



Congrega
Urcamp 2016

13ª Jornada de Pós-Graduação e Pesquisa

REVISTA DA JORNADA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA ISSN:1982-2960

Micropropagação e estresse salino no aumento de compostos bioativos em plantas de *Alternanthera brasiliana*

Isabel Rodrigues Brandão¹, Cristini Milech², Simone Ribeiro Lucho³, Alírcia Moraes Kleinowski⁴, Márcia Vaz Ribeiro⁵, Eugenia Jacira Bolacel Braga⁶

RESUMO

A espécie *Alternanthera brasiliana* é popularmente conhecida como penicilina, terramicina, doril ou carrapichinho sendo muito utilizada na medicina popular para diferentes finalidades e se destaca por apresentar betacianinas que são pigmentos naturais com atividades antioxidantes. As betacianinas, assim como outros produtos do metabolismo secundário das plantas costumam aumentar em razão de algum tipo de estresse pelo qual a planta passa. Em função disso, o trabalho teve o objetivo de estabelecer um protocolo eficaz para multiplicação *in vitro* de *A. brasiliana* e investigar a resposta dessa planta em relação ao teor de betacianina quando submetida ao estresse salino. Para a micropropagação foram testados três meios de cultura, MS, WPM e B5. 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 15 μM , com a finalidade de aumentar o número de brotações. A tolerância ao estresse salino foi avaliada em plantas cultivadas *in vitro*, em meio MS suplementado com concentrações de 0, 10, 20, 50, 100 e 200 mM de NaCl. Após o período de 30 dias as plantas que passaram pelo estresse salino foram aclimatizadas e mantidas em casa de vegetação por 30 dias. Observou-se que os meios testados não diferiram significativamente quanto às características números de folhas, brotos, raízes, altura e comprimento da raiz, por isso, o meio escolhido para realizar os testes com o estresse salino foi o meio MS. A utilização de concentrações crescentes de BAP não aumentou o número de brotações, apresentando inibição do crescimento radicular e diminuição da parte aérea. Os teores de betacianina foram incrementados à medida que as concentrações salinas aumentaram. As plantas oriundas do cultivo *in vitro* apresentaram 100 % de taxa de sobrevivência para todos os tratamentos no processo de aclimatização. Com estes resultados conclui-se que o melhor meio de cultivo para a espécie em estudo é o MS sem BAP e as concentrações de 10 e 20 mM de cloreto de sódio são as mais indicadas para incrementar os teores de betacianina.

Palavras-chave: cultivo *in vitro*, metabolismo secundário, penicilina

Micropropagation and salt stress on increase bioactive compounds in *Alternanthera brasiliana* plant.

ABSTRACT

The *Alternanthera brasiliana* species is popularly known as penicillin, terramycin, doril or carrapichinho. It is being widely used in folk medicine for different purposes and stands out for presenting betacyanins that are natural pigments with antioxidant activity. The betacyanins, as well as other secondary metabolic products of plants usually increase due to some kind of stress by which the plant passes through. Because of this, the study aimed to establish an effective protocol for *in vitro* multiplication of *A. brasiliana* and investigate the response of the plant in relation to betacyanin content when subjected to salt stress. For micropropagation we tested three culture media, MS, WPM and B5. After choosing the most suitable medium for multiplication the addition of cytokinin benzylaminopurine (BAP), at concentrations of 0; 1; 2.5; 5; 10 and 15 μM was done, in order to increase the number of shoots. The salt tolerance was evaluated in plants grown *in vitro* on MS medium supplemented with concentrations of 0, 10, 20, 50, 100 and 200 mM NaCl. After 30 days the plants that have passed through salt stress were acclimatized and maintained in a greenhouse for 30 days. It was observed that the tested media did not differ significantly regarding number of leaves, characteristics, shoots, roots, root length and height, so the method chosen to perform the tests with salt stress was the MS medium. The use of increasing concentrations of BAP did not increase the number of shoots, showing inhibition of root growth and decreased shoot. The betacyanin was incremented as the salt concentration increased. The plants from *in vitro* culture showed 100% survival rate for all treatments in the acclimatization process. With these results it is concluded that the ideal culture medium for the species under consideration is in BAP MS and the concentrations of 10 and 20 mM sodium chloride are most suitable to increase the levels of betacyanin.

Keywords: *in vitro* culture, secondary metabolism, penicillin

INTRODUÇÃO

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 otimização da produção de metabólitos secundários (OKSMAN-CALDENTY; INZÉ, 2004).

Alternanthera brasiliana é uma espécie muito utilizada na medicina popular para diferentes fins, incluindo tratamento de infecções virais, distúrbios gástricos, hepáticos e do aparelho respiratório, além do uso como agente antimicrobiano, antiinflamatório e analgésico (VENDRUSCOLO; MENTZ, 2006). Estudos *in vitro* com *A. brasiliana* confirmaram a presença de flavonoides como o canferol (BROCHADO et al., 2003), terpenos, esteroides, compostos fenólicos e pigmentos da classe betalaína (KLEINOWSKI et al., 2014). É uma

planta potencialmente tolerante ao sal, podendo ser uma cultura alternativa para ser utilizada na recuperação de áreas degradadas (PEREIRA et al., 2007).

Os pigmentos hidrofílicos da classe betalaína, tipicamente associados com plantas da ordem Caryophyllales, são um grupo de metabólitos secundários nitrogenados, derivados da L-tirosina, 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).

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 (SINGH et al., 2009). A micropropagação é a aplicação mais prática da cultura de tecidos, sendo sua utilização em âmbito comercial já realizada em diversos países do mundo. Esta técnica permite um rápido aumento no número de plantas geneticamente idênticas, produção de mudas durante o ano todo, formação de plantas com elevada qualidade sanitária e, ainda, auxilia na propagação de plantas cujas sementes têm baixo poder germinativo (SERAFINI et al., 2001; DEBNATH et al., 2006).

A adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura é uma importante forma de reproduzir o que ocorre naturalmente nas plantas e combinações destas substâncias podem proporcionar melhor crescimento e desenvolvimento do explante (GONÇALVES; ROMANO, 2013).

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 com possibilidade de serem utilizadas na recuperação de solos degradados. 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 et al., 2001).

Diante do exposto, pela importância medicinal e ecológica da espécie *A. brasiliiana* este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de estabelecer um protocolo eficaz para multiplicação *in vitro* e investigar a resposta dessa planta quando submetida a estresse salino.

MATERIAL E MÉTODOS

Plantas de *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze, mantidas em casa de vegetação, foram levadas para o laboratório, lavadas com água corrente, 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. Posteriormente foram imersas em álcool 70% por 20 segundos e lavadas com água autoclavada, para posterior inoculação no meio de cultivo.

Segmentos nodais de aproximadamente 1,0 cm, contendo um entrenó com duas gemas, foram seccionados das brotações e inoculados individualmente, em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio, constituído da concentração de sais e vitaminas do MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), adicionado de 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose, 7 g 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 48 µmoles m⁻² s⁻¹, por 15 dias.

Para a produção de novas brotações, foram utilizados três meios de cultura, MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), Woody Plant Medium - WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980) e B5 (GAMBORG et al., 1968). Todos os meios foram suplementados com 30 g L⁻¹ de sacarose e tiveram seu pH ajustado para 5,8, antes da adição do ágar na concentração de 7 g L⁻¹.

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 15 µM, com a finalidade de aumentar o número de brotações. A citocinina foi adicionada ao meio, MS, contendo 30 g L⁻¹ de sacarose e 100 mg L⁻¹ de mioinositol. O pH foi ajustado para 5,8, antes da adição do ágar, na concentração de 7 g L⁻¹.

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

Na fase de aclimatização, as plantas oriundas dos tratamentos *in vitro* suplementado com NaCl, enraizadas e não enraizadas, tiveram a vedação de seus frascos perfuradas e foram mantidas desta forma pelo período de três dias em sala de incubação.

Posteriormente, essas plantas foram lavadas para retirar o 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 250 mg 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.

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 utilizadas 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.

Para análise das betacianinas, foram utilizadas as partes aéreas das brotações, as quais foram maceradas em 5 mL de água destilada e, em seguida, centrifugadas a 15000 rpm, a 4°C, por 25 minutos. A quantificação de betacianinas foi realizada em espectrofotômetro Ultrospec 2100 Pro da Amersham Bioscience®, de acordo com a metodologia descrita por Cai et al. (1998).

A concentração de betacianina foi calculada e expressa como amarantina pela seguinte fórmula: $\text{Concentração de amarantina} = ((A_{536} - A_{650}) \times P.M. \times V \times FD \times 100 / \epsilon \times BMF)$, em que: ϵ = coeficiente de absorção de amarantina ($5,66 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$), A_{536} = absorbância a 536 nm para a amarantina e A_{650} = absorbância a 650 para clorofila, P.M. = peso molecular ($726,6 \text{ g mol}^{-1}$), V = volume de extração (5 mL), FD = fator de diluição e BMF = biomassa fresca das amostras. Os resultados foram expressos em mg de amarantina por $100 \text{ g}^{-1} \text{ MF}$.

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).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para as características números de folhas, brotos, raízes, altura e comprimento da raiz não houve diferença significativa em função dos meios testados. As maiores médias para número de folhas (9,70), altura (4,34 cm) 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, conforme tabela 1.

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

MEIOS	VARIÁVEIS				
	Nº FOLHAS	ALTURA	Nº BROTOS	Nº RAIZ	COMP. 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 este ser de emprego mais amplo na cultura de tecidos.

Corroborando 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.

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

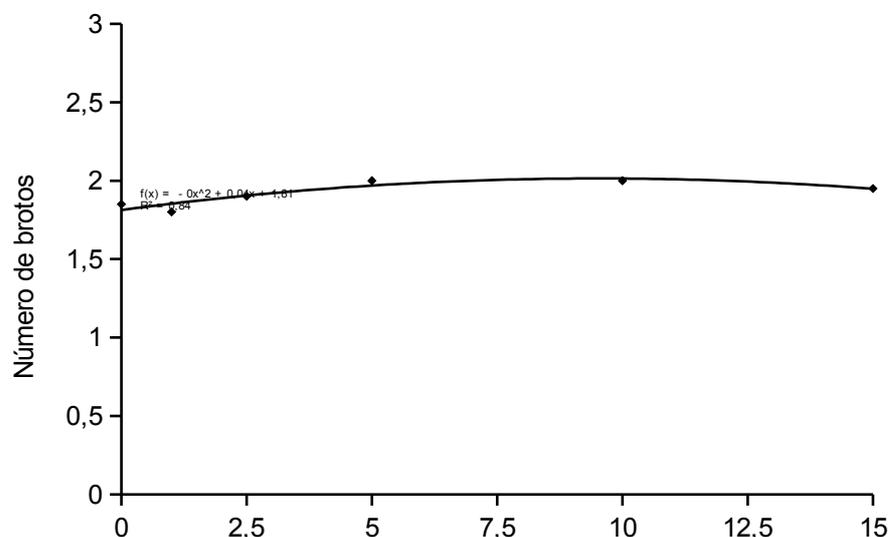


FIGURA 1. Número de brotações em plantas de *Alternanthera brasiliana*, cultivadas *in vitro*, em meio MS, acrescido de seis concentrações de BAP, por 45 dias.

A utilização de BAP causou um efeito negativo sobre a espécie *A. brasiliana*, apresentando inibição do crescimento radicular e diminuição da parte aérea. Este resultado concorda 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

fitoreguladores. 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 et al., 2008).

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

O número de brotações foi gradualmente aumentado de 0,0164 unidades, conforme as concentrações de NaCl foram elevadas (Figura 2).

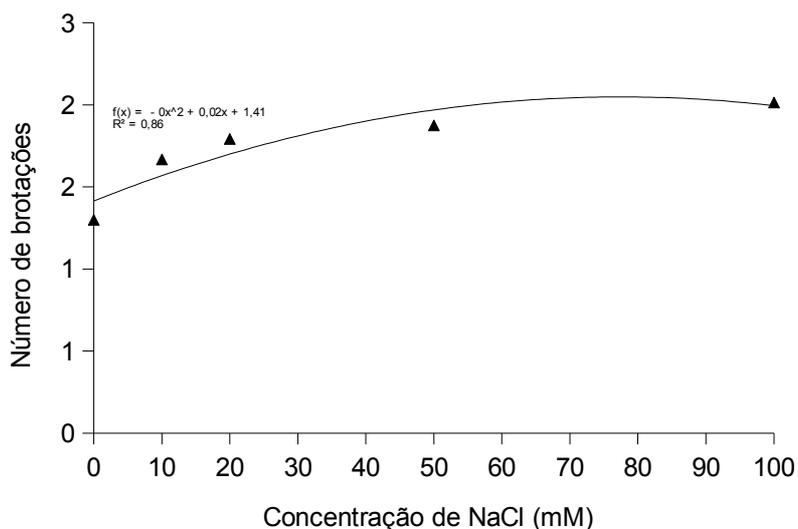


FIGURA 2. Número de brotações de plantas de *Alternanthera brasiliana*, cultivadas *in vitro* em meio MS com diferentes concentrações de NaCl, por 45 dias. Os valores desse gráfico no eixo y estão repetidos

Similar a outras espécies de plantas de dunas, tais como *Spartina ciliata*, *Blutaparon portulacoides*, *Cakile maritima* (CORDAZZO et al., 2006), *A. brasiliana* apresentou uma significativa redução na altura (Figura 3), conforme aumentou a concentração de NaCl (exceto na concentração de 10 mM), porém tolerando (sobrevivendo) até 100 mM 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 observada em plantas de dunas (CORDAZZO, 1999).

Quando as plantas se desenvolvem sob salinidade, um dos sintomas mais característicos é a inibição do crescimento, pelos sais (CORDEIRO, 2001). Esta inibição é devido à dificuldade das plantas absorverem água, sofrendo assim uma série de alterações metabólicas semelhantes às plantas submetidas ao estresse hídrico (MUNNS, 2002).

Plantas mantidas em condições de alta salinidade precisam realizar um ajuste osmótico, gastando a energia que em condições normais seriam utilizadas para o crescimento, além disso, 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 (CORDEIRO, 2001).

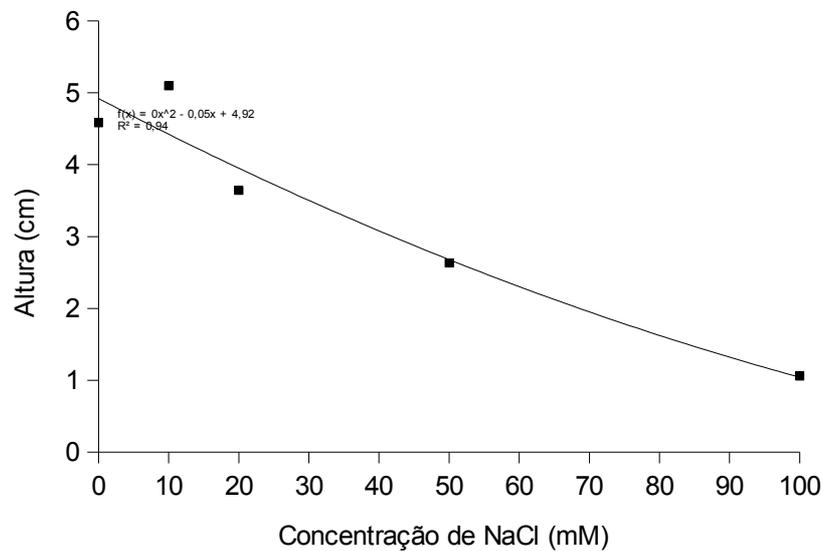


FIGURA 3. Altura de plantas de *Alternanthera brasiliana* cultivadas *in vitro* em meio MS com diferentes concentrações de NaCl, por 45 dias.

Para a variável número de raiz, as plantas cultivadas em meio livre de cloreto de sódio apresentaram os maiores valores (7,57), e a diminuição deste foi proporcional ao aumento de NaCl (Figura 4). O comprimento médio das raízes apresentou um incremento em relação ao controle (5,29 cm) quando a planta foi cultivada no meio de cultura contendo 10 mM de NaCl (5,89 cm), porém nas concentrações mais elevadas ocorreu um decréscimo, conforme o aumento da concentração (Figura 5).

Em estudo sobre diferentes concentrações de salinidade, no crescimento de *Bactris gasipaes*, Fernandes et al. (2003), 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 a mais sensível ao estresse salino do que a raiz.

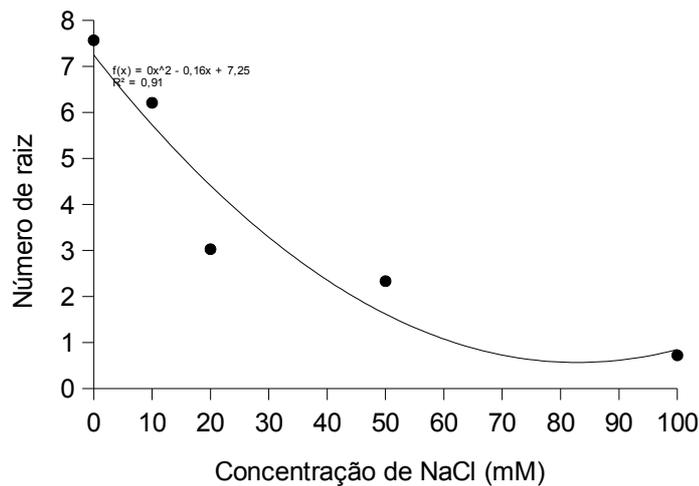


FIGURA 4. Número de raiz de plantas de *Alternanthera brasiliana* cultivadas *in vitro* em meio MS, sob diferentes concentrações de NaCl, por 45 dias.

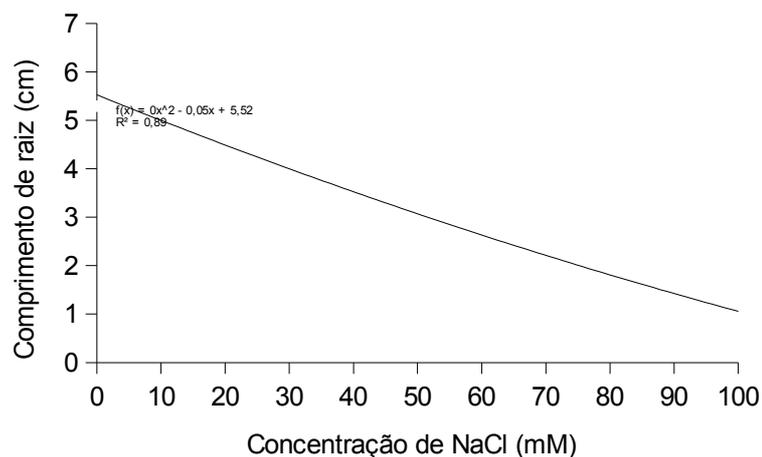


FIGURA 5. Comprimento médio das raízes de plantas de *Alternanthera brasiliana* cultivadas *in vitro*, sob diferentes concentrações de NaCl, em meio MS, por 45 dias.

O processo de aclimatização das plantas foi eficiente apresentando 100% de sobrevivência para todos os tratamentos (Tabela 2), portanto as plantas produzidas podem ser diretamente plantadas em casa de vegetação, sem precisar passar pelo processo de enraizamento *in vitro*, sendo este resultado semelhante ao observado por Grigoriadou; Maloupa (2008), 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	COM AIB
MS	100	100	N
MS + 10 mM	100	80	100
MS + 20 mM	100	68,8	100
MS + 50 mM	100	18,8	77
MS + 100 mM	100	13,33	53,9

Em relação ao teor de betacianinas, observou-se que o aumento da concentração de NaCl incrementou o conteúdo de betacianina, um composto de metabolismo secundário, que participa da resposta de defesa da planta (Figura 6). No entanto em concentrações maiores de 40 mM os explantes tiveram seu desenvolvimento prejudicado.

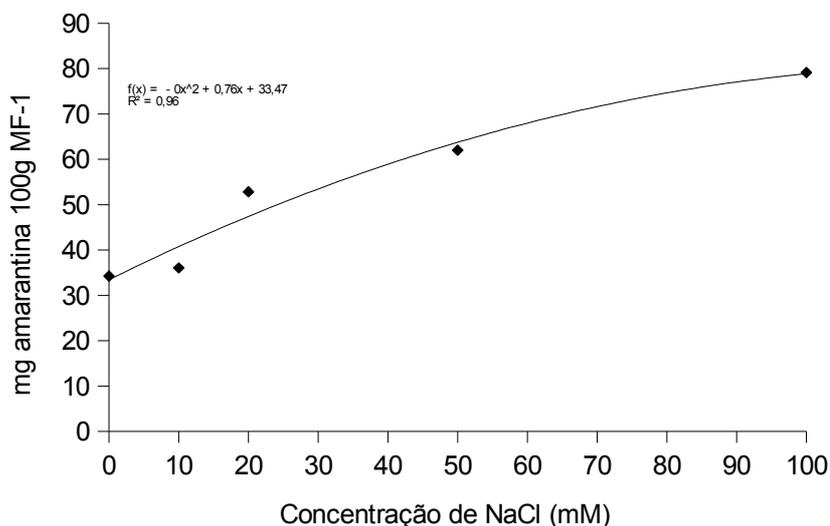


FIGURA 6. Concentração de betacianina em plantas de *Alternanthera brasiliana* cultivadas *in vitro* em meio MS com diferentes concentrações de NaCl, por 45 dias.

Para sobreviverem frente as mais diversas adversidades bióticas e abióticas as plantas tiveram que evoluir seus processos defensivos, através da co-evolução junto aos seus principais predadores e desenvolvendo de mecanismos de resposta de defesa. Estas 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 (HUANG et al., 2016)

CONCLUSÃO

O melhor meio para o cultivo *in vitro* da espécie *A. brasiliiana* é o MS, sem adição do fitoregulador BAP. Teores de betacianina são incrementados quando as plantas são submetidas a altas concentrações de cloreto de sódio, sendo que concentrações acima de 40 mM impedem o desenvolvimento dos explantes. Por isso, as concentrações de 10 e 20 mM são as mais indicadas para o aumento de betacianinas sem prejudicar o desenvolvimento dos explantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- 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 rutinosides from *Alternanthera brasiliiana* (Amaranthaceae) and their effects on lymphocyte proliferation *in vitro*. **Journal of the 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 agriculture food and chemistry**, V. 46, p. 2063-2070, 1998.
- CORDAZZO, C.V. Effects of salinity of seeds germination seedling growth and survival of *Spartina ciliate* Brong. **Acta botanica Brasilica**, v.13, p.317-322, 2006.
- CORDAZZO, C.V.; PAIVA, J.B.; SEELIGER, U. **Guia Ilustrado Plantas das dunas da costa sudoeste Atlântica**. 2.ed. Rio Grande: FURG, 1995. 136p.
- CORDEIRO, G.G. **Salinidade em agricultura irrigada (conceitos básicos e práticos)**. Petrolina, PE: Embrapa Semi-árido, 2001. 38p.
- COSTA, A.S.; 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.068-072, 2007
- 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.
- FERNANDES, A.R; CARVALHO, J.G.; CURTI, 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.

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.

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

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.

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.

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.

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 Medicinais: Nativas e Exóticas**. 2.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 544p.

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. Goiânia: Redbio, 2001. 6p.

HUANG, L.; RAATS, D. SELA, H.; KLYMIUK, V.; LIDZBARSKY, G.; FENG, L.; KRUGMAN, T.; FAHIMA, T. Evolution and daptation of wild emmer wheat populations to biotic and abiotic stresses. **Annual review phytopathology**, v. 53, p. 12.1-12.23, 2016.

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

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

MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant, cell and environment**, v.25, p.239–250, 2002.

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.; 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**, 2007, p.160.

SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, 2001. 463p.

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.

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

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