

**GERMINAÇÃO DE SEMENTES E AÇÃO DA
QUALIDADE DA LUZ SOBRE O
DESENVOLVIMENTO VEGETATIVO E
ASPECTOS FITOQUÍMICOS DE *Catharanthus
roseus* (L.) G. Don**

ANDERSON ADRIANO MARTINS MELO

2006

ANDERSON ADRIANO MARTINS MELO

**GERMINAÇÃO DE SEMENTES E AÇÃO DA QUALIDADE DA
LUZ SOBRE O DESENVOLVIMENTO VEGETATIVO E
ASPECTOS FITOQUÍMICOS DE *Catharanthus roseus* (L.) G. Don**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. Amauri Alves de Alvarenga

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Melo, Anderson Adriano Martins

Germinação de sementes e ação da qualidade da luz sobre o desenvolvimento vegetativo e aspectos fitoquímicos de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. / Anderson Adriano Martins Melo. -- Lavras: UFLA, 2006.

85 p. : il.

Orientador: Amauri Alves de Alvarenga

Dissertação (Mestrado) – UFLA

Bibliografia.

1. *Catharanthus roseus*. 2. Malhas coloridas. 3. Germinação.
4. Desenvolvimento vegetativo. 5. Alcalóides. I. Universidade Federal de Lavras.
II. Título.

CDD-583.72
-631.521

ANDERSON ADRIANO MARTINS MELO

**GERMINAÇÃO DE SEMENTES E AÇÃO DA QUALIDADE DA
LUZ SOBRE O DESENVOLVIMENTO VEGETATIVO E
ASPECTOS FITOQUÍMICOS DE *Catharanthus roseus* (L.) G. Don**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 31 de agosto de 2006

Profa. Dra. Angela Maria Soares

UFLA

Prof. Dr. Mário César Guerreiro

UFLA

Prof. Dr. Amauri Alves de Alvarenga

DBI/UFLA

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

A Deus e aos meus pais, Paulo Tadeu e Maria das Graças, e avós, Geraldo e Adriana, pois sem eles não chegaria até aqui,

DEDICO

Aos meus irmãos, Paulinho, Graciane, Isabel e Gabriel.

Aos meus primos.

Aos meus tios e tias.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, a quem devo a minha vida.

Aos meus pais e avós, a quem devo tudo o que sou, e a todos os meus familiares.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), por todo o apoio nestes sete anos de aprendizagem, em especial ao Departamento de Biologia, Setor de Fisiologia Vegetal, pela oportunidade e pelo apoio durante o período de realização dos trabalhos.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Amauri Alves de Alvarenga, pelo constante apoio, amizade, conhecimentos e pelo exemplo de vida durante estes meses de convivência.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Mário César Guerreiro e sua orientada de doutorado, Maráisa Gonçalves, pelo apoio na execução desta pesquisa.

À Profa. Dra. Ângela Maria Soares, pela disponibilidade na avaliação deste trabalho e pelos ensinamentos.

À colega de trabalho e amiga, Profa. MSc. Cristina Filomena Justo, pelo constante apoio e incentivo em todas as fases de planejamento e execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira, pela amizade, grandes ensinamentos e exemplo de vida.

Ao meu amigo Paulo Cairo, pelo exemplo de caráter, pelos ensinamentos e amizade.

Aos meus amigos Girlene, Vanessa, Maiana, Morbeck, Fernanda (Soares, Nery, Grisi), Marcus e Hyrandir.

A todos os meus amigos e colegas da pós-graduação em Fisiologia Vegetal.

Aos meus amigos Fábio Pena, Fernando Cantão e Douglas William, pela convivência.

Aos alunos de graduação, bolsistas de iniciação e estagiários, Marcos, Meline, Poliana e Sara, pelo apoio na realização dos experimentos.

Aos funcionários do Departamento de Biologia e do Setor de Fisiologia Vegetal, em especial a Joel, Odorêncio, Lena, Dartagnan, Izonel, Ana Cristina, Evaristo e Rafaela, pelo constante apoio.

A todos que, de uma forma ou de outra, colaboraram para a conclusão de mais uma etapa de minha vida e que, embora não citados aqui, não deixam de merecer meu profundo agradecimento.

SUMÁRIO

Página

RESUMO GERAL	i
GENERAL ABSTRACT	ii
INTRODUÇÃO	01
REFERENCIAL TEÓRICO	03
Origem da espécie e descrição botânica	03
A radiação e a temperatura na germinação de sementes.....	04
A radiação e o desenvolvimento vegetativo de plantas: pigmentos foliares.....	06
A radiação e o desenvolvimento vegetativo de plantas: análise de crescimento	08
O metabolismo secundário e os alcalóides indólicos de <i>Catharanthus roseus</i> ...	10
A radiação no controle da biossíntese dos alcalóides de <i>Catharanthus roseus</i> ..	13
Qualidade da luz e desenvolvimento vegetativo de plantas.....	15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don:	
EFEITOS DA TEMPERATURA, DO ÁCIDO GIBERÉLICO E DA LUZ	26
RESUMO.....	26
ABSTRACT	27
INTRODUÇÃO	28
MATERIAIS E MÉTODOS	31
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

SOMBREAMENTO DE PLANTAS DE <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don POR MALHAS COLORIDAS: DESENVOLVIMENTO VEGETATIVO.....	45
RESUMO.....	45
ABSTRACT	46
INTRODUÇÃO.....	47
MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

FATORES DE AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO AFETANDO O PERFIL DE ALCALÓIDES DE PLÂNTULAS DE <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. DON.....	65
RESUMO.....	65
ABSTRACT	67
INTRODUÇÃO.....	68
MATERIAIS E MÉTODOS.....	72
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
CONCLUSÕES	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

RESUMO GERAL

MELO, Anderson Adriano Martins. **Germinação de sementes e ação da qualidade da luz sobre o desenvolvimento vegetativo e aspectos fitoquímicos de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.** 2006. 85 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A vinca (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don), Apocynaceae, é uma planta reconhecida por sua importância medicinal como produtora de alcalóides com ação anti-cancerígena (vimblastina e vincristina). Neste trabalho objetivou-se avaliar os efeitos da luz e temperatura sobre aspectos da embebição e germinação de sementes, o desenvolvimento vegetativo de plantas desta espécie sombreadas por malhas de diferentes cores (preta, azul e vermelha), e as influências da luz fornecida por lâmpadas fluorescentes coloridas e da idade da planta sobre o perfil de alcalóides de duas diferentes cultivares de *Catharanthus roseus*. O comportamento de embebição desta espécie foi alterado pelo tratamento com GA₃, que aumentou a taxa de embebição e a porcentagem final de germinação. As sementes apresentaram germinação preferencialmente fotoblástica negativa, com uma menor germinação acumulada e porcentagem de germinação, e menor IVG na presença de luz, em todas as temperaturas testadas. A malha vermelha aumentou a matéria seca total e a área foliar das plantas em relação às malhas azul, preta e ao tratamento a pleno sol e um menor conteúdo de nitrogênio e pigmentos foliares em comparação com as malhas azul e preta. A irradiância mostrou efeito mais proeminente do que a alteração espectral sobre a relação raiz/parte aérea, relação clorofila a/b, razões de área foliar e de peso foliar das plantas crescidas a pleno sol em relação às plantas sombreadas. Os tratamentos com lâmpadas coloridas alteraram o aspecto morfológico das plântulas. Plântulas desenvolvidas sob lâmpada vermelha mostraram maior comprimento de caulículos em comparação aos outros tratamentos de luz, aspecto prostrado e cotilédones reduzidos. Um pico de m/z 793 (vimblastina), assim como seus precursores monoméricos vindolina (m/z 457) e catharantina (m/z 337) foram detectados em intensidade significativa somente no extrato de plantas com 180 dias. Para a cultivar Victory Pure White as intensidades relativas da vindolina foram muito menores do que os apresentados pela cultivar Pacifica White sob todos os tratamentos de luz.

* Comitê Orientador: Dr. Amauri Alves de Alvarenga – UFLA (Orientador), Dr. Mário César Guerreiro (Co-orientador) – UFLA.

GENERAL ABSTRACT

MELO, Anderson Adriano Martins. **Seed germination and light quality action on vegetative development and phytochemistry aspects of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.** 2006. 85 p. Dissertation (Master in Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

Periwinkle (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don), Apocynaceae, is recognized by its medicinal importance as producer alkaloids with anticancer action (vinblastine and vincristine). This work aimed to evaluate the temperature and light effects on imbibition and seed germination aspects, plant vegetative development features of this species shaded by different color nets (black, blue and red), and the influences of light provided by fluorescent colored lamps and the plant age on alkaloid profile of two different *Catharanthus roseus* cultivars. The imbibition behavior of this species was altered by the GA₃ treatment, which, in comparison with untreated seeds, increased the imbibition rate and the final germination percentage. Seeds presented a preferentially photoblastic negative germination, with a lower cumulative germination and germination percentage, and lower GVI in presence of light in all tested temperatures. The red net increased total dry matter and total leaf area of plants in relation to blue net, black net and the full sun treatment, and lower foliar nitrogen and pigments content in comparison to blue and black nets. The irradiance showed most prominent effect than spectral alteration on root/aerial part, chlorophyll a/b ratios, leaf area and leaf dry weight ratios of plants growth under full sun in relation to shaded plants. Treatments with colored lamps altered the morphological aspect of seedlings. Seedlings developed under red lamp showed higher stem length in comparison to other light treatments, prostrated aspect and reduced cotyledons. A m/z 793 (vinblastine) peak, as well as its monomeric precursors vindoline (m/z 457) and catharanthine (m/z 337) were detected in significantly intensity only in the 180 days' plant extract. For the cultivar Victory Pure White, the relative intensities of vindoline were very lower than that presented by the cultivar Pacifica White under all light treatments.

* Guidance Committee: Amauri Alves de Alvarenga – UFLA (Adviser), Mário César Guerreiro (Co-adviser) – UFLA.

INTRODUÇÃO

A vinca [*Catharanthus roseus* (L.) G. Don] pertence à família Apocynaceae e é mundialmente reconhecida pela produção de importantes metabólitos secundários (os alcalóides indólicos). Estes compostos são de considerável interesse farmacêutico, sendo utilizados na produção de medicamentos contra várias enfermidades, tais como hipertensão, doenças vasculares e o câncer.

A vindolina, alcalóide monomérico mais abundante nas folhas de *Catharanthus roseus*, é precursora dos dímeros vimblastina e a vincristina, os quais apresentam importante atividade citotóxica, inibindo a divisão celular e a progressão de tumores hematológicos e sólidos (Jordan, 2002).

Esta espécie é uma das plantas medicinais mais bem estudadas, com cerca de 70 publicações anuais dedicadas a ela (Van der Heijden et al., 2004). Desde a década de 1950, muitos estudos têm sido direcionados no sentido de aumentar a produção destes alcalóides, sobretudo por métodos biotecnológicos (cultura de caules, cultura de células, acoplamento em condições biomiméticas). No entanto, ainda não é possível a biossíntese de vindolina por cultura de células, devido à distribuição tecido-específica de enzimas-chave em sua rota biossintética, o que torna a planta a única fonte de alcalóides economicamente viável.

No entanto, há poucos relatos na literatura referentes aos aspectos fisiológicos destas plantas, sobretudo referentes ao crescimento e ao desenvolvimento e perfil de alcalóides afetados por fatores do ambiente.

A germinação de sementes e o desenvolvimento vegetativo de plantas, como eventos fotomorfogênicos, estão condicionados à disponibilidade de luz e

respondem tanto à presença como à ausência, à duração (fotoperíodo) e à qualidade da luz (distribuição espectral).

A composição de princípios ativos em plantas medicinais é uma característica extremamente susceptível a fatores inerentes à planta ou às alterações ambientais. O estágio de desenvolvimento e a alteração na disponibilidade de radiação (irradiância e distribuição espectral) podem causar oscilações no perfil de alcalóides.

Desse modo, é importante estudar a variação de fatores do ambiente, como a presença da luz sobre a germinação de sementes, a alteração na distribuição espectral da luz sobre o crescimento e o desenvolvimento, e sobre a biossíntese de metabólitos secundários de importância farmacêutica nesta planta.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do ácido giberélico, da temperatura e da luz sobre o desempenho germinativo de sementes de *Catharanthus roseus*, bem como o efeito da radiação solar modificada por coberturas de malhas coloridas sobre aspectos do desenvolvimento vegetativo e obter noções preliminares acerca do perfil de alcalóides em duas cultivares desta espécie, influenciado pela idade da planta e ambiente de crescimento (alterado pela luz fornecida por lâmpadas fluorescentes coloridas).

REFERENCIAL TEÓRICO

Origem da espécie e descrição botânica

A vinca (*Catharanthus roseus*) pertence à família Apocynaceae e é conhecida mundialmente pelo nome comum de Madagascar periwinkle ou vinca de Madagascar. Seu nome e classificação podem ser contraditórios em algumas literaturas, uma vez que a planta foi formalmente classificada como pertencente ao gênero *Vinca* ou *Lochnera*. As plantas do gênero *Vinca* também são da família Apocynaceae e muito similares à vinca de Madagascar, porém, ao contrário desta, elas não toleram o calor e não são cultivadas em regiões tropicais (Description and Natural History of the Periwinkle, 2006; *Catharanthus roseus*, 2006).

O gênero *Catharanthus*, cujo nome deriva do grego e significa “flor pura”, é composto por oito espécies, sendo sete endêmicas da ilha de Madagascar e uma (*C. pusillus*) originária da Índia. No entanto, a espécie *Catharanthus roseus* (L.) G. Don é a mais importante e conhecida mundialmente. No Brasil, ela é conhecida como vinca, pervinca, boa noite ou maria-sem-vergonha (Morgan, 1994; Van der Heijden et al., 2004).

A espécie *Catharanthus roseus* possui distribuição pantropical, sendo subespontânea em continentes como África, Américas, Ásia, Austrália, Sudeste da Europa e algumas ilhas do oceano Pacífico. Sua distribuição pelo mundo se deu por meio de marinheiros que utilizavam suas folhas, mastigando-as para suprimir a sensação de fome ou de fadiga (Van der Heijden et al., 2004).

A vinca é uma planta semi-herbácea, de porte subarbustivo e ciclo de vida perene. É uma planta bastante ramificada, possuindo hastes prolongadas e decumbentes, variando entre 30 a 80 cm de comprimento, com folhas opostas,

curto-pecioladas, oblongas, simples, de cor verde-escuro e brilhante (Morgan, 1994; Van de Heijden et al., 2004). Suas flores têm cinco pétalas relativamente grandes (possuem entre 2,5 a 5 cm de diâmetro), axilares, simples e com pedúnculo curto. A corola possui diversas cores, como rosa, vermelho ou branco, às vezes, contendo um halo de cor contrastante no centro. Atualmente, existem cultivares de flores roxas, vermelho-amareladas, vermelhas e laranjas, dentre outras. Seus frutos são folículos deiscentes e contêm cerca de 20 sementes de cor preta.

A radiação e a temperatura na germinação de sementes

A germinação da semente é considerada como a retomada das atividades metabólicas do eixo embrionário, a qual se encontrava paralisada nas fases finais do processo de maturação. Porém, quando estimulado por condições ambientais, o eixo desenvolve-se, ocorrendo, então, o rompimento do tegumento pela radícula. Essa é uma etapa crítica do biociclo vegetal pelo fato de o processo estar associado a vários fatores de natureza extrínseca (fatores do ambiente físico) e intrínseca, ou seja, a processos fisio-metabólicos (Labouriau, 1983; Bewley & Black, 1994).

A embebição é composta por três fases distintas. A fase I é caracterizada pela rápida absorção da água, ocorrendo tanto em sementes viáveis como inviáveis, em consequência da diferença do potencial hídrico existente entre a semente e o substrato. Nesta fase, são observados os primeiros sinais da reativação do metabolismo, ocorrendo o aumento da atividade respiratória, a ativação de enzimas e a síntese de proteínas a partir do mRNA armazenado ao final do processo de maturação. As reduções drásticas da velocidade de hidratação e da intensidade de respiração caracterizam a Fase II, cuja ocorrência

e duração são variáveis de acordo com a espécie considerada. Esta fase, caracterizada por atividades constituintes do processo bioquímico preparatório, pode ser necessária para a síntese de enzimas, de DNA e de mRNA, exauridos durante a Fase I. Já a fase III é caracterizada pela protrusão radicular e crescimento da plântula. No início da Fase III, torna-se visível a retomada de crescimento do embrião, que é identificada pela protrusão da raiz primária, tratando-se de uma etapa alcançada apenas por sementes vivas e não dormentes (Bewley & Black, 1978; Bewley & Black, 1994).

A embebição é fundamental para a germinação porque permite a retomada da atividade metabólica, contribuindo para os processos de mobilização e assimilação de reservas e crescimento subsequente (Marcos Filho, 2005). A velocidade de embebição é característica própria de cada espécie, dependendo, dentre outros fatores, da composição química e da permeabilidade do tegumento. A composição química das sementes é definida geneticamente, podendo ser influenciada, até certo ponto, pelas condições ambientais (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1989; Bewley & Black, 1994).

A germinação é um processo biológico regulado por diversos fatores, dentre eles a temperatura e a luz exercem influência significativa sobre o mesmo. A temperatura afeta tanto a porcentagem final como também a velocidade de germinação; além disso, ainda está relacionada com as reações bioquímicas necessárias para o início do processo germinativo (Carvalho & Nakagawa, 2000).

A temperatura pode regular a germinação por três maneiras: determinando a capacidade e a taxa de germinação, removendo a dormência primária ou secundária e induzindo a dormência secundária (Bewley & Black 1994).

Por sua vez, a luz regula a germinação por meio da molécula do fitocromo. As sementes que germinam na presença de luz são chamadas

fotoblásticas positivas, enquanto aquelas nas quais a germinação é inibida pela luz são chamadas fotoblásticas negativas (Vásques-Yanes & Orozco-Segovia 1993; Bewley & Black 1994). Existe uma ampla variação nas respostas germinativas em função da sensibilidade à luz para as diferentes espécies. No início do século XX, foi descoberto que a germinação de algumas espécies era inibida pela luz, enquanto que, em outras, a germinação era promovida, apesar de muitas se apresentarem indiferentes à luminosidade. Em muitos casos, os fatores luz e temperatura têm ação dependente sobre a germinação de sementes (Nassif et al., 1998).

Com relação à velocidade de germinação, existem lotes ou sementes que germinam (ou emergem) mais rapidamente (em geral, mais vigorosas) e outras cuja germinação é mais lenta. Para estas situações, existem medidas que quantificam a germinação sob ponto de vista cinético, isto é, informam quanto tempo foi necessário para determinado lote de sementes germinar. Um parâmetro bastante utilizado é o tempo médio de germinação. Essa informação é expressa, comumente, em horas ou dias (Ferreira & Borghetti, 2004).

A radiação e o desenvolvimento vegetativo de plantas: pigmentos foliares

A radiação solar é um pré-requisito para a vida no ambiente terrestre, como a principal fonte de energia direcionada ao processo fotossintético. Desse modo, a eficiência do crescimento da planta pode ser relacionada à habilidade de adaptação das plantas às condições luminosas disponíveis. O crescimento satisfatório de algumas espécies em ambientes com diferentes disponibilidades luminosas pode ser atribuído à capacidade de ajustar, eficaz e rapidamente, seu comportamento fisiológico para maximizar a aquisição de recursos nesse ambiente (Brand, 1997; Dias-Filho, 1997).

Diversos fatores externos e internos afetam o metabolismo de clorofilas e, por esta razão, seus conteúdos foliares variam consideravelmente. Segundo alguns autores, a luz é considerada como um dos principais fatores associados ao metabolismo clorofiliano (Brand, 1997).

No entanto, o excesso de luz é danoso para plantas, prejudicando o seu desenvolvimento. Este excesso gera um fluxo excessivo de elétrons, que altera o estado redox dos cloroplastos, levando a uma sobrecarga nos constituintes das cadeias de transporte de elétrons (CTE) e uma superprodução de NADPH. Este evento pode resultar em uma elevada formação de espécies reativas de oxigênio, que prejudicam o processo fotossintético. A superprodução de NADPH e reduzida regeneração do NADP^+ pode interferir no funcionamento normal do ciclo de Calvin (Vranová et al., 2002; Zhang et al., 2003).

Assim, sob alta intensidade luminosa, a presença de carotenóides é vital para o crescimento de organismos fotoautotróficos aeróbicos. As membranas fotossintéticas podem ser facilmente danificadas pelas grandes quantidades de energia absorvidas pelos pigmentos, se essa energia não puder ser armazenada pela fotoquímica. Esta é a razão da necessidade de um mecanismo de fotoproteção (Anderson & Robertson, 1960).

Para que não haja a formação do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), é necessário prevenir ou minimizar a produção do estado tripleto da clorofila, que é a sua fonte geradora. Se a formação desta espécie reativa de oxigênio não pode ser totalmente suprimida, deverá funcionar um mecanismo de descarregamento energético da clorofila tripleto e do oxigênio singlete produzidos (Edreva, 2005).

Os carotenóides, moléculas essencialmente hidrofóbicas, são tipicamente encontrados associados com membranas de organelas fotossintéticas. Contudo, eles não são livremente móveis no interior do fluido das membranas, mas são ligados não-covalentemente a complexos pigmento-protéicos específicos (Cogdell, 1985), sendo os principais compostos envolvidos no seqüestro do oxigênio singlete. Esta

capacidade dos carotenóides pode ser atribuída a sua especificidade química: eles possuem uma cadeia de resíduos isoprênicos contendo várias ligações duplas conjugadas, ou seja, pares de elétrons emparelhados. Isso permite a fácil absorção de energia de moléculas excitadas e a dissipação do excesso de energia como calor e, desse modo, prevenindo o dano ao sistema fotossintético (Mittler, 2002; Edreva, 2005).

Além de seu papel protetor, os carotenóides aumentam a eficiência da fotossíntese por absorver a luz verde-azulada e transferir esta energia à clorofila. Eles estão ligados aos complexos protéicos antena, que canalizam a energia ao pigmento fotoquímico ligando os centros de reação, em que o primeiro evento energético de armazenamento e transferência de elétrons ocorre (Telfer, 2002).

A radiação e o desenvolvimento vegetativo de plantas: análise de crescimento

A luz, agindo por meio de uma variedade de respostas em plantas, influencia o padrão de muitos processos fisiológicos. A intensidade e a qualidade da luz são de significância considerável para o crescimento de plantas não apenas pela sua conversão em energia química no processo fotossintético, mas também para alguns efeitos morfogênicos, os quais podem ser observados pelas variações do tamanho de folhas, crescimento de caule e vigor, razão caule/raiz e no controle fotoperiódico do florescimento, entre outros. Além disso, a plasticidade adaptativa das espécies, associada ao acúmulo diferencial de biomassa depende do ajuste de seu aparelho fotossintético e estão sujeitos às diferentes condições de radiação solar (Whatley & Whatley, 1982; Attridge, 1990).

A análise de crescimento baseia-se, fundamentalmente, no fato de que cerca de 90%, em média, da matéria seca acumulada pelas plantas ao longo do seu crescimento, resulta da atividade fotossintética (Benincasa, 1988).

A área foliar é uma característica muito utilizada na avaliação dos efeitos do sombreamento sob a planta. Em geral, o incremento da área foliar com o sombreamento é uma das maneiras da planta aumentar a superfície fotossintética, assegurando um aproveitamento mais eficiente das baixas intensidades luminosas e, conseqüentemente, compensando as baixas taxas de fotossíntese por unidade da área foliar característica da folha de sombra (Jones & McLeod, 1990).

A área foliar específica (AFE) é o componente da razão de área foliar que relaciona a superfície foliar (parte morfológica) com o peso de matéria seca da própria folha (parte anatômica). A área foliar específica, que indica a espessura da folha, e a razão de peso foliar (RPF), que é a razão entre a matéria seca retida nas folhas e aquela exportada para as demais partes da planta, são índices fisiológicos de crescimento marcadamente influenciados por fatores do ambiente, em especial a intensidade, a qualidade e a duração da radiação, o que resulta em alterações na morfologia de folhas (Benincasa, 1988).

A razão de área foliar é um componente morfofisiológico que expressa a área foliar útil para a fotossíntese. As plantas consideradas de sombra, geralmente, apresentam baixa razão de área foliar a pleno sol, como resultado da capacidade da planta de se adaptar a diferentes condições de luminosidade (Aguilera et al., 2004).

A distribuição de matéria seca entre os diferentes órgãos de uma planta constitui um importante comportamento inerente às espécies vegetais e que reflete a sua adaptabilidade às diferentes condições do ambiente. Sabe-se que o hábitat natural de uma planta determina características normais relativas ao seu crescimento, desenvolvimento e produção final e que, quando levada para outro ambiente, essas características podem ser modificadas (Benincasa, 1988).

As plantas podem se aclimatar aos diferentes ambientes em vários níveis de integração. Elas podem alterar a fração de biomassa investida em folhas, caules e raízes, modular a área foliar por unidade de biomassa, por alterar sua anatomia e mudar o investimento de nitrogênio entre componentes fotossintéticos (Evans & Poorter, 2001). Desse modo, para estes autores, a maximização da assimilação de carbono em plantas está associada à área foliar e ao particionamento de nitrogênio, características sujeitas a mudanças no ambiente de crescimento, como a irradiância. Estes autores constataram um maior conteúdo de nitrogênio foliar por unidade de massa em plantas crescidas sob baixa irradiância, concordando com o que foi verificado por Dias-Filho (1997), em *Solanum crinitum* e por Dias-Filho (1999), em trabalho com *Ipomoea asarifolia* e *Stachytarpheta cayennensis*, espécies consideradas invasoras de lavouras e pastagens.

O metabolismo secundário e os alcalóides indólicos de *Catharanthus roseus*

As plantas produzem vários compostos orgânicos, a grande maioria dos quais não parece participar diretamente do crescimento e do desenvolvimento. Estas substâncias, tradicionalmente referidas como metabólitos secundários, são, com freqüência, distribuídas diferentemente entre limitados grupos taxonômicos dentro do reino vegetal. Suas funções, muitas das quais permanecem desconhecidas, estão sendo elucidadas com crescente freqüência. Os metabólitos primários, todavia, são encontrados em todas as plantas e desempenham funções metabólicas que são essenciais e comumente evidentes (Croteau et al., 2000).

Os princípios ativos são, por definição, classes do metabolismo secundário constituídas de uma substância ou conjunto de substâncias quimicamente bem definidas produzidas por plantas e que apresentam

propriedades biológicas semelhantes. Com poucas exceções, estes compostos são sempre sintetizados segundo a rota biossintética proveniente da via dos ácidos mevalônico, malônico e chiquímico (Swain, 1977).

Os alcalóides constituem uma grande família com mais de 15.000 metabólitos secundários nitrogenados, encontrados em, aproximadamente, 20% das espécies de plantas vasculares, predominantemente em angiospermas. Os alcalóides (termo linguisticamente derivado da palavra árabe *al quali*, denominação vulgar da planta da qual a soda foi originalmente obtida) são, via de regra, sintetizados a partir de um ou poucos aminoácidos comuns – sobretudo lisina, tirosina e triptofano. Contudo, o esqueleto de carbono de alguns alcalóides apresenta algum componente derivado da rota dos terpenos. Uma definição para esta classe de substâncias apresenta certas dificuldades devido à ausência de uma separação precisa entre alcalóides propriamente ditos e aminas complexas de ocorrência natural (Henriques et al., 1999; Croteau et al., 2000; Taiz & Zeiger, 2004).

Estes compostos são classificados de acordo com os tipos de moléculas de aminoácidos, que se condensam, originando diferentes sistemas de cadeia heterocíclica presente em sua estrutura (Robinson, 1974).

A função de defesa química para os alcalóides em plantas se deve a sua grande quantidade de efeitos fisiológicos em animais e à atividade antibiótica que muitos deles possuem. Tem sido observado que muitas plantas produtoras de alcalóides são evitadas por animais ou insetos em sua dieta, certamente devido a sua toxicidade ou ao fato de a maioria dos alcalóides ter gosto amargo. Outras hipóteses têm sido levantadas, como, por exemplo, de que os alcalóides seriam produtos de detoxificação de substâncias nocivas geradas pelo metabolismo primário vegetal. Contudo, essa hipótese não é compatível com a complexidade metabólica envolvida na biossíntese dessas substâncias (Henriques et al., 1999).

O metabolismo secundário vegetal tem múltiplas funções durante todo o ciclo de vida das plantas. Estas funções podem ser classificadas como mediadoras na interação da planta com seu ambiente, tais como as interações planta-inseto, planta-microrganismo e planta-planta (Dixon, 2001).

Os alcalóides da vinca compreendem um grupo de cerca de 130 alcalóides indólicos terpênicos, dentre os quais, a vimblastina, que é comercializada há mais de 40 anos como uma droga anticâncer, devido ao seu exclusivo modo de ação: ela altera o arranjo de microtúbulos, resultando na interrupção da divisão celular na metáfase mitótica, sendo utilizada clinicamente para uma variedade de tumores hematológicos e sólidos (Lobert et al., 1996; Van der Heijden et al., 2004).

A vimblastina, por exemplo, liga-se em uma região específica da tubulina, proteína constituinte dos microtúbulos (Jordan, 2002). Esta ligação induz uma mudança conformacional na tubulina, o que a impede de executar sua função primordial, que é a manutenção da instabilidade dinâmica dos microtúbulos, da qual depende a divisão equitativa dos cromossomos pelos pólos da célula durante a mitose (Lobert & Correia, 2001). A célula, então, se mantém paralisada em uma fase prometáfase/metáfase e, eventualmente, sofre apoptose ou morte celular programada (Jordan et al., 1996).

Devido à importância farmacêutica e ao baixo conteúdo de vimblastina e vincristina na planta, a vinca é uma das plantas medicinais mais bem estudadas. Por muito tempo, a cultura de suspensão de células de plantas foi considerada uma fonte alternativa de metabólitos secundários industrialmente significantes, particularmente os alcalóides de importância farmacêutica.

Muitos esforços têm sido direcionados para produzir estes compostos por sistemas de cultura de tecidos, no entanto, poucos trabalhos têm sido bem sucedidos na produção de linhas de células que acumulam altas quantidades do alcalóide indólico monoterpênico catharantina (Hirata et al., 1987; Misawa et al.,

1988). Apesar disto, a técnica de cultura de células ainda não produz linhas que acumulem monômeros de vindolina (Aerts & De Luca, 1992), devido à distribuição tecido-específica de enzimas envolvidas nos últimos estágios da biossíntese deste monômero e à distribuição contrastante da maior parte do restante da rota (De Luca et al., 1986; St Pierre et al., 1999; Facchini, 2001).

Assim, as plantas de vinca cultivadas em campo são, ainda, as únicas fontes comerciais viáveis de vimblastina e vincristina, e também de serpentina e ajmalicina, compostos disponíveis na medicina para tratamento da hipertensão, arritmia e diferentes doenças vasculares (Van der Heijden et al., 2004). A síntese química destes compostos naturais altamente complexos não é simples ou comercialmente viável, o que ressalta a importância das plantas produtoras de alcalóides indólicos monoterpênicos como sendo a única fonte de moléculas bioativas (Pasquali et al., 2006).

A radiação no controle da biossíntese dos alcalóides de *Catharanthus roseus*

A biossíntese de alcalóides indólicos monoterpênicos em *Catharanthus roseus* inicia-se com a descarboxilação do aminoácido L-triptofano, pela triptofano descarboxilase (TDC), para formar a triptamina (Figura 2) (Croteau et al., 2000). A triptamina é, então, condensada com o secoiridóide secologanina (derivado do monoterpene pirofosfato de geranila), por meio da enzima strictosidina sintase (STR1), para produzir o intermediário central strictosidina, um alcalóide glicosilado. A strictosidina é desglicosilada pela enzima strictosidina β -D-glucosidase (SGD) e permutada, passando por vários intermediários instáveis, até a formação de diversos alcalóides indólicos monoterpênicos (Vázquez-Flota et al., 1997; St-Pierre et al., 1999).

A strictosidina, por meio de rearranjos intramoleculares da sua metade terpenóide, é a precursora dos alcalóides das famílias Iboga (catharantina) e Apidosperma (tabersonina e vindolina) (St-Pierre et al., 1999). Destes, a vindolina é o alcalóide indólico monomérico com maior riqueza de estudos acerca de sua rota biossintética (Croteau et al., 2000; Facchini, 2001).

A vindolina, juntamente com o monômero catharantina, é o precursor imediato do alcalóide bis-indólico vimblastina, o qual é produzido a partir de múltiplas reações de acoplamento enzimático (por uma enzima peroxidásica específica) e também não enzimático, em condições biomiméticas (acoplamento *in vitro*) entre estes monômeros (Sottomayor et al., 1998).

As rotas de biossíntese de alcalóides constituem um complexo sistema com controles altamente especializados espacial e temporalmente (nos níveis subcelular, de tecido, de órgão e de planta), em uma intrincada associação com estímulos ambientais bióticos e abióticos, acoplado com um estreito controle de desenvolvimento ontogeneticamente programado. Contudo, uma compreensão detalhada dos aspectos ecoquímicos e de desenvolvimento da produção de alcalóides em diferentes tecidos e plantas oferece importantes recursos para a produção sustentável e comercialmente viável de moléculas bioativas de interesse, tanto em plantas selvagens ou em transgênicas (Facchini, 2001).

O efeito do fator ambiental luz sobre a atividade de enzimas chave na biossíntese de vindolina, monômero precursor de vimblastina e vincristina, tem sido bastante estudado em *Catharanthus roseus*. O fitocromo está claramente envolvido na ativação da biossíntese de vindolina pela luz (De Luca et al., 1988; Aerts & De Luca, 1992).

Plântulas de *Catharanthus roseus* acumulam altos níveis do precursor tabersonina, que é a primeira molécula precursora acometida à síntese do monômero vindolina. Estudos com plântulas estioladas têm demonstrado que a luz desempenha um papel crítico sobre a atividade de enzimas dos últimos

estágios de síntese deste monômero. Embora a vindolina e a desacetoxivindolina (seu precursor imediato) possam ser detectadas em plântulas crescidas no escuro, elas ocorrem apenas em quantidades pequenas. Entretanto, a exposição de plântulas estioladas à luz induz a atividade da desacetoxivindolina-4-hidroxilase (D4H) e da desacetilvindolina-4-*o*-acetiltransferase (DAT), últimas enzimas envolvidas na síntese da vindolina em seus cotilédones, o que resulta na conversão quantitativa de tabersonina e intermediários em vindolina (De Luca et al., 1986).

Vázquez-Flota & De Luca (1998), ao exporem plântulas estioladas de 7 dias à luz branca, observaram que a atividade da D4H aumentou aproximadamente 10 vezes, verificando também, logo após subsequente retorno ao escuro, uma queda nesta atividade. Segundo estes autores, que também avaliaram o efeito da exposição das plantas à luz de comprimentos de onda na região do vermelho e do vermelho distante, o fitocromo possui papel importante como modulador da atividade desta enzima ou da expressão do gene *d4h*, uma vez que a atividade da D4H é aumentada pela luz vermelha e seu efeito é reduzido pela exposição subsequente ao vermelho-distante.

O gene *d4h* parece ser regulado pela luz em multinível, uma vez que a atividade da D4H é baixa em plântulas estioladas, mesmo havendo abundância do produto gênico da D4H. A exposição de mudas estioladas à luz causou rápido aumento na atividade desta enzima, sem que houvesse um aumento no nível de transcritos (Vázquez-Flota & De Luca, 1998; Vázquez-Flota et al., 1997).

Qualidade da luz e desenvolvimento vegetativo de plantas

A fotossíntese não é o único processo para o qual a luz é essencial. As plantas monitoram propriedades da luz incidente, tais como intensidade,

qualidade, direção e duração, e usam essa informação para modular respostas de desenvolvimento, para controlar sua arquitetura e determinar o momento do florescimento. As respostas de desenvolvimento das plantas às propriedades do ambiente de luz são coletivamente referidas como fotomorfogênese. Respostas fotomorfogenéticas de plantas envolvem a ação de várias classes distintas de fotorreceptores que são sensíveis às diferentes regiões do espectro luminoso, incluindo as regiões ultravioleta, azul e vermelho/vermelho-distante (Whitelam, 1995). Em plantas superiores, as três principais famílias de fotorreceptores têm sido identificadas e caracterizadas como: os fitocromos, que absorvem luz vermelha e vermelho-distante; os criptocromos (Cashmore et al., 1999) e as fototropinas, que absorvem luz azul/UV-A (Briggs & Christie, 2002).

A maioria dos processos biológicos influenciados pela luz, tanto para animais quanto para vegetais, ocorre na faixa do espectro denominada luz visível, a qual varia de 400 a 700 nm. Assim, a principal fonte de energia para a fotossíntese se encontra nos intervalos da luz visível e os efeitos desta faixa do espectro podem ser observados também na fotomorfogênese. Contudo, alguns pigmentos estão envolvidos na percepção dos sinais trazidos pela luz e possuem seu pico de absorção em comprimentos de ondas abaixo de 400 nm e acima de 700nm (Carvalho & Peres, 2003).

Mudanças na qualidade da luz nas regiões do vermelho e vermelho-distante do espectro são detectadas pelos fitocromos. Um parâmetro útil para descrever o ambiente de luz natural é a razão irradiância de fótons na região do vermelho/vermelho-distante (relação V/VD). Sob quase todas as condições de radiação, existirá uma mistura de equilíbrio das duas formas de fitocromo (Fv e Fvd). As quantidades relativas de luz vermelha e vermelho-distante na radiação incidente serão traduzidas pelos fitocromos em diferentes concentrações relativas de sua forma ativa Fvd (Franklin & Whitelam, 2005).

O aumento da irradiância no comprimento de onda vermelho-distante reduz a relação V/VD , o que promove a fotoconversão do F_{vd} a F_v e, conseqüentemente, os níveis de F_{vd}/F_{total} são reduzidos. Baixas relações V/VD são detectadas pelos fitocromos como indicadores de alta densidade ou competição pela luz e são consideradas como sinal chave da luz refletida ou transmitida pela vegetação vizinha (Franklin & Whitelam, 2005). Essa percepção inicia uma resposta que consiste num alongamento do hipocótilo ou dos entrenós e pecíolos (estiolamento), um florescimento precoce e em uma baixa síntese de clorofila, constituindo uma estratégia para alcançar maiores extensões no corpo da planta. Esta estratégia, conhecida como “evitação à sombra”, tem como objetivo adquirir melhor qualidade de luz presente em camadas superiores da vegetação, em plantas sombreadas, permitindo, assim, o desenvolvimento dessas plantas de forma apropriada ao seu ambiente (Ballaré et al., 1992; Carvalho & Peres, 2003).

Um considerável grau de complexidade é observado nos mecanismos moleculares e celulares subjacentes às respostas à luz azul e ultravioleta, devido à diversidade de respostas controladas por estes comprimentos de onda e ao fato de as respostas serem observadas em diferentes órgãos e tecidos da planta, em vários estádios de desenvolvimento (Jenkins et al., 1995). Talvez, as mais proeminentes respostas à luz azul das plantas sejam os fototropismos (respostas de curvatura de órgãos em relação à direção da iluminação), a inibição do alongamento do hipocótilo, a abertura de estômatos, o rearranjo de cloroplastos e a regulação da expressão gênica dependente da luz (Whitelam, 1995).

Várias técnicas para manipulação da qualidade da luz têm sido utilizadas. Alguns trabalhos mostram efeitos marcantes sobre a fotomorfogênese de plantas, seja pela iluminação artificial (Rajapakse & Kelly, 1992; Pons & Van Berkel, 2004), por coberturas de solo refletoras, tintas ou coberturas coloridas

para casas de vegetação ou malhas que modificam a radiação por elas transmitida (Rajapakse et al., 1999; Shahak et al., 2004).

As malhas coloridas representam um conceito agrotecnológico novo, que objetiva combinar a proteção física, juntamente com a filtragem diferencial da radiação solar, para promover respostas fisiológicas desejáveis, reguladas pela luz (Shahak et al., 2004). De modo diferente das casas de vegetação, as malhas exercem uma menor interferência sobre o microclima da planta, entretanto, são capazes de modificar tanto a quantidade como a qualidade da radiação solar transmitida, determinando modificações ópticas da dispersão e refletância da luz (Oren-Shamir et al., 2001).

Alguns estudos comparativos entre malhas coloridas e a malha preta têm demonstrado que a mudança na distribuição espectral da radiação provoca alterações no desenvolvimento vegetativo de plantas. Oren-Shamir (2001) e Shahak et al. (2004) verificaram um maior comprimento de ramificações de plantas crescidas sob malhas vermelhas e um menor tamanho de plantas sob malhas azuis, em relação à malha neutra (preta).

As malhas coloridas podem diferir na sua eficiência em transmitir a luz difusa ou dispersa e também em sua capacidade de espalhar a luz direta que por eles passa, de acordo com as suas propriedades físicas. A dispersão da luz é um importante fator que determina o quanto a luz essencialmente penetra no dossel (Oren-Shamir et al., 2001). A complexidade e a variabilidade da radiação natural, de um lado, e as múltiplas reações de resposta da planta, de outro, tornam difícil prever como uma dada manipulação da luz natural irá afetar respostas vegetativas particulares (Oren-Shamir et al., 2001; Shahak et al., 2004).

Na malha preta (neutra), apenas a luz que passa através dos furos na malha é transmitida, uma vez que as linhas de plástico preto que a compõem são essencialmente opacas. No entanto, nas malhas coloridas, as quais são unidas

mais densamente para atingir o mesmo efeito de sombreamento, uma fração maior da luz solar realmente passa através das linhas, sendo seletivamente filtrada (Oren-Shamir et al., 2001). Segundo estes mesmos autores, a malha azul transmite luz em uma banda larga em 470 nm, além de outros picos na região do vermelho-distante e infravermelho (acima de 750 nm).

Enquanto isso, a malha vermelha possui uma maior transmitância em comprimentos de onda acima de 590 nm e um pico menor em torno de 400 nm. Contudo, enquanto a relação UV-A/PAR na luz que é transmitida pelas malhas neutras não difere da radiação natural, as malhas vermelha e azul transmitem luz com uma razão UV-A/PAR significativamente menor. Por outro lado, as relações V/VD da luz transmitida através das malhas azul e preta foram as mesmas da luz natural, enquanto que a da vermelha foi ligeiramente menor (Oren-Shamir et al., 2001).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AERTS, R.; DE LUCA, V. Phytochrome is involved in the light-regulation of vindoline biosynthesis in *Catharanthus roseus*. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.100, n.2, p.1029-1032, Oct. 1992.

AGUILERA, D.B.; FERREIRA, F.A.; CECON, P.R. Crescimento de *Siegesbeckia orientalis* sob diferentes condições de luminosidade. **Planta Daninha**, Viçosa, v.22, n.1, jan./mar. 2004.

ANDERSON, I.C.; ROBERTSON, D.S. Role of carotenoids in protecting chlorophyll from photodestruction. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.35, n.4, p.531-534, July 1960.

ATTRIDGE, T.H. **Light and plant responses**. London: E. Arnold, 1990. 147p.

BALLARÉ, C.L. et al. Photomorphogenic processes in the agricultural environment. **Photochemistry and Photobiology**, Oxford, v.56, n.5, p.777-788, 1992.

BENINCASA, M.M.P. **Análise de crescimento de plantas**. Jaboticabal: Funep/UNESP, 1988. 42p.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Physiology and biochemistry of seed in relation to germination**. Berlin: Springer Verlag, 1978. v.1, 306p.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2. ed. New York: Plenum, 1994. 445p.

BRAND, M.H. Shade influences plant growth, leaf color and chlorophyll content of *Kalmia latifolia* L. cultivars. **Hortscience**, Alexandria, v.32, n.2, p. 206-208, Apr. 1997.

BRIGGS, W.R.; CHRISTIE, J.M. Phototropin 1 and phototropin 2: Two versatile plant blue-light receptors. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.7, n.5, p.204-210, May 2002.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588p.

CARVALHO, R.F.; PERES, L.E.P. **Fotomorfogênese**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2003. 21p. Disponível em: <http://orion.cpa.unicamp.br/sbfv/arquivos/aulas/grad01/17_crescimento_e_de_senvolvimento___fotomorfogenese/Fotomorfo.pdf>. Acesso em: 12 jul. 2006.

CASHMORE, A.R. et al. Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. **Science**, v.284, n.5415, p.760-765, Apr. 1999.

CATHARANTHUS ROSEUS. Disponível em: <http://www.floridata.com/ref/c/cath_ros.cfm>. Acesso em: 16 jul. 2006.

COGDELL, R.J. Carotenoids in photosynthesis. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v.57, n.5, p.723-728, May 1985.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N.G. Natural products (Secondary Metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. Chap. 24, p.1250-1318.

DE LUCA, V. et al. Biosynthesis of indole alkaloids: developmental regulation of the biosynthetic pathway from tabersonine to vindoline in *Catharanthus roseus*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.125, n.1-2, p.147-156, 1986.

DE LUCA, V. et al. Developmental regulation of enzymes of indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.86, n.2, p.447-450, Feb. 1988.

DESCRIPTION and natural history of the periwinkle. Disponível em: <<http://biotech.icmb.utexas.edu/botany/perihist.html>> Acesso em: 3 jun. 2006.

DIAS-FILHO, M.B. Physiological response of *Solanum crinitum* Lam. To contrasting light environments. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.32, n.8, p.789-796, 1997.

DIAS-FILHO, M.B. Physiological responses of two tropical weeds to shade. II Leaf gas exchange and nitrogen content. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.6, p.953-961, jun. 1999.

DIXON, R.A. Natural products and plant disease resistance. **Nature**, v.411, p.843-847, June 2001.

EDREVA, A. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v.106, n.2-3, p.119-133, Apr. 2005.

EVANS, J.R.; POORTER, H. Photosynthetic acclimation of plants to growth irradiance: the relative important of specific area and nitrogen partitioning in maximizing carbon gain. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v.24, n.8, p.755-767, Aug. 2001.

FACCHINI, P.J. Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.52, p.29-66, June 2001.

FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. **Germinação**: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, 2004. 323p.

FRANKLIN, K.A.; WHITELAM, G.C. Phytochromes and shade-avoidance responses in plants. **Annals of Botany**, London, v.96, n.2, p.169-175, Aug. 2005.

HENRIQUES, A.T. et al. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 5.ed. Porto Alegre: UFRGS, 1999. Cap.29. p.765-791.

HIRATA, K. et al. Production of indole alkaloids in multiple shoot culture of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v.51, n.5, p.1311-1317, 1987.

JENKINS, G.I. et al. Plant responses to UV and blue light: biochemical and genetic approaches. **Plant Science**, Limerick, v.112, n.2, p.117-13, 1995.

JONES, R.H.; MACLEOD, K.W. Growth and photosynthetic responses to a range of light environments in chinese tallow tree and carolina ash seedlings. **Forest Science**, Washington, v.36, n.4, p.851-862, Dec. 1990.

JORDAN, M.A. et al. Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. **Cancer Research**, Baltimore, v.56, n.4, p.816-825, Feb. 1996.

JORDAN, M.A. Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. **Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents**, Schiphol, v.2, n.1, p.1-17, Jan. 2002.

LABOURIAU, L.G. **A germinação das sementes**. XX: Organização dos Estados Americanos. Programa Regional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, 1983. 174p. (Série Biologia, Monografia, 24).

LOBERT, S.; CORREIA, J.J. Physicochemical aspects of tubulin-interacting antimetabolic drugs. **Current Pharmaceutical Design**, San Francisco, v.7, n.13, p.1213-1228, Sept. 2001.

LOBERT, S.; VULEVIC, B.; CORREIA, J.J. Interaction of vinca alkaloids with tubulin: a comparison of vinblastine, vincristine, and vinorelbine. **Biochemistry**, New York, v.35, n.21, p.6806-6814, 1996.

MARCOS FILHO, J. Dormência de sementes. In: _____. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p.253-289.

MAYER, A.M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. **The germination of seeds**. 4.ed. Oxford: Pergamon, 1989. 270p.

MISAWA, M. et al. Synthesis of dimeric indole alkaloids by cell free extracts from cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. **Phytochemistry**, Amsterdam, v.27, n.5, p.1355-1359, May 1988.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.7, n.9, p.405-410, Sept. 2002.

MORGAN, R. **Enciclopédia das ervas e plantas medicinais**. 8.ed. São Paulo: Hemus, 1994. 555p.

NASSIF, S.M.L.; VIEIRA, I.G.; FERNADES, G.D. Germinação de sementes: fatores externos (ambientais) que influenciam a germinação. **Informativo Sementes**, IPEF, 1998. Disponível em: <<http://www.ipef.br/tecsementes/germinacao.html>>. Acesso em: 16 mar. 2006.

OREN-SHAMIR, M. et al. Coloured shade nets can improve the yield and quality of green decorative branches of *Pittosporum variegatum* **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Ashford, v.76, n.3, p.353-361, May 2001.

PASQUALI, G.; PORTO, D.D.; FETT-NETO, A.G. Metabolic engineering of cell cultures versus whole plant complexity in production of bioactive monoterpene indole alkaloids: recent progress related to old dilemma. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v.101, n.4, p.287-296, Apr. 2006.

PONS, T.L.; VAN BERKEL, Y.E.M. de J. Species-specific variation in the importance of the spectral quality gradient in canopies as a signal for photosynthetic resource partitioning. **Annals of Botany**, London, v.94, n.5, p.725-732, Nov. 2004.

RAJAPAKSE, N.C.; KELLY, J.C. Regulation of chrysanthemum growth by spectral filters. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.117, n.3, p.481-485, 1992.

RAJAPAKSE, N.C. et al. Plant height control by photoselective filters: current status and future prospects. **Horttechnology**, Alexandria, v.9, n.4, p.618-624, Oct./Dec. 1999.

ROBINSON, T. Metabolism and function of alkaloids in plants. **Science**, Massachusetts, v.184, n.4135, p.430-435, Apr. 1974.

SHAHAK, Y. et al. ColorNets: a new approach for light manipulation in fruit trees. **Acta Horticulturae**, The Hague, v.636, p.609-616, 2004.

SOTTOMAYOR, M. et al. Purification and characterization of α -3',4'-anhydrovinblastine synthase (peroxidase-like) from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **FEBS Letters**, v.428, n.3, p.299-303, May 1998.

ST-PIERRE, B.; VÁZQUEZ-FLOTA, F.; DE LUCA, V. Multicellular compartmentation of *Catharanthus roseus* alkaloid biosynthesis predicts intercellular translocation of a pathway intermediate. **The Plant Cell**, Rockville, v.11, n.5, p.887-900, May 1999.

SWAIN, T. Secondary compounds as protective agents. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.28, p.479-501, June 1977.

- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.
- TELFER, A. What is b-carotene doing in the photosystem II reaction centre? **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, London, v.357, n.1426, p.1431-1440, Oct. 2002.
- VAN DER HEIJDEN, R. et al. The *Catharanthus* alkaloids: pharmacognosy and biotechnology. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v.11, n.5, p.607-628, Mar. 2004.
- VÁZQUEZ-FLOTA, F.A.; DE LUCA, V. Developmental and light regulation of desacetoxyvindoline 4-hydroxylase in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.117, n.4, p.1351-1361, Aug. 1998.
- VÁZQUEZ-FLOTA, F.A. et al. Molecular cloning and characterization of desacetoxyvindoline-4-hydroxylase, a 2-oxoglutarate dependent-dioxygenase involved in the biosynthesis of vindoline in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.34, n.6, p.935-948, Aug. 1997.
- VÁSQUES-YANES, C.; OROZCO-SEGOVIA, A. Patterns of seed longevity and germination in the tropical rainforest. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v.24, p.35-68, Nov. 1993.
- VRANOVÁ, E.; INZÉ, D.; VAN BREUSEGEM, F. Signal transduction during oxidative stress. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.53, n.372, p.1227-1236, May 2002.
- WHATLEY, J.M.; WHATLEY, F.R. **Light and plant life**. London: E. Arnold, 1982. 101p.
- WHITELAM, G. Plant photomorphogenesis: a green light for cryptochrome research. **Current Biology**, London, v.5, n.12, p.1351-1353, Dec. 1995.
- ZHANG, S. et al. Study on the photo-generation of superoxide radicals in photosystem II with EPR spin trapping techniques. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v.75, n.1, p.41-48, Jan. 2003.

ARTIGO 1:

GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Catharanthus roseus* (L.) G. DON: EFEITOS DA TEMPERATURA, DO ÁCIDO GIBERÉLICO E DA LUZ¹

ANDERSON ADRIANO MARTINS MELO²
AMAURI ALVES DE ALVARENGA^{3*}
CRISTINA FILOMENA JUSTO⁴

RESUMO – A vinca (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don), Apocynaceae, é uma planta perene, utilizada como ornamental, reconhecida por sua importância medicinal como produtora de alcalóides com ação anti-cancerígena. Este trabalho objetivou estudar características da embebição e a germinação de sementes influenciada pela temperatura e pelo fotoperíodo. Para a construção das curvas de embebição, frutos de vinca da cultivar Pacífica White foram colhidos, e as sementes retiradas e tratadas com solução fungicida antes de serem embebidas por 24h em GA₃, (1,0 g.L⁻¹). O comportamento de embebição de *C. roseus* mostrou-se afetado pelo tratamento com GA₃, que, em comparação com sementes não tratadas, aumentou a taxa de embebição na fase III e a porcentagem final de germinação. Os experimentos de germinação foram realizados em câmaras de germinação e BOD, sob escuro contínuo, ou fotoperíodo de 12 horas, nas temperaturas constantes de 20, 25 e 30°C, ou na alternada 20-30°C (noite/dia). As sementes da cultivar estudada apresentaram uma menor germinação acumulada e porcentagem de germinação, e menor IVG na presença de luz, em todas as temperaturas testadas. A velocidade de germinação foi interativamente afetada pelos fatores temperatura e luz, sendo esta maior nas temperaturas de 20-30°C alternadas e de 30°C constante. Estes resultados contribuem para o entendimento do processo de germinação de sementes de *Catharanthus roseus*.

Palavras-chave – *Catharanthus roseus*, curva de embebição, giberelina, Apocynaceae, germinação de sementes.

¹ Parte da dissertação de Mestrado do primeiro autor

² Departamento de Biologia, UFLA, Lavras-MG, Cx.P. 3037, CEP 37200-000

³ Departamento de Biologia, UFLA, Lavras-MG, Cx.P. 3037, CEP 37200-000

*Autor para correspondência: amauriaa@ufla.br

⁴ Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, ICLMA/UFMT, Pontal do Araguaia-MT, Rodovia MT-100, km 3,5 CEP 78698 000.

**GERMINATION OF *Catharanthus roseus* (L.) G. DON SEEDS:
TEMPERATURE, GIBBERELIC ACID AND LIGHT EFFECTS¹**

ABSTRACT – Periwinkle (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don), Apocynaceae, is a perennial plant, used as ornamental, recognized by its medicinal importance as producer alkaloids with anticancer action. This work aimed to study the imbibition features and seed germination influenced by temperature and photoperiod. For construction of imbibition curves, fruits of Pacifica White cultivar of periwinkle were harvested, and the seeds removed and treated with fungicide solution prior to be imbibed in GA₃ (1,0 g.L⁻¹) for 24h. The imbibition behaviour showed affected by the GA₃ treatment, which, in comparison with untreated seeds, increased the imbibition rate in the phase III and the final germination percentage. Germination experiments were accomplished in germination chambers and BOD, under continuous dark or a 12 hours photoperiod, in constant temperatures of 20, 25 and 30°C, or 20-30°C (night/day) alternating. The seeds of studied cultivar presented a lower cumulative germination and germination percentage, and lower GVI in presence of light, in all tested temperatures. The germination rate was interactively affected by the temperature and light factors, being higher in alternating temperatures and 30°C constant. These results contribute to understanding the germination process of *Catharanthus roseus*.

Key words – *Catharanthus roseus*, imbibition curve, gibberelin, Apocynaceae, seed germination.

INTRODUÇÃO

A vinca [*Catharanthus roseus* (L.) G. Don] (Apocynaceae) é uma planta herbácea, perene e prostrada, notável pela contínua produção de flores, desde a primavera até o inverno (Blazich et al., 1995). O gênero *Catharanthus* é composto por oito espécies, sendo sete endêmicas da ilha de Madagascar e uma (*Catharanthus pusillus*) originária da Índia. *Catharanthus roseus* (L.) G. Don é a espécie mais importante e difundida mundialmente. No Brasil, ela é conhecida como vinca, pervinca, boa-noite ou maria-sem-vergonha (Morgan, 1994; Van der Heijden et al., 2004).

A espécie possui considerável interesse farmacêutico, devido à produção de diversos alcalóides indólicos, dentre os quais os dímeros vincristina e vimblastina, que exibem atividade citotóxica, por interferir na dinâmica de microtúbulos durante a metáfase mitótica (Jordan, 2002). Devido a estas propriedades, eles têm sido usados clinicamente para combater tumores hematológicos e sólidos (Lobert et al., 1996).

A germinação consiste na reativação do crescimento do embrião por meio de uma seqüência ordenada de eventos metabólicos, resultando na ruptura do tegumento pela radícula. O início desse processo se dá pela absorção de água pelas sementes (embebição) contínua com o alongamento do eixo embrionário até a protrusão da radícula. A quantidade total de água absorvida durante a embebição é, geralmente, muito pequena, mostrando um comportamento trifásico sob condições ótimas de suprimento de água (Bewley & Black, 1994). A embebição é fundamental para a germinação porque permite a retomada das atividades metabólicas dos tecidos da semente, contribuindo para os processos de mobilização e assimilação de reservas e crescimento subsequente. A vinca é propagada, principalmente, por sementes. No entanto, não há relatos na literatura

no que diz respeito ao comportamento da embebição de sementes de *Catharanthus roseus*.

O ambiente exerce um papel fundamental na fisiologia da germinação. A sensibilidade da semente à luz, ao estresse hídrico e à temperatura é determinante na germinação da semente em uma situação particular (Bewley & Black, 1994). Carvalho & Nakagawa (2000) relatam que a temperatura afeta o processo germinativo de três maneiras distintas: sobre o total de germinação, sobre a velocidade de germinação e sobre a uniformidade de germinação.

A luz impede ou atrasa a germinação de muitas sementes. Sementes não dormentes, cuja germinação é inibida na presença de luz, são chamadas fotoblásticas negativas (Bewley & Black, 1994).

Estudos sobre o comportamento germinativo de *Catharanthus roseus* têm sido conduzidos com diferentes cultivares. Choudhury & Gupta (1995), trabalhando com germinação de *Catharanthus roseus* cv. Alba, classificaram-na como fotoblástica negativa, uma vez que observaram uma germinação de 40% a 25°C, no escuro e apenas 10% quando as sementes foram submetidas à mesma temperatura na presença de luz contínua. Cardoso (1999) relata que as sementes desta espécie mantêm-se negativamente fotoblásticas em temperaturas de 15°C, 20°C, 25°C e 33°C. Outros trabalhos também mostram que a radiação com luz branca constante inibe a germinação de sementes de *Catharanthus roseus* e que estas devem ser germinadas em escuro, para se obter maior germinabilidade (Carpenter & Boucher, 1992, Cardoso, 1999).

Segundo a AOSA (Association of Official Seed Analysts, 1981), a melhor germinação de *Catharanthus roseus* ocorre em um fotoperíodo de 8 horas e termoperíodo de 30/20°C (D/N). Carpenter & Boucher (1992) relataram que há respostas diferenciadas em razão das cultivares testadas e que a faixa de temperatura adequada à germinação da espécie se encontra entre 25°C e 35°C

(cultivares Grape Cooler e Peppermint Cooler) e entre 25°C e 30°C (cultivar Pretty in Rose).

Blazich et al. (1995), trabalhando com sementes de *Catharanthus roseus* das cultivares Dawn Carpet e Little Bright Eye, verificaram interação significativa entre temperatura de germinação e radiação. Segundo estes autores, a radiação afeta a germinação de sementes desta espécie em baixa temperatura (15°C e 20°C), tanto no período de luz quanto no período de escuro.

A giberelina tem sido amplamente mostrada como hormônio indutor da síntese de α -amilase, aumentando o conteúdo de mRNA para a síntese desta enzima na camada de aleurona de cereais e, conseqüentemente, provendo energia para a protrusão radicular (Higgins et al., 1982; Chrispeels & Varner, 1967).

O ácido giberélico (GA₃) é reconhecido por aumentar a germinabilidade, na luz, das sementes tidas como fotoblásticas negativas (Coccuci et al., 1981). Este fitorregulador parece estar envolvido em um fotomecanismo, no qual pode ativar intermediários da rota de interconversão do fitocromo, alterando-o para a forma ativa e iniciando a germinação (Choudhury & Gupta, 1995).

Choudhury & Gupta (1998) observaram que, na ausência do tratamento com GA₃, sementes de *Catharanthus roseus* cv. Alba mostraram apenas 40% de germinação. Com um tempo de embebição de 24 horas, os autores observaram um aumento gradual da porcentagem de germinação de 40% para 100% com o aumento das concentrações de GA₃, atingindo germinação completa com 2,886 mM de GA₃.

Choudhury & Gupta (1995), aplicando soluções de GA₃ com diferentes concentrações e tempos de embebição sobre sementes de *Catharanthus roseus*, observaram um aumento na porcentagem de germinação de 10% para 52%, sob luz contínua. Segundo os autores, o GA₃ antagoniza a inibição da germinação pela luz, aumentando a permeabilidade das sementes nesta espécie.

Este trabalho teve como objetivo estudar os efeitos do ácido giberélico, temperatura e luz sobre o comportamento da embebição e o desempenho germinativo de sementes de *Catharanthus roseus* da cultivar Pacifica White.

MATERIAIS E MÉTODOS

Frutos de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don cv. Pacifica White, com coloração verde-amarelada, foram colhidos de plantas cultivadas na área experimental do Setor de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras, e dispostos em sala climatizada a 23°C, por 2 dias, para secagem e retirada das sementes. Para a determinação das curvas de embebição, foram utilizadas três repetições de 300 sementes para cada, as quais foram inicialmente pesadas em balança analítica digital com precisão de 0,1mg. A seguir, as sementes foram acondicionadas em caixas do tipo Gerbox[®], contendo duas camadas de papel mata-borrão umedecido com solução de Cercobin[®] (1,0 g.L⁻¹), para a primeira curva ou solução de Cercobin[®] (1,0 g.L⁻¹) + GA₃ (1,0 g.L⁻¹), para a segunda curva, sendo, posteriormente, mantidas em câmara de germinação a 23°C. As sementes foram pesadas nos seguintes intervalos: ½, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas. Antes de cada pesagem, as sementes foram rapidamente secas em papel absorvente. Com os valores das porcentagens consecutivas, foi calculada a porcentagem relativa de ganho de água em relação ao peso inicial das sementes, a fim de construir as curvas de embebição.

Para o experimento de radiação e temperatura, as sementes de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don cv. Pacifica White (Ball Seeds) foram tratadas com 100 mL de solução de GA₃ a (1,0 g.L⁻¹), no escuro, com aeração, durante 24 horas. Em seguida, foram desinfestadas com solução de Cercobin[®] (1,0 g.L⁻¹), durante 15 minutos e secas em papel mata-borrão. As sementes foram, então, dispostas em caixas tipo Gerbox[®], com 2 folhas de papel mata-borrão embebido

em volume de água igual a 2,5 vezes a massa dos papéis secos e germinadas em câmaras tipo Mangelsdorff e em BOD.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4x2 com 4 tratamentos de temperatura (20°C, 25°C, 30°C e 20°C-30°C) e dois tratamentos de luz (fotoperíodo de 12 horas ou escuro contínuo). No tratamento de temperatura alternada, a temperatura do período de escuro foi de 20°C. O tratamento de escuro foi obtido envolvendo-se as caixas Gerbox[®] em papel alumínio e em sacos pretos de polietileno.

Os tratamentos consistiram de 4 replicatas de 50 sementes cada. As contagens de germinação foram realizadas diariamente, em sala escura, com lâmpada verde de segurança, tendo como critério a protrusão de 2 mm de radícula. As sementes contadas não foram retiradas, sendo consideradas na avaliação seguinte (germinação acumulada). Foram avaliados a porcentagem de germinação (G%), o índice de velocidade de germinação (IVG) e a velocidade média de germinação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Curva de embebição - As sementes analisadas neste trabalho mostram uma curva de embebição com comportamento trifásico, com uma fase I, caracterizada por uma rápida embebição nas primeiras 8 e 7 horas (para as sementes não tratadas e tratadas com GA₃, respectivamente) (Figura 1).

Segundo Bewley & Black (1994), o potencial da água de sementes maduras e secas é muito menor do que o do substrato para germinação e a fase I é, primordialmente, uma consequência de forças matriciais e a absorção de água ocorre independentemente da viabilidade ou da dormência das sementes. Nesta fase, observou-se um incremento de massa sobre a massa inicial de 43% e 40% por hora, durante as 8 e 7 primeiras horas, para as sementes tratadas e não

tratadas com ácido giberélico, respectivamente (Figura 2). A partir daí, a taxa reduziu para menos de 1,46% e 1,8% por hora, para as sementes não tratadas e tratadas, respectivamente, o que determinou o limite entre as fases I e II, de acordo com Pinho et al. (2004).

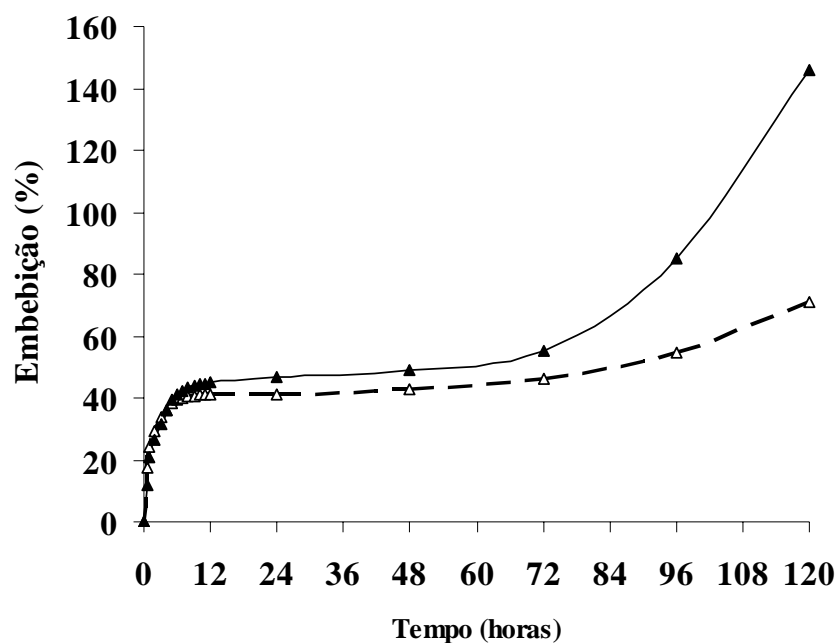
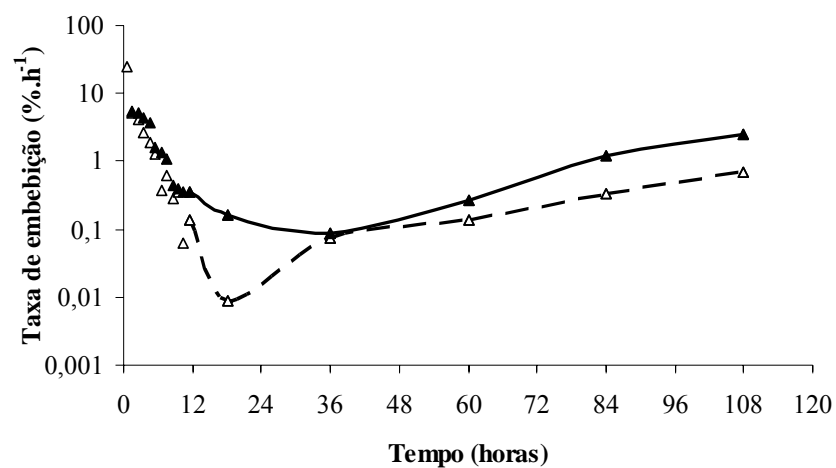


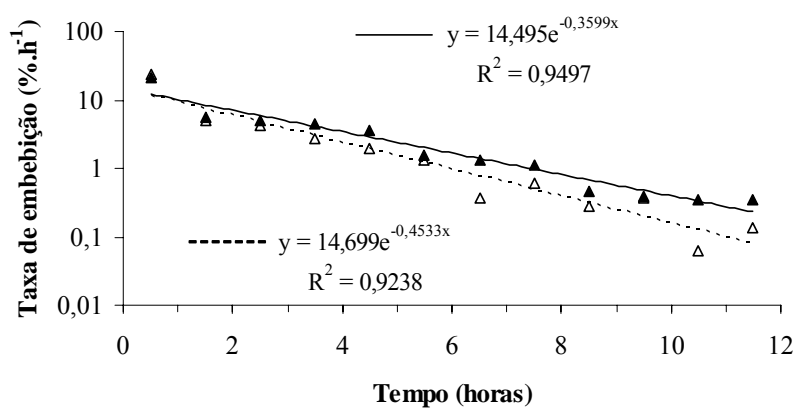
FIGURA 1: Efeito do ácido giberélico (GA₃) sobre as curvas de embebição de sementes de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. armazenadas a 23°C, durante 120 horas. (▲) Imersão em GA₃ (1,0 g,L⁻¹) por 24 horas, (△) Controle (Sem GA₃).

De acordo com Bewley & Black (1994), a fase II é uma fase *lag* de absorção de água, na qual forças matriciais não desempenham papel significativo, os principais eventos metabólicos iniciam a reativação do

metabolismo e a mobilização dos compostos de reserva para a retomada do crescimento do eixo embrionário.



(A)



(B)

FIGURA 2: Efeito do ácido giberélico sobre a taxa de embebição das sementes de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. armazenadas a 23°C (A), durante 120 horas; (B) Taxa de embebição nas primeiras 12 horas; (▲) imersão em GA₃ (1,0 g·L⁻¹) por 24 horas; (△) controle (Sem GA₃).

A taxa de embebição mostrou uma tendência de redução para ambos os tratamentos até 12 horas (Figura 2 B). Esta redução foi, no entanto, mais acentuada nas sementes não tratadas com GA₃, entre 12 e 24 horas (Figura 2 A). A partir do intervalo entre 24 e 48 horas, observou-se, então, uma retomada do ganho de massa e início da germinação para ambos os tratamentos, o que caracteriza o início da fase III. Nesta etapa, estas sementes tratadas com GA₃ mostraram uma taxa média de embebição de 4% por hora, até o intervalo entre 96 e 120 horas, enquanto que as sementes não tratadas mostraram uma taxa de embebição de apenas 1,2% por hora, neste mesmo período.

Com o início da fase III, o aumento da absorção de água é primariamente relacionado ao decréscimo do potencial osmótico resultante da hidrólise de substâncias de reserva e a alongação da radícula relacionada ao relaxamento da parede celular (Bewley & Black, 1994).

Verificou-se uma germinação final de 36,3%, nas 120 horas de embebição, nas sementes não tratadas com ácido giberélico. Em contrapartida, as sementes tratadas mostraram uma germinabilidade muito superior (87,2%) e mais uniforme, logo nas primeiras 72 horas de embebição. Carpenter & Boucher (1992) também conseguiram aumentar a germinação de três cultivares de vinca na luz, com uso de GA₃.

De acordo com Choudhury & Gupta (1998), tanto a natureza dos promotores quanto a permeabilidade dos tecidos à água e solutos desempenham papel crucial em possibilitar alta germinabilidade na semente fotoblástica negativa de *C. roseus* cultivar Alba. Parece que o tratamento com GA₃ exerce ação nos primeiros estágios do processo de germinação ou que ele penetre rapidamente no interior das sementes e permanece ativo por um período suficiente para induzir a germinação. Tal efeito foi também observado em

Catharanthus roseus, por Carpenter & Boucher (1992) e Choudhury & Gupta (1995).

A duração das fases da germinação depende das propriedades inerentes das sementes e das condições que prevalecem durante a hidratação (Bewley & Black, 1994). Os resultados aqui apresentados mostram que houve efeito do ácido giberélico, reduzindo a extensão da fase II das sementes de *Catharanthus roseus*.

Temperatura e fotoperíodo - O efeito dos fatores temperatura e fotoperíodo sobre a porcentagem de germinação e IVG das sementes de *Catharanthus roseus* não foi interativamente significativo. No entanto, o efeito isolado da temperatura mostrou que a 25°C e a 30°C houve maior porcentagem final de germinação (91,5% e 90,25%, respectivamente), em comparação com os demais tratamentos (Figura 3). Apesar das diferenças observadas, a geminabilidade foi elevada em todas as condições avaliadas (acima de 85%), fato que pode ser atribuído ao uso de ácido giberélico em todos os tratamentos. O IVG também foi afetado pelas diferentes temperaturas avaliadas, sendo menor no tratamento a 20°C que naqueles que envolveram temperaturas maiores ou alternadas.

Os resultados aqui apresentados concordam com os observados por Carpenter & Boucher (1992), para esta mesma espécie, em que os valores de máxima germinabilidade ocorreram entre 25°C e 30°C, para a cultivar Pretty in Rose, com uso da mesma concentração e tempo de embebição em ácido giberélico. Segundo estes autores, temperaturas constantes abaixo de 25°C reduzem a taxa e a porcentagem final de germinação das sementes de vinca mantidas no escuro, como observado neste trabalho.

Choudhury & Gupta (1995) também verificaram uma maior porcentagem de germinação para *Catharanthus roseus* a 25°C. Cardoso (1999), avaliando uma faixa de temperaturas entre 12°C e 40°C, relatou que a

germinabilidade ótima de sementes de vinca encontra-se na faixa entre 22°C e 27°C.

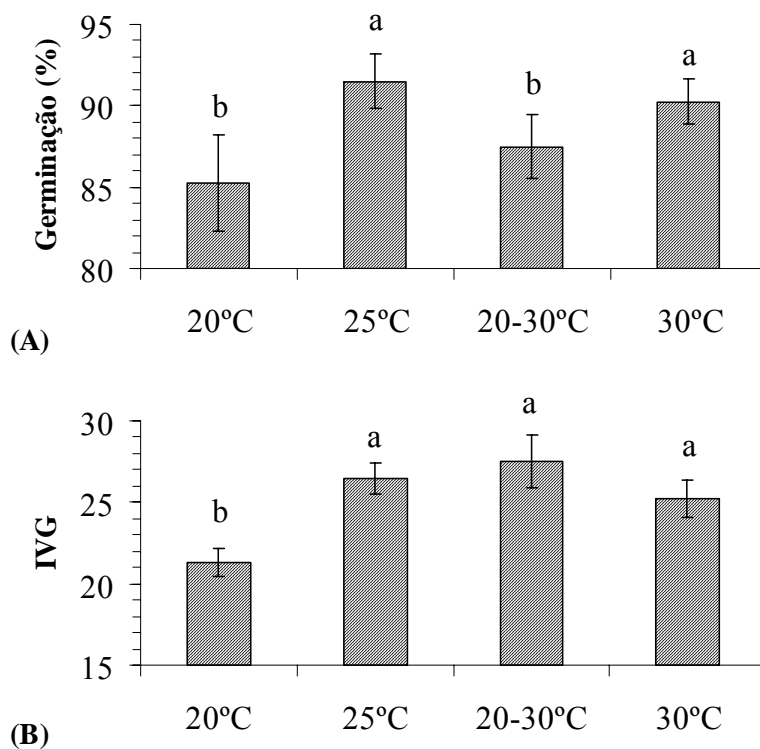


FIGURA 3: (A) Germinação total (%), (B) Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don submetidas a diferentes temperaturas, durante 7 dias. Linhas verticais representam o erro padrão entre médias (n=4). Letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

O regime de radiação também afetou a resposta germinativa, tendo o fotoperíodo de 12 horas determinado uma menor germinação acumulada (Figura

4), menor IVG e menor porcentagem final de germinação em relação ao tratamento mantido em escuro contínuo (Figura 5).

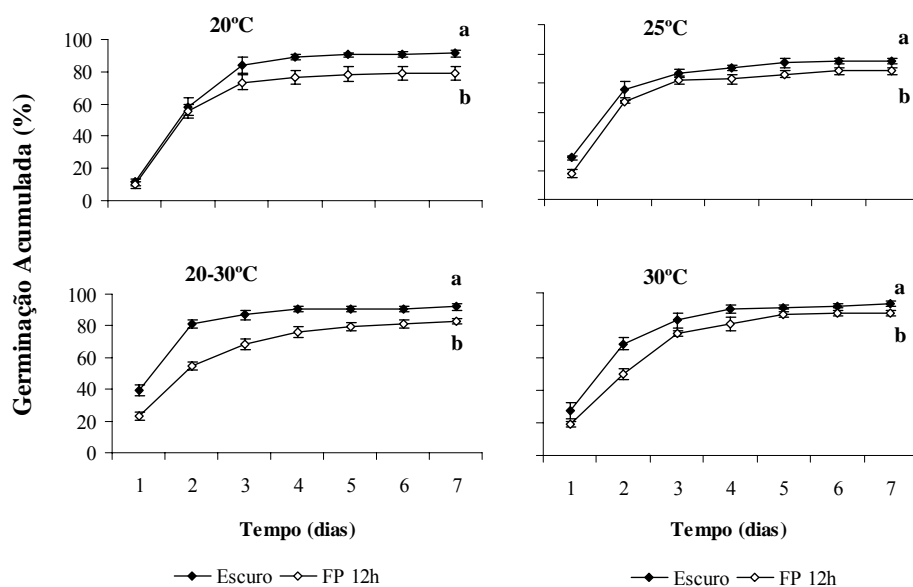


FIGURA 4: Efeito do regime de radiação (presença ou ausência) sobre a germinação acumulada (%) de sementes de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don sob diferentes temperaturas, durante 7 dias. Letras distintas representam médias de germinação acumulada diferentes entre si, pelo Teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

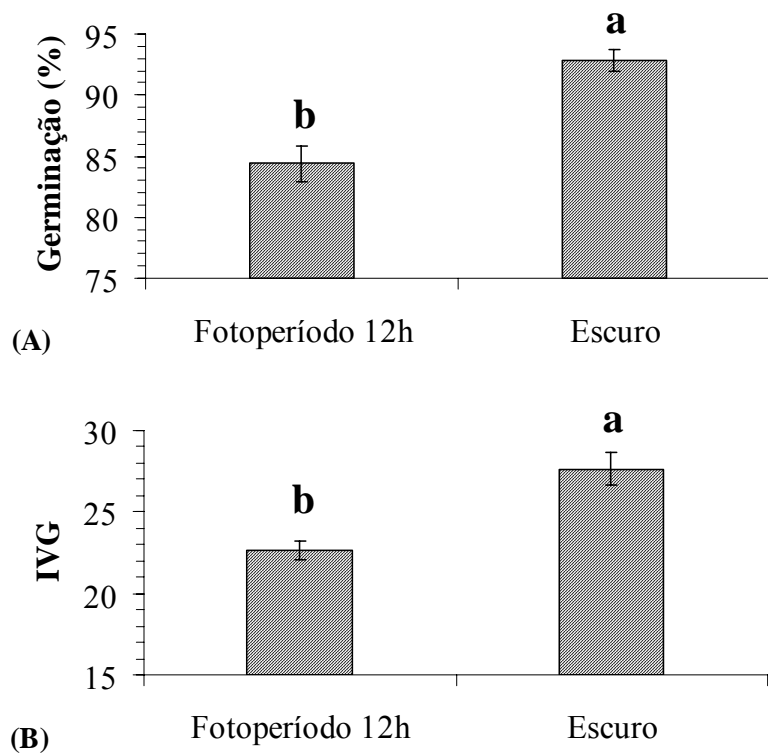


FIGURA 5: (A) Germinação total (%), (B) índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don submetidas a diferentes regimes de radiação (presença ou ausência), por 7 dias. Linhas verticais representam o erro padrão entre médias (n=4). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Entretanto, a germinação não se restringiu à ausência de luz, uma vez que também foi elevada, mesmo na presença de fotoperíodo de 12 horas. A germinabilidade, neste trabalho, mostrou percentuais elevados em ambas as condições de radiação (entre 84% e 93%), cujos valores estão de acordo com os

observados por Carpenter & Boucher (1992). Cardoso (1999) também verificou que a ausência de luz favoreceu a germinação de sementes de *Catharanthus roseus* em temperaturas de 20°C, 25°C e 33°C, porém, sem uso de ácido giberélico.

Blazich et al. (1995), estudando uma ampla faixa de fotoperíodos (0, 1, 2, 4, 8, 12 e 24 horas), observaram que o escuro não é estritamente necessário para que a germinação ocorra. Assim, fotoperíodos menores ou iguais a 12 horas não afetam adversamente a resposta, em relação às sementes mantidas no escuro, sendo a duração da radiação um fator mais crítico para a germinação do que sua presença ou ausência. De modo diferente, os resultados deste trabalho mostram que a presença de um fotoperíodo de 12 horas reduz a germinabilidade e o IVG das sementes de *Catharanthus roseus* cv. Pacifica White.

Choudhury & Gupta (1995) e Cardoso (1999) também encontraram germinação ótima de *Catharanthus roseus* à temperatura de 25°C. Carpenter & Boucher (1992) observaram que sementes mantidas em temperaturas de 25°C e 30°C necessitaram de um menor tempo para atingir 50% de germinação do que sementes mantidas a 20°C.

Neste trabalho, observou-se interação significativa entre temperatura e fotoperíodo sobre a velocidade média de germinação (Figura 6). O fotoperíodo de 12 horas não interferiu na velocidade de germinação de sementes armazenadas a 20°C ou a 25°C, que não diferenciaram entre si. No entanto, nas temperaturas de 30°C e alternada 20°C-30°C, as sementes armazenadas no escuro constante mostraram uma maior velocidade de germinação. Para Cardoso (1999), a germinação em *C. roseus* parece ser limitada por processos dependentes do fitocromo, durante um amplo intervalo de temperatura. Contudo, para a cultivar estudada neste trabalho, as diferenças na taxa de germinação induzidas pela luz foram significativas apenas para temperaturas constantes maiores que 25°C ou alternada 20°C-30°C.

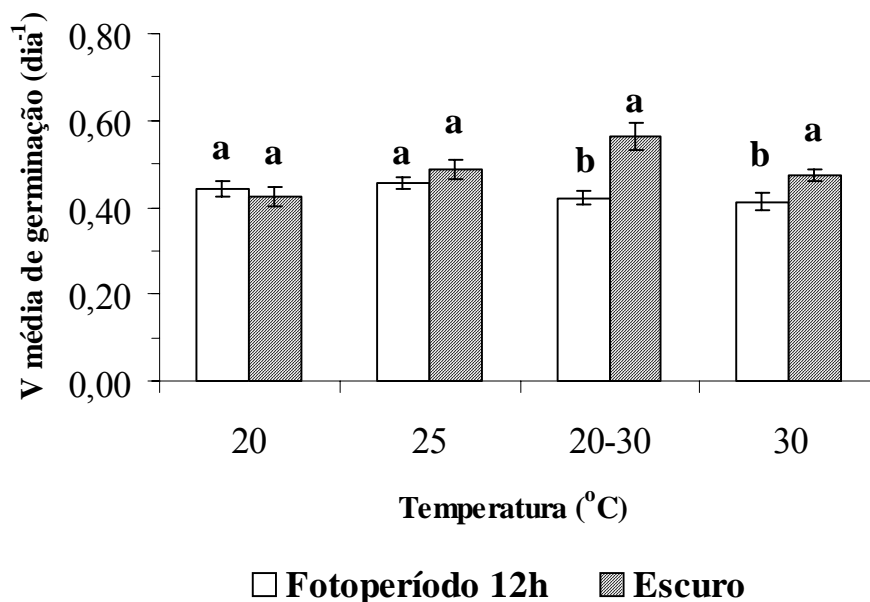


FIGURA 6: Velocidade média de germinação (1/t, dias) de sementes de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don submetidas a diferentes temperaturas e condições de radiação (presença ou ausência), durante 7 dias. Linhas verticais representam o erro padrão entre médias (n=4). Letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

As maiores percentagens de germinação desta espécie no escuro, em temperaturas mais altas, podem ser explicadas pelo fato de que a temperatura pode causar alterações da sensibilidade da semente a baixos níveis de Fve pré-existentes, favorecendo a germinação no escuro (Taylorson & Hendricks, 1972; Takaki et al., 1985).

CONCLUSÕES

Os resultados mostram que a curva de embebição das sementes desta espécie possui aspecto claramente trifásico, cuja taxa de embebição mostra-se elevada pelo uso de GA₃, que também eleva a porcentagem final de germinação em um menor tempo.

A luz exerce influência no processo germinativo das sementes de *Catharanthus roseus* cv. Pacifica White, as quais mostram comportamento preferencialmente fotoblástico negativo e dependente da temperatura de incubação. No entanto, as diferenças observadas são pequenas, do ponto de vista prático, fator atribuído ao uso de ácido giberélico em todos os tratamentos.

Os resultados mostrados aqui contribuem para o entendimento do processo de embebição de sementes de *Catharanthus roseus*, cultivar Pacifica White.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. Rules for testing seeds. **Journal of Seed Technology**, v.6, n.2, p.1-125, 1981.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum, 1994. 445p.

BLAZICH, F.A.; HENRY, P.H.; WISE, F.C. Seed germination of annual vinca responds to irradiation and temperature. **Hortscience**, Alexandria, v.30, n.2, p.357-359, Apr. 1995.

CARDOSO, V.J.M. Thermal dependence of the germination of *Catharanthus roseus* seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.11, n.1, p.41-49, jan./abr. 1999.

CARPENTER, W.J.; BOUCHER, J.F. Germination and storage of vinca seed is influenced by light, temperature and relative humidity. **Hortscience**, Alexandria, v.27, n.9, p.993-996, 1992.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4.ed. Jaboticabal: Funep, 2000. 588p.

CHOUDHURY, S.; GUPTA, K. Studies on the germination mechanism of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don cv. Alba seeds: effect of temperature and promoters. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.23, p.831-842, 1995.

CHOUDHURY, S.; GUPTA, K. Studies on the germination mechanism of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don cv. Alba seeds: effect of promoters and pH. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.26, p.719-732, 1998.

CHRISPEELS, M.J.; VARNER, J.E. Gibberellic acid-enhanced synthesis and release of α -amylase and ribonuclease by isolated barley and aleurone layers. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.42, n.3, p.398-406, Mar. 1967.

COCCUCI, S. et al. The role of darkness, GA, and fusicoccin (FC) in breaking photodormancy in *Phacelia tanacetifolia* seeds. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.52, n.2, p.177-180, June 1981.

HIGGINS, T.J.V.; JACOBSEN, J.V.; ZWAR, J.A. Gibberellic acid and abscisic acid modulate protein synthesis and mRNA levels in barley aleurone layers. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.1, n.3, p.191-215, Sept. 1982.

JORDAN, M.A. Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. **Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents**, Shiphol, v.2, n.1, p.1-17, Jan. 2002.

LOBERT, S.; VULEVIC, B.; CORREIA, J.J. Interaction of vinca alkaloids with tubulin: a comparison of vinblastine, vincristine, and vinorelbine. **Biochemistry**, New York, v.35, n.21, p.6806-6814, 1996.

MORGAN, R. **Enciclopédia das ervas e plantas medicinais**. 8.ed. São Paulo: Hemus, 1994. 555p.

PINHO, S.Z. de; CARVALHO, L.R. de; DELACHAIVE, M.E.A. Limit between stages I and II of a seed imbibition curve. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.61, n.1, p.17-20, Jan./Fev. 2004.

TAKAKI, M. et al. Analysis of the effect light and temperature on the fluence response curves for germination of *Rumex obtusifolius*. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.77, p.731-734, Mar. 1985.

TAYLORSON, R.B.; HENDRICKS, S.B. Phytochrome control of germination of *Rumex crispus* L. seeds induced by temperature shifts. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.50, p.645-648, Dec. 1972.

VAN DER HEIJDEN, R. et al. The *Catharanthus* alkaloids: pharmacognosy and biotechnology. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v.11, n.5, p.607-628, Mar. 2004.

ARTIGO 2:

SOMBREAMENTO DE PLANTAS DE *Catharanthus roseus* (L.) G. Don POR MALHAS COLORIDAS: DESENVOLVIMENTO VEGETATIVO¹

ANDERSON ADRIANO MARTINS MELO²
AMAURI ALVES DE ALVARENGA³

RESUMO: As malhas coloridas têm sido utilizadas para manipular a natureza do desenvolvimento vegetativo, melhorando a utilização da radiação solar por plantas ornamentais. Este trabalho objetivou estudar o efeito da redução de 50% da radiação fotossinteticamente ativa sobre aspectos do desenvolvimento vegetativo de plantas de vinca [*Catharanthus roseus* (L.) G. Don], utilizando malhas de cores azul e vermelha e malha preta (neutra), em comparação à ausência de sombreamento (pleno sol). As plantas foram obtidas a partir de sementes e mantidas sob os tratamentos por 180 dias. Foram avaliados o ganho de matéria seca e a distribuição de matéria seca entre órgãos da planta, o conteúdo de pigmentos foliares (clorofilas e carotenóides) e nitrogênio foliar. A malha vermelha aumentou a matéria seca total e a área foliar das plantas em relação às malhas azul, preta e ao tratamento a pleno sol, porém, exceto em relação a este tratamento, a malha vermelha mostrou um menor conteúdo de nitrogênio e pigmentos foliares. A maior relação raiz/parte aérea e relação clorofila a/b, menores razões de área foliar e de peso foliar das plantas crescidas a pleno sol em relação às plantas sombreadas indicam um efeito mais proeminente da maior irradiância do que da alteração espectral. O sombreamento altera significativamente a distribuição de matéria seca e o uso de malhas de diferentes cores modifica o conteúdo de pigmentos fotossintéticos nesta espécie vegetal.

Termos para indexação: vinca, área foliar, distribuição espectral, matéria seca, carotenóides, clorofilas.

¹ Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor

² Eng. Agr., aluno de mestrado em Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia – UFLA

³ Prof. Dr. Titular do Departamento de Biologia – UFLA

SHADDING OF *Catharanthus roseus* (L.) G. Don PLANTS WITH COLORED NETS: VEGETATIVE DEVELOPMENT¹

ABSTRACT: Colored shade nets have been used to manipulate the nature of vegetative development, improving the utilization of solar radiation by ornamental plants. This work aimed to study the effect of 50% reduction of PAR on vegetative development features of vinca [*Catharanthus roseus* (L.) G. Don] plants, using shade nets of blue and red colors, and black net (neuter), in comparison to lack of shading (full sun). The plants were obtained from seeds and kept under the treatments for 180 days. Dry mass increment and distribution between plant organs, foliar pigment content (chlorophylls and carotenoids) and foliar nitrogen were evaluated. The red net increased total dry matter and total leaf area of plants in relation to blue net, black net and the full sun treatment, however, except in relation to that treatment, the red net showed lower foliar nitrogen and pigments. The higher root/aerial part and chlorophyll a/b ratios, the lower leaf area and leaf dry weight ratios of plants growth under full sun in relation to shaded plants indicates a most prominent effect of higher irradiance than spectral alteration. The shading alters significantly the dry matter distribution and the use of different color shade nets changes the photosynthetic pigment content in this plant species.

Index terms: vinca, leaf area, spectral distribution, dry matter, carotenoids, chlorophylls.

INTRODUÇÃO

A vinca [*Catharanthus roseus* (L.) G. Don] é uma das plantas medicinais mais extensivamente estudadas. Além de planta ornamental, sua importância se deve à produção e ao acúmulo de alcalóides bis-indólicos nas folhas (vimblastina e vincristina) utilizados no tratamento de diversas formas de câncer e de outros dois (ajmalicina e serpentina), encontrados nas raízes, com uso na terapia de disfunções vasculares.

No entanto, há poucos relatos na literatura acerca de informações no que diz respeito à fisiologia do desenvolvimento desta espécie em relação às variações de fatores do ambiente.

As plantas, organismos autótrofos e sésseis dependem da aquisição da energia radiante para sua sobrevivência e competição em comunidades vegetais, devendo, para tanto, adaptar seu crescimento e desenvolvimento à radiação disponível no ambiente (Franklin & Whitelam, 2005).

Os estímulos ambientais fornecem informações de valor ecológico crucial em muitos estádios de desenvolvimento de plantas. A germinação de sementes, o estabelecimento de plântulas, o desenvolvimento da maquinaria fotossintética e da arquitetura da planta, o florescimento, respostas à competição com plantas vizinhas e a alocação de recursos nutricionais para raízes, caules, folhas, órgãos reprodutivos ou de armazenamento são processos fisiológicos potencialmente controlados pela percepção do estímulo luminoso pelos fitocromos (Smith, 2000).

Muitos trabalhos têm demonstrado que a qualidade da luz influencia muitos aspectos do desenvolvimento de plantas (McMahon et al, 1991; Rajapakse & Kelly, 1992; Pons & Van Berkel, 2004). A qualidade da luz pode causar alterações no fotoequilíbrio do fitocromo, relacionado às quantidades relativas das formas Fv e Fvd e, assim, determinar uma razão Fvd/Ftotal de cuja

percepção dependem muitas respostas morfogênicas (Kasperbauer & Peaslee, 1973; Smith & Whitelam, 1997).

As plantas podem perceber mudanças sutis na composição de vermelho e vermelho-distante do ambiente em que se encontram, ajustando-se morfológica e fisiologicamente por meio do fitocromo (Li et al., 2000). A relação vermelho/vermelho distante (V/VD) é considerada um fator importante para respostas mediadas pelo fitocromo (Batschauer, 1998). Em resposta aos sinais de baixa relação V/VD, muitas plantas mostram um rápido e pronunciado aumento na taxa de alongação de caules e pecíolos, freqüentemente às expensas do desenvolvimento de folhas e órgãos de armazenamento (Franklin & Whitelam, 2005).

A manipulação espectral da radiação natural tem sido utilizada em casas de vegetação por meio de filtros fotosseletivos líquidos contendo sulfato de cobre (Rajapakse & Kelly, 1992; McMahon & Kelly, 1995; Rajapakse et al., 1999), ou por meio de coberturas coloridas, as quais modificam especificamente a luz nas regiões espectrais do ultravioleta, do visível ou do vermelho-distante, aumentando a quantidade de luz difusa em seu interior (Oren-Shamir et al., 2001; Shahak et al., 2004). A malha azul, diferentemente da vermelha, não reduz a razão V/VD do espectro da luz difusa (Shahak et al., 2004), mas eleva levemente esta relação. Seu efeito mais proeminente, segundo os autores, é aumentar a relação azul/vermelho na luz difusa em seu ambiente.

Segundo Oren-Shamir et al. (2001), que utilizaram as malhas coloridas e mediram a distribuição espectral da luz, observaram que, sob malha azul, há transmissão de luz em uma banda abrangente em 470 nm, além de outros picos na região do vermelho-distante e infravermelho (acima de 750 nm), enquanto que a vermelha possui uma maior transmitância em comprimentos de onda acima de 590 nm e um pico menor em torno de 400 nm.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da radiação solar alterada por coberturas de malhas de cor azul e vermelha sobre aspectos do desenvolvimento vegetativo de plantas de vinca (*Catharanthus roseus*) cv. Pacífica White.

MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no período de novembro de 2005 a maio de 2006, no Setor de Fisiologia Vegetal, no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), situada no município de Lavras, Minas Gerais, situado na região sul do estado, a 918 m de altitude, latitude de 21°14'S e longitude 45°00'W GW.

Sementes de *Catharanthus roseus* foram previamente embebidas em solução de GA₃ (1,0 g.L⁻¹), no escuro, por 24 horas. Em seguida, foram secas em papel absorvente, desinfestadas por 15 minutos em solução de Cercobin® (1,0 g.L⁻¹) e colocadas para germinar em caixas tipo Gerbox®, sobre duas camadas de papel mata-borrão, utilização de câmara de germinação tipo BOD, sob temperatura de 23°C constante e no escuro. Após 3 dias, as sementes pré-germinadas foram, então, repicadas para tubetes com capacidade para 50 cm³, contendo substrato Plantmax® e transferidas para viveiro com 70% de sombreamento. Plântulas com 8 cm de altura na parte aérea e com dois pares de folhas verdadeiras (35 dias após emergência) foram selecionadas e repicadas para o substrato definitivo, em colunas de PVC contendo 5,0 L de terra de subsolo, areia e esterco bovino na proporção de 2:1:1. Após análise do solo utilizado, foi preparada uma solução nutritiva visando corrigir deficiências nutricionais e suprir a planta durante o período experimental. A aplicação foi feita cuidadosamente após a repicagem, com uso de proveta.

Os tratamentos de radiação consistiram de duas coberturas por malhas coloridas (vermelha e azul - Polysack Plastic Industries[®]) e uma preta, todas elas possuindo uma densidade da malha que fornece 50% de transmitância na região fotossinteticamente ativa, além de um tratamento testemunha a pleno sol. As malhas de diferentes cores, segundo o fabricante, alteram o espectro de luz solar por elas transmitida: a malha vermelha reduz as ondas azuis, verdes e amarelas, e acrescenta ondas na região do vermelho e vermelho distante. A malha azul reduz ondas na faixa do vermelho e vermelho-distante, e acrescenta ondas azuis.

As plantas permaneceram sob os tratamentos por 180 dias, sendo irrigadas em intervalos de 2 dias. Após este período, foi feita medição da área foliar, em 6 plantas em 100% das folhas completamente expandidas, com uso do medidor eletrônico de área foliar (LI-COR LI-3100). Nestas mesmas plantas, foi avaliada a matéria seca total e particionada. Após a separação da planta em folhas, ramos e raízes, as partes foram acondicionadas em sacos de papel e transferidas para uma estufa com circulação forçada de ar a 50°C, até adquirir massa constante. Após a secagem, os materiais foram pesados em balança analítica com precisão de 10^{-4} g.

Alguns índices fisiológicos de crescimento foram avaliados como razão de área foliar, razão de peso foliar e área foliar específica (RAF, RPF e AFE, respectivamente), por meio dos valores instantâneos de área foliar (A), expressos em dm^2 , matéria seca da planta (P) e matéria seca das folhas (P_f), ambos expressos em g, de acordo com Benincasa (1988).

Este experimento seguiu um delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) com quatro tratamentos de radiação (malha vermelha, azul, preta e pleno sol) e 6 repetições, sendo cada repetição constituída de uma planta.

As folhas provenientes da determinação da matéria seca foliar foram trituradas e utilizadas para a quantificação do nitrogênio foliar, pelo método de Micro-Kjeldahl. Para análise do teor de clorofilas, foram utilizadas 3 folhas

completamente expandidas por tratamento, sendo as quantificações das clorofilas a, b e total realizadas, segundo Arnon (1949).

A extração e a quantificação dos carotenóides totais foram realizadas em cinco folhas maduras completamente expandidas por tratamento, segundo a metodologia descrita por Duke & Kenyon (1986), com modificações: uma massa fresca (M) de 500 mg de folhas foi extraída com 10 mL de hidróxido de potássio em metanol (6% p/v). Em seguida, os extratos foram centrifugados a 5.000 g por cinco minutos a 15°C, sendo o sobrenadante depositado em um tubo tipo “falcon”. O extrato foi particionado com 3 mL de éter de petróleo (ponto de ebulição 60°C) para a extração dos pigmentos. A epifase foi coletada e depositada em tubo de ensaio. O particionamento foi repetido por mais duas vezes, precedendo a leitura (A) em espectrofotômetro (Beckman DU-640) a 445nm. A concentração de carotenóides totais foi calculada com base na matéria fresca de tecido e uma epifase de 9mL com uso dos coeficientes de extinção molar (E) de Sandmann & Böger (1983) para o β-caroteno (2500), utilizando-se a expressão: $\mu\text{g/g} = [(A \times V \times 10^6)/(E \times M \times 100)]$.

Este experimento foi conduzido num delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), com 4 tratamentos de radiação e em 4 repetições. Todos os dados obtidos foram submetidos à análise de variância. As médias, quando significativas, foram submetidas ao teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A matéria seca das plantas de *Catharanthus roseus* foi significativamente afetada pelo uso de malhas coloridas (Figura 1 A). Observou-se que plantas cultivadas sob malha vermelha apresentaram maior matéria seca

total, em relação aos demais tratamentos. Este tratamento também acumulou maior matéria seca em caules, comparativamente aos tratamentos com malha preta e azul. Estes resultados estão de acordo com o observado por Oren-Shamir et al. (2001), que verificaram um maior percentual de ramos de maior comprimento presentes em plantas de *Pittosporum variegatum* sob malha vermelha, em relação ao sombreamento com malha azul ou preta. Li et al. (2000) também observaram um menor tamanho de parte aérea das plantas cultivadas em casa de vegetação coberta com filmes de polietileno pintado com tinta que reduz a sua transmissividade à luz vermelho-distante.

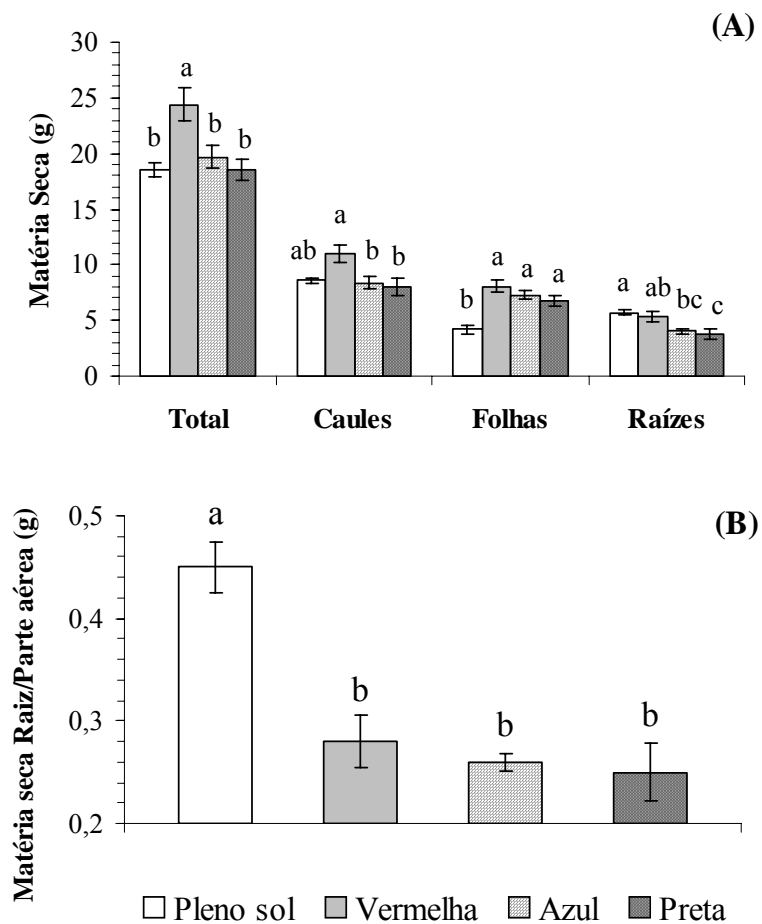


FIGURA 1: (A) Matéria seca total e particionada e (B) relação raiz/parte aérea (g) de plantas de *Catharanthus roseus* cv. Pacifica White submetidas ao sombreamento sob telado com malha de diferentes cores, durante 180 dias. Linhas verticais representam o erro padrão entre as médias (n=6). Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

O acúmulo de matéria seca foliar foi afetado pelo uso de sombreamento, sendo significativamente menor no tratamento a pleno sol, no qual se observa um maior incremento de matéria seca nas raízes em relação aos tratamentos com malha azul e preta.

Analisando-se a distribuição de biomassa entre os diferentes órgãos da planta (Figura 2), verifica-se que grande parte dos fotoassimilados foi alocada nas raízes de plantas a pleno sol, em detrimento do investimento em folhas, o que determinou uma maior relação raiz/parte aérea para o tratamento a pleno sol (Figura 1B). Os tratamentos com sombreamento não afetaram, significativamente, a distribuição de biomassa. Desse modo, parece que o efeito da irradiância é mais proeminente do que a alteração espectral sobre esta variável, na espécie estudada.

O maior investimento de fotoassimilados em raízes, em detrimento de folhas nestas plantas, é condizente com a estratégia adaptativa de aumentar a capacidade de absorção de água e nutrientes, e sobreviver a ambientes com maior incidência de ventos e alta irradiância e, conseqüentemente, maior exigência hídrica.

A distribuição de matéria seca entre os diferentes órgãos de uma planta constitui um comportamento interessante e inerente às espécies vegetais e que reflete a sua adaptabilidade às diferentes condições do ambiente (Benincasa, 1988). Ainda não está bem esclarecida a razão das alterações que ocorrem na alocação de biomassa entre os órgãos da planta em resposta às alterações espectrais. Alguns estudos, no entanto, associam a percepção do sinal ambiental pelo fitocromo e receptores de luz azul (criptocromos e fototropinas), e a resposta de crescimento de caules em *Arabidopsis*, atribuindo-lhes uma ação coordenada (Parks et al., 2001).

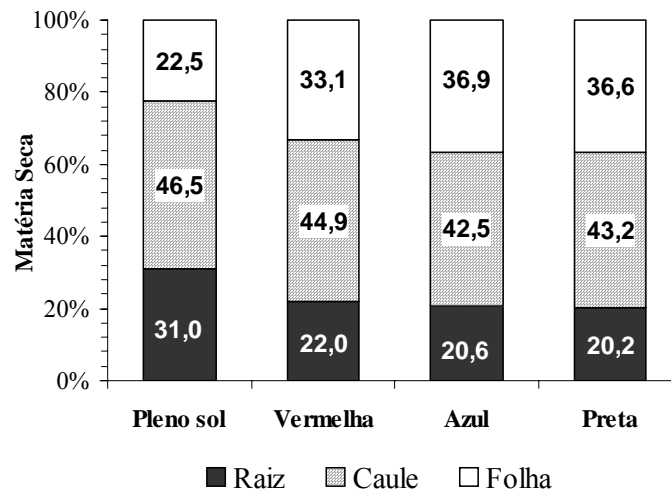


FIGURA 2: Distribuição relativa de matéria seca (g) entre os diferentes órgãos de plantas de *Catharanthus roseus* cv. Pacifica White submetidas a sombreamento sob telado com malha de diferentes cores, durante 180 dias.

Segundo Wei & Deng (1996) e Colon-Carmona et al. (2000), existe participação de genes, cujas ações mediadas por fotorreceptores modificam as relações entre reguladores de crescimento, alterando o balanço de auxinas, giberelinas e citocininas, em resposta às modificações espectrais, o que poderia modificar a distribuição de fotoassimilados.

O uso de malhas coloridas mostrou diferença significativa no conteúdo de nitrogênio foliar, em favor das malhas preta e azul, comparativamente às demais (Figura 3). O tratamento com malha vermelha determinou um maior conteúdo de nitrogênio foliar quando comparado às plantas cultivadas a pleno sol, as quais mostraram-se também com menor conteúdo de matéria seca retida em folhas dentre todos os tratamentos (Figura 1A e Figura 2).

Estes resultados concordam com o observado por Dias-Filho (1999) e Evans & Poorter (2001), que verificaram maior conteúdo de nitrogênio total em folhas de dicotiledôneas submetidas a uma menor irradiância. Pons & Van Berkel (2004) verificaram que o tratamento de seis espécies de plantas com luz vermelho-distante suplementar reduziu o conteúdo de nitrogênio por área foliar em cinco destas plantas. Os resultados aqui apresentados, em unidade de massa, podem ser atribuídos à provável menor razão V/VD da malha vermelha em relação às demais, uma vez que as plantas deste tratamento apresentaram maior área foliar que as demais.

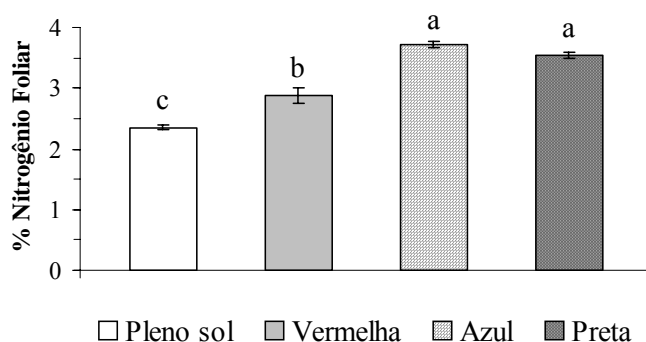


FIGURA 3: Conteúdo de nitrogênio total (g) na matéria seca de folhas de plantas de *Catharanthus roseus* cv. Pacifica White submetidas ao sombreamento sob telado com malha de diferentes cores, durante 180 dias. Linhas verticais representam o erro padrão entre as médias (n=4). Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A área foliar foi significativamente afetada pelos diferentes tipos de sombreamento, bem como pela sua ausência (Figura 4 A). As plantas sob malha

vermelha exibiram maior superfície total, seguidas daquelas sob o tratamento com malha azul. As plantas cultivadas a pleno sol tiveram uma área foliar significativamente reduzida e uma menor RAF e RPF em relação aos tratamentos de sombreamento (Figura 4 B), fato que pode ser correlacionado a uma menor matéria seca total destas plantas nestas condições.

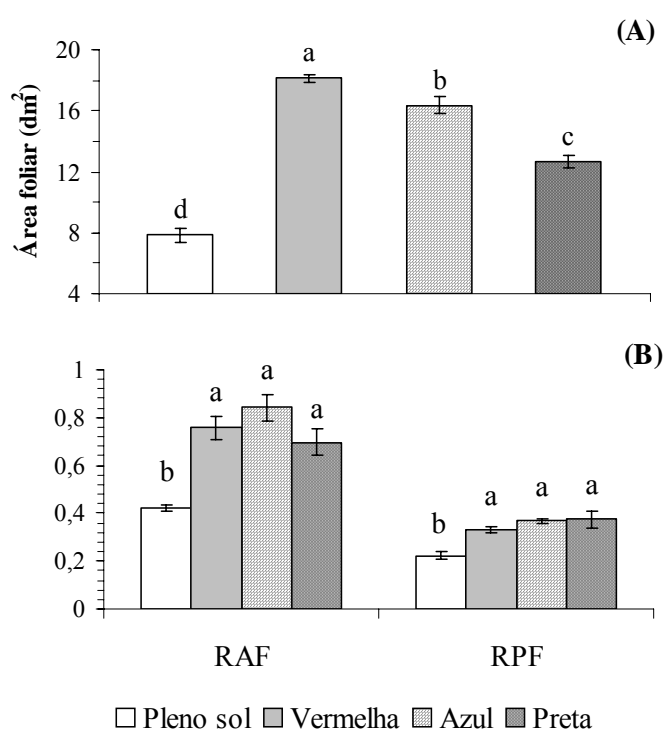


FIGURA 4: (A) Área foliar total e (B) razão de área foliar (RAF) (dm².g⁻¹) e razão de peso foliar (RPF) de plantas de *Catharanthus roseus* cv. Pacifica White submetidas ao sombreamento sob telado com malha de diferentes cores, durante 180 dias. Linhas verticais representam o erro padrão entre as médias (n = 6). Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A ocorrência de uma menor RPF e RAF, bem como uma maior relação raiz/parte aérea nas plantas a pleno sol, comparativamente àquelas sombreadas, podem estar relacionadas a uma plasticidade anatômica induzida por stress, o que poderia resultar na inadaptabilidade destas plantas a este regime luminoso.

Muitas respostas morfogênicas se devem à percepção da razão F_{vd}/F_{total} , que é reduzida na presença de radiação na região do vermelho distante (Kasperbauer & Peaslee, 1973; Smith & Whitelam, 1997). Desse modo, a razão V/VD e a taxa de fluência percebida pelas plantas constituem um sinal ecofisiológico que sinaliza acerca da proximidade entre elas e induz, em cada uma, alterações na morfologia e na alocação de assimilados (Ballaré et al., 1992).

Os teores de clorofila total não foram significativamente diferentes nas plantas sob malha azul e preta (Figura 5A), o que pode ser associado a um proporcional e maior conteúdo de carotenóides nestes tratamentos (Figura 5 B), em relação ao que utilizou malha vermelha ou a pleno sol, no qual se observou menor teor de clorofila total. Estes resultados podem ser devidos a uma provável menor relação V/VD existente no ambiente proporcionado pela malha vermelha, o que está de acordo com os resultados encontrados por Rajapakse & Kelly (1992) e McMahon & Kelly (1995), que também observaram maior conteúdo de pigmentos fotossintéticos em plantas de crisântemo crescidas sob filtro de sulfato de cobre, o qual aumenta a relação V/VD . Kasperbauer & Peaslee (1973) também observaram menor conteúdo de clorofila por unidade de área foliar em tabaco que recebeu menor relação V/VD .

Apesar de um menor teor de clorofila total encontrado nas plantas a pleno sol, este apresentou maior relação clorofila a/b que os demais tratamentos. A relação clorofila a/b foi reduzida como função da menor irradiância experimentada pelos tratamentos sob malhas. Este fenômeno é consistente com

outros trabalhos, sendo atribuído ao aumento do conteúdo de clorofila b pelo complexo de clorofilas do fotossistema II (Anderson et al., 1995).

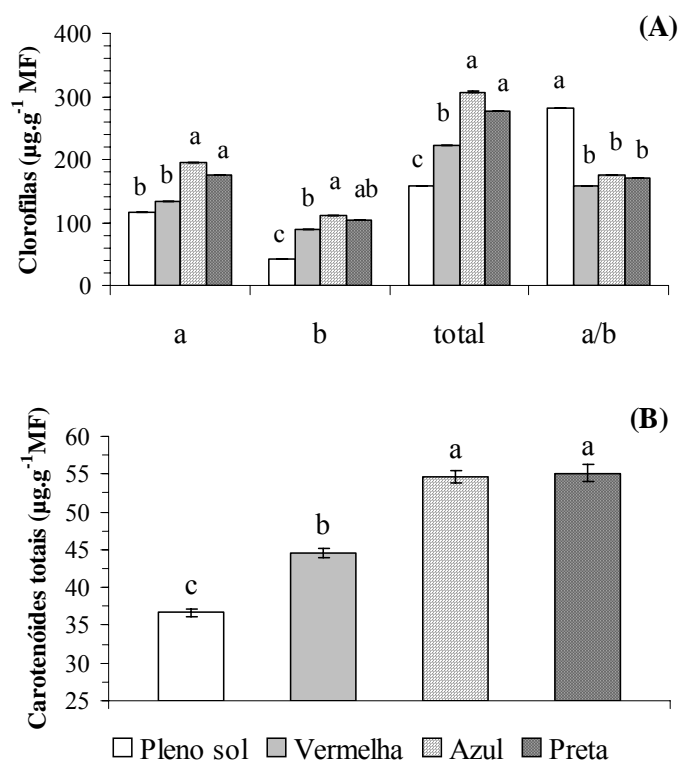


FIGURA 5: (A) Conteúdo de clorofilas e (B) carotenóides de plantas de *Catharanthus roseus* cv. Pacifica White submetidas ao sombreamento sob telado com malha de diferentes cores, durante 180 dias. Linhas verticais representam o erro padrão entre as médias (n=6). Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Estes resultados estão de acordo com os encontrados por McMahon & Kelly (1995), que cultivaram plantas de crisântemo sob filtro líquido de sulfato de cobre (que reduz a transmissão da luz vermelho-distante) e observaram maiores teores de clorofila a, clorofila b, carotenóides totais e plantas com menor porte e área foliar, em comparação ao controle ou sob filtro de tinta azul, que receberam uma relação V/VD menor.

Comparando-se estes resultados, observa-se que eles indicam uma predominância do efeito da intensidade luminosa sobre a razão V/VD ou, mesmo, da maior relação azul/vermelho proporcionada pela malha azul sobre a clorofila a/b, o que está de acordo o que foi verificado por Pons & Van Berkel (2004) em folhas de seis diferentes espécies de plantas. Estes efeitos indicam que o aparato fotossintético foi capaz de se ajustar à alteração espectral da radiação, mas não às diferentes irradiâncias impostas às plantas.

Os baixos valores observados para clorofila total, carotenóides, nitrogênio total e área foliar nas plantas cultivadas a pleno sol correlacionam-se, podendo indicar ocorrência de fotoinibição crônica nas plantas sob este regime de radiação, devido a um fluxo fotônico acima do nível de saturação para a cultivar Pacífica White. Segundo Edreva (2005), a fotoinibição pode ser provocada por irradiância excessiva e conseqüente superprodução de elétrons, o que leva à formação de espécies altamente reativas de oxigênio no PSII. Neste trabalho, parece ter havido uma falha no mecanismo fotoprotetor dos carotenóides, devido ao seu baixo conteúdo observado nas plantas a pleno sol.

A maior área foliar, em detrimento de um menor conteúdo de clorofilas e carotenóides observados para o tratamento vermelho em relação aos demais, pode ter resultado em uma maior capacidade de produção de fotoassimilados, fato que pode explicar a maior massa seca de parte aérea. Desse modo, o comportamento destas plantas parece não constituir apenas uma resposta mediada por fitocromos (evitação à sombra), mas uma complexa interação entre

percepção e sinalização entre diversos fotorreceptores, nesta condição de irradiância.

CONCLUSÕES

Plantas de *Catharanthus roseus* cv. Pacifica White se adaptam melhor a ambientes sombreados, independentemente da variação espectral, uma vez que plantas cultivadas a pleno sol mostram menor matéria seca total, com baixo teor de pigmentos foliares e sinais aparentes de fotoinibição.

O maior tamanho da parte aérea de plantas crescidas sob malha vermelha parece, a princípio, ser indicativo de uma maior capacidade de produção de alcalóides de interesse farmacológico por planta, uma vez que estes compostos são sintetizados e armazenados, preferencialmente, em folhas. Tal resultado torna necessários estudos futuros sobre o aspecto fitoquímico de plantas cultivadas nestas condições.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, J.M.; CHOW, W.S.; PARK, Y.I. The grand design of photosynthesis: acclimation of the photosynthetic apparatus to environmental cues. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v.46, n.1-2, p.129-139, Nov. 1995.

ARNON, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.24, n.1, p.1-15, Jan. 1949.

BALLARÉ, C.L. et al. Photomorphogenic processes in the agricultural environment. **Photochemistry and Photobiology**, Oxford, v.56, n.5, p.777-788, 1992.

BATSCHAUER, A. Photoreceptors of higher plants. **Planta**, Berlin, v.206, n.4, p.479-492, Oct. 1998.

BENINCASA, M.M.P. **Análise de crescimento de plantas : noções básicas**. Jaboticabal: FCAV-UNESP, 1988. 41p.

COLON-CARMONA, A. et al. Aux/IAA proteins are phosphorylated by phytochrome *in vitro*. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.124, p.1728-1738, Dec. 2000.

DIAS-FILHO, M.B. Physiological responses of two tropical weeds to shade. II Leaf gas exchange and nitrogen content. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.6, p.953-961, jun. 1999.

DUKE, S.O.; KENYON, W.H. Effects of dimethazone (FMC 57020) on chloroplast development II. Pigment synthesis and photosynthetic function in cowpea (*Vigna unguiculata* L.) primary leaves. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v.25, n.1, p.11-18, Feb. 1986.

EDREVA, A. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v.106, n.2-3, p.119-133, Apr. 2005.

EVANS, J.R.; POORTER, H. Photosynthetic acclimation of plants to growth irradiance: the relative important of specific area and nitrogen partitioning in maximizing carbon gain. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v.24, n.8, p.755-767, Aug. 2001.

FRANKLIN, K.A.; WHITELAM, G.C. Phytochromes and shade-avoidance responses in plants. **Annals of Botany**, London, v.96, n.2, p.169-175, Aug. 2005.

KASPERBAUER, M.J.; PEASLEE, D.E. Morphology and photosynthetic efficiency of tobacco leaves that receive end-of day red or far red light. **Plant Physiology**, v.52, p.440-442, 1973.

LI, S. et al. Growth responses of chrysanthemum and bell pepper transplants to photosensitive plastic films. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.84, n.3, p.215-225, June 2000.

McMAHON, M.J.; KELLY, J.W. Anatomy and pigments of chrysanthemum leaves developed under spectrally selective filters. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.64, n.3, p.203-209, Nov. 1995.

McMAHON, M.J. et al. Growth of *Dendrathermum x grandiflorum* (Ramat.) Kitamura under various spectral filters. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.116, n.6, p.950-954, 1991.

OREN-SHAMIR, M. et al. Coloured shade nets can improve the yield and quality of green decorative branches of *Pittosporum variegatum* **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Asford, v.76, n.3, p.353-361, May 2001.

PARKS, B.M.; FOLTA, K.M. SPALDING, E.P. Photocontrol of stem growth. **Current Opinion in Plant Biology**, v.4, n.5, p.436-440, Oct. 2001.

PONS, T.L.; VAN BERKEL, Y.E.M. de J. Species-specific variation in the importance of the spectral quality gradient in canopies as a signal for photosynthetic resource partitioning. **Annals of Botany**, London, v. 94, n.5, p.725-732, Nov. 2004.

RAJAPAKSE, N.C.; KELLY, J.C. Regulation of chrysanthemum growth by spectral filters. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.117, n.3, p.481-485, 1992.

RAJAPAKSE, N.C. et al. Plant height control by photosensitive filters: current status and future prospects. **Horttechnology**, v.9, n.4, p.618-624, Oct./Dec. 1999.

SANDMAN, G.; BÖGER, P. Comparison of the bleaching activity of norfluorazon and oxyfluorfen. **Weed Science**, Champaign, v.31, n.3, p.338-341, May 1983.

SHAHAK, Y. et al. ColorNets: A new approach for light manipulation in fruit trees. **Acta Horticulturae**, The Hague, v.636, p.609-616, 2004.

SMITH, H. Phytochromes and light signal perception by plants – an emerging synthesis. **Nature**, London, v.407, n.6804, p.585-591, Oct. 2000.

SMITH, H.; WHITELAM, G.C. The shade avoidance syndrome: multiple responses mediated by multiple phytochromes. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.20, p.840-844, 1997.

WEI, N.; DENG, X.W. The role of the COP/DET/FUS genes in light control of Arabidopsis seedling development. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.112, n.3, p.871-878, Nov. 1996.

ARTIGO 3:

FATORES DE AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO AFETANDO O PERFIL DE ALCALÓIDES DE PLÂNTULAS DE *Catharanthus roseus* (L.) G. DON¹

ANDERSON ADRIANO MARTINS MELO²
AMAURI ALVES DE ALVARENGA³
MÁRIO CÉSAR GUERREIRO⁴
MARAISA GONÇALVES⁵

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi avaliar as influências da luz fornecida por lâmpadas fluorescentes coloridas e da idade da planta sobre o perfil de alcalóides de duas diferentes cultivares de *Catharanthus roseus*. As plântulas foram crescidas, por 3 semanas, sob lâmpadas branca ($77 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), vermelha ($12 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) ou azul ($3 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), sendo avaliado o comprimento de seus caulículos e comparados os seus espectros de massa. Os tratamentos de luz afetaram grandemente o aspecto morfológico das plântulas. Plântulas desenvolvidas sob lâmpada vermelha mostraram maior comprimento de caulículos em comparação aos outros tratamentos de luz, aspecto prostrado e cotilédones reduzidos. As plântulas sob lâmpada azul apresentaram altura de parte aérea intermediária e aquelas sob lâmpada branca as mais baixas, porém, com maior expansão de cotilédones. O espectro de massas do extrato de plantas com 180 dias mostrou um pico da vimblastina $[\text{M}+\text{H}^+ - \text{H}_2\text{O}]$ (m/z 793), assim como seus precursores monoméricos vindolina $[\text{M}+\text{H}^+]$ (m/z 457) e catharantina $[\text{M}+\text{H}^+]$ (m/z 337). Nas plântulas, sob as condições experimentais avaliadas, a vimblastina ou qualquer outro íon com m/z maior que 550 não foram detectados. Com exceção das plântulas sob luz vermelha, nas quais se detectou um composto com dupla protonação de m/z (397) em intensidade relativa de 49%, os demais tratamentos de luz não afetaram o perfil de alcalóides desta planta,

¹ Parte da dissertação do primeiro autor

² Eng. Agr., aluno de mestrado em Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia – UFLA

³ Prof. Dr. do Departamento de Biologia – UFLA

⁴ Prof. Dr. do Departamento de Química – UFLA

⁵ MSc. Bacharel em Química, aluna de doutorado do Departamento de Química – UFLA

porém, na cultivar Victory Pure White, as intensidades relativas do alcalóide indólico vindolina foram muito menores do que os apresentados pela cultivar Pacífica White. Estes resultados preliminares sugerem que plântulas neste estágio de desenvolvimento produzem alcalóides diméricos em baixas intensidades relativas.

Termos para indexação: vindolina, catharantina, vimblastina, vinca, espectrometria de massas.

ENVIRONMENTAL AND DEVELOPMENTAL FACTORS AFFECTING ALKALOID PROFILE OF *Catharanthus roseus* (L.) G. DON SEEDLINGS

ABSTRACT: The objective of this work was to evaluate the influence of light provided by colored fluorescent lamps, and the plant age on alkaloid profile of two different *Catharanthus roseus* cultivars. Seedlings were grown for 3 weeks under white ($77 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), red ($12 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) or blue ($3 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) lamps, being evaluated its stem lengths and compared its mass spectra. Light treatments affected greatly the morphological feature of the seedlings. Seedlings developed under red lamp showed higher stem length in comparison to other light treatments, prostrated aspect and reduced cotyledons. Seedlings under blue lamp presented intermediate height of aerial part, and that under white lamp, the more short, but with higher cotyledons expansion. The mass spectra of 180 days plant extract showed a peak of vinblastine $[\text{M}+\text{H}^+ - \text{H}_2\text{O}]$ (m/z 793) as well as your monomeric precursors vindoline $[\text{M}+\text{H}^+]$ (m/z 457) and catharanthine $[\text{M}+\text{H}^+]$ (m/z 337). In the seedlings, under evaluated experimental conditions, vinblastine or any other ion with m/z higher than 550 were detected. Except the plants under the red lamp, where was detected a double protonated compound of m/z 397 in relative intensity of 50%, the other light treatments don't affected the alkaloid profile of this plant, however, in the cultivar Victory Pure White, the relative intensities of indole alkaloid vindoline were very lower than that presented by the cultivar Pacifica White. These preliminary results suggest that seedlings in such developmental stage produce dimeric alkaloids in low relative intensities.

Index terms: vindoline, catharanthine, vinblastine, periwinkle, mass spectrometry.

INTRODUÇÃO

A vinca (*Catharanthus roseus* - Apocynaceae) é uma planta de porte subarborescente, de fácil cultivo, sendo utilizada como ornamental e para a produção de metabólitos secundários, os alcalóides. Estes compostos, em geral, podem ser definidos como bases estruturalmente complexas, que contêm nitrogênio e são formados em plantas e fungos. Adicionalmente, os alcalóides da vinca compreendem uma variedade de importantes drogas naturais, com freqüente aplicação experimental e terapêutica (De Carolis & De Luca, 1993).

A biossíntese de alcalóides indólicos em *Catharanthus roseus* tem origem na rota do chiquimato, da qual deriva a triptamina (Figura 1). A triptamina é condensada com o secoiridóide secologanina (derivado da rota dos terpenóides), por meio da enzima strictosidina sintase (STR1), para produzir o intermediário central strictosidina, que dá origem a diversos alcalóides indólicos monoterpênicos por meio de rearranjos intramoleculares da sua metade terpenóide (Vázquez-Flota et al., 1997; St-Pierre et al., 1999). Entre estes, a vindolina é o alcalóide monomérico com maior riqueza de estudos acerca de sua rota biossintética (Croteau et al., 2000; Facchini, 2001).

A vindolina (MM=456,538 g.mol⁻¹), juntamente com o monômero catharantina (MM = 336,433 g.mol⁻¹), é o precursor imediato do alcalóide bis-indólico vimblastina (MM = 810,986 g.mol⁻¹), o qual é produzido a partir de múltiplas reações de acoplamento enzimático (por uma enzima peroxidásica específica) e também não enzimático, em condições biomiméticas (acoplamento *in vitro*), entre estes monômeros (Sottomayor et al., 1998).

importante atividade citotóxica por alterarem a dinâmica de microtúbulos na metáfase mitótica, impedindo a divisão celular (Jordan, 2002).

Devido ao baixo conteúdo de vimblastina e vincristina naturalmente produzido na planta (são necessários cerca de 500 kg de matéria seca para isolar 1g de vimblastina) e ao grande número de alcalóides presentes, o isolamento destes compostos é laborioso e caro (Hirata et al., 1993; Van der Heijden et al., 2004). Assim, muitos esforços têm sido direcionados para produzi-los por processos biotecnológicos. Alguns trabalhos têm sido bem sucedidos na produção de linhas de células que acumulam altas quantidades dos alcalóides indólicos monoterpênicos catharantina e tabersonina (Misawa et al., 1988; Hirata et al., 1987). Apesar disso, a técnica de cultura de células ainda não produz linhas que acumulem monômeros de vindolina (Aerts & De Luca, 1992), devido à distribuição tecido-específica de enzimas envolvidas nos últimos estágios da biossíntese deste monômero e à distribuição contrastante da maior parte do restante da rota (De Luca et al., 1986; Facchini, 2001).

A síntese química destes compostos naturais altamente complexos não é simples ou economicamente viável, tornando as plantas a única fonte de moléculas bioativas comerciais (Van der Heijden et al., 2004; Pasquali et al., 2006).

A biossíntese e o acúmulo de alcalóides em *Catharanthus roseus* são processos estritamente regulados por fatores como a idade de planta (De Luca et al., 1986; De Luca et al., 1988) e outros relacionados ao ambiente (Aerts & De Luca, 1992).

De acordo com Robinson (1974), os alcalóides encontram-se em estado dinâmico nas plantas, variando suas concentrações na planta de acordo com o estágio de desenvolvimento. Em *Catharanthus roseus*, a quantidade de alcalóides presentes no tecido cresce, a partir da germinação, durante 3 semanas, reduzindo drasticamente a sua concentração e aumentando novamente após 60

dias. Desde a germinação, intermediários da biossíntese de vindolina de elevada complexidade são acumulados conforme se processa o desenvolvimento da planta (De Luca et al., 1986).

O efeito da luz sobre a atividade de enzimas chave na biossíntese de vindolina tem sido bastante estudado em *Catharanthus roseus*. O fitocromo está claramente envolvido na ativação da biossíntese de vindolina pela luz (De Luca et al., 1988; Aerts & De Luca, 1992).

Vázquez-Flota & De Luca (1998), ao exporem plântulas estioladas de 7 dias à luz branca, observaram que a atividade da enzima D4H (desacetoxivindolina-4-hidroxilase - penúltima enzima-chave acometida à síntese de vindolina) aumentou aproximadamente 10 vezes e verificaram, logo após, uma queda nesta atividade quando plântulas foram retornadas ao escuro. De acordo com Aerts & De Luca (1992) e Vázquez-Flota & De Luca (1998), a indução da expressão das enzimas D4H e DAT (desacetilvindolina *o*-acetiltransferase – última enzima da biossíntese de vindolina) pela luz é aparentemente mediada pelo fitocromo, uma vez que um pulso de luz vermelha (660 nm) é suficiente para ativar ambas as enzimas em cotilédones de plântulas de *C. roseus* e subsequente exposição à luz vermelho-distante (710 nm) é capaz de reverter estes efeitos.

Hirata et al. (1993) avaliaram o efeito de diferentes comprimentos de onda sobre o acoplamento não-enzimático de vindolina e catharantina e observaram que houve somente a formação de uma quantidade significativa de anidrovimblastina (produto instável e imediato do acoplamento) quando os segmentos foliares foram irradiados com luz próxima ao ultravioleta (com pico de 370 nm). Além disso, a produção de dímeros (vimblastina e leurosina) foi notavelmente estimulada, sendo os níveis de seus precursores grandemente reduzidos.

Este trabalho objetivou obter noções preliminares acerca do perfil de alcalóides indólicos em plantas *Catharanthus roseus* das cultivares Pacífica White e Victory Pure White, influenciado pelo ambiente de crescimento (alterado pela luz fornecida por lâmpadas fluorescentes de cores branca, azul e vermelha) e pela idade da planta.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas sementes das cultivares Pacífica White e Victory Pure White, as quais foram tratadas previamente com $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido giberélico (GA_3), no escuro, durante 24 horas, desinfestadas com $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ de cercobin[®] por 15 minutos, secas em papel mata-borrão e colocadas para germinar em caixas tipo Gerbox[®] durante 3 dias. Logo após a germinação (considerada quando houve a protrusão de 2 mm de radícula), as sementes foram semeadas em bandejas contendo o substrato Plantmax[®] autoclavado na profundidade de 1 cm. As bandejas foram dispostas sob caixas de madeira cobertas com plástico preto de 32cm de altura x 34cm de largura x 72cm de comprimento. No interior destas caixas, foram instaladas lâmpadas comerciais de cor vermelha e azul, de 20W, a uma altura de 15 cm do substrato.

O tratamento de luz branca foi feito em sala de crescimento. A irradiância das fontes foi medida com uso de um quantômetro acoplado ao porômetro Li-1600 (LI-COR) na altura das plântulas, sendo de $77 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ para a luz branca, $12 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ para a luz vermelha e $3 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ para o tratamento que continha luz azul. Após 21 dias nestas condições, as plântulas tiveram medido o comprimento de seus caulículos, excisadas suas radículas e foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para análises de espectrometria de massas. Os valores de comprimento de 50 caulículos por

tratamento foram submetidos à análise de variância e as médias, quando significativas, ao teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A extração das amostras seguiu a metodologia descrita por Chu et al. (1997), com algumas modificações: aproximadamente 0,6g de folhas frescas obtidas de plantas cultivadas por 180 dias sob malha preta com 50% de sombreamento ou 0,6g de plântulas nas supracitadas condições foram pesadas dentro de erlenmeyers. Para a extração, adicionaram-se 4 mL de isopropanol, levando-se as amostras para agitação por 15 minutos. Os extratos foram filtrados em filtros de 45 µm para dentro de tubos tipo “falcon”, sendo, em seguida, secos em fluxo de nitrogênio gasoso e imediatamente reconstituídos em 1 mL de ácido acético 0,01M. As soluções ácidas foram particionadas 6 vezes com 1 mL de ciclohexano, sendo a epifase descartada. A solução ácida foi novamente seca em fluxo de nitrogênio e reconstituída em 1 mL de ácido acético 0,01M.

Os extratos foram analisados por espectrômetro de massas LC/MS Trap (Agilent-1100). As amostras foram inseridas no aparelho por infusão com um fluxo de 1,2 µL/min, com controle de carga no quadrupolo (ICC) ajustado para 30.000. A temperatura do gás de secagem (N₂) foi de 200°C e fluxo de 6,0 L.min⁻¹, com potencial de extração de íons de - 4500 V (modo positivo) e 100% de estabilidade dos compostos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observado efeito significativo entre os fatores cultivar e tratamento de luz, bem como da interação destes sobre o comprimento dos caulículos de plântulas de *Catharanthus roseus*. O emprego das lâmpadas comerciais coloridas determinou alterações marcantes no desenvolvimento dos caulículos durante os 21 dias de exposição aos tratamentos (Figura 2). As plântulas sob lâmpada vermelha apresentaram maior comprimento de caulículos em relação

aos demais, independente da cultivar testada. A cultivar Victory mostrou maior tamanho de caulículos em todos os regimes de radiação a que foi submetida.

As plântulas sob luz branca mostraram menor comprimento de caulículos (Figura 2) e, visualmente, uma maior expansão de cotilédones (Figura 3).

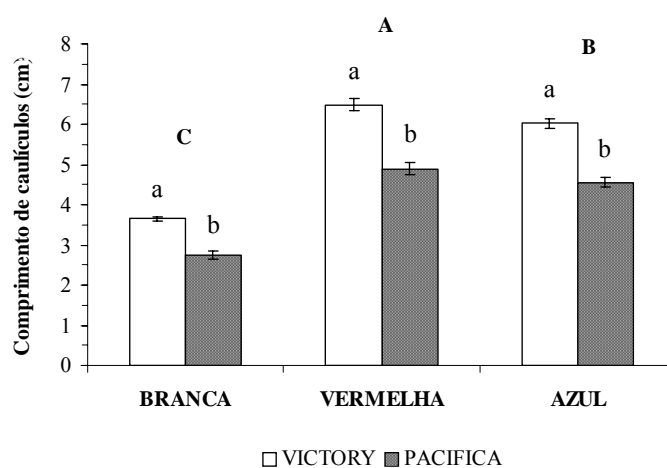


FIGURA 2: Comprimento médio de caulículos de plântulas de *Catharanthus roseus* das cultivares Pacifica White e Victory Pure White submetidas a regimes luminosos sob lâmpadas de diferentes cores, durante 21 dias. Linhas verticais representam o erro padrão entre as médias (n=50). Letras iguais (minúsculas entre cultivares, maiúsculas entre regimes luminosos) não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

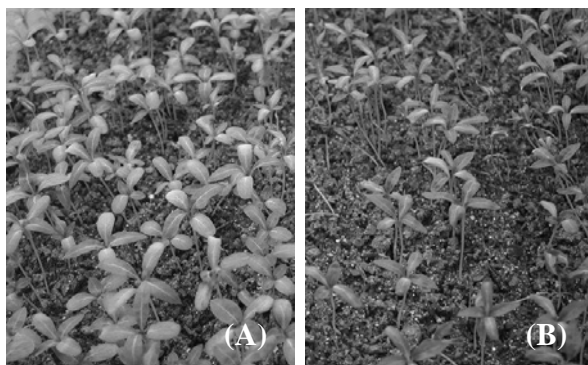


FIGURA 3: Aspecto morfológico de plântulas de *Catharanthus roseus* das cultivares (A) Pacifica White e (B) Victory Pure White, com 21 dias, crescidas em ambiente com lâmpadas fluorescentes de cor branca.

As plântulas sob luz azul mostraram crescimento direcionado à fonte luminosa (fototropismo positivo), sobretudo nos primeiros 7 dias, o que evidencia a existência de comprimentos de onda na região do azul (Figura 4).

Apesar disso, um maior comprimento de caulículos neste tratamento foi observado comparativamente às plantas sob luz branca, o que pode indicar a participação de outros comprimentos de onda que não o azul, a despeito da baixa irradiância a que essas plantas foram submetidas.

Plântulas sob lâmpada vermelha apresentaram aspectos morfológicos evidentes de uma síndrome de evitação à sombra, com hábito de crescimento prostrado, caules compridos e cotilédones hiponásticos e visualmente reduzidos e em relação aos demais tratamentos (Figura 5).

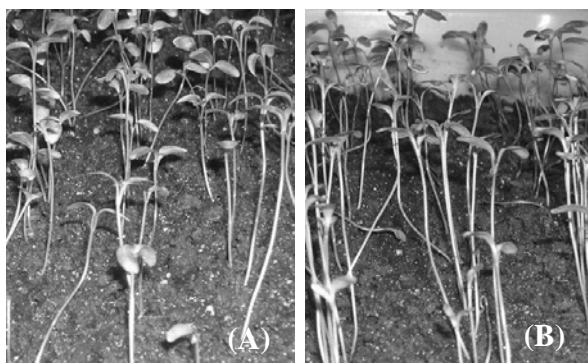


FIGURA 4: Aspecto morfológico de plântulas de *Catharanthus roseus* das cultivares (A) Pacifica White e (B) Victory Pure White, com 21 dias, crescidas em ambiente com lâmpadas fluorescentes de cor azul.

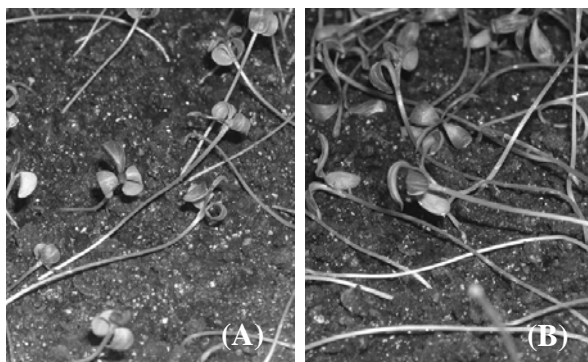


FIGURA 5: Aspecto morfológico de plântulas de *Catharanthus roseus* das cultivares (A) Pacifica White e (B) Victory Pure White, com 21 dias, crescidas em ambiente com lâmpadas fluorescentes de cor vermelha.

Este comportamento das plântulas sob a lâmpada vermelha pode ser explicado pela existência de um ambiente mais rico em comprimentos de onda na região do vermelho-distante, provavelmente proporcionado pela lâmpada

vermelha, o que reduz a relação V/VD recebida pelas plantas. Segundo Franklin & Whitelam (2005), em resposta aos sinais de baixa relação V/VD, muitas plantas mostram um rápido e pronunciado aumento na taxa de alongação, freqüentemente às expensas do desenvolvimento de folhas e órgãos de armazenamento.

A avaliação dos extratos por espectrometria de massas revelou diferenças entre os tratamentos utilizados com relação ao perfil de alcalóides em cada condição de radiação imposta e também no perfil de alcalóides de plantas comparativamente às plântulas.

O espectro de folhas de plantas mostrou a existência de uma molécula protonada com uma relação massa/carga (m/z) de 793 em uma intensidade relativa de 29% (Figura 6).

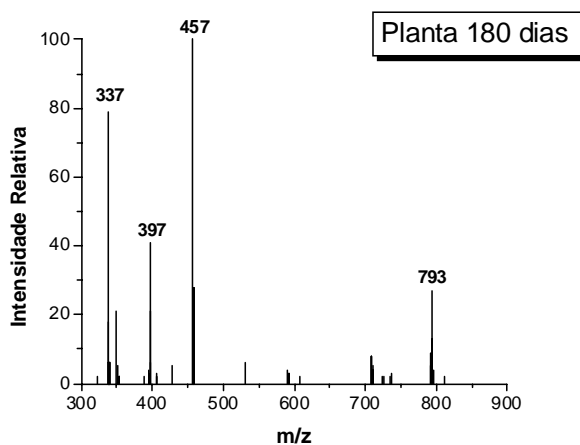


FIGURA 6: Espectro de massas (Electrospray) do extrato de folhas de plantas de *Catharanthus roseus* cultivadas a 50% de sombreamento, por 180 dias. O íon de m/z 397 é uma molécula duplamente carregada.

Segundo Chu et al. (1997) e Dennison et al. (2006), este íon corresponde, provavelmente, a um fragmento do íon molecular parental de

vimblastina (m/z 811), devido à perda de uma molécula de H₂O. Dennison et al. (2006) atribuem essa perda de água na fonte de íons do espectrômetro à formação de um composto intermediário altamente reativo (aminol), que poderia perder água rapidamente e fornecer o produto iônico de m/z 793.

Neste espectro, o composto dominante de m/z 457 corresponde ao monômero vindolina, enquanto o segundo composto, com intensidade de 77% em relação ao primeiro, refere-se à catharantina (m/z 337), segundo Rischer et al. (2006), o que concorda com o observado por Hirata et al. (1987), que verificaram a produção de tais alcalóides em cultura de caules.

As plântulas submetidas ao tratamento com lâmpada branca fluorescente mostraram um espectro semelhante para ambas as cultivares avaliadas (Figura 7). No entanto, a cultivar Pacifica White mostrou um pico dominante de vindolina (m/z 457), composto também presente na outra cultivar, porém, numa intensidade relativa de apenas 11% em relação ao seu composto dominante, de m/z 427. Em ambas as cultivares, também foi detectado o produto iônico catharantina, mas não foi detectada a presença de dímeros.

Em todos os espectros, tanto de plântulas quanto de plantas, foi detectado um composto de m/z 397, com dupla protonação, que, possivelmente, corresponde ao produto dimérico vindolina [M+H⁺ - H₂O] (m/z 793), contudo, em intensidades relativas muito baixas, não sobressaindo ao ruído.

A lâmpada vermelha influenciou o padrão de alcalóides nas plântulas, a despeito de sua morfologia extremamente distinta das demais. Em ambas foram detectados precursores, porém, em intensidades diferentes para cada cultivar (Figura 8). No entanto, no espectro da cultivar Pacifica White, observou-se a presença do composto dimérico (m/z 397) em uma intensidade de 49% em relação ao produto dominante.

O espectro de massas plântulas de *Catharanthus roseus* submetidas ao tratamento sob lâmpada azul (Figura 9) evidenciou um composto de m/z 471

como produto iônico dominante para as plântulas de ambas as cultivares, o que, segundo Dennison et al. (2006), representa um segmento protonado de N-formilvindolina.

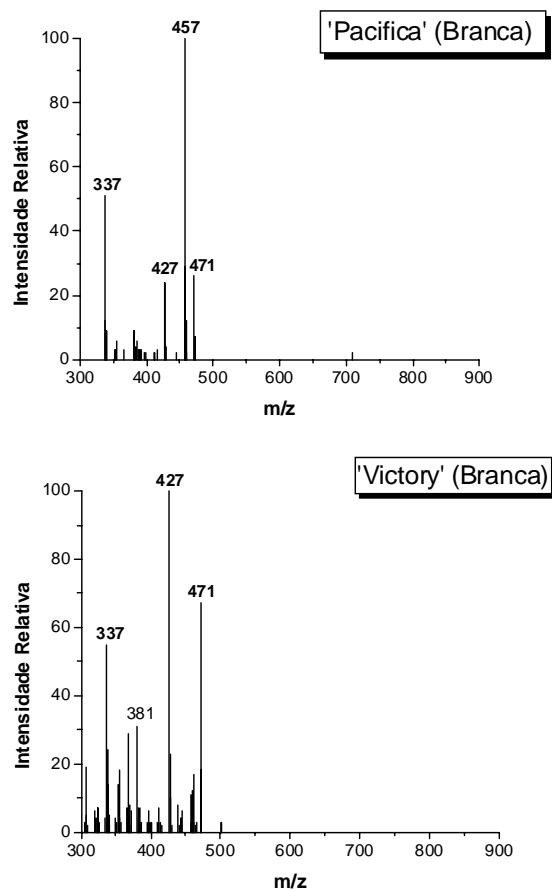


FIGURA 7: Espectro de massas (Electrospray) do extrato de plântulas de *Catharanthus roseus* das cultivares (A) Pacifica White e (B) Victory Pure White crescidas em ambiente com lâmpadas fluorescentes de cor branca, por 21 dias.

Nas duas cultivares, os precursores (vindolina e catharantina) estavam presentes, porém, o composto m/z 457 encontrava-se em intensidade muito baixa na cultivar Victory Pure White. Nestes espectros também foi detectado um íon de m/z 427, que corresponde ao produto iônico do composto de massa molecular 426,511 (cathovalina ou vindolidina), segundo Van der Heijden et al. (2004).

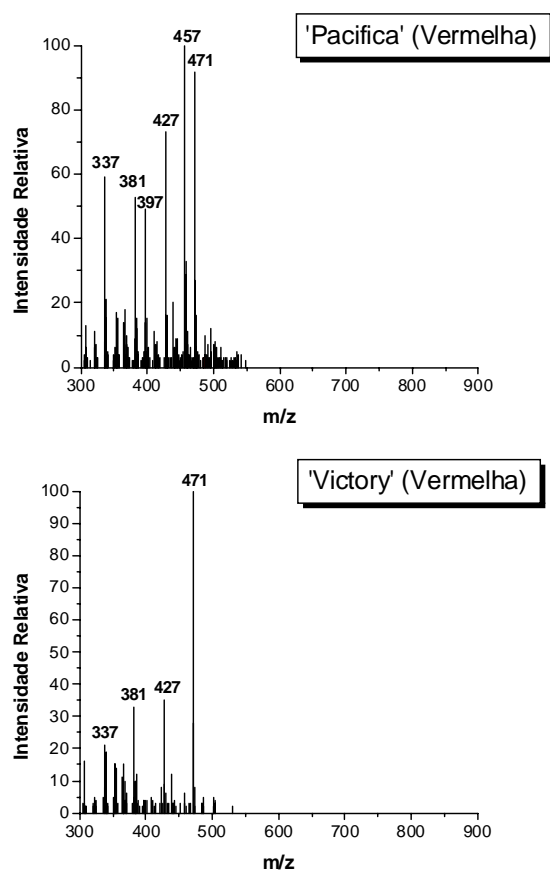


FIGURA 8: Espectro de massas (Electrospray) do extrato de plântulas de *Catharanthus roseus* das cultivares (A) Pacifica White e (B) Victory Pure White crescidas em ambiente com lâmpadas fluorescentes de cor vermelha, por 21 dias.

A presença dos monômeros precursores e do fator ambiental (luz) não parece ser suficiente para induzir a formação dos dímeros em plântulas de vinca com 21 dias. Se esta reação ocorre, provavelmente, se dá em proporções bastante pequenas, visto que o aparelho não foi capaz de detectá-la.

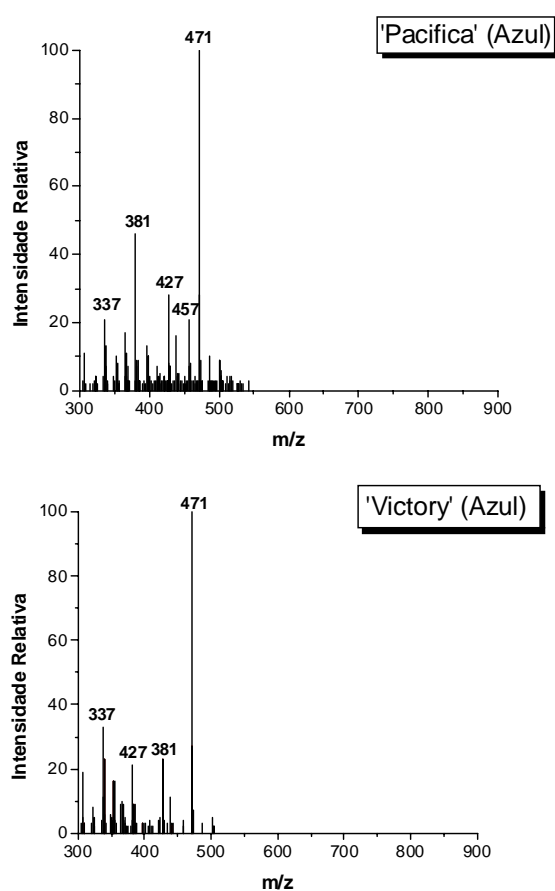


FIGURA 9: Espectro de massas (Electrospray) do extrato de plântulas de *Catharanthus roseus* das cultivares (A) Pacifica White e (B) Victory Pure White crescidas em ambiente com lâmpadas fluorescentes de cor azul, por 21 dias.

Este resultado sugere que deve haver um controle mais estrito do fator desenvolvimento da planta sobre este tipo de reação, em comparação ao ambiente de cultivo.

Hirata et al. (1993) observaram que plântulas pré-cultivadas por 6 semanas, sob um conjunto de lâmpadas fluorescentes vermelha (660 nm) e azul (480) nm), responderam a uma subsequente exposição à luz de 370 nm de pico, com expressivo acoplamento enzimático *in vitro*, formando dímeros. Estes autores sugerem que a radiação próxima ao ultravioleta é necessária para a oxidação da catharantina e subsequente formação de 3',4'-anidrovimblastina. Os resultados aqui apresentados sugerem que as lâmpadas azul e branca empregadas não foram eficazes em promover o acoplamento de monômeros *in vivo*. Porém, apesar de baixa intensidade, foi detectada a presença do produto dimérico nas plântulas sob luz vermelha.

Os resultados aqui observados mostram que há um efeito proeminente do fator de desenvolvimento, o que está de acordo com o observado por De Luca et al. (1988), para esta espécie. No entanto, estes autores avaliaram atividades de enzimas-chave apenas até a produção de vindolina durante os primeiros 10 dias de desenvolvimento da plântula. Parece haver também um efeito do fator cultivar, uma vez as plântulas do grupo 'Victory' mostraram a presença de vindolina, porém, em intensidade muito baixa comparativamente à cultivar do grupo Pacífica.

CONCLUSÕES

A análise por espectrometria de massas dos extratos plântulas de *Catharanthus roseus* 'Pacífica White' e 'Victory Pure White' com 21 dias não mostra intensidades significativas de alcalóides diméricos (vincristina e

vimblastina), a despeito da presença dos precursores vindolina e catharantina, em nenhum dos tratamentos de luz empregados, com exceção do tratamento sob luz vermelha, em que foi possível detectar a presença de dímero em intensidade relativa de 50%. No entanto, extratos de plantas desta espécie, da cultivar Pacifica White, com 180 dias, exibem tanto precursores quanto os compostos diméricos em altas intensidades.

O perfil de alcalóides em plântulas de *Catharanthus roseus* parece ser alterado pela cultivar, pois, somente na cultivar Pacifica White, a vindolina foi detectada nas condições estudadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AERTS, R.; DE LUCA, V. Phytochrome is involved in the light-regulation of vindoline biosynthesis in *Catharanthus roseus*. **Plant Physiology**, v.100, n.2, p.1029-1032, Oct. 1992.

CHU, I.H. et al. Determination of vincristine and vinblastine in *Catharanthus roseus* plants by high performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, New York, v.20, n.8, p.1159-1174, 1997.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N.G. Natural Products (Secondary Metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. Chap. 24, p.1250-1318.

DE CAROLIS, E.; DE LUCA, V. Purification, characterization, and kinetic analysis of a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase involved in vindoline biosynthesis from *Catharanthus roseus*. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.268, n.8, p.5504-5511, Mar. 1993.

DE LUCA, V. et al. Biosynthesis of indole alkaloids: developmental regulation of the biosynthetic pathway from tabersonine to vindoline in *Catharanthus roseus*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.125, p.147-156, 1986.

DE LUCA, V. et al. Developmental regulation of enzymes of indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.86, n.2, p.447-50, Feb. 1988.

DENNISON, J.B. et al. Selective metabolism of vincristine in vitro by CYP3A5. **Drug Metabolism and Disposition**, Baltimore, v.34, n.8, p.1317-1327, Aug. 2006.

FACCHINI, P.J. Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.52, p.29-66, June 2001.

FRANKLIN, K.A.; WHITELAM, G.C. Phytochromes and shade-avoidance responses in plants. **Annals of Botany**, London, v.96, n.2, p.169-175, Aug. 2005.

JOHNSON, I.S. et al. Antitumor principles derived from *Vinca rosea* Linn I. Vincalukoblastine and leurosine. **Cancer Research**, v.20, p.1016-1022, 1960.

JORDAN, M.A. Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. **Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents**, Schiphol, v.2, n.1, p.1-17, Jan. 2002.

HIRATA, K. et al. Production of indole alkaloids in multiple shoot culture of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v.51, n.5, p.1311-1317, 1987.

HIRATA, K. et al. Effects of near- ultraviolet light on alkaloid production in *Catharanthus roseus* plant. **Planta Medica**, Stuttgart, v.59, n.1, p.46-50, 1993.

MISAWA, M. et al. Synthesis of dimeric indole alkaloids by cell free extracts from cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. **Phytochemistry**, Amsterdam, v.27, n.5, p.1355-1359, May 1988.

PASQUALI, G.; PORTO, D.D.; FETT-NETO, A.G. Metabolic engineering of cell cultures versus whole plant complexity in production of bioactive monoterpene indole alkaloids: recent progress related to old dilemma. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v.101, n.4, p.287-296, Apr. 2006.

RISCHER, H. et al. Gene to metabolite networks for terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.103, n.14, p.5614-5619, Apr. 2006.

ROBINSON, T. Metabolism and function of alkaloids in plants. **Science**, Massachusetts, v.184, n.4135, p.430-435, Apr. 1974.

SOTTOMAYOR, M. et al. Purification and characterization of α -3',4'-anhydrovinblastine synthase (peroxidase-like) from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **FEBS Letters**, v.428, p.299-303, 1998.

ST-PIERRE, B.; VÁZQUEZ-FLOTA, F.; DE LUCA, V. Multicellular compartmentation of *Catharanthus roseus* alkaloid biosynthesis predicts intercellular translocation of a pathway intermediate. **The Plant Cell**, Rockville, v.11, n. 5, p.887-900, May 1999.

VAN DER HEIJDEN, R. et al. The *Catharanthus* alkaloids: pharmacognosy and biotechnology. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v.11, n.5, p.607-628, Mar. 2004.

VÁZQUEZ-FLOTA, F.A. et al. Molecular cloning and characterization of desacetoxyvindoline-4-hydroxylase, a 2-oxoglutarate dependent-dioxygenase involved in the biosynthesis of vindoline in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.34, n.6, p.935-948, Aug. 1997.

VÁZQUEZ-FLOTA, F.A.; DE LUCA, V. Developmental and light regulation of desacetoxyvindoline 4-hydroxylase in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.117, n.4, p.1351-1361, Aug. 1998.