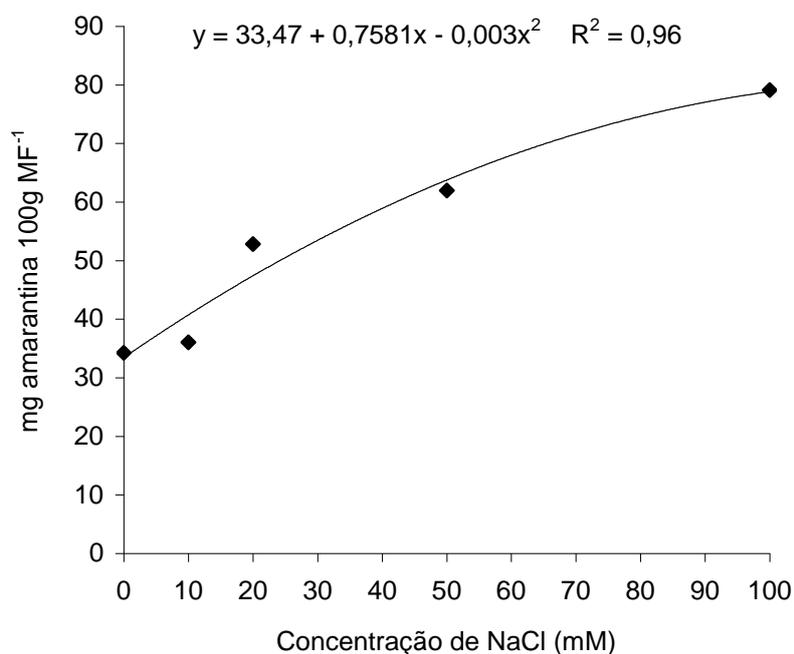


Figura 8- Concentração de betacianina em plantas de *Alternanthera brasiliana* cultivadas *in vitro*, em meio MS, com diferentes concentrações de NaCl, por 45 dias.

5.6 Cortes anatômicos

Alterações na espessura dos tecidos foliares são freqüentes em função do estresse imposto. Desta forma, a espessura do limbo foliar para a concentração de 10mM de NaCl diminuiu em relação ao controle, porém não diferiu significativamente. No entanto, nas demais concentrações houve um incremento significativo com o aumento nas doses de NaCl (Tabela 1), corroborando com resultados obtidos por Hameed; Ashraf; Naz (2009), em plantas de *Imperata cylindrica* (L.) submetidas as concentrações de 0 a 200mM de NaCl, ocorrendo também uma diminuição da espessura na menor concentração testada (50mM) seguido de um aumento nas demais. Porém Hwang; Chen (1995), em estudo realizado com *Kandelia*

candel (L.) observaram que a menor concentração de NaCl apresentou a maior espessura, diminuindo conforme o aumento na concentração.

Para a espessura na nervura central foi observada uma relação inversa, onde os aumentos nas concentrações de NaCl apresentaram uma diminuição significativa da sua espessura (Tabela 3).

Tabela 3- Espessura do limbo foliar e nervura central de plantas de *Alternanthera brasiliana* cultivadas *in vitro* sobre estresse salino por 45 dias

Características Avaliadas	Tratamentos				
	0mM NaCl	10mM NaCl	20mM NaCl	50mM NaCl	100mM NaCl
Limbo Foliar (μm)	202,53 C	176,95 C	256,37 B	290,37 A	329,57 A
Nervura Central(μm)	704,33 A	582,12 B	641,46 B	614,31 B	596,68 B

* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste de Tukey.

Não foram observadas estruturas de resistência ao estresse salino, como glândulas de sal. Em todos os tratamentos as folhas apresentaram tricomas tectores em ambas as faces da lâmina foliar (Figura 9), corroborando com o trabalho de Delaport et al. (2002) realizado com esta mesma espécie. Arruda; Viglio; Barros (2009) em estudo com *Canavalia rosea*, *Sporobolus virginicus* e *Miegia marítima* encontraram esta mesma característica, já na espécie da família Amaranthaceae *Blutaparon portulacoides* não foram encontrados tricomas tectores.

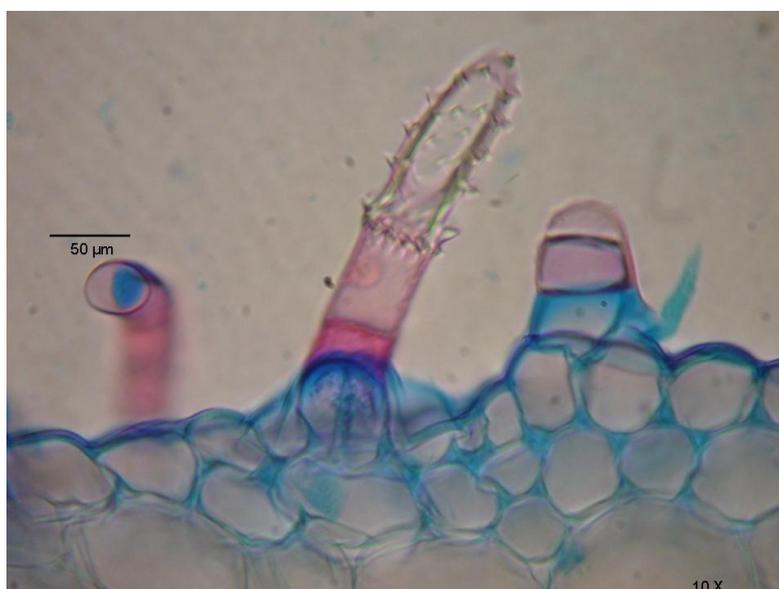


Figura 9- Detalhe dos tricomas tectores de *Alternanthera brasiliana* cultivadas *in vitro* em meio MS com 10mM de NaCl por 45 dias.

Segundo Lin; Ehleringer (1983) os tricomas atuam na reflexão da luminosidade e na alteração de características espectrais da folha, diminuindo a absorvância e evitando a fotoinibição. Em algumas espécies podem diminuir a absorção de ondas curtas, evitando elevação de temperatura e reduzindo a perda de água, sendo importantes para as plantas de ambientes intensamente iluminados, e sujeitos ao déficit hídrico (PRESS, 1999; GUTSCHICK, 1999),

Em todos os tratamentos foram observados feixes vasculares na porção mediana do mesófilo (Figura 10), corroborando com estudo de *B. portulacoides* (ARRUDA ; VIGLIO; BARROS, 2009).

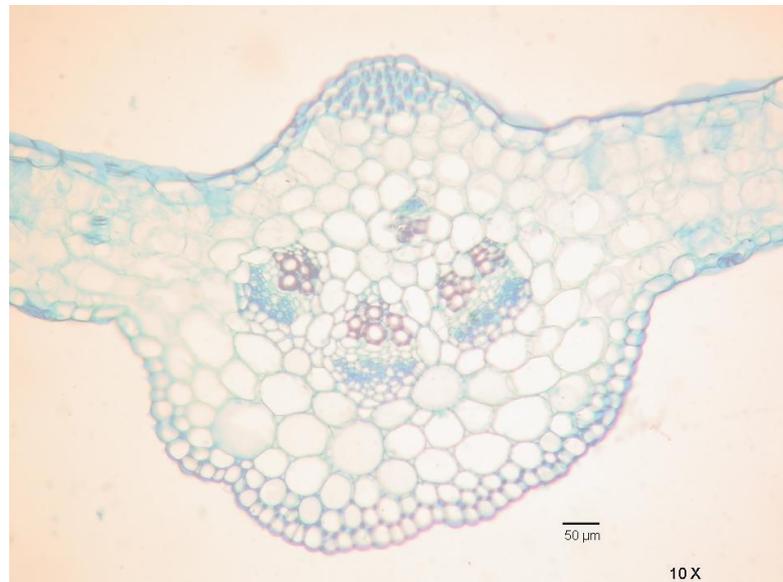


Figura 10- Corte da porção central de folha de *Alternanthera brasiliana* cultivadas em meio MS sem adição de NaCl por 45 dias, mostrando feixes vasculares na porção mediana do mesófilo.

6 Conclusões

A partir dos dados analisados, conclui-se que para a multiplicação de *A. brasiliiana in vitro* pode se optar por utilizar os meios MS, WPM ou B5 sem alteração na resposta multiplicativa. A adição da citocinina BAP prejudica o desenvolvimento do explante no meio MS.

A espécie *Alternanthera brasiliiana* é uma planta tolerante ao estresse salino, e em resposta a esse estresse ela aumenta a espessura de seu limbo e a síntese de betacianina, um colorante natural utilizado nas indústrias alimentícias e de cosméticos.

Referências Bibliográficas

ALONSO, J.R. **Tratado de fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas**. Buenos Aires: Isis, 1998. 1038p.

ANDRADE, Wrifran Fernandes. **Atuação do pulse na orgânogênese de *Eucalyptus grandis* cultivado *in vitro***. 2006. 55 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais)-Universidade de São Paulo, Piracicaba.

ARAÚJO, R.F.; SIQUEIRA, D.L.; CECON, P.R. Multiplicação *in vitro* do abacaxizeiro 'smooth cayenne' utilizando benzilaminopurina (BAP) e ácido naftalenoacético (ANA). **Revista Ceres**, v.55, p.455-460, 2008.

ARRUDA, R.C.O.; VIGLIO, N.S.F.; BARROS, A.A.M. Anatomia foliar de halófitas e psamófilas reptantes ocorrentes na Restinga de Ipitangas, Saquarema, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v.60, n.2, p.333-352, 2009.

BENITEZ, L.C.; RODRIGUES, I.C.S ; MAGALHÃES JUNIOR, A.M de ; BACARIN, M.A. ; PETERS, J. A. ; BRAGA, E. J. B. . Resposta ao estresse salino em genótipos de arroz avaliados por meio de caracteres morfológicos. **Revista Congrega Urcamp**, v.4, p.771-784, 2008.

BENNICI, A. GRIFONI, T.; SCHIFF, S.; BOVELLI, R. Studies on callus growth and morphogenesis in several species and lines of *Amaranthus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.49, p.29-33, 1997.

BETONI, R.; MUSSURY, R.M.; BATISTA, M.R.; SCALON, S.P.Q.; GOMES, A.A.; SILVA, M.A. Morfo-anatomia foliar comparada entre *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze e *Alternanthera tenella* Colla (Amaranthaceae). In: Congresso Brasileiro de OLERICULTURA, 46, 2006, Goiânia. **Anais do Congresso Brasileiro de OLERICULTURA**, Goiânia, 2006. p.658-658.

BHUIYAN, N. H.; ADACHI, T. Stimulation of betacyanin synthesis through exogenous methyl jasmonate and other elicitors in suspension-cultured cells of *Portulaca*. **Journal**

Plant Physiology, v.160, p.1117-1124, 2003.

BOLTA, Z.; BARICEVIC, D.; BOHANEC, B.; ANDRENSEK, S. A preliminary investigation of ursolic acid in cell suspension culture of *Salvia officinalis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.62, p.57–63, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. **O SUS de A a Z: garantindo saúde nos municípios**. 2ª Ed. Brasília: Editora MS, 2006. 384p.

BROCHADO, C. O.; ALMEIDA, A. P.; BARRETO, B. P.; COSTA, L. P.; RIBEIRO, L. S.; PEREIRA, R. L. C, KOATZ, V. L. G.; COSTA, S. S. Flavonol robinobiosides and rutosides from *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae) and their effects on lymphocyte proliferation *in vitro*. **Journal Brazilian Chemical Society**, v.14, p.449-451, 2003.

CAI, Y.; SUN, M.; WU, H.; HUANG, R.; CORKE, H. Characterization and Quantification of Betacyanin Pigments from Diverse *Amaranthus* Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.2063-2079, 1998.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios Nutritivos. In: **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CNPH, 1998. p.533-568.

CASTELLAR, R.; OBÓN, J.M.; ALACID, M.; FERNÁNDEZ-LOPES, J.A. Color properties and stability of betacyanins from opuntia fruits, **Journal Agricultural and Food Chemical**, v. 51, p. 2772-2776, 2003.

CHEPLICK, G.P.; DEMETRI, H. Impact of saltwater spray and sand deposition on the coastal annual *Triplasis purpurea* (Poaceae). **American Journal of Botany**, v.86, p.703-710, 1999.

CORDAZZO. C.V. **Comparative populations studies of four dominants plants of southern Brazilian coastal dunes**. 1994. 52f. .Ph.D. Tese (Doutorado), University of East Anglia, Norwich, UK.

CORDAZZO, C.V. Effects of salinity of seeds germination seedling growth and survival of *Spartina ciliate* Brong. **Acta Botanica Brasilica**, v.13, n.3, p.317-322, 1999.

CORDAZZO, C.V.; SEELINGER, U. Reproduction and vegetative regeneration in *Blutaparon portulacoides* (Amaranthaceae) on backshores of southern Brazil. **Journal of Coastal Research**, v.35, p.481-485, 2003.

CORDEIRO, G.G. **Salinidade em agricultura irrigada (conceitos básicos e práticos)**. Petrolina, PE: Embrapa Semi-árido, 2001. 38p.

CORDEIRO, S.Z. Composição e distribuição da vegetação herbácea em três áreas com fisionomias distintas na Praia do Perú, Cabo Frio, RJ, Brasil. **Acta Botanica Brasílica**, v.19, p.679-693, 2005.

COSTA, P.H.A.; SILVA, J.V.; BEZERRA, M.A.; ENÉAS FILHO, J.; PRISCO, J.T.; GOMES FILHO, E. Crescimento e níveis de solutos orgânicos e inorgânicos em cultivares de *Vigna unguiculata* submetidos à salinidade. **Revista Brasileira de Botânica**, v.26, p.289-297, 2003.

COSTA, Andréa Santos. **Sustentabilidade da Produção de Alecrimpimenta (*Lippia sidoides* Cham.)**: Micropropagação visando à conservação *in vitro*. 2006. 70 f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas)-Universidade Federal de Sergipe, Sergipe.

COSTA, A.S. da; ARRIGONI-BLANK, M.F.; BLANK A.F.; MENDONÇA A.B.; AMANCIO V.F.; LEDO A.S. Estabelecimento de alecrim-pimenta *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, v.25, p.68-72, 2007.

DELAPORTE, R.H.; MILANEZE, M.A.; DE MELLO, J.C.P.; JACOMASSI, E. Estudo Farmacognóstico das folhas de *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze (Amaranthaceae). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.21, p.169-174, 2002.

DICKISON, W.C. **Integrative plant anatomy**. San Diego: Harcourt Academic Press, 2000. 533p.

DIXON, R.A.; Paiva, N. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell**, v.7, p.1085-1097, 1995.

DORNENBURG, H.; KNORR, D. Generation of colors and flavors in plant cell and tissue cultures. **Critical Reviews in Plant Science**, v.15, p.141-168, 1996.

FEEMA 1988. Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente. **Importância da biota da região de Cabo Frio**. Rio de Janeiro, FEEMA.

FERNANDES, A.R.; CARVALHO, J.G.; CURI, N.; GUIMARÃES, P.T.G.; PINTO, J.E.B.P. Crescimento de mudas de pupunheira (*Bactris gasipaes* H.B.K.) sob diferentes níveis de salinidade. **Ciência e agrotecnologia**, v.27, n.2, p.278-284, 2003.

FERREIRA, E.O.; DIAS, D.A. A methyllenedioxyflavonol from aerial parts of *Blutaparon portulacoides*. **Phytochemistry**, v.53, p.145-147, 2000.

FERREIRA, E.A. PROCÓPIO, S.O.; SILVA, E.A.M.; SILVA, A.A.; RUFINO, R.J.N. Estudos anatômicos de folhas de espécies de plantas daninhas de grande ocorrência no Brasil. IV- *Amaranthus deflexus*, *Amaranthus spinosus*, *Alternanthera tenella* e *Euphobia heterophylla*. Viçosa-MG. **Planta Daninha**, v.21, n.2, p.263-271, 2003.

GALDINO, V.S. Das plantas medicinais e a biopirataria. In: XV Congresso Nacional do CONPEDI, Manaus. 2006, Manaus. **Direito Ambiental Internacional e Proteção Jurídica dos Recursos Naturais**. Manaus, 2006. p.1-19.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. et al. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v.50, p.151-158, 1968.

GEORGE, E. **Plant propagation by tissue culture**: the technology. Eversley: Exegetics Limited, 1996. 758p.

GRIGORIADOU, K.; MALOUPA, E. Micropropagation and salt tolerance of in vitro

grown *Crithmum maritimum* L. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.94, p.209-217, 2008.

GUTSCHICK, V. P. Biotic and abiotic consequences of differences in leaf structure. **New Phytologist**, v.143, n.1, p. 3-18, 1999.

HABERLANDT, G. **Physiological plant anatomy**. London: Macmillan, 1928. 777p.

HAMEED, M.; ASHRAF, M.; NAZ, N. Anatomical adaptations to salinity in cogon grass [*Imperata cylindrical* (L.) Raeuschel] from the Salt Range, Pakistan. **Plant Soil**, v.322, p.229-238, 2009.

HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A.; ZHU, J.K.; BOHNERT, H.J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.51, p.463-99, 2000.

HOWELL, S.H.; LALL, S.; CHE, P. Cytokinins and shoot development. **Trends in Plant Science**, v.8, p.453-9, 2003.

HOULE, G.; MOREL, L.; REYNOLDS, C.E.; SIRGEL, J. The effect of salinity on different developmental stages of an endemic annual plant, *Aster laurentianus* (Asteraceae). **American Journal of Botany**, v.88, n.1, p.62-67, 2001.

HSU, S. Green tea and the skin. **Journal of American Academy of Dermatology**, v.52, p.1049-59, 2005.

HU, Y.; FROMM, J.; SCHMIDHALTER, U. Effect of salinity on tissue architecture in expanding wheat leaves. **Planta**, v.220, p.838-848, 2005.

HWANG, Y.H.; CHEN, S.C. Salt tolerance in seedlings of the mangrove *Kandelia candel* (L.) Druce, Rhizophoraceae. *Botanical Bulletin Academia Sin.*, v.36, p.25-31, 1995.

JESUS, A.M.S.; CARVALHO, S.P.; MOACIR, P.; CARVALHO, M.; DUTRA, L.F. Micropropagação do cafeeiro com concentrações de BAP em meio de pré-cultivo e

de BAP e TDZ em meio de subcultivo. **Revista Ceres**, v.48, n.283, p.253-263, 2002.

JULIANI, H.R. (JR); KOROCH, A.R.; JULIANI, H.R.; TRIPPI, V.S. Micropropagation of *Lippia junelliana* (Mold.) Tronc. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.59, p.175–179, 1999.

KITTO, S.L. Comercial Micropropagation. **Hortscience**, v.32, n.6, p.1012-1016, 1997

KOYRO, H.W.. Effect of salinity on growth, photosynthesis, water relations and solute composition of the potencial cash crop halophyte *Plantago coronopus* L. **Environmental and Experimental Botany**. v.56, p.136-146, 2006.

LARCHER, W. 1995. *Physiological Plant Ecology*. 3.ed. New York: Springer, 1995. 540p.

LIN, Z. F & EHLERINGER, J. Epidermis effects on spectral properties of leaves of four herbaceous species. **Physiologia Plantarum**, v.59, p.91-94, 1983.

LLOYD, G.; MCCOWN B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Proc Int Plant Prop Soc**, v.30, p.421–427, 1980.

LORENZI, H.; MATOS, F.J. **Plantas Mediciniais: Nativas e Exóticas**. 2.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 544p.

LUCCA, R. A cura ameaçada. **Revista Terra**, São Paulo, ed.146, p.60-71, junho 2004.

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, 4., 2001, Goiânia-GO. **Anais do Encontro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal**. Goiânia: Redbio, 2001. 6p.

MACEDO, A. F.; BARBOSA, N.C.; ESQUIBEL; M.A.; SOUZA, M.M.; CECHINEL-FILHO, V. Pharmacological and phytochemical studies of callus culture extracts from *Alternanthera brasiliana*. **Pharmazie**, v.54, p.776-777, 1999.

MACÊDO, C.E.C.; SILVA, M.G.; NÓBREGA, F.S.; MARTINS, C.P.; BARROSO, P.A. V. ALOUFA, M.A.I. Concentrações de ANA e BAP na micropropagação de abacaxizeiro L. Merrill (*Ananas comosus*) e no cultivo hidropônico das plântulas obtidas *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.25, n.3, p.501-504, 2003.

MACHADO, A., CONCEIÇÃO, A.R. **Programa estatístico WinStat – Sistema de Análise Estatístico para Windows**, versão 2.0. Pelotas, RS, 2002.

MARCHIORETTO, M.S.; AZEVEDO, F.; JOSENDE, M.V.F.; SCHNORR, D.M. Biogeografia da família Amaranthaceae no Rio Grande do Sul. **Pesquisas Botânica**, n.59, p.171-190, 2008.

MARGIS-PINHEIRO, M.; SANDRONI, M.; LUMMERZHEIM, M.; OLIVEIRA, D. E. A defesa das plantas contra as doenças. **Ciência Hoje**, v.147, p.28-32, 1999.

MARTINS, S.; MACHADO, S.R.; ALVES, M. Anatomia e ultra-estrutura foliar de *Cyperus maritimus* Poir. (Cyperaceae): estratégias adaptativas ao ambiente de dunas litorâneas. **Acta Botânica brasílica**, v.22. p.493-503, 2008.

MATIAS, L.Q. ; NUNES, E.P. Levantamento florístico da área de proteção ambiental de Jericoacara, Ceará. **Acta Botanica Brasílica**, v.15, p.33-43, 2001.

MAUN, M.A. Adaptations enhancing survival and establishment of seedlings on coastal dune systems. **Vegetatio**, v.111, p.59-70, 1994.

MORS, W.B.; RIZZINI, C.T.; PEREIRA, N.A. **Medicinal Plants of Brazil**. Michigan: Reference publications, 2000. 550p.

MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell & Environment*, v.25, p.239-250, 2002.

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

NOE, G.B.; ZEDLER, J.B. Differential effects of four abiotic factors on the germination of salt marsh annuals. **American Journal of Botany**, v.87, p.1679-1692, 2000.

OLIVEIRA, J.E.Z., AMARAL, C.L.F., CASALI, V.W.D. **Plantas Medicinais e aromáticas: Avanços no Melhoramento Genético**. Viçosa. UFV, Departamento de Fitotecnia, 2001. 155p.

OKSMAN-CALDENTEY, K.; INZÉ, D. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. **Trends in Plant Science**, v.9, n.9, p.433-40, 2004.

PEREIRA, D.F. **Morfoanatomia e histoquímica comparativa entre *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze e *Alternanthera dentata* (Moench) Stuchlik; estudo fitoquímico e biológico de *Alternanthera brasiliana***. 2007. 110f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

PEREIRA D.F., ZANON R.B., MAGOGA B, ATHAYDE M.L. Conteúdo de polifenóis totais em folhas de *Alternanthera brasiliana*. In: I CONGRESSO DE FARMÁCIA DE MARINGÁ, 11, 2006, Maringá. **Arquivos do Mudi**, Maringá: UEM, 2007. 160p.

PRESS, M.C. The functional significance of leaf structure: a search for generalizations. **New Phytologist**, v.143, p.213-219, 1999.

RAO, S.; RAVISHANKAR, G.A. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v.20, p.101-53, 2002.

RASKIN, L. et al. Plants and human health in the twentyfirst century. **TRENDS in Biotechnology**, v.20, n.12, p.522- 31, 2002.

RESOLUÇÃO 261, **Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA**, 1999.

RIBEIRO, M.V.; LIMA, C.S.M.; BANDEIRA, J.M.; RUBIN, S.; BENITEZ, L.C.; PETERS, J.A.; BRAGA, E.J.B. Concentração de sacarose e tipos de vedação no cultivo in vitro de *Melissa officinalis*. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, s.2, p.843-845, 2007.

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

SAM, O.; RAMÍREZ, C.; CORONADO, M.J.; TESTILLANO, P.S. & RISUEÑO, M.C. Changes in tomato leaves induced by NaCl stress: Leaf organization and cell ultrastructure. **Biologia Plantarum**, v.47, p.361-366, 2003.

SANTOS, A.R.S.; FILHO, V.C.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Further studies on the antinociceptive action of the hydroalcoholic extracts from plants of the genus *Phyllanthus*. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v.47, n.1, p.66-71, 1995.

SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. Biotecnologia: princípios e aplicações. In: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba, RS: Agropecuária, 2001. p.25-75.

SHANNON, M.C. Adaptation of plants to salinity. **Advances in Agronomy**, v.60, p.75-120, 1997.

SIQUEIRA, J.C. 2002. Amaranthaceae In: WANDERLEY, M.G.L.; SHEPHERD, G. & GIULIETTI, A.M. **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo: FAPESP-HUCITEC**. p.11-30.

SILVA, A.B.; PASQUAL, M.; TEIXEIRA, J.B.; ARAÚJO, A.G. Métodos de micropropagação de abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.9, p.1257-1260, 2007.

SILVA, S.R.; BUITRON, X.; OLIVEIRA, L.H. **Plantas Medicinais do Brasil**: aspectos gerais sobre legislação. Quito: Traffic América do Sul-IBAMA, 2001. 44p.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 5ª edição. Florianópolis: Editora da UFSC, 2005, 1102p.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. 1.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. 640p.

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

TÁVORA, F.J.A.F.; FERREIRA, R.G.; HERNANDEZ, F.F.F. Crescimento e relações hídricas em plantas de goiabeira submetidas a estresse salino com NaCl. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23, n. 2, p. 441-446, 2001.

THORPE, T.A.; HARRAY, I.S.; KUMAR, P.P. Morphogenesis and regeneration. **Plant cell and tissue cult**, v.45, p.17-35, 1994

VERPOORTE, R.; HEIJDEN, R. V.D.; HOOPEN, H.J.G.; MEMELINK, J. Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. **Biotechnology Letters**, v.21, p.467-479, 1999.

ZANETTI, Gilberto Dolejal. *Tropaeolum majus* L. **morfo-histologia, fitoquímica, atividade antimicrobiana e toxicidade**. 2002. 90f.. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Farmacêutica da UFSM, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

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.