

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Centro de Biotecnologia

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**Metabolismo do Alcalóide Braquicerina de *Psychotria brachyceras*
em Resposta a Hormônios Vegetais e Precusores Indólicos**

Paloma Koprovski Menguer

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Arthur Germano Fett Neto

Porto Alegre, março de 2008

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de Botânica e Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Agradecimentos

À minha família amada, que com todos os seus defeitos e qualidades, conseguiu sempre me dar amor e incentivo em todos os momentos da minha vida. Obrigada pelos exemplos de caráter e responsabilidade que tanto contribuíram para a formação dos meus valores.

Ao meu querido orientador Arthur Germano Fett-Neto pela confiança no meu trabalho, orientação maravilhosa e pelo exemplo de pesquisador ético, honesto e dedicado.

À professora Janette Palma Fett, pela revisão da dissertação e pelas inúmeras ajudas na vida acadêmica.

À minha irmã do coração, Naíla, pelo companheirismo e amor em todos esses anos de amizade. Não tenho palavras pra te agradecer toda ajuda e carinho dedicado. Te amo!

À Vare, pela amizade mágica que não se acaba mesmo de tão longe. A saudade tá grande demais e o orgulho de ti também. Te amo!

Aos amigos e colegas Guilherme, Raul, Tatiana e Livia pelo apoio e ajuda no mundo molecular e na vida.

Aos amigos e colegas Felipe e Carol por serem os melhores exemplos de competência/diversão.

Ao amigo e colega Diogo, pela valiosa ajuda nas gambiarras, índices e discussões científicas.

À amiga e colega Juli, sempre tão disposta a ajudar em tudo com seu jeito doce e meigo.

À grande família do Lab de Fisiologia Vegetal, pela amizade e pelas longas divagações e brincadeiras nas conversas no mesão.

À amiga Tati Gregianini pela acolhedora introdução ao maravilhoso mundo das *Psychotrias*.

À professora Amélia T. Henriques da Faculdade de Farmácia da UFRGS pelo empréstimo do HPLC.

Aos apoios financeiros da CAPES e CNPq que tornaram possível a realização desse trabalho.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	1
INTRODUÇÃO.....	4
Metabolismo secundário.....	4
Hormônios vegetais e seus efeitos na regulação da biossíntese e acúmulo de alcaloides.....	9
Precusores da rota de biossíntese dos alcaloides e seus efeitos no acúmulo destes.....	15
O gênero <i>Psychotria</i>	17
<i>Psychotria brachyceras</i>	19
OBJETIVOS.....	22
ARTIGO: “Production of the bioactive alkaloid brachycerine by <i>Psychotria brachyceras</i> ; role of phytohormones and indole precursor feeding”.....	23
ABSTRACT.....	25
INTRODUCTION.....	26
MATERIAL AND METHODS.....	28
RESULTS AND DISCUSSION.....	31
CONCLUSIONS.....	36
ACKNOWLEDGMENTS.....	37
LEGEND OF FIGURES.....	41
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	47
REFERÊNCIAS.....	49

Lista de Abreviaturas e Símbolos

AIA: ácido indol acético

AIB: ácido indol butírico

ACC: 1-amoniciclopropano-1-carboxílico

APX: enzima ascorbato peroxidase

BAP: benzilaminopurina

°C: grau(s) Celsius

dat: gene que codifica a enzima deacetilvindolina acetiltransferase

DMAPP: dimetilalil difosfato

DNA: do inglês ‘Deoxyribonucleic Acid’

2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético

d4h: gene que codifica a enzima desacetoxivindolina 4-hidroxilase

DXP: 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato

Et: do inglês etileno

Ethrel: do inglês ‘2-chloroethylphosphonic acid’

g: grama(s)

h: hora(s)

HPLC: do inglês ‘High Performance Liquid Chromatography’

IAA: do inglês ‘indole 3-acetic acid’

IBA: do inglês ‘indole 3-butyric acid’

IPP: isopentenil difosfato

IPT: enzima fosfato isopentenil transferase

L: litro(s)

m: metro(s)

M: molar

1-MCP: do inglês ‘1-methylcyclopropene’

mg: miligrama(s)

MIAs: do inglês ‘monoterpene indole alkaloids’

min: minuto(s)

mL: mililitro(s)

mm: milímetro(s)
mM: milimolar
 μ M: micromolar
mRNA: do inglês 'messenger ribonucleic acid'
MS: solução de sais Murashige & Skoog
NAA: do inglês 'naphthaleneacetic acid'
nm: nanômetro
 $^1\text{O}_2$: oxigênio singleto
OH•: radical hidroxila
ORF: do inglês 'ribonucleic acid'
ROS: do inglês 'reactive oxygen species'
SAM: S-adenosilmetionina
SOD: enzima peróxido dismutase
STR: enzima estriectosidina sintase
str: gene que codifica a enzima estriectosidina sintase
TDC: enzima triptofano descarboxilase
tdc: gene que codifica a enzima triptofano descarboxilase
TIAs: do inglês 'terpene indole alkaloids'
Trp: do inglês 'tryptophan'
UV: radiação ultravioleta
W/V: do inglês 'weight/volume'
ZEA: do inglês 'zeatin'

INTRODUÇÃO

Metabolismo secundário

Devido à sua condição sésil, as plantas precisaram desenvolver estratégias para melhor desempenhar suas funções ecológicas como, por exemplo, a produção de metabólitos secundários. Metabólitos secundários são considerados substâncias de ocorrência natural não ubíqua e que não são vitais às células que as produzem, mas contribuem à aptidão geral do organismo, exercendo primariamente funções ecológicas (CROTEAU *et al.*, 2000). O acúmulo desses metabólitos geralmente ocorre em plantas que são expostas a algum tipo de estresse incluindo vários elicitores e moléculas sinais, sendo fontes únicas para a indústria farmacêutica, aditivos alimentares, flavorizantes e outros. (ZHAO *et al.*, 2005).

Diferentes classes de metabólitos secundários estão presentes em todas as espécies de plantas superiores, apresentando uma alta diversidade estrutural. Alguns grupos destes compostos são dominantes dentro de certo táxon e, dentro de uma mesma planta, o padrão de distribuição dos metabólitos secundários é complexo, variando entre os diferentes órgãos e tecidos, estádios de desenvolvimento, entre indivíduos e entre populações (WINK, 2003).

Esses metabólitos são representados pelos alcalóides, terpenóides, compostos fenólicos, glicosinolatos, glicosídeos cianogênicos e aminoácidos não protéicos, entre outros. Muitos destes têm funções biológicas conhecidas como pigmentos e aromas

envolvidos na atração de animais polinizadores e dispersores, feromônios, aleloquímicos, ou como agentes antinutricionais e antimicrobianos (ROBERTS & WINK, 1998). Podem ser produzidos em resposta a estresses ambientais como ataque patogênico, dano mecânico e radiação ultravioleta (UV), atuando em mecanismos de defesa (FACCHINI, 2001; RAMACHANDRA RAO & RAVISHANKAR, 2002). Estas funções ecológicas afetam profundamente a sobrevivência da planta no ambiente, levando a reconsiderar o papel não essencial destes metabólitos secundários (BUCHANAN *et al.*, 2000). Os metabólitos primários, em contraste, tais como fitoesteróis, acil lipídeos, nucleotídeos, aminoácidos e ácidos orgânicos, são encontrados em todas as plantas e realizam papéis metabólicos que são essenciais e geralmente evidentes (BUCHANAN *et al.*, 2000).

Muitos metabólitos secundários representam considerável valor econômico e são extensivamente utilizados em medicamentos pela indústria farmacêutica, em alimentos na forma de flavorizantes, fragrâncias em cosméticos ou, ainda, como inseticidas, fungicidas, antivirais e herbicidas na agricultura. A enorme biodiversidade vegetal do Brasil coloca o país em posição estratégica para desenvolver a exploração racional e sustentada de novos compostos de valor terapêutico. Do total estimado de 400.000 espécies de plantas superiores do mundo, somente cerca de 10 % foram caracterizadas quimicamente em algum nível e dos aproximadamente 100.000 metabólitos secundários que foram descobertos, somente a metade foi estruturalmente caracterizada (OKSMAN-CALDENTEY & INZÉ 2004).

Aproximadamente, cerca de 25 % dos medicamentos de uso terapêutico são derivados de plantas e muitos outros são utilizados como compostos puros ou como chás e extratos. Além disso, constituintes de plantas têm também servido como modelos

para drogas modernas, como a atropina para tropicamida, quinino para cloroquina e a cocaína para a procaína e tetracaína (KUTCHAN, 1995).

Alcalóides

Dentre os vários compostos com atividades terapêuticas derivados de plantas, os alcalóides constituem um dos maiores grupos de metabólitos secundários com cerca de 16.000 estruturas já descritas até o momento (MEMELINK *et al.*, 2001). O termo ‘alcalóide’ deriva da palavra árabe *al-quali*, nome vulgar da planta da qual a soda foi obtida originalmente. Essas moléculas são representadas por compostos orgânicos com baixo peso molecular e caráter básico, formando uma estrutura heterocíclica com a presença de nitrogênio (KUTCHAN, 1995).

Exemplos de alcalóides utilizados na indústria farmacêutica incluem o analgésico morfina, o analgésico e antitussivo codeína (ambos de *Papaver somniferum*), o antimalárico quinina (de *Cinchona officinalis*), o relaxante muscular (+)-tubocurarina (de *Chondodendrum tomentosum*), o antibiótico sanguinarina (de *Eschsholtzia californica*) e o sedativo escopolamina (de *Hyoscyamus niger*). Outros importantes alcalóides oriundos de plantas incluem cafeína, nicotina, cocaína e heroína. Cerca de 10 mil substâncias são testadas para o desenvolvimento de um novo medicamento pelo método de “screening” randômico (PAYNE *et al.*, 1991).

Os alcalóides indólicos terpênicos (TIAs) são encontrados em um número limitado de espécies de plantas das famílias Apocynaceae, Loganiaceae, Rubiaceae e Nyssaceae. Grande parte do conhecimento existente acerca da biossíntese destes compostos foi alcançada a partir do estudo da vinca (*Catharanthus roseus*), que produz diversos compostos com aplicações farmacêuticas, incluindo os alcalóides monoméricos serpentina e ajmalicina, utilizados como tranquilizantes e anti-hipertensivos,

respectivamente, e os alcalóides diméricos vincristina e vinblastina, que são potentes agentes anti-tumorais (VERPOORTE *et al.*, 1997).

Para alguns alcalóides, a síntese química foi desenvolvida; porém, para diversos desses compostos - como os do tipo indólico monoterpene (MIAs) - o baixo rendimento e o alto custo do processo, devido à complexidade química estrutural, inviabilizam o uso comercial da síntese, fazendo com que o cultivo e a extração de alcalóides da planta produtora (ou de precursores de alcalóides para semi-síntese) permaneçam sendo a alternativa mais viável economicamente (KUTCHAN *et al.*, 1995).

Apesar da grande importância dos alcalóides para uso medicinal, relativamente pouco é conhecido sobre a regulação da sua biossíntese e a sua função nas plantas. Estudos indicam que alcalóides desempenham um importante papel ecoquímico na defesa da planta contra patógenos e herbívoros (RHODES, 1994). Possíveis funções desses compostos nas plantas incluem proteção contra patógenos, atividade anti-herbivoria, proteção contra radiação UV, reserva de nitrogênio e alelopatia por seu poder quelante e efeitos citotóxicos (WINK, 1988; RHODES, 1994; HARTLEY & JONES, 1997; WINK, 1999).

Mesmo com todos os avanços na busca de genes que codificam enzimas das rotas de biossíntese de MIAs e fatores de transcrição que participam deste processo há uma percepção crescente de que as rotas de biossíntese de alcalóides estejam longe de ser apenas um mero conjunto de genes consecutivos e fatores de transcrição regulatórios correspondentes, mas sim um sistema complexo com controles espaciais e temporais especializados (no nível subcelular, de tecido, órgão e planta completa) em estreita associação com estímulos ambientais bióticos e abióticos, juntamente com um controle do desenvolvimento programado ontogeneticamente. Portanto, um entendimento detalhado do desenvolvimento e aspectos ecoquímicos da produção do alcalóide em

diferentes tecidos e plantas inteiras oferece uma importante fonte para a produção sustentável e economicamente viável de moléculas bioativas de interesse, tanto em plantas selvagens como transgênicas (PASQUALI *et al.*, 2006).

O controle espacial da produção de alcalóides nas plantas é conhecido para várias classes dessas moléculas. Em *C. roseus*, a expressão do mRNA de triptofano descarboxilase (*tdc*), strictosidina sintase (*str1*), desacetoxivindolina 4-hidroxilase (*d4h*) e deacetilvindolina acetiltransferase (*dat*) e a formação de suas proteínas correspondentes envolvidas na biossíntese do principal MIA foliar foram examinadas. Os resultados indicaram que no mínimo dois tipos de células estão envolvidos. *Tdc* e *str1* estão localizados na epiderme dos caules, folhas e botões florais, e na protoderme e células corticais ao redor do meristema apical das raízes. *D4h*, e *dat* envolvidos nos últimos passos da biossíntese de vindolina, estão presentes nas células dos laticíferos e idioblastos de folhas, caules e botões florais (PASQUALI *et al.*, 2006).

O controle espacial na biossíntese de alcalóides é também observado em nível subcelular. A compartimentalização de porções da rota metabólica de produção de MIAs em *C. roseus* envolvem cloroplastos, citosol, retículo endoplasmático e vacúolos. O motivo da divisão em diferentes compartimentos subcelulares inclui proteção contra autotoxicidade causadas pelos alcalóides e seus intermediários da rota, melhor controle do fluxo metabólico e otimização da atividade enzimática pelo fornecimento de exigências específicas em distintos microambientes (PASQUALI *et al.*, 2006).

Hormônios vegetais e seus efeitos na regulação da biossíntese e acúmulo de alcalóides

Auxinas

De modo geral, a auxina natural mais abundante é o ácido indol acético (AIA). Entretanto, dependendo da espécie, da idade da planta, da estação do ano e das condições sob as quais a planta se desenvolve, outras auxinas naturais podem ser encontradas, como, por exemplo, um análogo clorado do AIA, existindo certa controvérsia se eles realmente atuariam como hormônio na planta. Quimicamente, a característica que unifica todas as moléculas que expressam atividade auxínica é a existência de uma cadeia lateral ácida, a qual deve estar ligada a um anel aromático (KERBAUY, 2004).

Em geral, a biossíntese de auxina está associada com locais de divisão celular rápida, especialmente no meristema apical caulinar, folhas jovens, frutos em desenvolvimento e em sementes. Esses locais são considerados os centros primários da produção do AIA, embora, em níveis inferiores, essa auxina possa ser também produzida em folhas maduras e, mesmo, nos ápices radiculares. Nas plantas superiores, as rotas bioquímicas que levam a biossíntese do AIA não estão totalmente definidas e muito menos suas vias de regulação. Entretanto, sabe-se que há múltiplas rotas que permitem aos vegetais sintetizar o AIA. Existem muitas evidências de que este hormônio é sintetizado a partir do aminoácido triptofano, possivelmente por várias rotas de conversão, embora biossíntese a partir de indol e indol glicerol fosfato também tenha sido relatada. Auxinas também podem estar conjugadas, geralmente com aminoácidos,

açúcares ou inositol e se tornam inativas; a maioria dos conjugados é resistente a enzimas oxidativas e pode ser revertido à auxina livre, criando uma maneira eficaz de regulação de atividade de auxina (CROZIER *et al.*, 2000). A degradação de auxinas se faz por meio da oxidação, que pode ocorrer tanto na cadeia lateral (com descarboxilação) quanto no anel indólico (sem descarboxilação) (KERBAUY, 2004).

A auxina é uma molécula simples, mas com uma influência crucial e complexa no desenvolvimento da planta. O acúmulo e resposta deste hormônio tão importante são necessários em eventos diversos como formação do padrão embrionário, respostas de crescimento, luz e gravidade, formação da raiz lateral entre outras (KEPINSKI, 2007).

A sinalização por auxina é um passo chave para muitos processos. Grande parte, se não a totalidade, desses processos são iniciados e/ou mediados através de expressão gênica regulada por auxina. O ciclo da ubiquitina e proteólise é muito importante no mecanismo de ação das auxinas. Ativadores de transcrição ARFs (fatores responsivos a auxina) estão ligados a elementos promotores responsivos a auxina, quando na presença deste hormônio. Na ausência de auxina os elementos responsivos a auxina são desativados pela ligação de um repressor transcricional AUX/AIA via dois domínios conservados entre ARF e proteínas AUX/AIA não havendo expressão de genes responsivos a auxina. Na presença desse hormônio no sistema o mesmo liga-se no seu receptor chamado de TIR1 ou ao complexo TIR1/AUX/AIA para promover ou estabilizar a interação TIR1/AUX/AIA domínio II. TIR1 promove a interação da proteína AUX/AIA ao complexo SCF (Skp1/Cullin/F-box, complexo que adiciona uma cauda de ubiquitina a proteínas alvo) que ubiquitina esta proteína. A proteína ubiquitinada é degradada pelo proteossoma 26 S. O aumento da degradação de

AUX/AIA em resposta a auxina libera as proteínas ativadoras ARFS da repressão, possibilitando a resposta transcricional à auxina (WOODWARS & BARTEL, 2005).

Os efeitos negativos de alguns fitormônios na biossíntese de alcalóides são conhecidos e podem variar com o tipo e a quantidade do fitormônio aplicado, principalmente auxinas e citocininas. Em culturas de células, vários produtos naturais são acumulados predominantemente na fase estacionária de crescimento. Em cenoura e em *C. roseus*, auxina parece atuar como um componente de ligação entre crescimento celular e formação do produto secundário. Ela estimula a proliferação celular enquanto reprime a expressão de genes *tdc* e *str* envolvidos na biossíntese de TIAs e genes da biossíntese de antocianinas. O nível desses transcritos aumenta em meio sem fitormônios (GODJIN *et al.*, 1992; PASQUALI *et al.*, 1992). A enzima TDC opera na interface entre metabolismo primário e a biossíntese de TIAs.

O efeito negativo de auxinas na biossíntese de produtos naturais foi também observado na produção de tiofenos em *Tagetes argentina* (BENAVIDES, 1995) e de nicotina em tabaco (HASHIMOTO & YAMADA, 1994). A remoção de flores e folhas jovens (fontes de auxina) reduz temporariamente a dominância apical e resulta em aumento de nicotina nas folhas, apesar desta ser sintetizada nas raízes. Este tipo de manejo é prática comum entre plantadores de tabaco. De fato, a poda de tabaco cultivado em hidroponia aumentou a atividade de putrescina metiltransferase (enzima-chave na biossíntese de nicotina) nas raízes em cerca de 10 vezes em apenas um dia, mas a presença de 50 mM de AIA na solução nutritiva no momento da poda impediu completamente este aumento (HASHIMOTO & YAMADA, 1994). Ao contrário da maioria das plantas estudadas, *Cinchona ledgeriana* apresenta produção de alcalóides indólicos estimulada por altos níveis de auxina (HARKES *et al.*, 1985).

Citocininas

A maioria das citocininas naturais é derivada da adenina e possui uma cadeia lateral derivada de isoprenos na posição N6 terminal. As variações estruturais na cadeia lateral isoprenóide alteram a atividade biológica e a estabilidade. O primeiro passo para a síntese *de novo* de citocininas é catalisada pela adenosina fosfato isopentenil transferase (IPT), a qual produz isopenteniladenosina. Em plantas superiores, *trans*-zeatina, a citocinina presente em maior quantidade, é formada por subsequente hidroxilação. O padrão da expressão de genes que codificam enzimas para biossíntese de citocininas sugere que a biossíntese e a homeostase são finamente controladas por fatores do ambiente interno e externo como os fitormônios e fontes de nitrogênio inorgânico. Este sistema regulatório parece ser importante para ligar as respostas de sinalização de nutrientes e morfogênese (SAKAKIBARA, 2005).

Acredita-se que o principal sítio da biossíntese de citocininas são as raízes, e algumas evidências indicam que o meristema apical do caule e sementes em desenvolvimento também são sítios de produção. As citocininas sintetizadas nas raízes são transportadas pelo xilema para as partes aéreas da planta, onde elas participam na dominância apical e retardam a senescência foliar (BUCHANAN *et al.*, 2000). As citocininas também são encontradas no floema, sobretudo durante a translocação de assimilados de folhas maduras (fontes) para as partes jovens da planta (drenos), acumulando inicialmente nos vacúolos de folhas senescentes, sendo depois translocados para as gemas que deverão entrar em dormência, principalmente durante o inverno, para suprir as citocininas necessárias à retomada de crescimento na primavera (KERBAUY, 2004). A degradação deste hormônio se faz por meio de citocinina oxidases, que

removem a cadeia lateral da sua estrutura, a qual é essencial para atividade biológica, e através de passos subseqüentes formam nucleotídeos (BUCHANAN *et al.*, 2000).

Em conjunto com as auxinas, as citocininas promovem divisão celular nas plantas. Elas também influenciam diferenciação das células em cultura: uma alta proporção de citocinina/auxina promove formação de parte aérea e concentrações equimolares de citocinina e auxina causa proliferação de células indiferenciadas. As citocininas também induzem a abertura estomática, suprimem a dominância apical causada pela auxina, inibem a senescência dos órgãos das plantas, especialmente folhas, entre outras (BUCHANAN *et al.*, 2000).

Postula-se, atualmente, que a sinalização de citocininas envolveria o chamado sistema regulatório de dois componentes, inicialmente descrito em bactérias. Esse sistema, comum em procariotos, eucariotos simples e plantas, consiste em uma enzima cinase do tipo histidina (componente 1) que percebe a entrada do sinal e de um regulador de resposta (componente 2) que medeia a saída do sinal. A transdução do sinal de citocininas inicia com a ligação destas ao receptor CRE1, localizado na membrana plasmática, que faz com que este atue como uma histidina cinase, a qual inicia uma série de fosforilações que irão desencadear a ativação de reguladores de resposta (ARRs). As proteínas ARR do tipo B são fatores de transcrição que, quando ativados por fosforilação, se ligam ao DNA e promovem a ativação de genes ARR do tipo A. A ativação de reguladores de resposta do tipo A pode desencadear a ação de ciclinas, o que explicaria um dos principais papéis das citocininas, ou seja, a regulação do ciclo celular (KERBAUY, 2004).

As citocininas podem afetar a produção de metabólitos secundários nas plantas. O conteúdo dos alcalóides indólicos produzidos por *Catharanthus roseus* foi aumentado em resposta a zeatina, como um indutor enzimático da rota terpênica mevalonato

independente (PAPON *et al.*, 2005) corroborando com resultados que mostram o aumento dos alcaloides ajmalicina e serpentina em calos de *C. Roseus* em resposta a citocininas (GARNIER *et al.*, 1996). Por outro lado, em cultura de raízes em cabeleira de *Lobelia inflata*, cinetina (KIN) suprimiu a produção de lobelina (BÁLVÁNYOS *et al.*, 2001).

Etileno

O etileno é um composto simétrico de dois carbonos com uma dupla ligação e quatro hidrogênios. O aminoácido metionina é o precursor do etileno sendo que o grupo $\text{CH}_3\text{-S}$ da metionina é reciclado através do ciclo de Yang, formando SAM (S-adenosilmetionina), que é convertida a ACC (1-aminociclopropano-1-carboxílico) por uma reação catalisada pela ACC sintase (reação limitante da via de biossíntese do etileno). O ACC pode ser conjugado formando o N-malonil ACC ou ser convertido em etileno (KERBAUY, 2004).

Alguns efeitos fisiológicos do etileno incluem controle da germinação de sementes, crescimento da raiz e parte aérea, desenvolvimento floral e de folhas, maturação de frutos, modulação de respostas das plantas aos estresses bióticos e abióticos (TAIZ & ZEIGER, 2002).

O transporte do etileno, ao contrário dos demais hormônios vegetais, é independente de tecidos vasculares e outras células. O gás etileno movimenta-se facilmente entre os tecidos, difundindo-se através dos espaços intercelulares, podendo ser perdido para o ambiente. Devido à sua afinidade com lipídeos, o etileno é capaz de se difundir com relativa facilidade através da casca de alguns frutos (KERBAUY, 2004).

Existe um modelo teórico que representa o entendimento que se tem, atualmente, sobre o mecanismo de ação do etileno em *Arabidopsis*. O etileno se liga aos receptores ETR1 ou ERS1, que são proteínas da membrana do retículo endoplasmático. Os receptores de etileno ETR2 e EIN4, similares a ETR1, e ERS2, similar a ERS1, também podem estar na membrana plasmática. O etileno se liga ao receptor através do co-fator cobre, o que causa a inativação de CTR1 (proteína isolada de um mutante constitutivo para etileno, está envolvida no mecanismo de ação do mesmo), permitindo que EIN2 (envolvida na transdução de sinal desencadeada por etileno) se torne ativado, o que promove a ativação de uma cascata de fatores de transcrição, que causam a expressão de genes estimulados por etileno. Na ausência de etileno, essas respostas são reprimidas, possivelmente pela ativação direta do regulador negativo CTR1, que atuaria sobre uma cascata de fosforilações, impedindo a seqüência de proteínas EIN2, EIN3 e ERF1 de se tornar ativa (KERBAUY, 2004).

Etileno, que em muitos estudos não mostrou efeito na formação de metabólitos secundários, induziu diferentes rotas para produção de diferentes classes de alcalóides em *C. roseus* (EL-SAYED & VERPOORTE, 2004). A indução do acúmulo de alcalóides em resposta a etileno pode ser explicada pelo aumento da expressão do gene que codifica a enzima geraniol 10-hidroxilase que faz parte da rota de formação de terpenos (rota mevalonato independente) (PAPON *et al.*, 2005).

Precusores da rota de biossíntese dos alcalóides e seus efeitos no acúmulo destes

Duas rotas metabólicas convergentes fornecem os precursores indólico e terpênico para a biossíntese de TIAs. O aminoácido triptofano é derivado da rota do

chiquimato, sendo que a enzima TDC catalisa a conversão à triptamina, a qual provê a metade indólica (WHITMER *et al.*, 2002). Secologanina, um glicosídeo monoterpeneo, é derivado de loganina. Nas plantas, monoterpeneos são derivados de isopentenil difosfato (IPP), o precursor de cinco carbonos de todos isoprenóides, o qual pode ser sintetizado tanto pela rota citosólica mevalonato dependente ou pela via plastídica 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato, rota DXP (também chamada de rota mevalonato independente). Cada rota parece produzir isoprenóides únicos (tri e sesquiterpenos via mevalonato e mono, di e tetraterpenos via DXP), e as duas rotas operam tanto independentemente quanto simultaneamente, dependendo do tipo de tecido. Triptamina e secologanina são condensados pela enzima STR para formar estrictosidina, o precursor geral de TIAs (HONG *et al.*, 2003). Estudos recentes mostram que a separação entre as vias de produção de IPP não é absoluta, podendo ocorrer troca de intermediários (HEMMERLIN *et al.*, 2003).

Os estudos realizados até o momento mostrando os efeitos de triptofano e triptamina exógena na produção de alcalóides terpeno indólicos são contraditórios. Em trabalhos utilizando cultura de células de *C. roseus* o tratamento com triptofano aumentou o crescimento e o rendimento específico de serpentina em uma linhagem celular, reduziu estes parâmetros em uma linhagem celular filha (ZENK *et al.*, 1977) e não teve efeito na produção de alcalóides em outro trabalho (KARGI & GANAPATHI, 1991). Em outros exemplos, a adição de triptofano às células imobilizadas de *C. roseus* aumentou os níveis de triptamina, mas não teve efeito nos níveis de alcalóides (FACHINI e DICOSMO, 1991). Da mesma maneira, em cultura de calos de *C. roseus*, a adição de triptamina estimulou a produção de ajmalicina e catarantina em um estudo (ZHAO *et al.*, 2001), enquanto, em outro, não teve efeito nos níveis de serpentina e ajmalicina em cultura de células da mesma espécie (LEE-PARSONS e ROYCE, 2006).

A adição de loganina ou secologanina à cultura de células de *C. roseus* aumentou os níveis de alcalóides indólicos nos estudos de MERRILON *et al.* (1989) e MORENO *et al.* (1993). Os precursores geraniol, 10-hidroxigeraniol ou loganina resultaram em aumento significativo no acúmulo de tabersonina em cultura de raízes de *C. roseus* (MORGAN & SHANKS, 2000). Estes resultados sugerem que a rota terpênica pode ser limitante para produção de TIAs.

O Gênero *Psychotria*

O gênero *Psychotria* pertence à família Rubiaceae, tribo Psychotrieae, subfamília Ruboideae, e compreende quase 2.000 espécies amplamente distribuídas no estrato arbustivo das matas tropicais (DAVIS *et al.*, 2001). No sul do Brasil ocorrem 18 espécies deste gênero: *P. brachyceras*, *P. umbellata*, *P. kleinii*, *P. suterella*, *P. birotula*, *P. leiocarpa*, *P. myriantha*, *P. carthagenensis*, *P. nitidula*, *P. harconifolia*, *P. longipes*, *P. mapourides*, *P. nuda*, *P. pubigera*, *P. sessilis*, *P. stachioides*, *P. vellosiana* e *P. tenerior* (SANTOS, 1999).

A família Rubiaceae é conhecida pela produção de diversos alcalóides que apresentam propriedades farmacológicas importantes (ELISABETSKY *et al.*, 1995; KUTCHAN, 1995; ROBERTS & STRACK, 1999). O gênero *Psychotria* é caracterizado pela presença de alcalóides e outras substâncias bioativas. Os alcalóides deste gênero são derivados, em sua maioria, do aminoácido triptofano, e são do tipo poliindólico ou derivados metiltriptamínicos principalmente (HART *et al.*, 1974; LIBOT *et al.*, 1987; ADJIBADE *et al.*, 1992; SANTOS, 1999). A análise de várias espécies do Sul do Brasil mostrou que os alcalóides identificados são do tipo indol-monoterpênicos glicosilados, uma característica química peculiar para este tipo de

alcalóide (KERBER *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2001). Dessa forma, alcalóides podem representar um caractere quimiotaxonômico utilizável para distinguir agrupamentos dentro de um gênero complexo como *Psychotria* (SOLÍS *et al.*, 1995).

Vários estudos mostram diferentes efeitos farmacológicos dos alcalóides de *Psychotria*, como inibição da agregação plaquetária humana (BERETZ *et al.*, 1985), citotoxicidade (ROTH *et al.*, 1986), e atividade analgésica (LEAL & ELISABETSKY, 1996). No Brasil, principalmente, a pesquisa deste gênero foi motivada por um estudo etnofarmacológico com caboclos da floresta amazônica, no estado do Pará, que utilizavam partes da planta, popularmente denominada “perpétua-do-mato” (*P. colorata*), em preparações para o tratamento da dor (ELISABETSKY & CASTILHOS, 1990). Estudos químicos e farmacológicos revelaram a presença de diversos tipos de alcalóides pirrolidinoindolínicos com comportamento analgésico do tipo opióide, *i.e.* morfino-símile (ELISABETSKY *et al.*, 1995; ELISABETSKY *et al.*, 1997).

A identificação de diversos extratos ativos em várias espécies pertencentes ao gênero *Psychotria* estimulou a procura por novos compostos analgésicos produzidos por estas plantas. A presença de alcalóides com atividade opióide, e também a atividade inespecífica de outros extratos, demonstrou o potencial deste gênero como uma importante e inexplorada fonte de compostos analgésicos (LEAL & ELISABETSKY, 1996).

A análise farmacológica de extratos alcaloídicos de cinco espécies (*P. brachyceras*, *P. leiocarpa*, *P. myriantha*, *P. suterella* e *P. umbellata*), das 18 anteriormente citadas, mostrou atividade analgésica (LEAL, 1994; ELISABETSKY *et al.*, 1997). Os extratos de *P. brachyceras*, *P. leiocarpa*, *P. myriantha* e *P. suterella* resultaram em atividade analgésica não dependente da dose e não reversível por naloxona, aparentemente não específica nos extratos complexos, não purificados. No

entanto, a resposta obtida com o extrato de *P. umbellata* foi “dose-dependente” e reversível por naloxona, indicando a presença de uma atividade do tipo opióide (ELISABETSKY *et al.*, 1997). Posterior isolamento dos alcalóides presentes no extrato permitiu o isolamento da psicolatina, um novo alcalóide com efeito analgésico (LEÃO *et al.*, 1997; KERBER *et al.*, 2008) dose-dependente e parcialmente reversível por antagonistas (BOTH *et al.*, 2002; ELISABETSKY *et al.* 2002).

Psychotria brachyceras

A espécie *Psychotria brachyceras* Müller Argoviensis (Fig. 1) é uma planta arbustiva com até 3 metros de altura, amplamente distribuída em florestas tropicais e subtropicais brasileiras, ocorrendo desde o Estado do Rio de Janeiro até o Rio Grande do Sul, na área da Mata Pluvial Costeira e Mata da Planície Litorânea (DILLENBURG & PORTO, 1985). Este vegetal floresce de outubro a dezembro e frutifica no período de abril a junho. Apresenta flores brancas e frutos drupáceos de cor azul-violácea.

P. brachyceras é produtora do alcalóide monoterpene indólico braquicerina (Fig. 2, KERBER *et al.*, 2001), o qual possui algumas características marcantes, tais como a porção terpênica não derivada de secologanina e a manutenção de uma glicose ligada à porção terpênica; esta glicosilação é incomum na forma final da maioria dos alcalóides conhecidos. Braquicerina mostrou atividade anti-inflamatória específica em testes de migração de leucócitos em ratos por meio de um ensaio de quimiotaxia (F. Farias & A. T. Henriques, dados não publicados), e um extrato etanólico foliar de *P. brachyceras* mostrou atividade analgésica não específica (ELISABETSKY *et al.*, 1997).

No intuito de identificar um possível papel *in planta* deste alcalóide, estudos fisiológicos descreveram que a sua biossíntese é fortemente ativada por luz UV. Quando

estacas cultivadas em hidroponia foram irradiadas durante 16h com UV-C, o teor de braquicerina nas plantas aumentou cerca de 10 vezes no sexto dia de tratamento, enquanto que um regime de 4h diárias dobrou este teor ao quarto dia de tratamento. Resultados similares foram obtidos com luz UV-B. Estes resultados mostram que esta resposta é dose-dependente da intensidade de luz UV e sugerem que a braquicerina possui um papel de defesa contra danos causados por esse tipo de radiação. Esta hipótese é fortalecida pelo fato do alcalóide também apresentar, *in vitro*, uma atividade seqüestradora de oxigênio singlete, sugerindo relação direta com os radicais livres formados intracelularmente quando a célula é submetida a altos níveis de UV (GREGIANINI *et al.*, 2003). Além disso, braquicerina e o extrato foliar bruto de *P. brachyceras* possuem, efeitos antioxidantes e antimutagênicos em leveduras; resultados observados sugerem que essa atividade é principalmente relacionada com sua capacidade de retirar do sistema o radical hidroxila (OH•) (NASCIMENTO *et al.*, 2007).

A braquicerina é um alcalóide de estrutura peculiar, pois é possivelmente derivada de 10-oxo-1-*epi*-loganina, diferindo dos demais alcalóides indólicos os quais são geralmente derivados de secologanina e a subsequente formação de strictosidina, o precursor geral de pelo menos três mil alcalóides indol-terpênicos conhecidos. A unidade indólica é provavelmente derivada do aminoácido triptofano, o qual é convertido em triptamina pela enzima citossólica TDC (triptofano descarboxilase). A porção terpênica é fornecida por isopentenil difosfato (IPP) ou dimetilalil difosfato (DMAPP) oriundo da rota biossintética triose fosfato/piruvato em plastídios, a rota independente de mevalonato (CONTIN *et al.*, 1998). A estrutura final do alcalóide parece ser o resultado da condensação direta da substância triptamina com a 10-oxo-1-*epi*-loganina, proveniente da rota dos terpenos. Essa hipótese biogenética indica uma

rota alternativa para biossíntese dessa molécula, representando uma nova classe de alcalóides indólicos (KERBER *et al.*, 2001).

A natureza monoterpênóide indólica dos alcalóides de *Psychotria* sugere o envolvimento, ao menos nas etapas iniciais de sua biossíntese, das enzimas TDC e STR-like (KUTCHAN, 1995), ou seja, novas enzimas relacionadas a STR capazes de reconhecer terpenos distintos da secologanina.



Figura 1. Planta de *P. brachyceras* com frutos. Frutos maduros possuem diâmetro aproximado de 1 cm.

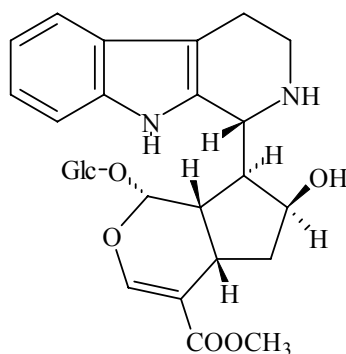


Figura 2. Estrutura do alcalóide monoterpêno indólico Braquicerina hipoteticamente resultante da condensação direta da triptamina (oriunda da descarboxilação do aminoácido triptofano) com 10-oxo-1-*epi*-loganina (proveniente da rota plástica mevalonato-independente).

OBJETIVOS

Tendo em vista que *Psychotria brachyceras* é uma espécie não cultivada e de disponibilidade relativamente limitada, seu alcalóide majoritário braquicerina apresenta diversas bioatividades de interesse farmacológico e fitormônios estão freqüentemente envolvidos na transdução de sinais do meio ambiente para a realização de ajustes metabólicos em plantas, o presente estudo buscou: 1) caracterizar a produção de braquicerina em diferentes sistemas de cultivo; 2) analisar o papel de fitormônios, especialmente os mais envolvidos em cultivos *in vitro*, no controle de produção deste alcalóide; 3) avaliar o grau de limitação imposto por precursores indólicos (pontos de conexão entre metabolismo primário e secundário) ao acúmulo de braquicerina.

“Production of the bioactive alkaloid brachycerine by *Psychotria brachyceras*: role of phytohormones and indole precursor feeding”

(A ser submetido ao periódico Plant Growth Regulation - Springer)

Production of the alkaloid brachycerine by *Psychotria brachyceras*: role of phytohormones and indole precursor feeding

Paloma Koprovski Menguer^{1,2}, Naíla Cannes do Nascimento^{1,2}, Tatiana Schäffer Gregianini⁴,
Amélia Teresinha Henriques³ and Arthur Germano Fett-Neto^{1,2*}

¹Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia,
UFRGS

²Laboratório de Fisiologia Vegetal, Departamento de Botânica, UFRGS

³Faculdade de Farmácia, UFRGS

⁴Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fundação Estadual de Produção e
Pesquisa em Saúde – CDCT/FEPPS-RS

* Corresponding author. Laboratório de Fisiologia Vegetal, Centro de Biotecnologia, UFRGS.
Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970, Caixa Postal 15005, Porto Alegre – RS, Brasil.
fettneto@cbiot.ufrgs.br

Key words: brachycerine, monoterpene indole alkaloid, phytohormones, precursor feeding, tryptophan, tryptamine

ABSTRACT

Psychotria brachyceras produces the monoterpene-indole alkaloid brachycerine, which is capable of singlet oxygen and hydroxyl radical quenching activity. Its accumulation is increased upon leaf exposure to UV radiation and both brachycerine and the crude foliar extract of *P. brachyceras* have antioxidant and antimutagenic effects in yeast. Phytohormones are well known as messengers of environmental cues important for adjusting plant metabolism and development, whereas indole precursors of monoterpene-indole alkaloids are key branching points, integrating primary and secondary metabolism. In the present investigation, three different experimental systems, tip cuttings, microcuttings and leaf disks were evaluated to study the metabolic responses of brachycerine upon exposure to phytohormones important in the control of tissue culture growth and morphogenesis. The system of leaf disks yielded more consistent responses probably due to the higher genetic homogeneity of the plant material. Accumulation of brachycerine was promoted by indole-3-acetic acid (IAA), Ethrel (Et – ethylene precursor) and zeatin (ZEA) (only in the fourth day of treatment) and was negatively affected by indole-3-butyric acid (IBA), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), zeatin (only in the sixth day of treatment) and benzylaminopurine (BAP). Tryptophan feeding increased brachycerine content in leaf disks by about an order of magnitude, whereas tryptamine had no effect on alkaloid content.

INTRODUCTION

Species of *Psychotria* (Rubiaceae) from southern Brazil have been shown to contain novel bioactive monoterpene indole alkaloid (MIAs), some of which display opioid analgesic properties, cytotoxic effects and antioxidant or anti-inflammatory activities (Both et al. 2002; Elisabetsky et al. 2002; Pasquali et al. 2006). Biosynthesis of MIAs is initiated by condensation of an indole moiety of tryptamine from the shikimate pathway and the monoterpeneoid secologanin derived from isopentenyl diphosphate (IPP), the five-carbon precursor of all isoprenoids. IPP is synthesized either via the cytosolic mevalonate pathway or via the plastidic 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) pathway, also known as non-mevalonate pathway (Hong et al. 2003). Tryptamine is synthesized from tryptophan (Trp), a step catalyzed by Trp decarboxylase, whereas secologanin is produced from loganin, which is derived from the monoterpeneoid geraniol. The first committed step in the biosynthesis of MIAs is the condensation of secologanin and tryptamine, catalyzed by strictosidine synthase, which results in the formation of strictosidine, the presumed universal precursor of terpenoid indole alkaloids (Whitmer et al. 1998).

Psychotria brachyceras Muell. Arg. is a native shrub, reaching up to 3 m in height, found in tropical and subtropical forests of Brazil, ranging from the state of Rio de Janeiro to Rio Grande do Sul (Dillenburg and Porto 1985), which accumulates the major MIA brachycerine (Fig. 1). Brachycerine represents a new class of indole alkaloid; its structure suggests a direct condensation of tryptamine with a form of loganin (Kerber et al. 2001), instead of secologanin and the consequent formation of strictosidine. Brachycerine retains a residue of glucose, which is an interesting feature for improved solubility in biological systems and pharmacological applications (Pasquali et al. 2006).

Brachycerine has shown *in vitro* antioxidant activity towards singlet oxygen and its accumulation increased upon leaf exposure to UV radiation (Gregianini et al. 2003); moreover, brachycerine and the crude foliar extract of *P. brachyceras* have both antioxidant and antimutagenic effects in yeast, as well as scavenging capacity towards the OH• radical (Nascimento et al. 2007).

In cell suspensions of *C. roseus*, terpenoid indole alkaloids accumulate predominantly in the stationary phase and to a lesser extent during active growth of these cultures. Auxin appears to act as a regulator of this switch between cell growth and secondary product formation. The enzyme tryptophan decarboxylase (TDC) appears to operate at the interface between primary metabolism and MIA biosynthesis (Goddijn et al. 1992; Pasquali et al. 1992). TDC is probably involved with one of the possible pathways leading to auxin and indole alkaloid biosynthesis. In *Catharanthus roseus*, auxin stimulates cellular proliferation whereas it down-regulates the transcription of the *tdc* and *str* genes involved in MIA production (Goddijn et al. 1992; Pasquali et al. 1992). Unlike alkaloid production in *Catharanthus*, accumulation of brachycerine is not observed in callus, cell suspensions or untransformed root cultures, being closely dependent on shoot differentiation (Gregianini et al. 2003).

There are other examples of phytohormones that affect the production of alkaloids in *C. roseus*. Cytokinins increased the content of the indole alkaloids ajmalicine and serpentine in callus (Garnier et al. 1996). Methyl jasmonate is a fast stimulator of the accumulation of MIAs, including brachycerine (Gregianini et al., 2004). Salicylic acid, abscisic acid, and ethylene, that in several studies with MIAs were found to have no effect on alkaloid accumulation, have been shown to induce different pathways of other classes of alkaloids. Gibberellins had no impact or weak induction effect on *Catharanthus* alkaloid biosynthesis (El-Sayed and Verpoorte 2004).

The addition of precursors geraniol, 10-hydroxygeraniol or loganin resulted in significant increases in the accumulation of tabersonine in *C. roseus* hairy root cultures. Tryptophan or tryptamine had no effect during the stationary phase of the growth cycle. Thus, during the early stationary phase of growth the terpenoid pathway appears to be rate-limiting (Morgan and Shanks, 2000).

The present study examined the effects of auxins of different chemical stability on the production of brachycerine in three different experimental systems (tip cuttings, leaf disks and microcuttings of *P. brachyceras*). In leaf disks, additional experiments examined the effect of cytokinins, ethylene, ethylene action inhibitors, and indolic precursors on brachycerine

production. A complex profile emerged from these analyses, with stimulation of brachycerine accumulation being observed upon exposure to tryptophan, IAA and Et; overall negative effects were seen for cytokinins and stable auxin exposure, whereas no effect was detected upon treatment with tryptamine.

MATERIAL AND METHODS

Plant material and experimental parameters

Psychotria brachyceras Müll Arg. (Rubiaceae) adult trees growing at Morro Santana – UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, were used in the experiments. A voucher specimen, identified by Dr. Marcos Sobral, is deposited at the University Herbarium (ICN 7899). All of the tests were carried out in a growth room under white fluorescent tubes (Osram L40 W/10 s, F40D daylight, USA mixed with equal number of Osram Universal 40 W, KOB8A 6, São Paulo, Brazil) with a 16/8 h day/night regime (P.A.R. of approximately $73 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) at 25 ± 3 °C. The media pH was adjusted to 5.8 before autoclaving at 121 °C for 15 min. Growth conditions for micropropagated cultures were the same as above.

Shoot micropropagation of nodal segments and treatment of microcuttings

Germinated seedlings served as source for nodal segments from which microcuttings originated. Nodal segments were inoculated in BAP3 shoot induction medium, consisting of: MS salts (Murashige and Skoog 1962) (Gibco/BRL) supplemented with 3 % (w/v) sucrose, 3 mg.l^{-1} 6-benzylaminopurine (BAP) (Gibco/BRL) and 0.25 % (w/v) Phytigel™ (Sigma) as solidifying agent (Maraschin, 2004).

The concentrations of 1 and 10 mg.L^{-1} of the growth regulators 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid, Sigma), IAA and IBA were tested to examine their impact on brachycerine production. Microcuttings originated from the BAP3 shoot induction medium were cultured using sterile vermiculite as solid substrate with a 0.1 X MS mineral nutrient solution supplemented with the mentioned auxins. Control plants were cultured in MS salts

only. Microcuttings were harvested before treatments and after 2, 4 and 6 days of treatment to analyze the content of brachycerine.

Effects of auxins on brachycerine content in cuttings

Tip cuttings with two to six leaves were harvested at mid morning, washed and trimmed under distilled water to prevent xylem cavitation. Approximately 10 cm long cuttings were cultured in dark flasks with test solutions. Leaves were exposed to light and temperature conditions as described above. The concentrations of 1 and 10 mg.L⁻¹ of the auxins 2,4-D and IAA were tested to examine their impact on brachycerine production by cuttings. Cuttings were cultured in nutrient solution of 0.1 X MS medium supplemented with the mentioned auxins (continuous exposure). Control plants were cultured in 0.1 X MS salts only. Samples (leaves) were harvested at the times described above to quantify brachycerine.

Effects of auxins, cytokinins, ethylene, ethylene inhibitors and indole precursor feeding on leaf disk brachycerine content

Leaves from tip cuttings were detached and surface sterilized. Sterilization was done by washing leaves for one minute in ethanol 70 %, followed by immersion in 1.5% NaClO with a few drops of neutral detergent for 20 min. Then, leaves were washed at least three times with sterile distilled water. Leaf disks with 1 cm of diameter were prepared with a cork borer. The concentrations of 1 and 10 mg.L⁻¹ of the growth regulators IBA, 2,4-D, IAA, BAP, ZEA and 2-chloroethylphosphonic acid (Ethrel, ethylene precursor) were tested to examine their impact on brachycerine production. All phytohormones and precursors were from Sigma – USA. The ethylene inhibitors AgNO₃ and 1-methylcyclopropene (1-MCP, AgroFresh, USA) were also examined. The concentrations of 6.9, 3.4 and 2.3 μ M of AgNO₃ (that are equivalent to equimolar amount, 50% and 33% of ethylene at 1 mg.L⁻¹) were tested, with or without Ethrel; for 1-MCP, 50 μ M were added to MS medium, containing or not Ethrel, in each of the six days of treatment. The indole precursors tryptophan and tryptamine (both from Sigma-USA) were

tested at the concentration of 1 mM. Leaf disks (20 per plate) were incubated in Petri plates (9 cm of diameter) containing 25 mL of 0.1 X MS nutrient medium supplemented with treatment adjuvants. Control plants were cultured in 0.1 X MS salts only. Samples (leaf disks) were harvested as described above for brachycerine quantification. Leaf disks were exposed to light and temperature conditions as described above.

Brachycerine extraction and analyses

In order to quantify the brachycerine content, samples were ground with mortar and pestle in liquid nitrogen. Tissues from cuttings, microcuttings and leaf disks were extracted in 2.0, 1.5 and 1.0 ml methanol (HPLC grade), respectively, and ultrasonicated for 30 min. The extracts were centrifuged at 5,000 g for 10 min and the supernatant was recovered. Chemical analyses of the methanolic extracts were performed using a Perkin Elmer HPLC system. Chromatography was performed on a Merck Hibar C₈ (particle size 0.5 µm) HPLC reverse phase column 275 x 8.0 mm (E. Merck, Darmstadt, Germany), equipped with a C₈ pre-packed column, using a linear gradient with methanol-water-trifluoroacetic acid ranging from 19:81:0.05 (T₀) to 100:0:0.05 (T₂₁) in 21 minutes, at a flow-rate of 1.0 ml.min⁻¹. The eluted compounds were monitored at 280 nm. Quantification was obtained using an external standard curve; identity and purity were based on retention time and co-chromatography with authentic brachycerine.

Statistical analyses

Statistical analyses were done by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan tests at $P \leq 0.05$, when appropriate (Sokal and Rohlf, 1981). Treatment effects were considered statistically significant at $P \leq 0.05$, unless stated otherwise. Each treatment and harvest time had four replicates (each replicate had 8 microcuttings, or 4 plates of 20 leaf disks, or 4 tip cuttings). Experiments were independently carried out two to three times.

RESULTS AND DISCUSSION

Impact of Auxin Exposure on Brachycerine Accumulation in Cuttings, Leaf Disks and Microcuttings

Although none of the tested concentrations of IBA significantly affected the brachycerine amounts in leaves from cuttings (data not shown), overall results with leaf disks and microcuttings in IBA-containing media showed a statistically significant decrease in brachycerine content when compared to their corresponding controls, cultured in absence of phytohormones (Fig. 2a and 2b, respectively). However, when microcuttings were used as explants, at the lowest concentration of IBA (1 mg.l^{-1}) an increased amount of brachycerine was observed in the second day of treatment (Fig. 2b).

The endogenous BAP accumulated in micropropagated shoots during their previous stage of shoot induction culture could be interacting with auxin present in the test media, resulting in this sporadic inducible pattern of brachycerine. Satdive et al. (2003), reported that shoot cultures of *C. roseus* accumulated high levels of ajmalicine, a monomeric indole alkaloid, when culture medium was supplemented with IAA at high concentrations and BA at low concentrations. The possible effect of auxin interaction with endogenous BAP observed at low concentrations of IBA might be overcome at higher auxin concentrations, because the content of brachycerine remained low throughout the time in microcuttings of the 10 mg.l^{-1} IBA treatment.

Similar to the inducible responses in brachycerine content observed with IBA at 1.0 mg.l^{-1} , the same dose of 2,4-D promoted an increase of alkaloid accumulation in the sixth day, although 2,4-D general effect on brachycerine was clearly inhibitory (Fig. 3). All (three) types of explants tested, cuttings, microcuttings and leaf disks, when treated with 10 mg.l^{-1} 2,4-D, showed a decrease in content of brachycerine compared with their respective controls (Fig. 3a, 3b and 3c).

Inhibitory effects of auxins have been reported in secondary metabolism. In cell suspension cultures of *Catharanthus*, omission of NAA from the growth medium resulted in

accumulation of *tdc* mRNA (Goddijn et al. 1992). Similarly, the auxins 2,4-D, naphthalene acetic acid (NAA) and IBA had a negative effect on thiophene biosynthesis in roots of *Tagetes argentina*, *T. patula*, (Benavides 1995 and references therein) and on nicotine production in tobacco (Hashimoto and Yamada 1995). The addition of NAA, IAA or 2,4-D to *Catharanthus roseus* cell cultures rapidly reduced the *tdc* transcript level, indicating that auxin negatively regulates expression of the *tdc* gene (Goddijn et al. 1992). A similar inhibitory effect of metabolically more stable auxins, such as IBA and 2,4-D on *tdc* gene expression may have occurred in *P. brachyceras*, reducing brachycerine yield.

Differently of the majority of plants studied so far, *Cinchona ledgeriana* showed indole alkaloid induction in response to high levels of auxins (Harkes et al. 1985). Indeed, in developing seedlings, external application of IBA or 2,4-D enhanced and prolonged the rise in TDC activity (Aerts et al. 1992), showing that alkaloid metabolism has complex responses to auxins. In the three experimental systems herein examined, cuttings, microcuttings and leaf disks, 10 mg.l⁻¹ IAA significantly induced the accumulation of brachycerine (Fig. 4a, 4b and 4c) when compared to the respective controls. The concentration of 1 mg.l⁻¹ increased the alkaloid content only in leaf disks (Fig. 4c). It is possible that the more stable auxins 2,4-D and IBA may have reduced brachycerine metabolism by negatively affecting the transcription of genes involved in alkaloid biosynthesis (e.g. *tdc* gene), whereas IAA could be promptly degraded, perhaps providing an indole moiety for alkaloid synthesis (Taiz and Zeiger 2002; Pasquali et al., 2006). Another hypothesis is that IAA promoted ethylene synthesis by enhancing the rate of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) synthase production (Buchanan, 2000). It has previously been reported that ethylene remarkably enhanced the accumulation of alkaloids in *C. roseus* cell suspensions (Papon et al. 2005). In this scenario, the effect of stable auxins on repression of *tdc* transcription would possibly overcome potential positive impacts of ethylene production on brachycerine accumulation.

The use of three different experimental systems to analyze the metabolic responses of brachycerine had the purpose of selecting the best one for studies on the regulation of

brachycerine biosynthesis. The system of leaf disks resulted in more consistent responses when compared to the other systems tested in these work, presumably due to the higher genetic homogeneity of the plant material, derived from the random pooling of disks from various leaves prior to treatment distribution. Besides, leaf disks can be readily obtained and demand relatively lower plant biomass per experiment.

Impact of Cytokinins and Ethylene Exposure on Brachycerine Accumulation in Leaf Disks

Exposure to BAP (1 and 10 mg.l⁻¹) significantly reduced the brachycerine content (Fig. 5) whereas ZEA (1 and 10 mg.l⁻¹) treatment caused a decrease (forth day of treatment) followed by an increase (sixth day of treatment) on brachycerine content (Fig. 6). Cytokinins promote cell division and delay leaf senescence (Taiz and Zeiger 2002). Thus, BAP and ZEA may be causing diversion of carbon, nitrogen and energy to delay senescence of leaf disks in detriment of alkaloid production; it is possible that brachycerine metabolization could support part of this process. Later, ZEA may be acting like an enzyme inducer at the level of the MEP/Terpenoid Pathway (Papon et al. 2005), supporting an increase in brachycerine biosynthesis. Papon et al. (2003), isolated a full-length cDNA (CrRR3) from *C. roseus* cDNA library that encodes an ORF (open reading frame) sharing homologies with *A. thaliana* response regulators. Its transcripts are transiently up-regulated after trans-zeatin treatment in *C. roseus* suspension cells. It has been suggested that CrRR3 protein might be involved in the cytokinin-enhanced alkaloid production in *C. roseus* cell cultures.

Papon et al. (2005) reported that ethylene enhanced the accumulation of alkaloids in *C. roseus* cell suspensions increasing the expression of geraniol 10-hydroxylase gene (MEP/Terpenoid Pathway). *C. roseus* seedlings treated with ethylene enhanced the content of vindoline showing an increased basic peroxidase activity (El-Sayed and Verpoorte 2004). Leaf disks of *P. brachyceras* exposed to ethylene (1 and 10 mg.l⁻¹) had significantly enhanced brachycerine content (Fig. 7).

As discussed above, IAA stimulated brachycerine production, and this process could be due to auxin-enhanced ethylene synthesis. In order to test this hypothesis, it became necessary

to evaluate the impact of inhibitors of ethylene action on brachycerine accumulation. Silver (Ag^+) blocks the binding of ethylene to its receptors, thus inhibiting its action (Taiz and Zeiger 2002). However, all concentrations of AgNO_3 tested in this study increased brachycerine production (data not show). This is likely the result of oxidative stress induced by the heavy metal.

Navabpor et al. (2003) showed that treatment of *Arabidopsis* cotyledon and leaf tissues with silver nitrate results in enhanced expression of LSC54 gene (encoding a metallothionein protein) that is related to oxidative stress. This result is in agreement with the increased content of brachycerine in foliar disks of *P. brachyceras* exposed to oxidative stress, which is associated with higher activity of ascorbate peroxidase (APX) but not of superoxide dismutase (SOD) (Nascimento and Fett-Neto, unpublished results). In the same investigation, brachycerine induction by exposure of leaf disks to aluminum was also observed. Thus, it is possible that brachycerine acts as an effective $\text{O}_2\cdot^-$ scavenger, but not like a H_2O_2 scavenger, and may be involved in mitigating oxidative stress, including that induced by heavy metals. Gregianini et al. (2003) reported that brachycerine has a possible protective role related to ROS quenching capacity *in vitro* towards singlet oxygen, which can be explained by the presence of a secondary amine, double bonds, OH-group and the glucose residue in its structure.

The ethylene action inhibitor 1-MCP reduced significantly the increase in brachycerine production induced by ethylene (Fig. 7). MCP binds irreversibly to ethylene receptors. These results indicate that the pathway involved in IAA – brachycerine production may be partly mediated via ethylene.

Impact of Precursor Feeding on Brachycerine Accumulation in Leaf Disks

Studies on precursor feeding, enzyme activities, and cell cultures overexpressing the jasmonate responsive ORCA transcription factor, which regulates the transcription of several biosynthetic genes involved in *C. roseus* MIA production, have shown that precursors from the terpenoid pathway limit metabolic flux for alkaloid production (Moreno et al., 1993; Pasquali et al., 2006). Leaf disks of *P. brachyceras* fed with 1 mM tryptamine showed no change on

brachycerine content (data not show). The precursor concentration of 1mM used in the present work was chosen based on reports from the literature using cell and callus cultures (Silvestrini et al., 2002; Zhao et al., 2001). However, Morgan et al. (2000) reported that dosages of geraniol (a precursor from the MEP/Terpenoid Pathway) at and above 1mM had toxic effects on the growth of cells possibly affecting alkaloids production. The lack of tryptamine influence on brachycerine accumulation could be related to the activity of other tryptamine-utilizing enzymes, such as those leading to IAA intermediates (Celenza, 2001), and/or to limitations of tryptamine transport across membranes (Whitmer et al. 1998).

Tryptophan increased the alkaloid content significantly (Fig 8). Morgan et al. (2000) reported that tryptophan feeding in *C. roseus* hairy roots cultures produced auxin-like effects. Based on these findings, it has been suggested that the influence of tryptophan on growth and alkaloid accumulation may be auxin mediated. In hairy roots derived from agropine *Agrobacterium* strains, the genes for the synthesis of IAA from tryptophan are inserted (Cardarelli et al. 1985). Furthermore, in roots of *Arabidopsis thaliana*, tryptophan was reported to be the precursor of IAA (Müller et al. 1998). Since tryptophan has multiple biochemical fates, such as protein, alkaloid, and hormone synthesis, the effects of metabolic manipulations on all of these pathways must be considered (Morgan et al. 2000). The enhancement on brachycerine content upon tryptophan exposure could be caused by increased levels of TDC activity; however, IAA production and subsequent alkaloid accumulation like it has already been suggested in this work cannot be ruled out. To better understand the flux-limitation in the indole pathway leading to the formation of brachycerine, future experiments should analyze TDC activity in response to tryptophan.

CONCLUSIONS

Out of the three different experimental systems examined, tip cuttings, microcuttings and leaf disks, the latter proved to be the best choice for conducting studies on the regulation of brachycerine biosynthesis. Leaf disks resulted in more consistent responses, probably due to the higher genetic homogeneity of the plant material, as well as required lower amounts of experimental biomass. Overall, the labile auxin IAA and ethrel promoted brachycerine

accumulation, whereas the chemically more stable auxins and cytokinins reduced alkaloid yield. The ethylene action inhibitor 1-MCP partially impaired the ethrel induced accumulation of brachycerine. The ethylene inhibitor AgNO₃ increased brachycerine production at all concentrations examined, probably through a mechanism of oxidative stress. Tryptophan feeding caused an increase in brachycerine content, suggesting a limitation of the indole pathway for brachycerine biosynthesis; however tryptamine did not affect alkaloid amounts. Metabolized IAA may promote brachycerine accumulation by providing indole moieties for alkaloid biosynthesis.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Janette Palma Fett (Departamento de Botânica, UFRGS) for critical reading of the manuscript. Research was supported by grants and fellowships from the Brazilian Agencies *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq), *Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior* (CAPES), and *Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul* (FAPERGS).

REFERENCES

1. Aerts RJ, Snoeijer W, Aerts-Teerlink O et al (1991) Control and biological implications of alkaloid synthesis in *Cinchona* seedlings. *Phytochem* 30:3571-3577
2. Aerts R J, Alarco A-M and De Luca V (1992) Auxins induce tryptophan decarboxylase activity in radicles of *Catharanthus* seedlings. *Plant Physiol* 100:1014-1019
3. Benavides MP (1995) Auxins and gibberellic acid effect on growth and thiophene production of root cultures of *Tagetes argentina*. In: Gustine DL and Flores HE (eds) *Phytochemicals and Health. Current Topics in Plant Physiology* (Rockville, American Society of Plant Physiologists) 15: 273-276
4. Both FL, Kerber VA, Henriques AT and Elisabetsky E (2002) Analgesic properties of umbellatine from *Psychotria umbellata*. *Pharm Biol* 40:336-341
5. Buchanan BB, Gruissem W and Jones RL (2000) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Biologists, Rockville, Maryland
6. Cardarelli M, Spano L, De Paolis A et al (1985) Identification of the genetic locus responsible for non-polar root induction by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Mol Biol* 5:385-391
7. Celenza JL (2001) Metabolism of tyrosine and tryptophan – new genes for old pathways. *Curr Opin Plant Biol* 4: 234-240.
8. Dillenburg CR and Porto ML (1985) RUBIACEAE - Tribo Psychotrieae. *Boletim Instituto de Biociências da UFRGS* 39:1-76
9. Elisabetsky E, Henriques AT, Misturini J et al (2002) Avaliação da atividade analgésica de extratos alcaloídicos de espécies de *Psychotria*. *Rev. Bras. Plantas Medic* 5(1):41-45
10. El-Sayed M and Verpoorte R (2004) Growth, metabolic profiling and enzymes activities of *Catharanthus roseus* seedlings treated with plant growth regulators. *Plant Growth Regulation* 44: 53-58.

11. Garnier F, Carpin S, Label P et al (1996) Effect of cytokinin on alkaloid accumulation in periwinkle callus cultures transformed with a light-inducible *ipt* gene. *Plant Science* 120:47-55
12. Godjin OJM, De Kam RJ, Zanetti A et al (1992) Auxin down-regulates transcription of the tryptophan decarboxylase gene from *Catharanthus roseus*. *Plant Mol Biol* 18:1113-1120
13. Gregianini TS, Silveira VC, Porto DD et al (2003) The alkaloid brachycerine is induced by ultraviolet radiation and is a singlet oxygen quencher. *Photochemistry and Photobiology* 78(5): 470-474
14. Gregianini TS, Porto DD, Nascimento NC et al (2004) Environmental and ontogenetic control of accumulation of brachycerine, a bioactive indole alkaloid from *Psychotria brachyceras*. *J Chem Ecol* 30 (10):2023-2036, 2004.
15. Harkes PAA, Krijbolder L, Libbenga KR et al (1985) Influence of various media constituents on the growth of *Cinchona ledgeriana* tissue cultures and the production of alkaloids and anthraquinones therein. *Plant Cell Tiss Org Cult* 4:199-214
16. Hashimoto T and Yamada Y (1995) Regulation of tobacco alkaloid biosynthesis. In: Gustine DL and Flores HE (eds) *Phytochemicals and Health. Current Topics in Plant Physiology* (Rockville, American Society of Plant Physiologists) 15:130-144
17. Hong S-B, Hughes EH, Shanks JV et al (2003) Role of the non-mevalonate pathway in indole alkaloid production by *Catharanthus roseus* hairy roots. *Biotechnol Prog* 19(3):1105-1108
18. Kerber VA, Gregianini TS, Paranhos JT et al (2001) Brachycerine, a novel monoterpene indole alkaloid from *Psychotria brachyceras*. *Nat. Prod J* 64(5):677-679
19. Maraschin FS (2004) Micropropagação, transformação genética e análise de genes envolvidos na síntese de alcalóide de *Psychotria brachyceras* Muell. Arg. Master's Thesis, Graduate Program in Cell and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

20. Moreno HRH, van der Heijden R and Verpoorte R (1993) Effect of terpenoid precursors feeding and elicitation of formation of indole alkaloids in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Rep* 12:702-705
21. Morgan J and Shanks JV (2000) Determination of metabolic rate-limitation by precursor feeding in *Catharanthus roseus* hairy root cultures. *Biotechnology J* 79:137-145
22. Müller A, Hillebrand H and Weiler EW (1998) Indole-3-acetic acid is synthesized from L-tryptophan in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 206:362-369
23. Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:709-714
24. Nascimento NC, Fragoso V, Moura DJ et al (2007) Antioxidant and antimutagenic effects of the crude foliar extract and the alkaloid brachycerine of *Psychotria brachyceras*. *Environ Mol Mutagen* 48(9):728-734
25. Navabpour S, Morris K, Allen R et al (2003) Expression of senescence-enhanced genes in response to oxidative stress. *J Exp Bot* 54(391):2285-2289
26. Papon N, Oudin A, Vansiri A et al (2003) Differential expression of two type-A response regulators in plant cell cultures of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *J Exp Bot* 54(388):1793-1795
27. Papon N, Bremer J, Vansiri A et al (2005) Cytokinin and ethylene control indole alkaloid production at the level of the MEP/terpenoid pathway in *Catharanthus roseus* suspension cells. *Planta Med* 71(6): 572-574
28. Pasquali G, Godjin OJM, De Waal A et al (1992) Coordinated regulation of two indole alkaloid biosynthetic genes from *Catharanthus roseus* by auxin and elicitors. *Plant Mol Biol* 18:1121-1131
29. Pasquali G, Porto DD and Fett-Neto AG (2006) Metabolic engineering of cell cultures versus whole plant complexity in production of bioactive monoterpene indole alkaloids: recent progress related to old dilemma. *J Biosci Bioeng* 101(4):287-296

30. Satdive RK, Fulzele DP and Eapen S (2003) Studies on production of ajmalicine in shake flasks by multiple shoot cultures of *Catharanthus roseus*. *Biotechnol Prog* 19:1071-1075
31. Silvestrini A, Pasqua G, Botta B et al (2002) Effects of alkaloid precursors feeding on a *Camptotheca acuminata* cell line. *Plant Physiol Biochem* 40:749-753
32. Sokal RR and Rohlf FJ (eds) (1981) *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. WH Freeman and company, San Francisco
33. Taiz L and Zeiger E (eds) (2002) *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Sunderland
34. Whitmer S, Canel C, Hallard D et al (1998) Influence of precursor's availability on alkaloid accumulation by transgenic cell line of *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol* 116(2):853-857
35. Zhao J, Hu Q, Guo Y-Q and Zhu W-H (2001) Effects of stress factors, bioregulators, and synthetic precursors on indole alkaloid production in compact callus clusters cultures of *Catharanthus roseus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 55:693-698

LEGEND OF FIGURES

Figure 1. Brachycerine structure

Figure 2. Effects of IBA exposure on brachycerine content in microcuttings (a) and leaf disks (b) of *P. brachyceras* compared with respective controls (without auxin). Bars sharing a letter within each day are not significantly different at $P \leq 0.05$ by a Duncan test.

Figure 3. Effects of 2,4-D exposure on brachycerine content in cuttings (a), microcuttings (b) and leaf disks (c) of *P. brachyceras* compared with respective controls (without auxin). Bars sharing the same letter within each day are not significantly different at $P \leq 0.05$ by a Duncan test.

Figure 4. Effects of IAA exposure on brachycerine content in cuttings (a), microcuttings (b) and leaf disks (c) of *P. brachyceras* compared with respective controls (without auxin). Bars sharing the same letter within each day are not significantly different at $P \leq 0.05$ by a Duncan test.

Figure 5. Effects of BAP exposure on brachycerine content in leaf disks of *P. brachyceras* compared with respective controls (without cytokinin). Bars sharing the same letter within each day are not significantly different at $P \leq 0.05$ by a Duncan test.

Figure 6. Effects of Zeatin exposure on brachycerine content in leaf disks of *P. brachyceras* compared with respective controls (without cytokinin). Bars sharing the same letter within each day are not significantly different at $P \leq 0.05$ by a Duncan test.

Figure 7. Effects of Ethylene and 1-MCP (ethylene inhibitor) exposure on brachycerine content in leaf disks of *P. brachyceras* compared with respective controls. Bars sharing the same letter within each day are not significantly different at $P \leq 0.05$ by a Duncan test.

Figure 8. Effect of Tryptophan (1 mM) feeding on brachycerine content in leaf disks of *P. brachyceras* compared with respective controls. Bars sharing the same letter within each day are not significantly different at $P \leq 0.05$ by a Duncan test.

Figure 1

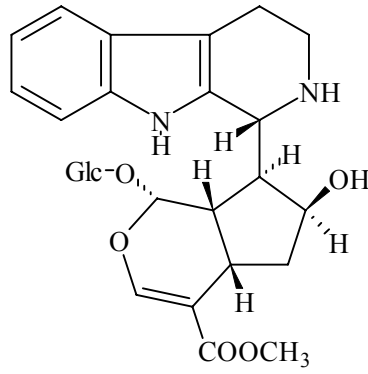


Figure 2

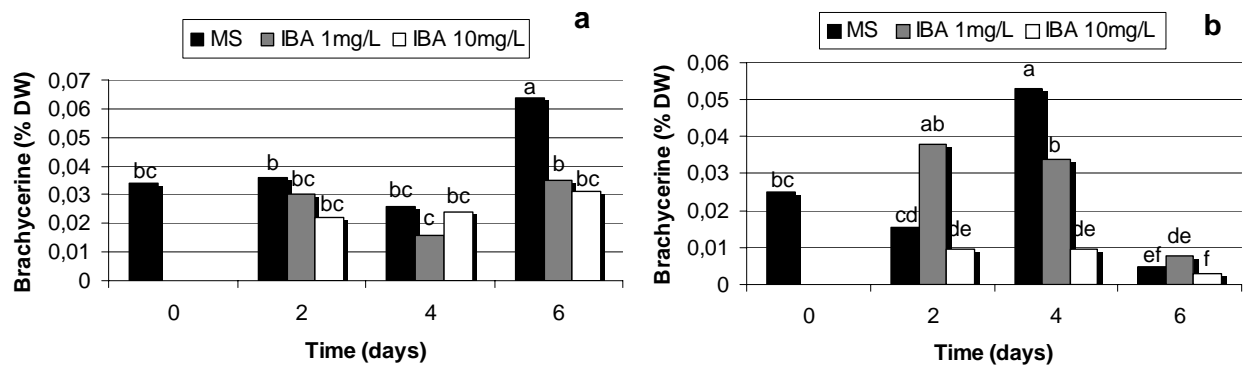


Figure 3

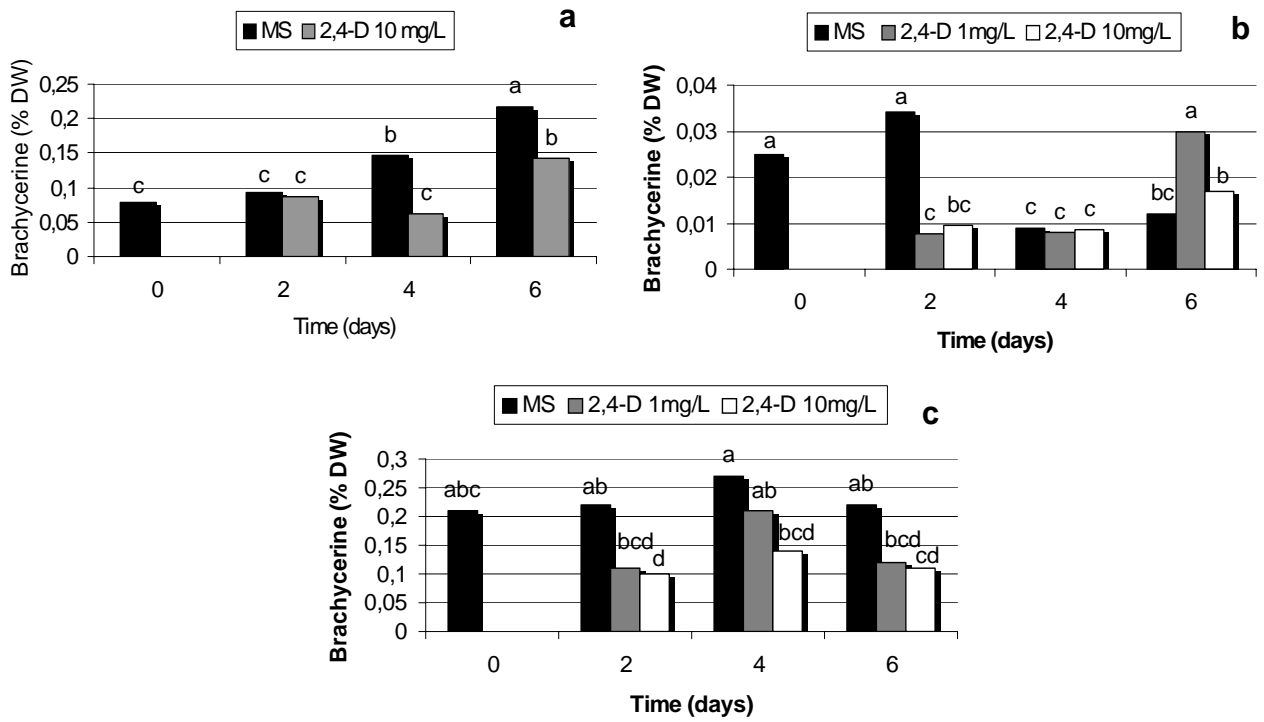


Figure 4

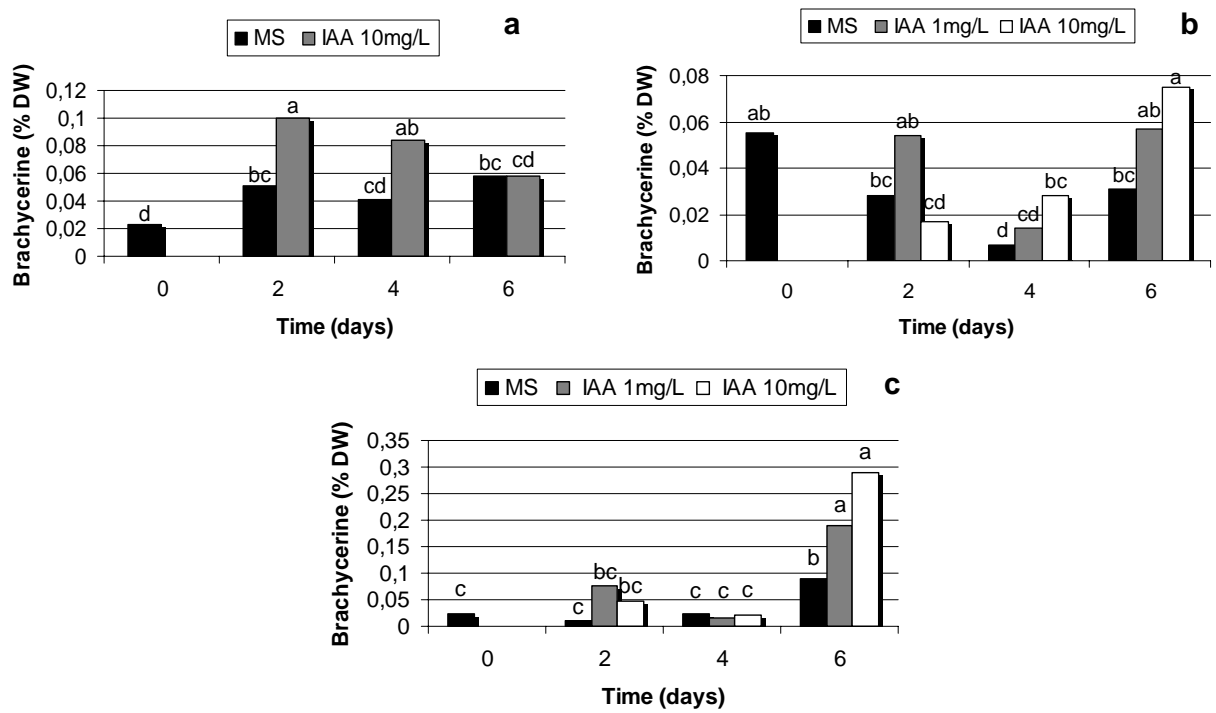


Figure 5

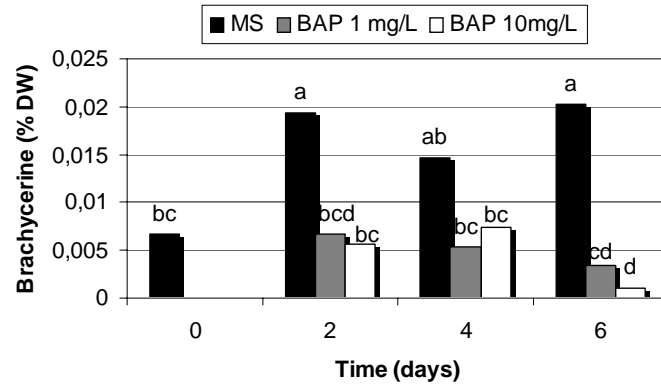


Figure 6

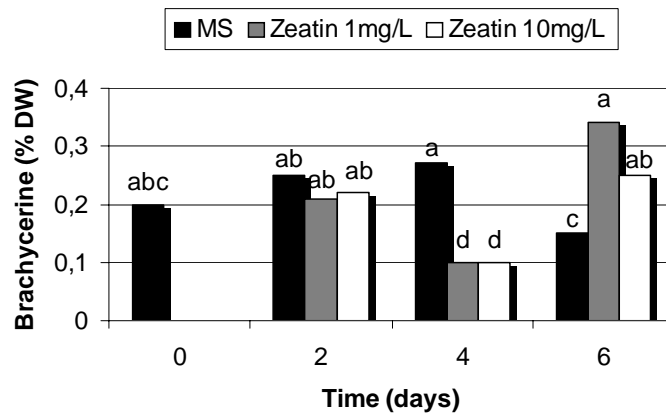


Figure 7

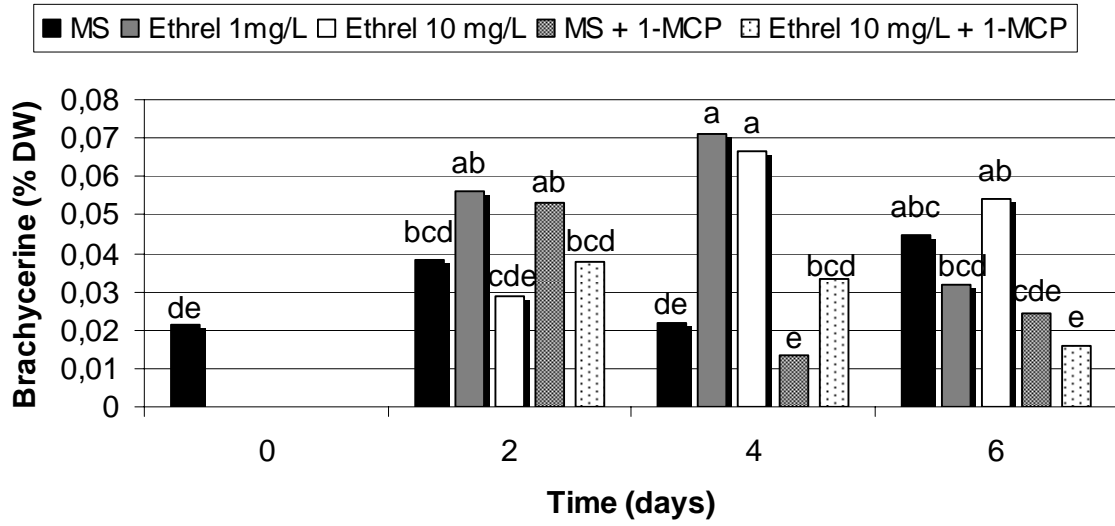
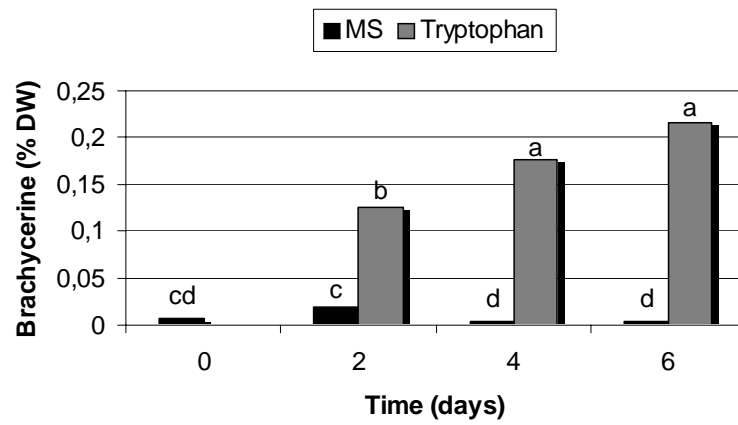


Figure 8



CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O sistema de discos foliares mostrou-se como o mais apropriado dentre os avaliados por trazer vantagens operacionais importantes, como rapidez e necessidade reduzida de biomassa experimental, para estudos bioquímicos e moleculares detalhados do processo de indução de acúmulo do alcalóide. Também se destaca o aspecto de simplificação do sistema experimental e a maior capacidade de obter-se homogeneidade genética relativa do material vegetal, mediante mistura de discos oriundos de diferentes folhas antes da distribuição entre tratamentos.

O acúmulo de braquicerina mostrou ser regulado diferentemente por diversos hormônios vegetais. Nos tratamentos estudados no presente trabalho, constatou-se diminuição do acúmulo de braquicerina em plantas tratadas com 2,4-D, IBA, BAP e ZEA (apenas no quarto dia de tratamento) e aumento do alcalóide em exposição à AIA, ZEA (apenas no sexto dia de tratamento) e etileno. O inibidor de etileno AgNO_3 aumentou o conteúdo de braquicerina, provavelmente devido a um mecanismo de estresse oxidativo induzido pela prata, enquanto 1-MCP reduziu consideravelmente o acúmulo de braquicerina frente à exposição a etileno. Os precursores da rota indólica de biossíntese dos alcalóides, triptofano e triptamina, geraram respostas distintas, aumentando e não afetando a produção de braquicerina, respectivamente.

Esses resultados contribuem para uma melhor compreensão da regulação do metabolismo deste alcalóide, apresentando diversas implicações no manejo eficaz de plantas e cultivos de *P. brachyceras* que poderão ser utilizadas na produção do alcalóide numa eventual produção de maior escala.

No sistema de discos foliares, novos experimentos devem ser realizados visando esclarecer a hipótese de que o aumento do alcalóide braquicerina frente à AIA envolve

etileno e também de que o aumento frente a triptofano pode ser devido em parte à produção de AIA. O primeiro pode ser delineado utilizando o tratamento de AIA juntamente com o bloqueador de etileno 1-MCP, e o segundo, testando em tratamentos separados concentrações equimolares de triptofano e AIA para comparação dos níveis de aumento do conteúdo de braquicerina. Infiltração a vácuo de triptamina em discos foliares poderá também ser examinada, com vistas à superação parcial de barreiras de entrada nas células. A expressão do gene *tdc*, que possivelmente está envolvido na rota de biossíntese desse alcalóide, também poderá ser monitorada por RT-PCR em diferentes tratamentos, assim como a atividade enzimática de triptofano descarboxilase pode ser quantificada sob as mesmas condições. Estas atividades encontram-se em andamento.

REFERÊNCIAS

1. ADJIBADE, Y.; WENIGER, B.; QUIRION, J. C.; KUBALLA, B.; CABALION, P. & ANTON, R. Dimeric alkaloids from *Psychotria fosteriana*. *Phytochem.*, 31: 317-319, 1992.
2. BÁLVÁNYOS, L.; KURSINSZKI, L. & SZŐKE, É. The effect of plant growth regulators on biomass formation and lobeline production of *Lobelia inflata* L. hairy root cultures. *Plant Growth Regulation*, 34: 339-345, 2001.
3. BENAVIDES, M. P. Auxins and gibberellic acid effect on growth and thiophene production of root cultures of *Tagetes argentina*. In: Gustine, D. L. & Flores, H. E. *Phytochemicals and Health*. Rockville, American Society of Plant Physiologists, p. 273-276, 1995.
4. BERETZ, A.; ROTH-GEORGER, A.; CORRE, G.; KUBALLA, B.; ANTON, R & CAZENALE, J. P. Polyindolic alkaloids from *Psychotria fosteriana*. Potent inhibitors of the aggregation of human platelets. *Planta Med.*, 4: 300-303, 1985.
5. BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W. & JONES, R. L. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Biologists, Rockville, Maryland, 2000.
6. CONTIN, A.; VAN DER HEIJDEN, R.; LEFEBER, A. W. & VERPOORTE, R. The iridoid glucoside secologanin is derived from the novel triose phosphate/pyruvate pathway in a *Catharanthus roseus* cell culture. *FEBS Lett.*, 434: 413-419, 1998.
7. CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M. & LEWIS, N. G. Natural Products (Secondary Metabolites). In: Buchanan, B. B.; Gruissem, W. & Jones, R. L. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, p.1102-1156, 2000.
8. CROZIER, A.; KAMIYA, Y.; BISHOP, G. & YOKOTA, T. Biosynthesis of hormones and elicitor molecules. In: Buchanan, B. B.; Gruissem, W. & Jones, R.

L. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, p. 850-929, 2000.

9. DAVIS, A. P.; BRIDSON, D.; JARVIS, C. & GOVAERTS, R. The typification and characterization of the genus *Psychotria* L. (Rubiaceae). *Bot. J. Linn. Soc.*, 135: 35-42, 2001.

10. DILLENBURG, C. R. & PORTO, M. L. RUBIACEAE - Tribo Psychotrieae. *Boletim Instituto de Biociências da UFRGS*, 39: 1-76, 1985.

11. EL-SAYED, M. & VERPOORTE, R. Growth, metabolic profiling and enzymes activities of *Catharanthus roseus* seedlings treated with plant growth regulators. *Plant Growth Regul.*, 44: 53-58, 2004.

12. ELISABETSKY, E. & CASTILHOS, Z. C. Ethnopharmacology of medicinal plants used as analgesic by amazonian caboclos (Brazil) as a basis for selecting plants for investigation. *Intern. J. Crude Drug Res.*, 28: 309-320, 1990.

13. ELISABETSKY, E.; AMADOR, T. A.; ALBUQUERQUE, R. R.; NUNES, D. S. & CARVALHO, A. C. T. Analgesic activity of *Psychotria colorata* (Willd. ex R.&S.) Muell. Arg. alkaloids. *J. Ethnopharmac.*, 48: 77-83, 1995.

14. ELISABETSKY, E.; AMADOR, T. A.; LEAL, M. NUNES; D. S. (*et al.*) Merging ethnopharmacology with chemotaxonomy: an approach to unveil bioactive natural products. The case of *Psychotria* alkaloids as potential analgesics. *Ciência e Cultura*, 49: 378-385, 1997.

15. FACHINI P.J. & DICOSMO F., 1991. Secondary metabolite biosynthesis in cultured cells of *Catharanthus roseus* (L.) G. 1991.

16. FACCHINI, P. J. Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 52: 29-66, 2001.

17. GARNIER, F.; CARPIN, S.; LABEL, P.; CRECHE J.; RIDEAU M. & HAMDI S. Effect of cytokinin on alkaloid accumulation in periwinkle callus cultures transformed with a light-inducible *ipt* gene. *Plant Sci.*, 120: 47-55, 1996.
18. GODJIN, O. J. M.; DE KAM, R. J.; ZANETTI, A.; SCHILPEROORT, R.A. & HOGE J.H.C. Auxin down-regulates transcription of the tryptophan decarboxylase gene from *Catharanthus roseus*. *Plant Mol. Biol.*, 18: 1113-1120, 1992.
19. GREGIANINI, T. S.; SILVEIRA, V. C.; PORTO, D. D.; KERBER, V. A.; HENRIQUES, A. T. & FETT-NETO, A. G. The alkaloid brachycerine is induced by ultraviolet radiation and is a singlet oxygen quencher. *Photochem. Photobiol.*, 78(5): 470-474, 2003.
20. HARKES, P. A. A.; KRIJBOLDER, L.; LIBBENGA, K. R.; WIJNSMA, R.; ARENGE, T.N. & VERPOORTE, R. Influence of various media constituents on the growth of *Cinchona ledgeriana* tissue cultures and the production of alkaloids and anthraquinones therein. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 4: 199-214, 1985.
21. HART, N. K.; JOHNS, S. R.; LAMBERTON, J. A. & SUMMONS, R. E. Psychoridine, a C₅₅H₆₂N₁₀ alkaloid from *Psychotria beccarioides* (Rubiaceae). *Aust. J. Chem.*, 27: 639-646, 1974.
22. HARTLEY, S. E. & JONES, C. G. Plant chemistry and herbivory, or why the world is green. In: Crawley, M. J. *Plant Ecology*. Blackwell Science, Oxford, p. 284-324, 1997.
23. HASHIMOTO, T. & YAMADA, Y. Alkaloid biogenesis: molecular aspects. *Ann. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol.*, 45: 257-285, 1994.
24. HEMMERLIN, A.; HOEFFLER, J-F.; MEYER, O.; TRITSCH, D.; KAGAN, I. A.; GROSDEMANGE-BILLIARD, C.; ROHMER, M. & BACH, T. J. Cross-talk between the cytosolic mevalonate and the plastidial methylerythritol phosphate pathways in tobacco bright yellow-2 cells. *J. Biol. Chem.*, 278 (29): 26666-26676, 2003.

25. HONG, S-B.; HUGHES, E. H.; SHANKS, J. V.; SAN K.Y. & GIBSON S.I. Role of the non-mevalonate pathway in indole alkaloid production by *Catharanthus roseus* hairy roots. *Biotechnol. Prog.*, 19(3): 1105-1108, 2003.
26. KARGI F. & GANAPATHI B. Effects of precursors and stimulating agents on formation of indole alkaloids by *C. roseus* in a biofilm reactor. *Enzyme and Microbial Technology*, 13 (8), p.643-647, 1991.
27. KEPINSKI, S. The anatomy of auxin perception. *Bioessays*, 29(10): 953-956, 2007.
28. KERBAUY, G. B. *Fisiologia Vegetal*. 2004.
29. KERBER, V. A.; GREGIANINI, T. S.; PARANHOS, J. T.; SCHWAMBACH, J.; FARIAS, J.; FETT, J. P.; FETT-NETO, A. G.; ZUANAZZI, J. A. S.; QUIRION, J.; ELISABETSKY, E. & HENRIQUES, A. T. Brachycerine, a novel monoterpene indole alkaloid from *Psychotria brachyceras*. *J. Nat. Prod.*, 64(5): 677-679, 2001.
30. KERBER, V. A.; PASSOS, C. S.; VERLI, H.; FETT-NETO, A. G.; QUIRION, J. P. & HENRIQUES, A. T. Psychollatine, a Glucosidic Monoterpene Indole Alkaloid from *Psychotria umbellata*. *J Nat. Prod.*, 2008. Feb 21 [Epub ahead of print] DOI 10.1021/np0703951.
31. KNOBLOCH, K. H. & BERLIN, J. Influence of medium composition on the formation of secondary compounds in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Z. Naturforsch*, 35c: 551-556, 1980.
32. KUTCHAN, T. M. Alkaloid biosynthesis - the molecular basis for metabolic engineering in plants. *Plant Cell*, 7: 1059-1070, 1995.
33. LEAL, M. B. Estudo Psicofarmacológico de Espécies de *Psychotria* (Rubiaceae) do estado do Rio Grande do Sul. Tese de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1994.

34. LEAL, M. B. & ELISABETSKY, E. Opioid-like activity of *Psychotria brachypoda*. *Intern. J. Pharmacogn.*, 34 (4): 267-272, 1996.
35. LEÃO, M. Z.; AMADA, T.; KERBER, V.; ELISABETSKI, E. & HENRIQUES, A. Analgesic effect of the indole alkaloid brachypodine. Resumo. 5^a Jornada de Investigación. Asociación de Universidades Grupo Montevideo, Universidad Nacional de Asunción. San Bernardino, Paraguai, 10 a 12 de setembro de 1997, p.92, 1997.
36. LEE-PARSON, C.W.T. & ROYCE, A.J. Precursors limitations in methyl jasmonate-induced *Catharanthus roseus* cell cultures. *Plant Cell Rep.* 25:607-612, 2006.
37. LIBOT, F.; MIET, C.; KUNESH, N.; POISSON, J. E.; PUSSET, J. & SÉVENET, T. Rubiacées d'océanie: alcaloïdes de *Psychotria oleoides* de Nouvelle-Calédonie et de *Calycodendron milnei* du Vanuatu (Nouvelle-Hébrides). *J. Nat. Prod.*, 50: 468-473, 1987.
38. MEMELINK, J.; VERPOORTE, R. & KIJNE, J. W. ORCAnization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. *Trends Plant Sci.*, 6(5): 212-218, 2001.
39. MERILLON, J.M.; OULHAZI, L.; DOIREAU, P.; CHENIEUX, J.-C. & RIDEAU, M. Metabolic changes and alkaloid production in habituated and non-habituated cells of *Catharanthus roseus* grown in hormone free medium. Comparing hormone deprived non-habituated cells with habituated cells. *J. Plant Physiol.* 134, 54–60, 1989.
40. MORENO, H. R. H.; VAN DER HEIJDEN, R. & VERPOORTE, R. Effect of terpenoid precursors feeding and elicitation of formation of indole alkaloids in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Rep.*, 12: 702-705, 1993.
41. MORGAN, J. & SHANKS, J. V. Determination of metabolic rate-limitation by precursor feeding in *Catharanthus roseus* hairy root cultures. *Biotechnol. J.*, 79: 137-145, 2000.
42. NASCIMENTO, N. C.; FRAGOSO, V.; MOURA, D. J.; SILVA A.C.R.; FETT-

NETO, A. G & SAFFI, J. Antioxidant and antimutagenic effects of the crude foliar extract and the alkaloid brachycerine of *Psychotria brachyceras*. *Environ. Mol. Mutagen.*, 48(9): 728-734, 2007.

43. OKSMAN-CALDENTY, K. M. & INZÉ, D. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends Plant Sci.*, 9: 433-440, 2004.

44. PAPON, N.; BREMER, J.; VANSIRI, A.; ANDREU F.; RIDEAU, M. & CRÈCHE J. Cytokinin and ethylene control indole alkaloid production at the level of the MEP/terpenoid pathway in *Catharanthus roseus* suspension cells. *Planta Med.*, 71(6): 572-574, 2005.

45. PASQUALI, G.; GODJIN, O. J. M.; DE WAAL, A.; VERPOORTE, R.; SCHILPEROORT, R.A.; HOGE, J.H. & MEMELINK, J. Coordinated regulation of two indole alkaloid biosynthetic genes from *Catharanthus roseus* by auxin and elicitors. *Plant Mol. Biol.*, 18: 1121-1131, 1992.

46. 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. *Biosci. Bioeng. J.*, 101(4): 287-296, 2006.

47. PAYNE, G.; BRINGI, V.; PRINCE, C. & SHULER, M. *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems*, 1991.

48. RAMACHANDRA RAO, S. & RAVISHANKAR, G. A. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.*, 20: 101-153, 2002.

49. RHODES, M. J. C. Physiological roles for secondary metabolites in plants: some progress, many outstanding problems. *Plant Mol. Biol.*, 24: 1-20, 1994.

50. ROBERTS, M. F. & STRACK, D. Biochemistry and physiology of alkaloids and betalains. In: WINK, M. Biochemistry of plant secondary metabolism. *Annu. Plant Rev.*, 1:17-78, 1999.
51. ROBERTS, M. F. & WINK, M. *Alkaloids, biochemistry, ecology and medicinal applications*. New York and London, Plenum Press, 1998.
52. ROTH, A.; KUBALLA, B.; BOUNTHAN, C.; CABALION, P. SÉVENET, T.; BECK, J. P. & ANTON, R. Cytotoxic activity of polyindole alkaloids of *Psychotria fosteriana* (Rubiaceae). *Planta Med.*, 5: 450-453, 1986.
53. SAKAKIBARA, H. Cytokinin biosynthesis and regulation. *Vitam. Horm.*, 72: 271-87, 2005.
54. SANTOS, L. V. *Psychotria suterella* Mull. Arg.: Caracterização dos alcalóides, análise farmacológica e cultivo *in vitro* de calos e raízes. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.
55. SANTOS, L. V.; FETT-NETO, A. G.; KERBER, V. A.; ELISABETSKY, E.; QUIRION, J. C. & HENRIQUES, A. T. Indole monoterpene alkaloids from leaves of *Psychotria suterella* Müll. Arg. (Rubiaceae). *Biochem. System. Ecol.*, 29: 1185-1187, 2001.
56. SOLÍS, P. N.; WRIGHT, C. W.; GUPTA, M. P. & PHILLIPSON, J. D. Quinoline alkaloids from *Psychotria glomerulata*. *Phytochem.*, 44: 963-969, 1995.
57. TAIZ, L. & ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 3a ed. 2004.
58. VERPOORTE, R.; VAN DER HEIJDEN, R.; MORENO, P.R.H. Biosynthesis of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus*. *The alkaloids*, v. 49, cap. 3, p.221-229, 1997.

59. WHITMER, S.; VAN DER HEIJDEN, R. & VERPOORTE R. Effect of precursor feeding on alkaloid accumulation by a tryptophan decarboxylase over-expressing transgenic cell line T22 of *Catharanthus roseus*. *Biotechnol. J.*, 96 (2):193-203, 2002.
60. WHITMER, S.; CANEL, C. & HALLARD, D. (et al) Influence of precursor availability on alkaloid accumulation by transgenic cell line of *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol.*, 116(2): 853-857, 1998.
61. WINK, M. Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theor. Appl. Gen.*, 75: 225-233, 1988.
62. WINK, M. Introduction: biochemistry, role and biotechnology of secondary metabolites. In: Wink, M. (ed.) *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism.*, Annual Plant Reviews, vol 2, Sheffield Academic Press, p. 1-16., 358p., 1999.
63. WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochem.*, 64: 3-19, 2003.
64. WOODWARS, A.W. & BARTEL B. A receptor for auxin. *The Plant Cell*, 17:2425-2429, 2005.
65. ZHAO, J.; HU, Q.; GUO, Y.-Q. & ZHU, W.-H. Effects of stress factors, bioregulators, and synthetic precursors on indole alkaloid production in compact callus clusters cultures of *Catharanthus roseus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55:693-698, 2001.
66. ZHAO, T.; DAVIS, L. C. & VERPOORTE, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.*, 23: 283-333, 2005.
67. ZENK, M.H.; EL-SHAGI, H.; ARENS, H. STÖCKIGT, J.; WEILER, E.W. & DEUS, B. Formation of the indole alkaloids serpentine and ajmalicine in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. In BARE, W.; REINHARD, E. & ZENK, M.H. *Plant Tissue Culture and Its Bio-Technological Application*. Springer-Verlag, p. 27-44, 1977.