

LOURDES IAREMA

**Enxertia e propagação *in vitro* de fáfia [*Pfaffia glomerata*
(Spreng.) Pedersen]**

Tese apresentada à Universidade Federal
de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Botânica
para obtenção do Título de *Doctor Scientiae*

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

II 1 e
2008

Iarema, Lourdes, 1976-

Enxertia e propagação *in vitro* de fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] / Lourdes Iarema.
– Viçosa, MG, 2008.
xiv, 170f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Wagner Campos Otoni.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Plantas medicinais. 2. Enxertia. 3. *Pfaffia glomerata* - Enxertia. 4. Plantas medicinais - Propagação. 5. Propagação vegetativa. 6. Folhas - Anatomia. 7. Planta - Anatomia. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 633.88

LOURDES IAREMA

**Enxertia e propagação *in vitro* de fáfia [*Pfaffia glomerata*
(Spreng.) Pedersen]**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica para obtenção do Título de *Doctor Scientiae*

APROVADA: 10 de junho de 2008.

Prof.^a Luzimar Campos da Silva
(Co-orientadora)

Prof. Carlos Roberto de Carvalho
(Co-orientador)

Prof. Rogério Ferreira Ribas

Prof. Vespasiano Borges de Paiva Neto

Prof. Wagner Campos Otoni
(Orientador)

**Vencer os outros não é uma grande vitória
Vitorioso é aquele que consegue vencer a si mesmo
A vitória sobre nós mesmos é muito mais difícil,
Pois requer muita coragem, mais disciplina,
Mais perseverança e, maiores desafios...**

Ao meu marido Rogério, aos meus
pais Miguel e Erna, e, a minha irmã Alice,
Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todos os momentos.

À minha família, pela confiança, compreensão e apoio durante todos os momentos da minha vida, sem os quais jamais teria atingido mais esta etapa.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e, em especial, ao Programa de Pós-Graduação em Botânica, pela oportunidade de realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Wagner Campos Otoni, pela orientação, carinho, amizade, confiança, experiências compartilhadas e apoio, nessa importante fase de aprendizado e preparação para o mercado de trabalho.

Aos professores Luzimar Campos da Silva, Luiz Cláudio de Almeida Barbosa e Carlos Roberto de Carvalho, pela co-orientação, aconselhamentos, auxílio, críticas, sugestões e motivação dispensada nesse trabalho.

Aos professores Leandro Grossi de Freitas e Rogério Ferreira Ribas, pela colaboração e dedicação em importantes etapas do trabalho.

Ao professor Cosme Damião Cruz, pela colaboração nas análises e interpretações estatísticas.

Aos professores Marco Antônio Oliva Cano, Vicente Wagner Dias Casali, Fernando Luiz Finger e Vitor Hugo pela disponibilidade de infra-estrutura essencial à condução dos experimentos.

A todos os mestres envolvidos, direta ou indiretamente, em minha formação, e em especial, ao professor Eldo Antônio Monteiro da Silva pelo exemplo de conduta, profissionalismo e, principalmente, perseverança.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pela concessão dos materiais avaliados nesse estudo. Ao Laboratório de Anatomia Vegetal, Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos, Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais II, Laboratório de Química do Solos e a Unidade de Crescimento de Plantas, pela viabilidade na condução das diferentes etapas do experimento.

Aos técnicos da UFV, Zé Maria, Vânia e Edite (DBV), Carlos (DPS), Rogério (UCP), Zé Luiz (LASA), Eduardo, Antônio Cordeiro (DBV) e Lili (LCTII), pela atenção, auxílio e sugestões.

Aos estagiários Virgílio Loriato e Diego Rocha, aos colegas Katryne, Rony, Marcela, Fabiana, Ana Claudia, André, Donizetti, Eduardo, Cláudio pela valiosa contribuição e auxílio direto na obtenção desses resultados.

Aos demais colegas do LCTII e do laboratório de Anatomia Vegetal, pelo convívio e apoio recebido, no qual eu agradeço em nome de uma pessoa que eu acho que representa o verdadeiro sentido das palavras amizade e profissionalismo, Ana Claudia, obrigada pelos inúmeros momentos de ausência em sua família em função da dedicação neste trabalho.

Ao Patch e a Gabriela pela compreensão e convívio.

A todos os meus colegas de Curso e dos Laboratórios que passei, funcionários e professores desta instituição, pessoas os quais tornaram o ambiente de agradável convívio e, contribuíram para o progresso profissional e pessoal.

Ao meu marido pelo auxílio, ausência, compreensão, apoio e companheirismo durante mais esta jornada.

Aos meus pais e a minha irmã querida pela compreensão, paciência e apoio, que ajudaram a suportar a distância nestes últimos anos.

Muito obrigada, a todos que contribuíram para esta conquista!

BIOGRAFIA

LOURDES IAREMA, filha de Miguel Iarema Sobrinho e Erna Iarema, nasceu em 29 de agosto de 1976, em Matelândia, Estado do Paraná.

No ano de 1999 concluiu o Curso de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas pela Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT) – Campus Universitário de Alta Floresta.

Em Agosto de 2001 iniciou, na UNEMAT, o Programa de Pós-graduação “Lato Sensu” em Educação Ambiental Párea a Conservação da Amazônia Norte-Matogrossense, submetendo-se à defesa em 19 de agosto de 2003.

Em março de 2002 iniciou o curso de mestrado em Botânica, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), submetendo-se à defesa em 20 de fevereiro de 2004.

Em março de 2004 ingressou no Programa de Pós-graduação em Botânica da UFV, em nível de doutorado, submetendo-se à defesa de tese em 10 de junho de 2008.

ÍNDICE

RESUMO	ix
ABSTRACT	xii
INTRODUÇÃO GERAL	1
Referências Bibliográficas	6
CAPÍTULO 1. The Brazilian ginseng (<i>Pfaffia</i> sp.)	10
The genus <i>Pfaffia</i> (Amaranthaceae)	10
Economic importance	12
Chemical and pharmacological properties	13
<i>Pfaffia glomerata</i>	16
<i>Pfaffia iresinoides</i>	20
<i>Pfaffia paniculata</i>	20
<i>Pfaffia tuberosa</i>	21
Conventional propagation and <i>in vitro</i> propagation	21
<i>Pfaffia glomerata</i>	23
<i>Pfaffia tuberosa</i>	26
<i>Pfaffia iresinoides</i>	28
General micropropagation protocol	28
Disinfection and plant establishment	28
Shoot proliferation and rooting	30
Acclimatization and transplanting	30
References	32
CAPÍTULO 2. Enxertia <i>in vitro</i> em fáfia [<i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng.) Pedersen]	41
Introdução	41
Material e Métodos	44
Origem do material vegetal e condições de crescimento	44
Seleção do material	44

Enxertia <i>in vitro</i>	45
Características avaliadas <i>in vitro</i>	45
Delineamento experimental	46
Resultados	47
Enxertia <i>in vitro</i>	47
Discussão	52
Referências Bibliográficas	57
CAPÍTULO 3. Desenvolvimento <i>ex vitro</i> de fáfia [<i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng.) Pedersen] propagadas pela enxertia <i>in vitro</i>	61
Introdução	61
Material e Métodos	64
Aclimatização	64
Avaliação de parâmetros fisiológicos	65
Pigmentos cloroplastídicos	65
Determinação das trocas gasosas	65
Avaliações em condições <i>ex vitro</i>	65
Avaliações da taxa fotossintética <i>in vitro</i>	66
Determinação da fluorescência da clorofila <i>a</i>	66
Análises de campo	66
Características agronômicas	67
Determinação do índice de galhas	67
Delineamento experimental	67
Resultados	68
Aclimatização	68
Parâmetros fisiológicos	68
Análises de campo	74
Discussão	82
Referências Bibliográficas	88
CAPÍTULO 4. Caracterização histológica da enxertia <i>in vitro</i> de fáfia [<i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng.) Pedersen]	92
Introdução	92
Material e Métodos	95
Análise histológica	95
Delineamento experimental	97

Resultados	98
Discussão	104
Referências Bibliográficas	110
CAPÍTULO 5. Produção de β -ecdisona em acessos de fáfia [<i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng.) Pedersen] propagados via enxertia <i>in vitro</i>	114
Introdução	114
Material e Métodos	116
Análise química	117
Delineamento experimental	118
Resultados	119
Discussão	125
Referências Bibliográficas	132
CAPÍTULO 6. Propagação <i>in vitro</i> de fáfia [<i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng.) Pedersen] ..	136
Introdução	136
Material e Métodos	138
Material vegetal	138
Características avaliadas	138
Área foliar	139
Pigmentos cloroplastídicos	139
Avaliações da taxa fotossintética	139
Determinação da fluorescência da clorofila <i>a</i>	139
Determinação de macro e micronutrientes	140
Análise em microscopia de luz	140
Análise em microscopia eletrônica de varredura	140
Perda de água do sistema	141
Delineamento experimental	141
Resultados	142
Discussão	155
Referências Bibliográficas	164
CONSIDERAÇÕES FINAIS	169

RESUMO

IAREMA, Lourdes. D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, junho de 2008. **Enxertia e propagação *in vitro* de fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]**. Orientador: Wagner Campos Otoni. Co-orientadores: Luzimar Campos da Silva, Carlos Roberto de Carvalho e Luiz Cláudio de Almeida Barbosa.

Pfaffia glomerata, popularmente conhecida como Ginseng brasileiro, é uma importante espécie medicinal cuja demanda no mercado e a forma de extrativismo levaram a sua inclusão na lista de espécies prioritárias para a conservação. Apresenta grande diversidade genética entre suas populações naturais, sendo essa variabilidade tanto na produção de biomassa das raízes, órgão de interesse na espécie, quanto na concentração de princípio ativo (β -ecdisona). Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivos: (a) avaliar a eficiência da enxertia *in vitro* na propagação de dois acessos de *Pfaffia glomerata*, visando a estabelecer combinação compatível entre um acesso de elevada (2202) e um de baixa produção do princípio ativo (2209), para aumentar a produção do composto de interesse comercial; e (b) analisar o potencial fotoautotrófico de *P. glomerata* propagadas *in vitro*, comparando-se parâmetros fisiológicos e estruturais das plantas propagadas sob condições heterotróficas, fotomixotrófica e fotoautotrófica. Na enxertia *in vitro* foram utilizados segmentos internodais como hipobioto e ápice caulinar como epibioto, de plantas cultivadas *in vitro*, para estabelecer as combinações recíprocas entre os acessos utilizados, auto-enxertia (controle) e testemunhas (plantas sem enxerto). As avaliações foram realizadas quanto ao percentual de pegamento e características de crescimento dos enxertos durante a etapa *in vitro* (aos 30 dias) e quanto à sobrevivência e desenvolvimento das plantas enxertadas, tanto na condição *in vitro* quanto *ex vitro*, sendo monitoradas por 360 dias após a enxertia. Em toda a etapa de aclimatização foram analisados parâmetros fisiológicos como teor de pigmentos cloroplastídicos, fluorescência da clorofila *a* e taxa fotossintética. As regiões de conexões de todos os tratamentos que envolveram enxertia foram analisadas histologicamente, nos períodos de 7, 14, 21, 28, 35, 70 e 100 dias de cultivo após a enxertia *in vitro*. O índice de pegamento da enxertia variou de regular à excelente em 80% das plantas em todas as combinações. As plantas enxertadas apresentaram menor média de crescimento *in vitro* em relação às testemunhas, porém o

estabelecimento e o desenvolvimento dos enxertos *in vitro* e *ex vitro* não ficaram comprometidos. Foram observadas mortalidade e diferenças no crescimento entre os tratamentos somente na fase de estabelecimento *in vitro*. Analisando os padrões fisiológicos não foram detectadas diferenças estatísticas entre os tratamentos, no entanto, considerando as condições de cultivo a que foram submetidas, a casa de vegetação foi o melhor ambiente. Em condição de campo foi notável a diferença na fenologia dos dois acessos utilizados, principalmente em relação à produção de raízes e inflorescências, bem como na susceptibilidade ao ataque de insetos. As plantas que apresentaram maior concentração do princípio ativo nas folhas foram constituídas pelo acesso 2202; estas também apresentaram maior número de danos ocasionados pelo ataque de insetos na parte aérea. O acesso considerado o maior produtor de princípio ativo foi susceptível ao ataque de nematóides e apresentou sintomas de galhas, enquanto o outro acesso mostrou-se resistente. Os nematóides influenciaram a produção do princípio ativo nas raízes, mas não comprometeram o desenvolvimento das plantas. A enxertia proporcionou maior concentração do princípio ativo quando a planta foi constituída pelo acesso 2202 como epibioto e pelo acesso 2209 como hipobioto, comprovando as interações fisiológicas existentes entre os componentes da enxertia. As análises anatômicas indicaram que a formação do calo na região de união foi resposta imediata à injúria, e a reconexão vascular das plantas enxertadas ocorreu aos 21 dias após a realização da enxertia. Não houve diferença estrutural no processo de cicatrização entre os tratamentos. Os resultados indicaram a eficiência da aplicação da enxertia *in vitro* para estabelecer diferentes combinações de acessos de *P. glomerata* e obter maior concentração de β -ecdisona nas raízes. (b) Foram utilizados segmentos nodais para propagação em meio contendo 0 e 30 g L⁻¹ de sacarose, combinado com tipos de vedação: 1. uma camada de filme plástico de PVC transparente (PVC); 2. tampa rígida de polipropileno autoclavável (TSO); 3. tampa rígida de polipropileno autoclavável com um orifício (T1O); e 4. TR com dois furos (T2O), cobertos por membranas permeáveis a trocas gasosas. O experimento foi mantido em sala de crescimento, à temperatura de 25 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 16 horas com irradiância de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Foram observadas diferenças morfológicas significativas entre os tratamentos; as plantas cultivadas na presença de sacarose e de membrana apresentaram-se mais vigorosas. No entanto, analisando os padrões de crescimento, as plantas cultivadas na ausência de sacarose e na presença de membranas não diferiram estatisticamente dos demais tratamentos cultivados heterotroficamente. A sacarose influenciou as respostas fisiológicas, sendo encontrados maiores teores de pigmentos

cloroplastídicos e maior quantidade de massa seca na presença desse carboidrato, enquanto que a taxa fotossintética foi maior na ausência de sacarose. A análise estrutural da folha demonstrou a influência da fonte de carboidrato na formação das paredes celulares, na presença de tecido de sustentação e na diferenciação de feixes vasculares. As plantas cultivadas na ausência de sacarose e sem a membrana apresentaram estômatos mal formados e células hipertrofiadas, enquanto que, na presença da fonte de carboidrato, independente do tipo de tampa utilizada, as folhas apresentaram organização bem definida. As plantas cultivadas sem sacarose e com duas membranas apresentaram organização típica das plantas cultivadas *in vitro*. No entanto, esse tratamento apresentou maior área foliar entre os tratamentos, e seu crescimento não ficou comprometido. Portanto, *P. glomerata* apresenta potencial para propagação fotoautotrófica.

ABSTRACT

IAREMA, Lourdes. D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, June 2008. **Grafting and propagation *in vitro* of fafia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]**. Adviser: Wagner Campos Otoni. Co-advisers: Luzimar Campos da Silva, Carlos Roberto de Carvalho and Luiz Cláudio de Almeida Barbosa.

Pfaffia glomerata, popularly known as Brazilian Ginseng, is an important medicinal species whose market demand and extractivism form led to its inclusion in the priority conservation species list. It presents great genetic diversity among its natural populations, being this variability expressed both in root biomass production, organ of interest of the species, as in the active principle content (β -ecdysone). Thereby, the present work aimed: (a) to evaluate *in vitro* micrografting efficiency in two *P. glomerata* accessions to establish a compatible combination between a low- (2202) and a high-producing (2209) β -ecdysone accessions, in order to increase the production of the commercial interest compound; and (b) to evaluate the photoautotrophic capacity of *P. glomerata* propagated *in vitro* by comparison of physiological and structural parameters under heterotrophic, photomixotrophic and photoautotrophic conditions. In *in vitro* micrografting, internodal segments and stem apices, obtained from *in vitro* propagated plants, were used as rootstock and as scion, respectively, in order to establish reciprocal combinations between the accessions, self-micrografting, and comparisons with non-micrografted counterparts. Evaluations were made concerning the connection percentage and growing features of graftings during *in vitro* stage (at 30 days) and survival and growing of micrografted plants both *in vitro* as in *ex vitro* conditions, being monitored throughout 360 days after micrografting. The acclimatization process was monitored by physiological parameters, such as chloroplastidic pigments tenors, chlorophyll fluorescence, and photosynthetic rates. The time course of grafting connections was monitored by histological analyses in the periods of 7, 14, 21, 28, 35, 70 and 100 days after the *in vitro* grafting. Well-formed micrografting connections achieved indexes varying from regular to excellent in 80% of plants in all combinations. The micrografted plants had lower *in vitro* growth rates as compared to the non-grafted ones. Mortality rates (2.5-17.5%) were only observed during the phase of *in vitro* establishment. Analyzing the physiological patterns

statistical differences were not detected among the treatments, however considering the cultivation conditions which plants were submitted, the greenhouse was the best environment tested. Under field conditions, the phenology difference between both accessions tested was very expressive, especially concerning root and inflorescence production, as well as susceptibility to insects attack. Accession 2202 plants presented higher active principle concentration in leaves, and higher number of injuries resulting from insect attack to the shoots. The accessions considered the greatest active principle producer was susceptible to nematode attack and exhibited gall symptoms, while the other access was resistant. Interestingly, the nematodes positively influenced β -ecdysone production in roots, but did not commit plants development. Micrografting promoted higher active principle concentration when constituted by accession 2202 as scion and accession 2209 as rootstock, proving the existence of physiological interactions between grafting components. Anatomical evaluations indicated that formation of calli in graft union region occurred as an immediate response to injury, and vascular reconnection of graftings occurred 21 days after micrografting performance. There was no structural difference in healing process among treatments. Results indicated efficiency of *in vitro* micrografting application in establishing different accession combinations of *P. glomerata* and obtainment of higher concentrations of β -ecdysone on roots. Nodal segments were used for propagation in sucrose-containing (0 to 30 g L⁻¹) medium combined with closure types: 1. one polyvinyl chloride transparent film layer (PVC); 2. polypropylene rigid lid (LWH); 3. LWH with one orifice (L1H); and 4. LWH with 2 orifices (L2H) covered by gas exchanging permeable membranes. The experiment was maintained in growth room at 25 ± 2 °C under 16 hours of photoperiod with 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ irradiance. Significant morphological differences were observed among treatments; plants cultivated with sucrose and membrane closure were the most vigorous. However, analyzing growing patterns plants cultivated without sucrose and with membranes closure did not differ statistically from other heterotrophic cultivation treatments. Sucrose influenced physiological responses, with highest content of chloroplastidic pigments and higher amount of fresh mass with this carbohydrate, while photosynthetic rates were higher in sucrose-lacking medium. Leaf structural analysis demonstrated influence of carbohydrate source on cell wall formation, supporting tissues and vascular bundles differentiation. Plants cultivated without both sucrose and membrane closure presented poorly formed stomata and hypertrophic cells, while with this carbohydrate source, despite closure types used, leaves presented well defined organization. Plants cultivated without sucrose and with two membranes

closure presented typical *in vitro* organization. However, this treatment presented the highest leaf area between treatments, without growth compromising. Therefore, *P. glomerata* has potential for photoautotrophic propagation.

INTRODUÇÃO GERAL

O aumento da demanda por produtos naturais vem acompanhado por dificuldades em assegurar bom suprimento das plantas medicinais, devido ao decréscimo nas reservas naturais, resultante da forma de exploração a que algumas espécies são submetidas, além de dificuldades técnicas em cultivar plantas silvestres.

Considerando a importância do cultivo *in vitro* de espécies ameaçadas, tanto para propagação clonal em larga escala e como ferramenta para subsidiar estudos de otimização da produção de princípios ativos, informações sobre as respostas fisiológicas sob diferentes condições de cultivo são fundamentais para auxiliar esses objetivos.

Pfaffia pertence à família Amaranthaceae, que possui distribuição cosmopolita, inclui cerca de 170 gêneros e 2.000 espécies, sendo que no Brasil ocorrem 20 gêneros nativos e aproximadamente 100 espécies (Souza & Lorenzi, 2005).

Espécies do gênero *Pfaffia* são utilizadas na medicina popular, devido a suas propriedades químicas (Martins & Nicoloso, 2004). Algumas como *P. iresinoides*, *P. glomerata*, *P. jubata*, *P. paniculata* e *P. tuberosa* já têm suas propriedades medicinais confirmadas com o isolamento de compostos bioativos de suas raízes (Nakai et al., 1984; Nishimoto et al., 1984; 1986; 1987; 1988; Shiobara et al., 1992; 1993).

O Brasil é o mais importante centro de coleta de espécies do gênero (Corrêa Júnior et al., 2006a; 2006b), sendo conhecidas principalmente como ginseng-brasileiro e fáfia, também denominada paratudo, corango (Oliveira, 1986), corrente, sempre-viva, batata-do-mato, ou suma no mercado internacional (Corrêa Júnior et al., 2006a; 2006b). Utilizada há séculos pelos índios brasileiros na cura e prevenção de doenças, a fáfia (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) só teve suas propriedades medicinais comprovadas cientificamente depois de levada ao Japão (Ming & Corrêa Júnior, 2004; Corrêa Júnior et al., 2006a; 2006b).

As espécies de *Pfaffia* nativas no Brasil mais utilizadas para fins medicinais são principalmente *P. iresinoides*, *P. paniculata* e *P. glomerata* (Lorenzi & Matos, 2002; Corrêa Junior et al., 2006a; 2006b). Importada pelos japoneses e, mais recentemente, pela União Européia e pelos Estados Unidos da América, o crescimento do consumo de

P. glomerata é estimado em 10% ao ano (Corrêa Júnior & Ming, 2004), levando à inclusão na relação de espécies prioritárias para conservação (Vieira et al., 2002).

Os principais constituintes isolados das raízes de *Pfaffia* são estigmasterol, sitosterol, alantoína, ecdisteróides, triterpenóides e nortriterpenóides (Nakai et al., 1984; Nishimoto et al., 1984; Festucci-Buselli et al., 2008). Entre os constituintes presentes na *P. glomerata*, destaca-se o composto 20-hidroxiecdisona ou β -ecdisona (20E), um ecdisteróide análogo dos hormônios de insetos envolvidos na ecdise (Dinan, 2001).

Fitoesteróides são produtos da biossíntese de terpenos e suas estruturas variam de acordo com o número, localização e posição das hidroxilas substituintes no anel esteroidal (Báthori & Pongrácz, 2005). O papel dos ecdisteróides nas plantas pode ser considerado em nível de família ou planta, porque nem todas as plantas da mesma família contem ecdisteróides e aquelas que contêm, diferem no conteúdo (Baltaev, 2000). A distribuição de espécie contendo ecdisteróides entre famílias e gêneros é algo ainda inexplicável, sugere-se que sua distribuição ocorra ao acaso (Dinan et al., 2001).

A produção de 20E e demais metabólitos são as principais características relacionadas ao aspecto medicinal da fáfia, sendo o teor de 20E frequentemente utilizado nas avaliações de cultivo e seleção de genótipos (Magalhães, 1998; Correia Júnior, 2003; Figueiredo, 2004). Atualmente, devido à grande demanda de ginseng brasileiro para a produção de medicamentos, buscam-se alternativas para a produção de matéria-prima homogênea e de qualidade (Flores et al., 2006).

A tecnologia do cultivo *in vitro* pode ser aplicada em plantas medicinais pela propagação clonal *in vitro*, cultura de calos e de células em suspensão, visando a produção de compostos secundários de interesse farmacêutico, cosmético e alimentar (Rout et al., 2000; Gómez-Galera et al., 2007). A exploração da capacidade biossintética de várias culturas celulares tem ocorrido nas últimas décadas e novos conhecimentos têm sido relatados para grande variedade de produtos naturais (Alfermann & Petersen, 1995; Gómez-Galera et al., 2007).

Nesse contexto, o cultivo *in vitro* de tecidos e células vegetais constitui uma alternativa promissora para o suprimento de material vegetal. As técnicas de propagação *in vitro* são úteis em programas de melhoramento genético, possibilitando a manutenção de germoplasma para conservação da biodiversidade. Além disso, a cultura de células e tecidos vegetais é um sistema adequado para estudo de eventos fisiológicos, bem como das vias biossintéticas, permitindo a otimização da produção *in vitro* de metabólitos secundários, assim como a produção comercial de mudas clonais de espécies de interesse.

Buscando maximizar o processo de propagação *in vitro* de *P. glomerata* foram conduzidos estudos utilizando carvão ativado e concentração de macronutrientes (Nicoloso et al., 2001), fontes e doses de ferro (Nicoloso & Ferrão, 2001), níveis de nitrogênio, fósforo (Russowski & Nicoloso, 2003) e sacarose (Skrebsky et al., 2004; Maldaner et al., 2007). No cultivo *in vitro*, as plantas perdem parcialmente o autotrofismo e, conseqüentemente, necessitam de uma fonte exógena de carboidratos, sendo a sacarose o carboidrato mais apropriado para a multiplicação *in vitro* de *P. glomerata* (Nicoloso et al., 2003). O aumento, a eliminação e, ou, a redução da concentração de carboidratos no meio de cultura pode ser um dos fatores determinantes no sucesso da aclimatização (Pospíšilová et al., 1999; Skrebsky et al., 2004). A redução de açúcar no meio de cultivo apresenta vantagens, como a prevenção do rápido crescimento de bactérias e de fungos no meio de cultivo, a redução de custos e o aumento na sobrevivência das plantas durante a aclimatização (Kozai & Kubota, 2001; Xiao & Kozai, 2006).

Outro fator que pode ser determinante neste processo é o tipo de vedação utilizado no recipiente de cultura. Geralmente, os explantes *in vitro* são mantidos em frascos vedados, porém, dependendo do tipo de vedação encontram-se baixas trocas gasosas entre os ambientes externo e interno (Chen, 2004; Tsay et al., 2006). As modificações na concentração destes gases afetam o crescimento e a morfogênese de algumas espécies de plantas em vários sistemas de cultivo *in vitro* (Marino & Berardi, 2004; Gonçalves et al., 2008). As trocas gasosas no ambiente de cultura estão diretamente relacionadas com a umidade relativa, temperatura do ar e concentração de CO₂ no ambiente de cultivo (Shim et al., 2003).

A elevada umidade relativa e a concentração de CO₂ no ambiente interno dos frascos podem influenciar as características anatômicas (Dami & Hugles, 1995), fisiológicas (Ogasawara, 2003; Kitaya et al., 2005) e morfológicas (Mitra et al., 1998), resultando em alta mortalidade de plântulas após a transferência para as condições *ex vitro*. A promoção do metabolismo fotoautotrófico e o decréscimo da taxa transpiratória no início da aclimatização são importantes para o melhor crescimento e porcentagem de sobrevivência das plantas (Kirdmanee et al., 1997). Uma das formas de reduzir a umidade relativa é a utilização de ventilação forçada (Zobayed et al., 2000; Zobayed, 2006). Com o aumento nas trocas gasosas, a atmosfera interna dos frascos de cultura fica menos contrastante àquela encontrada no ambiente externo (Gonçalves et al., 2008), favorecendo a aclimatização em algumas espécies (Pospíšilová et al., 1999).

A enxertia *in vitro* apresenta-se como ferramenta para estudos de produção dos metabólitos secundários nessa planta medicinal, fundamentada na enxertia recíproca de genótipos divergentes na produção, baseada na diferença apresentada por indivíduos em caracteres relacionados ao teor de β -ecdisona e produção de raízes. A otimização da produção *in vitro* de *Pfaffia* está relacionada à biossíntese de metabólitos secundários e à manutenção da diversidade genética. A redução dos custos pelo uso dessa técnica é fundamental para a produção comercial de mudas, bem como para a maximização da produção do princípio ativo de interesse.

P. glomerata não é uma espécie domesticada. Uma única população pode demonstrar ampla variabilidade, seja associada às diferenças no desenvolvimento, na resistência a pragas e doenças, nas respostas à fertilidade do solo e na produtividade individual ou genética, que pode ser expressa nas plantas com diferentes conteúdos de constituintes bioativos, responsáveis pelos efeitos terapêuticos, sendo que as populações que apresentam variação genética são difíceis de cultivar (Montanari Júnior, 2005; Montanari Júnior & Perecin, 2006).

A domesticação desta espécie aumenta as possibilidades de obtenção de plantas com menor heterogeneidade e com maior produtividade, podendo ser facilitada pela utilização da técnica de enxertia *in vitro* como método de propagação.

A enxertia *in vitro* foi desenvolvida na busca de plantas cítricas livres de vírus (Murashige et al., 1972), e, posteriormente, utilizada para maximizar a limpeza clonal (Navarro et al., 1975). Além de permitir a obtenção de plantas isentas de vírus e outras doenças, a enxertia *in vitro* pode contribuir para estudos relacionados com a incompatibilidade entre epibioto e hipobioto, e com aspectos fisiológicos e histológicos envolvidos no processo (Jonard, 1986; George, 1993; Hartmann et al., 1997).

Dentre as vantagens da enxertia *in vitro*, destacam-se a formação de bancos de plantas matrizes para fornecimento de borbulhas certificadas; a possibilidade de intercâmbio de mudas, assegurando o estado fitossanitário; a manutenção de bancos de germoplasma livres de vírus; a possibilidade de aumentar a produtividade nos plantios comerciais e o rejuvenescimento de essências florestais (Paz & Pasqual et al., 1998).

A enxertia *in vitro* pode também ser uma alternativa para a otimização da produção do princípio ativo de plantas medicinais que possuem genótipos divergentes na produção, bem como na seleção de plantas resistentes a pragas e doenças.

O hipobioto obtido de propágulos vegetativos proporciona uniformidade e manutenção das características desejáveis (Jonard, 1986), merecendo destaque a resistência a certas doenças (Hartmann et al., 1997), além da influência que exercem

sobre o crescimento e o desenvolvimento dos enxertos (Bandeira, 2006). Pois afetam diretamente o vigor da variedade da copa enxertada, estando relacionados diretamente ao genótipo e suas relações, induzindo diferenças marcantes no tamanho da copa e na sua produção (Schafer et al., 2001).

Em citros, os hipobiotos respondem com diferentes níveis de crescimento, influenciando no tempo de obtenção da muda em decorrência das características dos substratos e das restritas condições dos recipientes (Fochesato et al., 2007). Portanto, o manejo adequado em relação ao ambiente, as técnicas nutricionais, bem como a seleção do material vegetal, são fatores que influenciam diretamente no processo de crescimento da enxertia, sendo a produção de hipobiotos homogêneos, vigorosos e de alta produtividade fundamentais nesse processo.

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivos: (a) avaliar a eficiência da enxertia *in vitro* na propagação de dois acessos de *Pfaffia glomerata*, visando estabelecer combinação compatível entre um acesso de elevada (2209) e um de baixa produção do princípio ativo (2202), para avaliar a produção do composto de interesse comercial; e (b) analisar o potencial fotoautotrófico de *P. glomerata* propagadas *in vitro*, comparando-se parâmetros fisiológicos e estruturais das plantas propagadas sob condições heterotrófica, fotomixotrófica e fotoautotrófica.

Referências Bibliográficas

- ALFERMANN, A.W.; PETERSEN, M. 1995. Natural product formation by plant cell biotechnology. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 43:199-205.
- BALTAEV, U.A. 2000. Phytoecdysteroids: structure, sources, and biosynthesis in plants. **Russian Journal Bioorganic Chemistry**, 26:799-831
- BÁTHORI M, PONGRÁCZ, Z. 2005. Phytoecdysteroids – from isolation to their effects on humans. **Current Medicinal Chemistry**, 12:153-172
- BANDEIRA, F.S.; XAVIER, A.; OTONI, W.C.; DIAS, J.M.M. 2006. Enxertia *in vitro* na propagação de clones de *Eucalyptus urophylla* e *E.grandis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 41:223-232.
- BARROS, F.A.R.; STRINGHETA, P.C. 2006. Microencapsulamento de antocianinas – uma alternativa para o aumento de sua aplicabilidade como ingrediente alimentício. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, 36:18-24.
- CHEN, C. 2004. Humidity in plant tissue culture vessels. **Biosystems Engineering**, 88:231-241.
- CORREIA JÚNIOR, C. 2003. **Estudo agrônomico da fáfia (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen): sazonalidade na produção de raízes e conteúdos de beta-ecdisona em diferentes indivíduos de São Paulo, Paraná e Mato Grosso do Sul**. Doutorado (Horticultura), Botucatu: UNESP/FCA. 94 p.
- CORRÊA JÚNIOR, C.; MING, L. C. 2004. Fáfia (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen): o ginseng brasileiro.. In: Alexiades, M.N.; Shanley, P. (Org.). **Productos forestales, medios de subsistencia y conservacion: estudios de caso sobre sistemas de manejo de productos forestales no maderables**. Jacarta: CIFOR. 3:349-363.
- CORRÊA JÚNIOR, C.; CORTEZ, D.A.G.; MING, L. C.; SOARES, W. 2006a. **Fáfia – O ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Sprengel) Pedersen): Aspectos Agronômicos e Fitoquímicos**. Curitiba: Clichetec, 22p.
- CORREA JÚNIOR, C.; MING, L. C. 2006b. Fáfia, ginseng brasileiro. In: LÓPEZ, C.; SHANLEY, P.; CRONKLETON. (ORG.). **Riquezas del bosque: frutas, remedies y artesanías en América Latina**. Santa Cruz: Centro para la investigación forestal internacional, p.82-86. Disponível em: www.cifor.cgiar.org/publications, Acesso em: 20/07/2007.
- DAMI, I.; HUGLES, H. 1995. Leaf anatomy and water loss of *in vitro* PEG-treated ‘Valiant’ grape. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 42:179-184.
- DINAN, L. 2001. Phytoecdysteroids: biological aspects. **Phytochemistry**, 57:325-339.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. 1999. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília, Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 370p.
- FESTUCCI-BUSELLI, R.A.; CONTIM, L.A.S.; BARBOSA, L.C.A.; STUART, J.J.; OTONI, W.C. 2008. Biosynthesis and potential functions of the ecdysteroid 20-hydroxyecdysone – a review. **Botany**, 86:978-987.
- FIGUEIREDO, L.S.; TEIXEIRA, S.L.; FREITAS, S.P.; VIEIRA, I.J.C.; MARTINS, E.R. 2004. Comportamento de acessos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae) nas condições de Campos dos Goytacazes – RJ. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 7:67-72.
- FLORES, R.; MALDANER, J.; NICOLOSO, F. T. 2006. Otimização da micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Ciência Rural**, 36:845-851.

- FOCHESATO, M.L.; SOUZA, P.V.D.; SCHÄFER, G.; MACIEL, H.S. 2007. Crescimento vegetativo de porta-enxertos de citros produzidos em substratos comerciais. **Ciência Rural**, 37:970-975.
- GEORGE, E. F. 1993. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. 2nd. ed. England: Exegetics, v. 1. 575p.
- GÓMEZ-GALERA, S.; PELACHO, A.M.; GENÉ, A.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P. 2007. The genetic manipulation of medicinal and aromatic plants. **Plant Cell Reports**, 26:1689-1715.
- GONÇALVES, L.A.; GERALDINE, R.M.; PICOLI, E.A.T.; VENDRAME, W.A.; CARVALHO, C.R.; OTONI, W.C. 2008. *In vitro* propagation of *Herreria salsaparilha* Martius (Herreriaceae) as affected by different sealing materials and gaseous exchanges. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 92:243-250.
- HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T.; GENEVE, R. L. 1997. **Plant propagation: principles and practices**. 6 ed. New Jersey: Prentice-Hall, 770 p.
- JONARD, R. 1986. Micrografting and its applications to tree improvement. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.), **Biotechnology in agriculture and forestry**. v. 1: trees. Springer-Verlag, Berlin, p. 31-48.
- KIRDMANEE, C.; KOZAI, T.; ADELBERG, J. 1997. Rapid acclimatization of *in vitro* eucalyptus plantlets by controlling relative humidity *ex vitro*. **Acta Horticulturae**, 440:616-620.
- KITAYA, Y.; OHMURA, Y.; KUBOTA, C.; KOZAI, T. 2005. Manipulation of the culture environment on *in vitro* air movement and its impact on plantlets photosynthesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 83:251-257.
- KOZAI, T.; KUBOTA, C. 2001. Developing a photoautotrophic micropropagation system for woody plants. **Journal of Plant Research**, 114: 525-537.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. 2002. **Plantas medicinais no Brasil – nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum. p.45-46.
- MAGALHÃES, P. M. 1998. **Agrotecnologia para o cultivo da *Pfaffia***. Campinas: CPQBA – UNICAMP. 5p.
- MALDANER, J.; NICOLOSO, F.T.; SANTOS, E.S.; FAGUNDES, C.K.; FLORES, R.; JUCOSKI, G.O.; SKREBSKY, E.C. 2007. Crescimento de plântulas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen cultivadas *in vitro* sob dois níveis de nitrogênio e sacarose, durante seis subculturas sucessivas e aclimatização. **Ciência Rural**, 37:133-140.
- MARINO, G.; BERARDI, G. 2004. Different sealing materials for petri dishes strongly affect shoot regeneration and development from leaf explants of Quince 'BA 29'. **In Vitro Cellular and Development Biology – Plant**, 40:384-388.
- MARTINS, C.F.; NICOLOSO, F.T. 2004. Micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, 6:53-61.
- MING, L. C.; CORRÊA JÚNIOR, C. 2004. Evaluation of the development of fafia - *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Acta Horticulturae**, 629:273-275.
- MITRA, A.; BHATTACHARYA, P.S.; DEY, S.; SAWARKAR, S.K.; BHATTACHARYYA, B.C. 1998. Photoautotrophic *in vitro* culture of Chrysanthemum under CO₂ enrichment. **Biotechnology Techniques**, 12:335–337.
- MONTANARI JUNIOR, I. 2005. **Avaliação de genótipos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen visando seu cultivo comercial**. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical/Melhoramento Genético Vegetal). Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, 63p.
- MONTANARI JÚNIOR, I.; PERECIN, M.B. 2006. Evaluation of morphological and agricultural characteristics and their phenotypic correlations in genotypes of a *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen population. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, 8:46-48.

- MURASHIGE, T.; BITTERS, W. P.; RANGAN, T. S.; NAUER, E. M.; ROISTACHER, C. N.; HOLLIDAY, P. B. 1972. A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free citrus clones. **HortScience**, 7:118-119.
- NAKAI, S.; TAKAGI, N.; MIICHI, H.; HAYASHI, S.; NISHIMOTO, N.; TAKEMOTO, T.; KIZU, H. 1984. Pfaffosides, nortriterpenoid saponins, from *Pfaffia paniculata*. **Phytochemistry**, 23:1703-1705.
- NAVARRO, L.; ROISTACHER, C. N.; MURASHIGE, T. 1975. Improvement of shoot tip grafting *in vitro* for virus-free citrus. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 100:471-479.
- NICOLOSO, F.T.; ERIG, A.C.; MARTINS, C.F.; RUSSOWSKI, D. 2001. Micropropagação do ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 3:11-18.
- NICOLOSO, F.T.; FERRÃO, G.E. 2001. Fontes e doses de ferro na micropropagação de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). **IV Encontro Latino Americano de Biotecnologia Vegetal**. Disponível em: www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001. Acesso em 25/07/2007.
- NICOLOSO, F.T.; ERIG, A.C.; RUSSOWSKI, D.; MARTINS, C.F. 2003. Efeito de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, 27:84-90.
- NISHIMOTO, N.; NAKAI, S.; TAKAGI, N.; HAYASHI, S.; TAKEMOTO, T.; ODASHIMA, S.; KIZU, H.; WADA, Y. 1984. Pfaffosides and nortriterpenoid saponins from *Pfaffia paniculata*. **Phytochemistry**, 23:139-142.
- NISHIMOTO, N.; SHIOBARA, Y.; YNOUE, S.; FUJINO, M.; TAKEMOTO, T.; YEOH, C.L.; HASHIMOTO, G. 1986. Ecdisterone from *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 1:188-191.
- NISHIMOTO, N.; SHIOBARA, Y.; FUJINO, M.; INOUE, S-S.; TAKEMOTO, T.; OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K.; HASHIMOTO, G.; TANAKA, O.; KASAI, R.; MATSUURA, H. 1987. Ecdysteroids from *Pfaffia iresinoides* and reassignment of some ¹³C-NMR chemical shifts. **Phytochemistry**, 26:2505-2507.
- NISHIMOTO, N.; SHIOBARA, Y.; INOUE, S-S.; FUJINO, M.; TAKEMOTO, T.; YEOH, C.L.; OLIVEIRA, F. de; AKISUE, G.; AKISUE, M.K.; HASHIMOTO, G. 1988. Three ecdysteroid glycosides from *Pfaffia iresinoides*. **Phytochemistry**, 27:1665-1668.
- OGASAWARA, N. 2003. Ventilation and light intensity during *in vitro* culture affect relative growth rate and photosynthate partitioning of *Caladium* plantlets after transplanting to *ex vitro*. **Acta Horticulturae**, 616:143-149.
- OLIVEIRA, F. 1986. *Pfaffia paniculata* (Martius) Kuntze - O ginseng brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 1:86-92.
- PAZ, O. P.; PASQUAL, M. 1998. Microenxertia. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, v. 1. Brasília: EMBRAPA – SPI / EMBRAPA – CNPH. p.147-160.
- POSPÍŠILOVÁ, J.; TICHÁ, I.; KADLECEK, P.; HAISEL, D.; PLZÁKOVÁ, Š. 1999. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. **Biologia Plantarum**, 42:481-497.
- ROUT, G.R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. 2000. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. **Biotechnology Advances**, 18:91-120.
- RUSSOWSKI, D.; NICOLOSO, F.T. 2003. Nitrogênio e fósforo no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. **Ciência Rural**, 33:57-63.
- SCHÄFER, G.; BASTIANEL, M.; DORNELLES, A.L.C. 2001. Porta-enxertos utilizados na citricultura. **Ciência Rural**, 31:723-733.

- SHIM, S-W.; HAHN, E-J.; PAEK, K-Y. 2003. *In vitro* and *ex vitro* growth of grapevine rootstock '5BB' as influenced by number of air exchanges and the presence or absence of sucrose in culture media. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 75:57-62.
- SHIOBARA, Y.; INOUE, S.; NISHIGUCHI, Y.; KATO, K.; TAKEMOTO, T.; NISHIMOTO, N.; OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K; HASHIMOTO, G. 1992. Iresinoside, a yellow pigment from *Pfaffia iresinoides*. **Phytochemistry**, 31:953-956.
- SHIOBARA, Y.; INOUE, S-S.; KATO, K.; NISHIGUCHI, Y.; OISHI, Y; NISHIMOTO, N.; OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K; HASHIMOTO, G. 1993. A nortriterpenoid, triterpenoids and ecdysteroids from *Pfaffia glomerata*. **Phytochemistry**, 32:1527-1530.
- SKREBSKY, E.C.; NICOLOSO, F.T.; FERRÃO, G.E. 2004. Sacarose e período de cultivo *in vitro* na aclimatização *ex vitro* de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Ciência Rural**, 34:1471-1477.
- SOUZA, V.C.; LORENZI, H. 2005. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, p.220-223.
- TSAY, H-S.; LEE, C-Y.; AGRAWAL, D.C.; BASKER, S. 2006. Influence of ventilation closure, gelling agent and explant type on shoot bud proliferation and hyperhydricity in *Scrophularia yoshimurae* – a medicinal plant. **In Vitro Cellular and Development Biology – Plant**, 42:445-449.
- VIEIRA, R.E.; SILVA, S.R.; ALVES, R.B.N.; SILVA, D.B.; WETZEL, M.M.V.S.; DIAS, T.A.B.; UDRY, M.C.; MARTINS, R.C. 2002. Estratégias para conservação e manejo de recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas: **Resultados da 1ª Reunião Técnica. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Ibama, CNPq, Brasília, 184p.
- XIAO, Y.; KOZAI, T. 2006. *In vitro* multiplication of statice plantlets using sugar-free media. **Scientia Horticulturae** 109:71–77.
- ZOBAYED, S.M.A. 2000. *In vitro* propagation of *Lagerstroemia* spp. from nodal explants and gaseous composition in the culture headspace. **Environment Control in Biology**, 38:1-11.
- ZOBAYED, S.M.A. 2006. Aeration in plant tissue culture. In: DUTTA GUPTA, S. & IBARAKI, Y. (Eds.). **Plant Tissue Culture Engineering**. Netherlands: Springer, p. 313-327.

Capítulo 1

The Brazilian ginseng (*Pfaffia* sp.)

The genus *Pfaffia* (Amaranthaceae)

The genus *Pfaffia* was established by Martius in 1826, using *Pfaffia glabrata* as "type species", and its etymology was in honour to Christian Heinrich Pfaff, 1774-1852 [1,2]. It comprises around 33 species distributed in Central and South Americas. In Brazil, the species occurs mainly in the forest borders or inner formations, rivers margins, humid secondary forests, savannahs, rupestrian and clear fields [3].

Pfaffia glomerata (Spreng.) Pedersen occurs all over Brazil and neighboring countries from Guianes to Bolivia and Argentina [1,3]. In Brazil, it is naturally found in the margins and islands of the Paraná River, within São Paulo, Mato Grosso do Sul and Paraná states, where it is threatened due to the intensive collection [4]. However, *Pfaffia iresinoides* (H.B.K.) Spreng. is restricted to the North of Brazil, in the Brazilian Amazon and neighboring countries [3]. *Pfaffia jubata* Martius, on the other hand, is popularly known as 'corango-de-juba', being found in Brazil from Bahia to Mato Grosso and Paraná states, and appears as a quite rare species in the South of Brazil [1]. This species is rather common in savannah areas and rupestrian fields from Brazil, mainly in the Central-Western region. *Pfaffia paniculata* (Martius) O. Kuntze, whose basonymous comes from *Hebanthe paniculata* Martius, is frequent in São Paulo and Paraná states, and known as 'Brazilian ginseng', 'paratudo' [5] or 'corango-açu' [1]. It occurs all over Brazil, Bolivia, Colombia and French Guiane [1]. This species is less frequent in the restingas from Rio de Janeiro, but rather frequent in the borders of the Atlantic Rain Forest [6]. *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken is known as 'corango-de-batata' [1] and 'Brazilian ginseng'. It occupies vast areas of the Brazilian territory, in central, southeast and south regions, occurring in savannahs, rupestrian fields, and in dry and sandy soils [3,7]. Its name derives from the typical tuberous roots, though presenting alternating tuber and non-tuberous zones [8]. It is a perennial herb with a tuberous and woody base and found in Brazil from Goiás, Minas Gerais down to Rio Grande do Sul; and in Uruguai, Argentina, Paraguai and Colombia. It is a selective

xerophyte and heliophyte species, rather common in the clean dry and rupestrian fields, with uniform distribution, but without dense populations [1].

The distinction of the species is not simple, making the botanical identification sometimes very confusing [9,10], though leading to misunderstandings during trade activities [11]. However, some tools can be used to distinguish them, such as the cytogenetic characterization, which revealed a difference between *P. tuberosa* ($2n = 4x = 68$) and *P. glomerata* ($2n = 2x = 34$) [12].

Pfaffia paniculata [13,14,15], *P. stenophylla* [13], *P. iresinoides* [15,16,17,18], *P. glomerata* [19] and *P. tuberosa* [20,21] are widely used in folk medicine [12]. Amid them, *P. glomerata* [22], *Pfaffia iresinoides* Sprengel [17] and *Pfaffia paniculata* [14,23], have higher number of phytochemical studies [24]. Indeed, several species of the genus are employed in folk medicine due to their remarkable medicinal properties [25], and commonly recognized as ginseng, mainly as Brazilian ginseng and ‘fáfia’, and also known popularly as ‘paratudo’, ‘corango’ [13], ‘corrente’, ‘sempre-viva’, and ‘batata-do-mato’. However, in the international market the product from *Pfaffia* species is known as ‘suma’ [26].

Several species of *Pfaffia* are commercialized in Brazil, as a substitute to *Panax* spp. (Araliaceae). Due to the roots morphological similarity with ginseng, it is popularly accepted as Brazilian ginseng [13,23]. The name Ginseng may refer to at least 22 plant species, being the Korean ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer.) considered the typical species. In Brazil other species are commonly used in its place, amongst them *Pfaffia paniculata* [27]. Some species of Amaranthaceae destined to human consumption are similar to Korean ginseng, at least in terms of some morphological attributes and presence of saponins [28]. However, the Brazilian ginseng belongs to a very divergent family from the imported ginsengs (*Panax* spp.), though generating specific chemical composition within products named as ginseng [11,29,30]. Although all these species are saponin-producing, these compositions show different structures amongst themselves [13].

Among analyzed characteristics of *P. glomerata*, the physicochemical properties [22,31,32,33], leaf anatomy and ultrastructure patterns [34, 35], medicinal properties [10,18], molecular markers [36], cytogenetic studies [12,37,38,39], and the vegetative propagation methods [19], in which tissue culture techniques have been applied [40, 41,42, 43, 44, 45, 46,47].

Economic importance

The plant kingdom provides a wide variety of natural products with diverse chemical structures and a vast repertoire of biological activities. Over the years, many of these compounds have found applications in the health science area to such a great extent that medicinal plants became important to the global economy, generating employment and income.

The phytotherapies world market exceeds US\$ 14 billion, representing 5% of the synthetic medicines global market [48]. In Brazil, it is estimated that 82% of the population use natural medicines, and the phytotherapy sector moves annually around R\$ 1 billion in the productive chain, and employs more than 100,000 people [49].

Brazil, a megabiodiverse country in genetic resources, is the most important harvesting center of *Pfaffia*, destined for both food and medicinal purposes [26,50], being the largest world supplier of its roots. A remarkable characteristic is related to the crop period of Korean ginseng, which demands five to seven years to be harvested, as compared to *Pfaffia*, which takes two years at most [30]. Indeed, *Pfaffia* has a great potential for both internal and external markets [51]. Approximately 30 tons of roots of *Pfaffia* spp. are collected from the wild populations, and exported monthly to Japan [52], the main consumer market for this plant, a rich source of steroids of pharmacological interest and cosmetics purposes [53]. The price in the international market for the extracted bioactive compound ecdysone reaches US\$ 85,00/g [4].

The European Union and the United States have shown increasing interest to import this medicinal species, due to the growing consumption rates, as high as 10% a year [54]. It is estimated that around 720 tons of *P. glomerata* roots and 190 tons of processed powder were marketed at the internal and external markets in 2002 [55]. As a consequence of disordered harvesting, Asia is now considered a huge potential market for exportation of raw and processed material [30].

The increasing interest for *Pfaffia* led to its inclusion in the priority list of species during the “1st Technical Meeting on Strategies for Conservation and Management of Genetic Resources of Medicinal and Aromatic Plants”, a joint accomplishment by Embrapa Genetic Resources and Biotechnology-Cenargen, The Brazilian Institute of the Environment and of the Renewable Natural Resources - IBAMA and The National Council of Scientific Development – CNPq, held in Brasília in 2001 [56].

It is well-known that much of the traditional collecting activities have been intensified throughout the years, following scientific validation of a large number of therapeutic properties of *Pfaffia*. These activities generate genetic erosion, potentializing the risks of extinction, and consequently committing the raw material supply, besides causing damages to the environment [4, 52, 57, 58]. Vieira [58] advocates the importance of the establishment of a germplasm collection for these species, based on its economical importance and the need to better characterize its chemical components.

Its uncontrolled extractivism promotes high ecological risk for natural populations, being the cultivation an alternative to reduce the ecological pressures on the species [57,58,59,60,61,62]. It justifies the adoption of thoughtful management strategies and adaptation of techniques for commercial cultivation projects, though lessening the environmental degradation by means of domestication process and cultivation of this species, making it available to a great part of the population [4,60,63]. In this context, tissue culture-based techniques might be a reliable tool in helping to establish methodologies to support sustainable exploitation of this important medicinal crop species, by maintaining the genetic variability, existing in the natural populations in laboratory germplasm collections under controlled conditions.

However, as a non-domesticated species, a certain population can demonstrate wide phenotypic variability, for instance, differences in the development, in the resistance against pests and diseases, in the responses to soil fertility and the individual productivity. In addition, the genetic variability can also be expressed in plants with different contents of secondary metabolites, responsible for the therapeutic effects [61,62].

Chemical and pharmacological properties

The different species of *Pfaffia* possess outstanding potential for the development of phytotherapies and phytocosmetics, and these plants have been object of chemical studies and research on their biological activities [53]. They have been used for centuries by the Brazilian Indians for the cure and prevention of diseases, however their properties were only proven scientifically after having been taken to Japan and submitted to the analysis by Rohto Pharmaceutical Co. Ltd. laboratory [26,54].

Studies showed that the Indians were not wrong: the roots accumulate components that act in the purification of the blood, inhibition of tumorous cells growth

[55], regeneration of cells, regularization of the hormonal and sexual functions and as bioenergetic substances [14]. The pfaffosides and pfaffic acid derivatives from *Pfaffia* have been patented as antitumor compounds (Japanese Patent 84184198, Oct. 19, 1984 by Rohto Pharmaceutical Co., Ltd.) [58].

Species like *Pfaffia paniculata*, *P.iresinoides*, *P.tuberosa* and *P. glomerata* had their medicinal properties confirmed by the presence of bioactive compounds from its roots [14,15,16,18,22,23]. *Pfaffia glomerata*, a genuine Brazilian medicinal plant produces 20-hydroxyecdysone (20-E) [23]. It might explain why its roots are widely used in Brazilian traditional medicine to cure or prevent several diseases [17]. Some indications have been suggested by manufacturers, among them: as a re-invigorant; cellular regenerator; to treat physical and mental exhaustion and lack of memory; to aid in the treatment of circulatory disorders, stress, anemia, and diabetes; in case of indisposition in general; and in the treatment of the sexual weakness [11].

In general the *Pfaffia* sp. is largely used as tonic, aphrodisiac, healing; to increase the appetite, to reduce sleep disturbances, to improve the memory, to increase the vitality state and the sociability, to improve the superficial turgidity of skin and the irrigation of hair, it is also used in the diabetes, in disturbances of the digestive system, in labirintites and "tremors of aging" [64].

Among the species subjected to chemical analysis, the ecdysteroids and saponins were the major substances isolated [26]. However, other chemicals found in the roots of *P. paniculata*, include 19 aminoacids, traces of iron, magnesium, cobalt, silicious, zinc and vitamins A, B1, B2, E, K, pantotenic acid. It has also been detected a high content of germanium, which confers oxygenation properties at cellular level [65].

The saponins are pointed as active representative compounds of the ginseng and there is a growing interest in its characterization and pharmacological investigations. However, the mechanism of ginseng action is not fully understood [11]. Its presence in *P. paniculata* is associated with antitumoral activities [14,23,66], and as aphrodisiac [67]. Saponins isolated from *P. iresinoides* reduced the surface tension, therefore facilitating the action of other constituent substances of the formulation [53]. The saponins also have detergent, emulsifying and umectant properties [68], and the hemolytic ones might be related to the moluscicide activity [69].

The roots of *Pfaffia* contain approximately 11% of saponins [55], however roots of *P. paniculata* are composed by more than 11% [65], being these the main components [70]. These saponins include a group of chemicals named pfaffosides, as well as pfaffic acid, glicosydes and nortriterpenes. These saponins have demonstrated

ability to inhibit cultured tumor cells and as an auxiliary in the regulation of the clinical levels of sugar in the blood. The paffosides and derivatives of the paffic acid have been patented as antitumor compounds [65].

Interestingly, important ecdysteroids such as ecdysone and 20-hydroxyecdysone are found in both insects and plants. The ecdysteroids are a group of 2,3,14-trihydroxi- Δ -7-6-cetosteroids represented by the extracted compounds from *Pfaffia*, used in the preparation of cosmetic and dermatological products; and ecdysterone or β -ecdysone is the most important steroid employed in the cosmetic formulations and extracted commercially from several plants [53]. They confer anabolic properties without the side effects of the synthetic steroids [71]. The phytoecdysteroids are frequently used as tonic, aphrodisiac and anti-diabetic in the folk medicine [72].

P. paniculata is rich in β -ecdysterone, whose properties were well known as "the Russian secret", since the Russian Olympic athletes used to take this substance to improve the muscle body mass and the physical resistance, without the effects associated to the steroids. Due to the value of this substance, a Japanese patent for methods of its extraction from *Pfaffia* roots has been granted [65].

The 20-E (Figure 1) possesses biological activities as an inhibitor of the microorganism development, such as pheromones in the control of insects [73], and in the analgesic activity [74]. On top of that, some authors report tonic and anabolizing properties, stimulant of the biliar secretion, anticholesteremic, antieschlerotic, besides promoting a therapeutic effect in the diabetes [68].

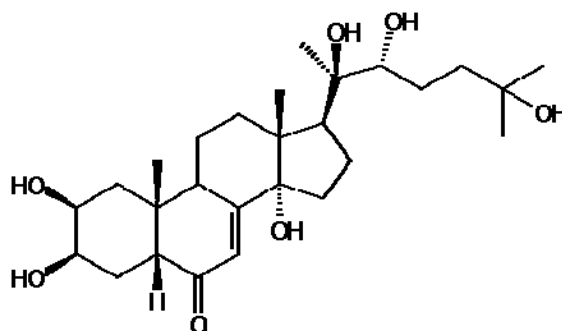


Figure 1. Structural formula of 20-hydroxyecdysone (20-E).

The promotion of health through the prevention of diseases, the capacity to promote immunostimulant activity, antiallergenic, psychotropic and, or tonic properties has been associated to the presence of flavonoids in several species of *Pfaffia* (*P. glomerata*, *P. iresinoides*, *P. jubata*, *P. paniculata*, *P. pulverulenta*, and *P. spicata*) [4,26,50].

Chikusetsusaponin presents tonic and anti-fatigue action, and seems to have some influence upon ulcers treatment [68]. The presence of allantoin in the roots might be related to the healing of wounds and anti-ulcer properties [13]. Allantoin has recognized healing action, regenerative properties, and can be used in preparations for skins that suffered small injuries [53]. The saponins demonstrate hemolytic properties due to the affinity with steroids of the membrane, particularly cholesterol [70].

Although pre-clinical studies exist for some species of *Pfaffia* the effectiveness and safety of its use are still not fully defined. There are no criteria published for the standardization and quality control of the commercial products, as for instance, the definition of the active substances or possible markers compounds [11].

The main chemical constituents identified by researches involving some species of *Pfaffia* are summarized in table 1.

Table 1. Major chemical components identified in *Pfaffia* species.

Species	Chemical components
<i>P. glomerata</i>	Glomeric acid, pfameric acid, ecdysterone, rubrosterone, oleanolic acid and β -glucopyranosyl oleanolate [22], β -ecdysone [18,63,75].
<i>P. iresinoides</i>	Ecdysterone, polypodine B, pterosterone, Chikusetsusaponin IVa [15], iresinosides, ecdysteroid glucosides [17], ecdysterone 25- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside, pterosterone 24- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside, podecdysone B 25- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside [16], β -ecdisone, podecdisone B [53].
<i>P. paniculata</i>	Pfaffic acid, allantoin, stigmasterol, and its glycosides, pfaffosides A, B, C, D, E and F, [14,23,53,76]; daucosterol, polypodine B, β -sitosterol; estigmasterol-3- <i>O</i> - β -D-glucoside, β -ecdysone [65,77], pantothenic acid [65], [14,23,53,76] did not report the presence of β -ecdisone in this species.
<i>P. pulverulenta</i>	Pulveric acid, 11-deoxopulveric acid, 11-oxopfaffic acid, pfaffosides A-G, four hexacyclic nortriterpenoids, ecdysterone, rubrosterone, pfaffic acid, 7-oxopulveric acid, 7-hydroxy pulveric acid, pulverulactone, three hexacyclic nortriterpenoids [78,79].
<i>P. tuberosa</i>	Ecdysterone, oleanolic acid [20].

Reinforcing the remarkable importance of the genus, there are several registered patents that include species of *Pfaffia* as a component of various formulations (Table 2).

Pfaffia glomerata

P. glomerata is highly exploited in the South of Brazil by commercial trade groups that extract active compounds and market them around the world [37]. It is one of the best studied species of the genus, and well known for associated medicinal effects [1], being the most used one in tonic medicines [28]. Chemically, it is a triterpenic saponins-rich species, having β -ecdysone as the main active ingredient [75], which is an analogous to hormones involved in the ecdise of insects [115].

Table 2. Registered patents involving species of the genus *Pfaffia* in their formulations

	Applications	Patents	
Pharmaceutical industry	<i>Pfaffia sp.</i> Pharmaceutical preparations and dietary supplements to treat various human ailments	US6746695 [77]	
	An antiallergy composition exhibiting a remarkable antiallergy action	JP2002308795 [80]	
	A treating agent for diseases involving neovascularization contains the neovascularization inhibitor	JP2006273739 [81]	
	<i>Pfaffia iresinoides</i> A composition free from side effects and useful as analgesic	JP63002928 [74]	
	<i>Pfaffia glomerata</i> Useful as an immunopotentiator, antiallergic agent, neurotropic agent and/or tonic agent (♣)	JP11100325 [82]	
	<i>Pfaffia paniculata</i> To overcome natural inhibitors of human sexual response and allow for improved response and psychological effects	US6444237 [67]	
	Pharmaceutical preparations of bioactive substances	US6746695B1 [77]	
	An antitumor agent	JP59184198 [83]	
	An antitumor agent capable of exhibiting improved inhibitory activity against melanoma cells, cervical cancer cells, cancer cells of the lung, among others	JP59010548 [66]	
	For preventing and treating mental and physical stress states	20040234544 [84]	
	A multi-compartment capsule, comprising, ingredient is selected from the group consisting of a nutraceutical, a vitamin, a dietary supplement and a mineral	2005008690 [85]	
	The substance is embodied in the requisite such that when the requisite is lit and smoked by a smoker, a quantity of the substance is ingested by the smoker	20040112395 [86]	
	Plant extracts and compositions comprising extracellular protease inhibitors	2004175439 [87]	
	For treatment of angiogenesis and metastasis	20060228426 [88]	
	Phytochemical compositions for the prevention and treatment of circulatory disorders, feminine endocrine disorders, and dermal disorders	20070104728 [89]	
	Used in treating liver failure, liver cirrhosis, acute hepatitis and chronic hepatitis, and in faliciting the regeneration of liver cells	KR20040030375 [90]	
	Therapeutic compositions for treatment of sickle cell simptomatology (Increased hemoglobin levels) (♣)	US5449516 [91]	
	Treating ischemic, heart diseases, arteriosclerosis, hyperlipemia and hypertension	KR20040030376 [92]	
	<i>Pfaffia stenophylla</i> Actions include a general tonic for the organism, immunostimulant, healing and anti-inflammatory	WO2007/016756A1 [93]	
	To produce a compound useful for the control harmful life and the control of the growth of useful life	JP9143197 [94]	
	Cosmetics industry	<i>Pfaffia sp.</i> To obtain a composition that have excellent <i>in vivo</i> collagen synthesis promoting action	JP2005255527 [95]
		<i>Pfaffia iresinoides</i> Safe skin care preparation for external use having effects on bleaching, skin roughening, wrinkles and flabbiness	JP2003335625 [96]
		To provide a composition for hair treatment	20060165636 [97]
The invention relates to a cosmetic or dermatological composition, as well as a cell culture medium*		5609873 [98]	
To use of at least one ecdysteroid for preparing cosmetic or dermatological compositions intended to prevent hair loss*		20050137175 [99]	
<i>Pfaffia paniculata</i> To treatment or prevention of various dermatological conditions, including wrinkling or sagging of the skin, irradiation induced skin and/or hair damage, deepening of skin lines, elastotic changes in the skin, as well as for the routine care of the skin, hair and/or nails		20070122492 [100]	
A highly preservative and antibacterial cosmetic composition that can easily be applied to both emulsion and non-emulsion type cosmetics		20060018867 [101]	
<i>Pfaffia stenophylla</i> Cellulite treatment (*, ♣)		BRPI0403155 [102]	
Defensives		<i>Pfaffia sp.</i> To provide a termite control agent	JP2007070351 [103]
		<i>Pfaffia paniculata</i> To obtain an ecdysial hormone of insects	JP59010600 [73]
	<i>Pfaffia stenophylla</i> Ecdysone useful for pest control	JP2240096 [104]	

General uses	<i>Pfaffia</i> sp.	
	To inhibit the composition of decenoic acid as well as to prevent browning by mixing raw royal jelly	JP2145161 [105]
	A process for producing astaxanthin industrially efficiently at a low cost by culturing microorganism	EP0543023 [106]
	A composition containing a flavonoid	DE19834717 [107]
	<i>Pfaffia iresinoides</i>	
	Production by callus cultures of crude saponin, crude sapogenin, β -ecdysone, among others	JP63216478 [108]
	Use of an ecdysteroid for the preparation of cosmetic or dermatological compositions intended, in particular, for strengthening the water barrier function of the skin or for the preparation of a skin cell culture medium, as well as to the compositions*	5609873 [98]
	Hydrated lipidic lamellar phases or liposomes are disclosed containing at least in part at least one ecdysteroid or ecdysteroid derivative, in particular ecdysterone*	5198225 [109]
	<i>Pfaffia glomerata</i>	
	Process for producing a plant extract containing plant powder	20040161524 [110]
	<i>Pfaffia paniculata</i>	
	Agent in kavalactones production (Ansiolitic and relaxing substance)	20040071794 [111] 20040081664 [112] 20060251715 [113] 20060251742 [114]

Use of * *P. paniculata*; and * species of the genus *Pfaffia*.

It is found endemically in tropical regions of Brazil, being highly adapted with variable productivity, and different levels of active ingredients of phytoterapeutic value [63]. The contents of ecdysone in dry roots of *P. glomerata* as determined in several reports, ranged from 0.64 to 0.76% [52,63,116]. However, Figueiredo et al. [117] analyzed several accessions and observed values between 0.15 and 0.47%. Kamada [36] evaluated the genetic diversity of *Pfaffia* populations by means of RAPD, morphologic characters and β -ecdysone concentration. The author has found high dissimilarity for all groups of evaluated characters among individuals, and high average of β -ecdysone production (0.72%), recommending the incorporation of these individuals into breeding programs. These works highlight the great genetic variability existing among the populations.

The *P. glomerata* root extracts possess anti-inflammatory, analgesic [10], antioxidant [9], anti-hyperglycemic [75], tonic, aphrodisiac [116,118], antireumatics [19], antitumoral and antidiabetic properties, and also as food supplement, among other indications [61]. It also aids the protection and disturbances in the gastric mucous membrane [118], purification of the blood and the hormonal and sexual functions regulation [59].

Gosmann et al. [119], analyzing the ethanolic extract observed the absence of antiviral, antiproliferative, antifungal or inhibitory monoaminooxidases activities. However, they emphasized the need of further chemical, pharmacological and technical studies, to guarantee the bases of the therapeutic use of the species of *Pfaffia*.

The hydroalcoholic extract obtained from *Pfaffia* sp. roots effectively protected the gastric mucosa and inhibited gastric acid secretion in rats, ratifying the folk information regarding the use of the plant in gastric disturbances [120]. *P. glomerata* which has gastric protecting action [64], is widely used by folk medicine for seniors as tonic products for the memory, to improve fitness [121], and as aphrodisiac [122]. The ecdysteroids (β -ecdysterone) present moisturizing function, avoiding the excessive loss of water from the epidermis and the precocious aging of the skin [26,98].

De-Paris et al. [123] evaluated the psychopharmacological profile of the roots of *P. glomerata* and their results showed depressive effects of the central nervous system in the model of time of sleep in mice treated acutely. On the other hand, Vigo et al. [32] focussed on the treatment doses and times variations in relation to sleep, and concluded that the extract of the roots seems to promote some interference on the sleep of animals in a two-phase way in agreement with the dose and time treatments. Both works are then conflicting regarding the indication of the use of *Pfaffia*.

In relation to the antimicrobial activity, Farias & Costa [124] employing root extracts of *P. glomerata* prepared with ethyl acetate, evaluated the effects on several microorganisms, inhibiting growth with *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and *Mycobacterium smegmatis*. However, Vigo et al. [32] using small amount of the extract of *P. glomerata* mixed with inoculum of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* diluted 1:10 for the microdilution in broth, concluded that there was no antimicrobial effect. However, studies accomplished *in vitro* indicated efficient activity against *Leishmania braziliensis*, but it was inactive for *Trypanosoma cruzi* [125].

Amongst the several works that aimed at elucidating the pharmacological application of *Pfaffia* species, Marques et al. [121] evaluated the tonic effect of the standardized extract of the *P. glomerata* roots in physical activity. The authors concluded that in the terms of the used protocol and the number of volunteers involved, the extract did not promote any benefit to the volunteers in aptitude terms and physical activity, contradicting the folk use and the commercial propaganda of several products containing roots of species of this genus. Souza et al. [9] analyzing the antioxidant activity of 20-hydroxy-ecdysterone observed that although the toxicity *in vitro* does not mean that these circumstances will be reflected in humans, other investigations and monitoring of the adverse effects of the use of *Pfaffia* must be accomplished. Still considering that the use of *P. glomerata* should be cautious, because it can present different effects depending on the administration route [123].

Pfaffia iresinoides

The concentrations of β -ecdysone obtained in different organs of *P. iresinoides* were: 0.92% in the leaves, 0.17% in the stems and 0.62% in the roots of ecdysterone [15]. However, for commercial extraction of β -ecdysone the roots are used because they present a larger proportion in the total plant in relation to the leaves.

Tanaka et al. [126] suggested that the use of *P. iresinoides* in the extraction of the composition β -ecdysone would be favored, because this presents a small amount of analogous compositions as the polypodine B and pterosterone.

Analysis by HPLC of saponin extract demonstrated the presence of 0.072% of ecdysterone in *P. iresinoides*, and their roots presented the effective power in rheumatic patients when repeated doses were administered for some weeks [18]. Moreover, these authors investigated the pharmacological activities of the aqueous extracts and saponins fraction, as well as those of the ecdysterone from the roots of *P. iresinoides*, and did not observe anti-inflammatory activity in the experimental models used. However, it possesses analgesic activity in mice, as reported in a Japanese patent registered under n° 63002928 of January 07, 1988 [53].

Pfaffia paniculata

The interest in *P. paniculata* increased after the report of their pharmacological properties, in the form of patents. Due to those results, the national and international commercialization of roots of the Brazilian ginseng was disseminated, either separately or in association with "ginsengs" of other origins [28].

This species is considered a complementary element in the alternative medicine, and it has been included in the database of NAPRALERT as a plant used against cancer [127]. Roots of *P. paniculata* possess moluscicide activity [69], analgesic, anti-inflammatory [128] and anticarcinogenic [129,130] properties and they act in the hepatocarcinogenic promotion or in its progression [70].

All parts of the plants are used in folk medicine, but the roots are considered the most valuable. Traditionally, the plants have been used in the treatment of diabetes, rheumatism, ulcers, leukemia and other cancer types, as a tranquilizer, general tonic and aphrodisiac [77]. Recent studies demonstrated that the plant has biological activity as an anti-allergenic, analgesic, anti-inflammatory, antitumoral, and has a weak depressive

effect in the central nervous system and it reduces the vascular permeability, not demonstrating toxicity levels to the humans [77].

The efficiency of dietary supplements in the prevention and cancer treatment is a popular and controversial object of the research; the largest effect of anticarcinogenic action has been demonstrated by agents with multiple activities, suggesting that the natural compositions present a multifunctional activity, among them the angiogenesis control [131]. In this line, Carneiro et al. [132] investigated the toxicity and the action of metanolic extracts of *P. paniculata* root as a therapeutic effect in the angiogenesis and concluded that the dose of 1000 mg Kg⁻¹ was capable of reducing it without showing any toxic effects.

The saponins of the pfaffosides group and pfaffic acid, both found in the roots of this plant, are effective for the inhibition of melanoma tumors culture cells and for the regulation of sugar blood level, as found in a Japanese patent [71].

The allantoin, present in the *P. paniculata*, has a recognized healing and regeneration cellular action and it can be used in preparations for skins that suffered small damages [53].

Pfaffia tuberosa

The ecdysterone presence was registered in the roots of *P. tuberosa* and of *P. irisinoides* [15,16,20], that are often used in the processing of phytoterapics [25].

In the folk medicine *P. tuberosa* is used in the vascular and rheumatic diseases treatment, as a tonic aphrodisiac [21], and for the infertility treatment [133]. According to Nishimoto et al. [20] the ecdysterone content in *P. tuberosa* is smaller than the one found in *P. irisinoides*.

Conventional propagation and *in vitro* propagation

The increased demand for natural products requires a regular and adequate supply of raw material of many medicinal plants. The main reason is related to the drastic decrease of the natural populations as a result from the intensive and predatory exploitation [55], besides technical difficulties in cultivating wild plants and increasing labor costs [134].

In order to attend the ever increasing demand of the Brazilian ginseng alternatives for the production and regular supply of homogeneous raw material with quality, adequate propagation techniques have to be available [135].

The propagation of the species can be achieved by sexual means [61]. Despite the difficulty of seed extraction and processing, with low extraction efficiency, propagation by seeds may be considered viable [136]. However, seed germination percentages range from 12 to 67% [55].

Clonal propagation by cuttings is also an alternative method [19]. In this case, the age of the mother plant influences the root weight positively [61], therefore, the β -ecdysone concentrations vary according to the plant age [4,63]. In agreement with these correlations, the height of the plant and the number of branches per plant can be important variables to improve the productive potential of the cultivated materials of *P. glomerata*, since they are non destructive variables, though enabling the evaluation of root yielding of a certain genotype without the need of harvesting [61]. Montanari found that the production of roots of *P. glomerata* plants established by sexual propagation was higher than the one achieved by vegetative propagation [61].

In addition, clonal propagation is also possible via tissue culture. Tissue culture constitutes a promising alternative for a regular and homogeneous supply of raw plant material, with high physiological and sanitary standards. This technique has a great potential of application for the species, with potential application on *in vitro* germplasm conservation, micropropagation, establishment of cell suspension cultures, and in plant regeneration and genetic transformation protocols to study biosynthetic pathways of secondary metabolites.

The possible use of plant tissue culture techniques in maintaining some of the large world collections of vegetatively reproduced plants has long been in mind of the researchers [137]. The importance of characterizing germplasm collections is based on the identification and eligibility of relevant traits for genetic improvement and *ex situ* germplasm conservation. The world germplasm collections of cereals account for 46.8% of the total, whereas medicinal plants correspond to only 0.07% [138]. Indeed, *in vitro* techniques could facilitate crop propagation and improvement, avoiding future losses in consequence of diseases and pests [139].

In spite of the great importance of *Pfaffia*, only a few reports on tissue-cultured based techniques are found in the literature. The works related to the *in vitro* propagation focussing mainly on two species of the genus *Pfaffia* - *P. glomerata* and *P.*

tuberosa. However, the clonal propagation of *P. iresinoides* has also been reported (Table 3).

A field and *in vitro* *Pfaffia* germplasm collection was initiated by late 2001 and mid 2002, respectively, at Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. In 2004, stem cuttings of the accessions were kindly exchanged Viçosa Federal University for agronomic, molecular studies, and subsequent chemical characterization of β -ecdysone of the genotypes available [36,55]. These accessions were established *in vitro*, and the germoplasm bank is nowadays composed by 71 accessions collected in several regions in Brazil. Besides qualitative and quantitative traits, 20-hydroxyecdysone concentrations were also analyzed. The chemical, agronomical, and genetic characterization of these accessions is necessary to identify promising source of materials, including nematodes and fungi resistance, and high content of β -ecdysone. The data supported the hypothesis that there is a genetic diversity in between *P. glomerata* germoplasm bank accessions.

These accessions established *in vitro* are currently being used for further propagation, classical breeding and studies at molecular level. The establishment of germplasm collections together with the domestication of this species will contribute for a more rational and sustainable exploitation of natural populations [55].

Pfaffia glomerata

The propagation of *P. glomerata* is viable through seed [59] as well as by cuttings maintained under nursery or hydroponic conditions [19]. The vegetative propagation carried out by cutting of branches is one the means of obtaining homogeneous populations, as the propagation by seeds results in populations with a wider genetic variability [140].

Although the propagation by cuttings is an appropriate method for *P. glomerata* it is technically a low-yield approach [19], once the availability of propagative material presents an average of 30 branches/plant of 2 year-old [40]. In that way, Nicoloso et al. [40] established a protocol for *in vitro* propagation, in which a single nodal segment yielded 15.000 plants at the end of six months, demonstrating the potential of this technique to scale up propagation.

Aiming to optimize the *in vitro* propagation for *P. glomerata*, several studies focused on the effect of the activated charcoal and macronutrients concentration [40]; nitrogen and phosphorus contents in MS medium [43]; auxin and cytokinin combination

in the growth of callus and saponins production [44,134]; sources and doses of iron in the micropropagation [141]; sucrose concentrations seeking acclimatization [45]; levels of nitrogen and sucrose during six successive subcultures and acclimatization, evaluating the growth of the seedling [47]; sucrose concentration with sealing types, gelling agents and its concentration and *in vitro* micrografting (unpublished data).

To establish *Pfaffia in vitro* Nicoloso et al. [40] tested four explant types (leaf apical and basal portion, nodal and internodal segments), and used 0.1% HgCl₂ for 5 minutes, in the disinfection process. These conditions were efficient in providing aseptic plants starting from nodal segments. But prolonged time of immersion in HgCl₂ led to a sensitive decrease in the rate of shoot and root growth, or even determined explant senescence and death. Bearing in mind that the combination of alcohol and sodium hypochlorite is a reliable alternative for surface sterilization of the material to be introduced, but depends on the degree of contamination and the cultural treats that the mother plants are submitted.

The nodal segment-based *in vitro* culture is prone for cloning *P. glomerata* [40]. The explants derived from the proximal end provided the highest multiplication rate and greater plant biomass, height, number of roots and shoots. The size of test tube (20 cm of height x 2 cm Ø) positively influenced growth and biomass accumulation of vitroplants, as compared to the small one (15 cm height x 2,5 cm Ø) [41].

It is well known that cells, tissues and seedlings cultivated *in vitro* do not find light conditions and CO₂ concentrations, and appropriate chlorophyll tenors to accomplish photosynthesis and sustain the growth [142,143,144,145]. Considering such *in vitro* conditions, Skrebsky et al. [45] obtained favorable results in the acclimatization stage of plantlets comes from treatments with 45 and 60 g L⁻¹ sucrose.

The increase of the sucrose concentration associated to the reduction of the N concentration stimulates the biomass production, while the MS medium stimulates the growth in height and number of nodal segments. The differences concerning the biomass production observed in the *in vitro* culture were not reflected in the acclimatization process [47].

Kagiki et al. [44] obtained best callusing responses using 1 mg L⁻¹ 2,4-D along with 0.5 mg L⁻¹ kinetin, under darkness. However, the greatest saponins production occurred when 60 g L⁻¹ sucrose was added to the culture medium.

Regarding to the influence of carbon sources (sucrose, fructose, glucose, maltose and lactose) and their doses on plant micropropagation by means of nodal cultures in any of the tested doses Nicoloso et al. [42] obtained greater shoot number, as similarly

observed by Nicoloso et al. [40]. The results suggest that *P. glomerata* does not present a great plasticity in relation to the shoot number. As for the carbon source the authors observed that sucrose influenced in a positive way the shoot numbers, whereas lactose was considered inappropriate. The total number of nodal segments, average height of the shoots, height of the longest shoot, fresh and dry masses of the aerial part and the dry mass of roots increased by the increment of the sucrose doses (30, 45 and 60 g L⁻¹).

Studies to evaluate the photomixo- and photoautotrophic potential of *P. glomerata* *in vitro* cultures are currently in progress in our laboratory. The preliminary results obtained so far indicated a high competence for growth when gaseous exchanges are stimulated in culture medium lacking sucrose (unpublished data). Indeed, positive results have been published on the use of photoautotrophic propagation [146] upon *in vitro* growth and acclimatization of medicinal species [147,148,149,150].

The easiness of *in vitro* rooting and in well developed plants evidenced that the standard concentration of the MS medium salts and the absence of activated charcoal favored the growth of *P. glomerata* [40]. Studies accomplished by Nicoloso et al. [40] showed that the rooting percentage (91%) of the *P. glomerata* was not influenced by the variation in all of the macronutrients of the MS medium at 14 days after the inoculation. However, Russowski & Nicoloso [43] observed that the increase of the nitrogen and phosphorus concentrations, between 60 and 100% that of the MS medium, supported the best growth of the aerial part.

Nicoloso & Ferrão [141] evaluated different sources and doses of iron in the micropropagation of *Pfaffia*. It was concluded that the number of roots differentiated in elongated shoots increased with the time of propagation and it differed among sources and doses of iron. However, the shoot number per plant was not affected by the sources of iron, considering that the best dose of iron was 2.8 mg L⁻¹, as recommended by Caldas et al. [151]. The supplementation of the culture medium with BAP and KIN did not promote any additional effect upon axillary shoot proliferation in nodal cultures [152].

The development of an *in vitro* culture protocol to scale up production of homogeneous propagative material requires adjustments from the multiplication phase up to the establishment and maintenance of these plants *ex vitro*. The *in vitro* propagation of nodal segments in MS medium showed to be an appropriate methodology for the production of homogeneous and productive seedlings of *P. glomerata* [40,153].

Flores et al. [153] evaluated the morphogenic behavior of explants of two *P. glomerata* accessions during the micropropagation. Plants of both accessions presented a high survival rates during the acclimatization phase, and a satisfactory adaptation to the environmental conditions. Interestingly, after two years of cultivation in soil, the greater concentration of β -ecdysone (0.42%) in roots was detected in the accession presenting higher averages of shoot numbers, nodal segments and medium shoots size, as compared to the accession that presented the lower tenor of β -ecdysone (0.28%).

Variations in the concentrations of β -ecdysone are due mainly to a great genetic variability among the accessions [117]. However, there is lack of information on the contribution of plant organs on the biosynthesis of ecdysteroids, in special in the aerial parts throughout culture cycle. Using two accessions whose productions of the active principles are divergent, *in vitro* reciprocal grafting were done. This technique proved to be efficient for the species, including with good adaptation of the grafted plants to the *ex vitro* conditions. Further chemical analyses will be accomplished to quantify active principles tenor and possible alterations in the concentration as affected by reciprocal micrograftings (unpublished data).

Once tissue culture confirmed the success in the micropropagation of *P. glomerata*, further studies on the type and concentration of the gelling agents and different supporting material are under way in our laboratory, aiming to refining the protocol and lowering costs. For instance, positive and promising results were obtained in the absence of gelling agent (unpublished data).

Pfaffia tuberosa

P. tuberosa presents an extremely fragile stem, which seems to possess little potentiality for the vegetative propagation via cutting *ex vitro* [25]. Unlike other species, its propagation is not prone and the cultivation of seeds probably originates highly heterogenous plants, as revealed by the high genetic variability present in this species [38]. The success in the cloning of this species opens perspectives for the production of superior genotypes, seeking for uniform and high productivity plantings [154].

Some *in vitro* propagation studies of *P. tuberosa* have been carried out, aiming the following: evaluation of influence of macronutrient concentrations of the MS medium [25]; explant source and auxin type in the establishment of callus and in the morphogenetic expression [133]; optimization of the protocol [135]; and the use of TDZ (Thidiazuron) as an alternative cytokinin [154]. The cloning of *P. tuberosa* was

established from nodal explants, however its *in vitro* establishment depends on successive treatments with 0.1% HgCl₂ (mercury bichloride), whose toxicity represents further difficulties in the survival in the acclimatization stage [25]. The macronutrients standard concentration from the MS medium sustained the growth of the plants, and allowed the obtainement of about 100 new plants starting from a single explant in the period of six months [25].

Flores et al. [135] looked at the improvement of the surface disinfection and acclimatization process of this species. The authors suggest a sterilization protocol based on the use of the fungicide benomyl, alcohol, sodium hypochloride and HgCl₂. Also, nodal segments provided a greater rate of *in vitro* multiplication when compared to the apical segments, not being affected in elapsing of the subcultures, which must be accomplished every 30 days.

Furthermore, Flores et al. [154] on the use of TDZ concentrations during the multiplication, elongation, rooting and acclimatization of the plants, reported better result at 30 days of cultivation. In average, 18 new nodal segments were obtained in the multiplication phase with the use of 1 µM of TDZ. Following the subculture of the shoots in MS medium devoid of growth regulators generated, nine nodal segments/shoot, though yielding a total of 162 plants starting from a single nodal segment established *in vitro*, at the end of two months.

Flores et al. [155] using leaf, nodal, internodal and root segments cultured in the presence of different concentrations of 2,4-D, BAP and ANA, found significant differences in the morphogenic responses among the different explants. The best results were achieved root explants, followed by nodal segment, internodal segment and leaf explants. The former had embryogenic competence, whereas leaf explants presented rhizogenic competence. The largest proliferation of friable calli was obtained in nodal segments cultured in 1 mM BAP and 10 mM 2,4-D-supplemented MS medium; however, the regeneration took place when calli were culture in the presence of 1 mM BAP and 1 mM 2,4-D.

Recently, was evaluated the behaviour of cultures of *P. tuberosa* as affected by concentrations of carbohydrate source, sealing types and increased levels of irradiance in the growth room. The results demonstrated that the species, under these conditions, presented a markedly photoautotrophic potential if it is given the proper conditions (unpublished data). These results can help in the obtaining of the plants better survival rates in the acclimatization phase. Because these plants are very susceptible to the

dehydration, and the process of acclimatization of *P. tuberosa* though should be conducted in atmospheres with high relative humidity [135].

The conditions that prevail *in vitro*, mainly the irradiance, can be used to determine cultivation conditions optimized [156], when the light levels are insufficient for the occurrence of the compensation for photosynthesis, and high carbon dioxide levels may accumulate in the culture vessel, because the respiration rate exceeds the photosynthesis [137]. In addition, the culture media are based on the carbohydrate supplementation and photosynthetic activity *in vitro* cultures sometimes linked to the sequential reduction of the sugar supply [137]. Due to the low photosynthetic capacity of the plants cultivated *in vitro*, these require the carbohydrates addition to supply their metabolic needs, either participating in the generation of energy or as a carbon skeletons source for several biosynthetic processes implicated in the differentiation and cellular growth [157].

Pfaffia iresinoides

The only report on *in vitro* propagation of this species was by Tanaka et al. [126], highlighting significant shoot proliferation induced by 1 mg L⁻¹ BAP, concomitantly with the decrease in the amount of β -ecdysone. However, the addition of 1 mg L⁻¹ NAA somehow counteracted the reduction of the β -ecdysone production, as affected for BAP in the multiple shoots. The leaves of this species are not adequate for the extraction of β -ecdysone due to its highly fluctuating content in this organ and the high chlorophyll content that make the isolation of this substance difficult.

General micropropagation protocol

Disinfection and plant establishment

To set up our *in vitro* germoplasm bank, plants collected from various places in Brazil were vegetatively propagated by cuttings and grown in a greenhouse. They were sprayed once with the systemic fungicide Benomyl 0.1%. Actively growing young apical cuttings (2-3 cm height) with 2-3 axillary buds were removed from donor plants and washed with running water for 60 min.

They were sequentially immersed in ethanol 70% (v/v) for 20 s, in sodium hypochlorite 1% (w/v) (Super Globo[®] UFE, Brazil) plus 2 drops of Tween-20 (Sigma-Aldrich Co, St Louis, MO) for 10 min., then immersed in HgCl₂ 0,1% for 5 min., and

rinsed six times in sterile distilled water [40,135]. All procedures were carried out under sterile conditions in a laminar flow hood (Pachane[®], Brazil).

Table 3: Optimal parameters for *Pfaffia* spp. *in vitro* culture as determined by different authors

Species	Source of explant	Hormone type and concentration	Morphogenic response	Reference
<i>P. iresinoides</i>	Nodal segments	MS0	Direct organogenesis/axillary shoot proliferation	[126]
		4.44 μ M BAP	Direct organogenesis/axillary proliferation	
<i>P. glomerata</i>	Nodal segments	MS0	Direct organogenesis/axillary proliferation	[40]
	Nodal segments	MS0	Direct organogenesis/axillary proliferation	[41]
	Nodal segments	MS0	Direct organogenesis/axillary proliferation Rhizogenesis	[43]
	Nodal segments	MS0	Direct organogenesis/axillary proliferation	[42]
	Stem and root explants	4.53 μ M 2,4-D + 2.33 μ M KIN	Callogenesis	[44]
	Nodal segments	MS0	Direct organogenesis/axillary proliferation	[45]
	Nodal segments	MS0	Direct organogenesis/axillary proliferation	[46]
	Nodal segments	MS0	Direct organogenesis/axillary proliferation	[47]
<i>P. tuberosa</i>	Nodal segments	MS0	Direct organogenesis/axillary proliferation	[25]
	Nodal segments	1 mM BAP + 1 and 10 mM 2,4-D	Callusing/indirect organogenesis	[133]
	Nodal segments	MS0	Direct organogenesis/axillary proliferation	[135]
	Nodal segments	1 μ M TDZ	Direct organogenesis/axillary proliferation	[154]
	Nodal and roots segments	1 μ M BAP + 1 or 10 μ M 2,4-D or 10 μ M NAA	Embryogenic calli Shoot regeneration/indirect organogenesis	[155]
			1 μ M BAP + 1 μ M 2,4-D	

BAP: 6-benzylaminopurine; 2,4-D: 2,4 dichlororophenoxyacetic acid; MS0: MS medium lacking growth regulators; TDZ: Thidiazuron.

The medium was autoclaving at 120 °C, 1.1 kgf cm⁻² for 20 min. Nodal segments were incubated in this medium in a growth room at 25 \pm 2 °C, under a 16-h photoperiod and PFD of 50 μ mol m⁻² s⁻¹ provided by two cool white fluorescent tubes (20 W, Phillips[®]).

Shoot proliferation and rooting

Shoot induction and rooting were achieved on a MS medium plus vitamins [158] supplemented with 3 % (w/v) sucrose (Sigma-Aldrich Co, St Louis, MO) and myo-inositol (100 mg L^{-1}) (Sigma-Aldrich Co, St Louis, MO) devoid of growth regulators, all media were prepared with 0.7 % (w/v) agar (Merck, Germany) and its pH was adjusted to 5.7. Elongated shoots rooted spontaneously.

Acclimatization and transplanting

Rooted plants were individually transferred to disposable plastic pots (200 mL capacity) vessels filled with horticulture organic substrate (Plantmax[®], Brazil) covered with a transparent plastic bag, under a light panel ($70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) for 30 days. Plastic bags were progressively opened by lateral cuts throughout the first four weeks of the hardening-off process. At the end of the fourth week, the vessels were completely uncovered. They were transferred to a shading house and irrigated on a daily basis. Acclimatized plants were transplanted outdoors into 20 L vessels filled with substrate composed of soil:sand:manure (4:1:1). Plants were watered on a daily basis.

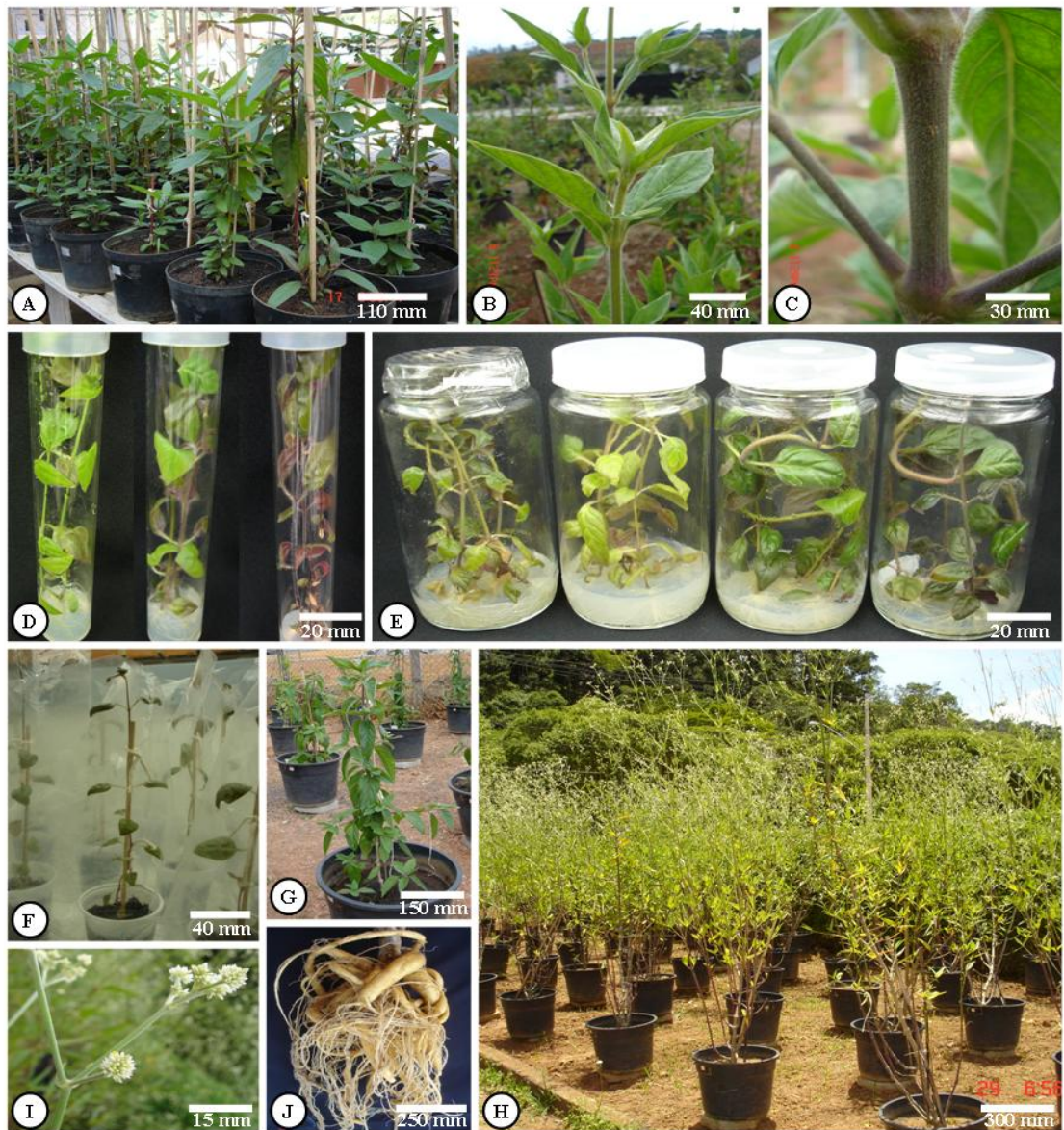


Figure 1. General aspects of *Pfaffia glomerata* vitroplants cultured *in vitro* and *ex vitro*. **A.** Plants growing under greenhouse conditions propagated from stem cuttings. Detail of the stem of field grown plants (**B**) and close-up of nodal and internodal (**C**) stem regions, used as explants for establishment *in vitro*. **D, E.** Plants cultured *in vitro* in different culture vessels and type of closures (**G**). **F.** Acclimatization of vitroplants. **G-H.** Vitroplants transferred outdoors, after 45 (**G**) and 6 months (**H**) after acclimatization. Details of an inflorescence (**I**) of a mature plant and tuberos roots (**J**) produced after 9 months after acclimatization.

REFERENCES

- [1] SMITH, L.B.; DOWNS, R.J. 1972. Amaranthaceas de Santa Catarina *In*: Flora Ilustrada Catarinense. Itajaí: HBR. p. 35-50.
- [2] SIQUEIRA, J.C.; GRANDI, T.S.M. 1986. O Gênero *Pfaffia* Mart. (Amaranthaceae) nos Cerrados e Campos Rupestres de Minas Gerais. *Acta Biol. Leopold.*, 1(2):213-230.
- [3] SIQUEIRA, J.C. 1988. Considerações taxonômicas sobre as espécies brasileiras do gênero *Pfaffia* Mart. (Amaranthaceae). *Acta Biol. Leopold.*, 10(2):269-278.
- [4] CORRÊA JR., C. 2003. Estudo agrônômico de fâfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]: Sazonalidade na produção de raízes e conteúdos de β -ecdisona em diferentes acessos de São Paulo, Paraná e Mato Grosso do Sul. Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 73p. (PhD. Thesis).
- [5] CORREIA, M. 1974. Dicionário de plantas úteis do Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 5:369-371.
- [6] SIQUEIRA, J. C. 1987. A família Amaranthaceae nas restingas do Brasil. *Acta Biol. Leopold.*, 9(1):5-22.
- [7] VIGO, C.L.S.; NARITA, E.; MARQUES, L.C. 2004. Influências da variação sazonal e tipos de secagem nas características da droga vegetal – raízes de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). *Rev. Bras. Farmacog.*, 14(2):137-144.
- [8] TASCHETTO, O.M.; PAGLIARINI, M.S. 2004. Meiotic behavior in tetraploid population of *Pfaffia tuberosa* (Amaranthaceae). *Acta Bot. Croat.*, 63(1):17-24.
- [9] SOUZA D., J.F.S.; ALVES, K.Z.; DA SILVA JACQUES, D.S.; SILVA E SOUZA, P.V.S.; CARVALHO, M.G.; FREIRE, R.B.; FERREIRA, D.T.; FREIRE, M.F.I. 2005. Free radical scavenging activity of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). *Indian J. Pharmacol.*, 37(3):174-178.
- [10] NETO, A.G.; COSTA, J.M.L.C.; BELATI, C.C.; VINHÓLIS, A.H.C.; POSSEBOM, L.S.; DA SILVA FILHO, A.A.; CUNHA, W.R.; CARVALHO, J.C.T.; BASTOS, J.K.; SILVA, M.L.A. 2005. Analgesic and anti-inflammatory activity of a crude root extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. *J. Ethnopharmacol.*, 96:87-91.
- [11] RATES, S.M.K.; GOSMANN, G. 2002. Gênero *Pfaffia*: aspectos químicos, farmacológicos e implicações para seu emprego terapêutico. *Rev. Bras. Farmacog.*, 12(2):85-93.
- [12] TASCHETTO, O.M.; PAGLIARINI, M.S. 2003. Occurrence of 2n and jumbo pollen in the Brazilian ginseng (*Pfaffia glomerata* and *P. tuberosa*). *Euphytica*, 133: 139–145.
- [13] OLIVEIRA, F. 1986. *Pfaffia paniculata* (Martius) Kuntze - O ginseng brasileiro. *Rev. Bras. Farmacog.*, 1(1):86-92.
- [14] NISHIMOTO, N.; NAKAI, S.; TAKAGI, N.; HAYASHI, S.; TAKEMOTO, T.; ODASHIMA, S.; KIZU, H.; WADA, Y. 1984. Pfaffosides and nortriterpenoid saponins from *Pfaffia paniculata*. *Phytochemistry*, 23(1):139-142.
- [15] NISHIMOTO, N.; SHIOBARA, Y.; FUJINO, M.; INOUE, S-S.; TAKEMOTO, T.; OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K.; HASHIMOTO, G.; TANAKA, O.; KASAI, R.; MATSUURA, H. 1987. Ecdysteroids from *Pfaffia iresinoides* and reassignment of some ¹³CNMR chemical shifts. *Phytochemistry*, 26(9):2505-2507.
- [16] NISHIMOTO, N.; SHIOBARA, Y.; INOUE, S-S.; FUJINO, M.; TAKEMOTO, T.; YEOH, C.L.; OLIVEIRA, F. de; AKISUE, G.; AKISUE, M.K.; HASHIMOTO, G. 1988. Three ecdysteroid glycosides from *Pfaffia iresinoides*. *Phytochemistry*, 27(6):1665-1668.
- [17] SHIOBARA, Y.; INOUE, S.; NISHIGUCHI, Y.; KATO, K.; TAKEMOTO, T.; NISHIMOTO, N.; OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K.; HASHIMOTO, G. 1992. Iresinoside, a yellow pigment from *Pfaffia iresinoides*. *Phytochemistry*, 31(3):953-956.

- [18] TANIGUCHI, S.F.; BERSANI-AMADO, C.A.; SUDO, L.S.; ASSEF, S.M.C.; OLGA, S. 1997. Effect of *Pfaffia irsinoides* on the experimental inflammatory process in rats. *Phytother. Res.*, 11:568-571.
- [19] NICOLOSO, F.T.; FORTUNATO, R.P.; FOGAÇA, M.A.F. 1999. Influência da posição da estaca no ramo sobre o enraizamento de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen em dois substratos. *Ciência Rural*, 29(2):277-283.
- [20] NISHIMOTO, N.; SHIOBARA, Y.; YNOUE, S.; FUJINO, M.; TAKEMOTO, T.; YEOH, C.L.; HASHIMOTO, G. 1986. Ecdisterone from *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. 1986. *Rev. Bras. Farmacog.*, 1(2):188-191.
- [21] SIQUEIRA, V.L.; LOPES, A.M.V.; AKISUE, M.K.; AKISUE, G.; PAIM, A.C. 1993. Aspectos anatômicos e morfológicos do sistema subterrâneo de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken (Amaranthaceae). *LECTA – USF, Brag. Pta.*, 11(1):29-42.
- [22] SHIOBARA, Y.; INOUE, S-S.; KATO, K.; NISHIGUCHI, Y.; OISHI, Y.; NISHIMOTO, N.; OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K.; HASHIMOTO, G. 1993. A nortriterpenoid, triterpenoids and ecdysteroids from *Pfaffia glomerata*. *Phytochemistry*, 32(6):1527-1530.
- [23] NAKAI, S.; TAKAGI, N.; MIICHI, H.; HAYASHI, S.; NISHIMOTO, N.; TAKEMOTO, T.; KIZU, H. 1984. Pfaffosides, nortriterpenoid saponins, from *Pfaffia paniculata*. *Phytochemistry*, 23(8):1703-1705.
- [24] CORRÊA JR., C.; MING, L. C. 2004. Fáfia (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen): o ginseng brasileiro. In: Alexiades, M.N.; Shanley, P. (Org.). *Productos florestales, medios de subsistencia y conservacion: estudios de caso sobre sistemas de manejo de produtos florestales no maderables*. Jacarta: CIFOR. 3:349-363.
- [25] MARTINS, C.F.; NICOLOSO, F.T. 2004. Micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. *Rev. Bras. Pl. Med.*, 6(3):53-61.
- [26] CORRÊA JR., C.; CORTEZ, D.A.G.; MING, L. C.; SOARES, W. 2006. Fáfia – O ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Sprengel) Pedersen): Aspectos Agronômicos e Fitoquímicos. Curitiba: Clichetec, 22p.
- [27] SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M.L. 2002. Saponinas. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 4.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2002. pp. 607-632.
- [28] VIGO, C.L.S.; NARITA, E.; MILANEZE-GUTIERRE, M.A.; MARQUES, L.C. 2004. Caracterização farmacognóstica comparativa de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Hebanthe paniculata* Martius – Amaranthaceae. *Rev. Bras. Pl. Med.*, 6(2):7-19.
- [29] SANTOS, R.I.; SCHENKEL, E.P. 1986. Análise cromatográfica de amostras comercializadas como *Panax ginseng* C.A. Meyer e *Pfaffia paniculata* (Martius) Kuntze. *Cad. Farm.*, 1(1):17.
- [30] VALLEJO, S. 2007. Cultivo de ginseng. Resposta Técnica. Disponível em: www.sbirt.ibict.br. Acesso em 25/07/2007.
- [31] VIGO, C.L.S.; NARITA, E.; MARQUES, L.C. 2003. Validação da metodologia de quantificação espectrofotométrica das saponinas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen – Amaranthaceae. *Rev. Bras. Farmacog.*, 13(2):46-49.
- [32] VIGO, C.L.S.; NARITA, E.; NAKAMURA, C.V.; MARQUES, L.C. 2003. Avaliação dos efeitos das raízes de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen sobre o tempo de sono e crescimento bacteriano. *Rev. Bras. Farmacog.*, 14:14-17.
- [33] ZIMMER, A.R.; BRUXEL, F.; BASSANI, V.L.; GOSMANN, G. 2006. HPLC method for the determination of ecdysterone in extractive solution from *Pfaffia glomerata*. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 40:450-453.
- [34] ESTELITA-TEIXEIRA, M.E.; HANDRO, W. 1984. Leaf ultrastructure in species of *Gomphrena* and *Pfaffia* (Amaranthaceae). *Can. J. Bot.*, 62:812-817.

- [35] HANDRO, W. 1964. Contribuição ao estudo da venação e anatomia foliar das Amaranáceas dos Cerrados. Anais Acad. Bras. Ciências, 36:479-499.
- [36] KAMADA, T. 2006. Avaliação da diversidade genética de populações de fáfia (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) por RAPD, caracteres morfológicos e teor de β -ecdisona. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 106p. (PhD Thesis).
- [37] TASCHETTO, O.M.; PAGLIARINI, M.S. 2003. Chromosome numbers in Brazilian and Argentine populations of *Pfaffia glomerata* (Amaranthaceae). Cytologia, 68(2): 147–152.
- [38] TASCHETTO, O.M.; PINTRO, J.C.; PAGLIARINI, M.S. 2003. Chromosome stickiness during microsporogenesis in *Pfaffia glomerata* and *P. tuberosa* (Amaranthaceae). Nucleus, 46(3):128-137.
- [39] TASCHETTO, O.M.; PAGLIARINI, M.S. 2004. Meiotic behaviour in some Brazilian and Argentine populations of *Pfaffia glomerata* (Amaranthaceae). Nucleus, 47(1/2):1-6.
- [40] NICOLOSO, F.T.; ERIG, A.C.; MARTINS, C.F.; RUSSOWSKI, D. 2001. Micropropagação do ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. Rev. Bras. Pl. Med., 3(2):11-18.
- [41] NICOLOSO, F.T.; ERIG, A.C. 2002. Efeito de tipo de segmento nodal e tamanho do recipiente no crescimento de plantas de *Pfaffia glomerata in vitro*. Ciência Agrotec., Ed. Especial: 1499-1506.
- [42] NICOLOSO, F.T.; ERIG, A.C.; RUSSOWSKI, D.; MARTINS, C.F. 2003. Efeito de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. Ciência Agrotec., 27(1):84-90.
- [43] RUSSOWSKI, D.; NICOLOSO, F.T. 2003. Nitrogênio e fósforo no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. Ciência Rural, 33(1):57-63.
- [44] KAGIKI, F.O.; GONÇALVES, G.C.; OLIVEIRA, E.T.; CROCOMO, O.J.; GALLO, L.A. 2004. Indução de calos e produção de saponinas totais em *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen *in vitro*. Rev. Bras. Pl. Med., 7(1):43-50.
- [45] SKREBSKY, E.C.; NICOLOSO, F.T.; FERRÃO, G.E. 2004. Sacarose e período de cultivo *in vitro* na aclimatização *ex vitro* de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. Ciência Rural, 34(5):1471-1477.
- [46] MALDANER, J.; NICOLOSO, F.T.; SANTOS, E.S.; FLORES, R.; SKREBSKY, E.C. 2006. Sacarose e nitrogênio na multiplicação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. Ciência Rural, 36(4):1201-1206.
- [47] MALDANER, J.; NICOLOSO, F.T.; SANTOS, E.S.; FAGUNDES, C.K.; FLORES, R.; JUCOSKI, G.O.; SKREBSKY, E.C. 2007. Crescimento de plântulas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen cultivadas *in vitro* sob dois níveis de nitrogênio e sacarose, durante seis subculturas sucessivas e aclimatização. Ciência Rural, 37(1):133-140.
- [48] SOARES, A. C. 2002. Se bem não fizer, mal também não fará. Revista Eletrônica de Ciências, 12. Disponível em: http://www.cdcc.sc.usp.br/ciencia/artigos/art_12/ medicamento. Acesso em: 02/08/2007.
- [49] ABIFISA- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS EMPRESAS DO SETOR FITOTERÁPICO. 2007. Uma legislação justa para os produtos de origem natural. Disponível em: <http://www.abifisa.org.br/introducao>. Acesso em: 02/08/2007.
- [50] CORREA JÚNIOR, C.; MING, L. C. 2006. Fáfia, ginseng brasileiro. In: LÓPEZ, C.; SHANLEY, P.; CRONKLETON. (Org.). Riquezas del bosque: frutas, remedios y artesanías en América Latina. Santa Cruz: Centro para la investigación forestal internacional, p.82-86. Disponível em: www.cifor.cgiar.org/publications. Acesso em: 20/07/2007.
- [51] NASCIMENTO, E.X.; MOTA, J.H.; VIEIRA, M.C.; ZÁRATE, N.A.H. 2007. Produção de biomassa de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Plantago major* L. em cultivo solteiro e consorciado. Ciência Agrotec., 31(3):724-730.

- [52] MAGALHÃES, P.M. 2000. Agrotecnología para el cultivo de fáfia o ginseng brasileiro. In: MARTÍNEZ, J.V.; BERNAL, H.Y.; CÁCERES, A. Fundamentos de Agrotecnología de cultivo de plantas medicinales iberoamericanas. Colombia: Convenio Andres Bello e CYTED (Serie Ciencia Y Tecnología, Nº 83). p. 323-332.
- [53] CORTEZ, D.A.G.; TRUITI, M.C.T.; CORTEZ, L.E.R. 1998. Ginseng brasileiro: revisão bibliográfica. Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR, 2(3):299-306.
- [54] MING, L. C.; CORRÊA JR., C. 2004. Evaluation of the development of fáfia - *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. Acta Hortic., 629(1):273-275.
- [55] ALVES, R.B.N.; MENDES, R.A.; MENDES, M.A.; CARNEIRO, R.M.D.G.; SILVA, D.B.; CARDOSO, L.D.; SALOMÃO, A.N.; VIEIRA, R.F. 2006. Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] germplasm conservation. Rev. Bras. Pl. Med., 8 (Esp.):1-4.
- [56] VIEIRA, R.F.; SILVA, S.R.; ALVES, R.B.N.; SILVA, D.B.; WETZEL, M.M.V.S.; DIAS, T.A.B.; UDRY, M.C.; MARTINS, R.C. 2002. Estratégias para conservação e manejo de recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas: Resultados da 1ª Reunião Técnica. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Ibama, CNPq, Brasília.
- [57] VIEIRA, R.F. 2002. Conservação de Recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas brasileiras: um desafio para o futuro. Acta Hortic., 569:61-68.
- [58] VIEIRA, R. F. Conservation of medicinal and aromatic plants in Brazil. Perspectives on new crops and new uses. Alexandria, p.152-159, 1999.
- [59] GUERREIRO, C.P.V. 2006. Análise de crescimento, curva de absorção de macronutrientes (N, P e K) e teor de β -ecdisona em fáfia (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen): em função de adubação orgânica. Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 124p. (Master Dissertation).
- [60] MING, L.C.; CORRÊA JR., C. 2002. Collection of fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] in north-western state of Paraná - Brazil. Acta Hortic., 576:29-32.
- [61] MONTANARI JR., I. 2005. Avaliação de genótipos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen visando seu cultivo comercial. Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, 63 p. (Master Dissertation).
- [62] MONTANARI JR., I.; PERECIN, M.B. 2006. Evaluation of morphological and agricultural characteristics and their phenotypic correlations in genotypes of a *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen population. Rev. Bras. Pl. Medic., 8(esp.):46-48.
- [63] MONTANARI JR., I.; MAGALHÃES, P.M.; QUEIROGA, C.L. 1999. Influence of plantation density and cultivation cycle on root productivity and tenors of b-ecdysone in *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. Acta Hortic., 502(3):125-128, 1999.
- [64] OTOFUJI, G.M. 2005. Vias envolvidas no mecanismo de ação do efeito gastroprotetor das raízes da *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 151p. (Master Dissertation)
- [65] TAYLOR, L. 2002. Herbal Secrets of the Rainforest. Disponível em: www.rain-tree.com/suma.htm, acesso em 15/07/2007.
- [66] TAKEMOTO, T.; ODAJIMA, T.; HAYASHI, S.; NISHIMOTO, K.; NAKAI, S.; TAKAGI, N. 1984. Pfaffic acid and derivative thereof. JP59010548.
- [67] HELEEN, P.A. 2002. Herbal composition for enhancing sexual response. US6444237.
- [68] TERÀN, E. 1990. Plantas de interesse da cosmetologia. Cosm. Toiletries, 2(5):18-23.
- [69] ALVIN, N. R.; CUNHA, K. C. T.; CORTEZ, L.E.R.; BAZOTTE, R.B.; MARQUES, L.C.; CORTEZ, D.A.G. 1999. Efeitos biológicos da *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Pfaffia paniculata* (Martius) Kuntze (Amaranthaceae). Acta Scient., 21(2):349-352.
- [70] SILVA, T.C.; SILVA, A.P.; AKISUE, G.; AVANZO, J.L.; NAGAMINE, M.K.; FUKUMASU, H.; MATSUZAKI, P.; RASPANTINI, P.C.; HARAGUCHI, M.; GÓRNIAC, S.L.; DAGLI, M.L.Z. 2005. Inhibitory effects of *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) on

- preneoplastic and neoplastic lesions in a mouse hepatocarcinogenesis model. *Cancer Lett.*, 226: 107-113.
- [71] LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. 2002. Plantas medicinais no Brasil – nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum. p.45-46.
- [72] OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K. 1980. Contribuição para o estudo farmacognóstico do “ginseng brasileiro” *Pfaffia paniculata* (Martius) Kuntze. *Anais da Sociedade de Farmacia e Quimica de Sao Paulo*, 20(1/2):261-277.
- [73] MATSUURA, H.; KUNIHIRO, K.; TANAKA, O.; SARUWATARI, Y. 1984. Preparation of beta-ecdysone. JP59010600.
- [74] TAKEMOTO, T.; NISHIMOTO, K.; SHIOBARA, Y.; FUJINO, M.; INOUE, S. 1988. Analgesic. JP63002928.
- [75] SANCHES, N.R.; GALLETTO, R.; OLIVEIRA, C.E.; BAZOTTE, R.B.; CORTEZ, D.A.G. 2001. Avaliação do potencial anti-hiperglicemiante da *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). *Acta Scient.* 23(2):613-617.
- [76] TAKEMOTO, T.; NISHIMOTO, N.; TAKAGI, N.; HAYASHI, S.; ODASHIMA, S.; WADA, Y. 1983. Pfaffic acid, a novel nortriterpene from *Pfaffia paniculata* Kuntze. *Tetrahedron Lett.*, 24:1057-1060.
- [77] MARTIN; M.Z.; ASHRAF-KHORASSANI, M.; TAYLOR, L. 2004. Pharmaceutical preparations of bioactive substances extracted from natural sources. United States Patent: 6746695.
- [78] SHIOBARA, Y.; INOUE, S-S.; NISHIGUCHI, Y.; KATO, K.; TAKEMOTO, T.; NISHIMOTO, N.; OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K.; HASHIMOTO, G. 1992. Pfaffane-type nortriterpenoids from *Pfaffia pulverulenta*. *Phytochemistry*, 31(5):1737-1740.
- [79] SHIOBARA, Y.; INOUE, S-S.; KATO, K.; NISHIGUCHI, Y.; TAKEMOTO, T.; OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K.; HASHIMOTO, G. 1993. Pfaffane-type nortriterpenoids from *Pfaffia pulverulenta*. *Phytochemistry*, 33(4):897-899.
- [80] MASAKI, N.; SHIBUYA, T.; FUKUDA, Y. 2002. Antiallergy composition. JP2002308795.
- [81] OBA, H.; BABA, H. 2006. Novel neovascularization inhibitor and its manufacturing method. JP2006273739.
- [82] SHIBUYA, T.; ARIO, T.; FUKUDA, S. 1999. Composition. JP11100325.
- [83] TAKEMOTO, T.; ODAJIMA, T.; HAYASHI, S.; NISHIMOTO, K.; NAKAI, S.; TAKAGI, N.; WATANABE, Y. 1984. Pfaffocide. JP59184198.
- [84] JAGER, R.; DIRK, B. 2004. Formulation containing (lyso-) phosphatidylserine for the prevention and treatment of stress states in warm blooded animals. United States Patent Application: 20040234544.
- [85] MILLER, F.H. 2005. Multi-phase, multi-compartment capsular delivery apparatus and methods for using same. United States Patent Application: 20050008690.
- [86] ENSLIN, G.F. 2004. Smoker's requisite. United States Patent Application: 20040112395.
- [87] CYR; B. 2004. Plant extracts and compositions comprising extracellular protease inhibitors. United States Patent Application: 20040175439.
- [88] CYR; B. 2006. Plant extracts for treatment of angiogenesis and metastasis. United States Patent Application: 20060228426.
- [89] OLALDE RANGEL; J.A. 2007. Synergistic phytoceutical compositions. United States Patent Application: 20070104728.
- [90] LEE, B.G.; SHINN, H.S. 2004. Pharmaceutical composition for treating liver disease. KR20040030375.

- [91] DE ARAUJO, J.T. 1995. Brazilian ginseng derivatives for treatment of sickle cell symptomatology. US5449516.
- [92] LEE, B.G.; SHINN, H.S. 2004. Pharmaceutical composition for treating thrombus. KR20040030376.
- [93] DOS SANTOS, A.S. 2007. Pharmaceutical compositions containing plant extracts, use of pharmaceutical compositions and method of treatment. WO 2007/016756 A1.
- [94] KATSUYA, H.; SHIBAGAKI, A. 1997. Production of ecdysteroid. JP9143197.
- [95] IMAI, S.; IWASHIMA, K.; MATSUURA, K. 2005. Composition for *in vivo* collagen synthesis promotor. JP2005255527.
- [96] MIYAMOTO, Y.; BUNICHI, K. 2003. Skin care preparation for external use. JP2003335625.
- [97] HASEBE, K.; YAMADA, K. 2006. Hair treatment composition and hair cosmetic for damaged hair. United States Patent Application: 20060165636.
- [98] MEYBECK, A.; BONTE, F.; REDZINIAK, G. 1997. Use of an ecdysteroid for the preparation of cosmetic or dermatological compositions intended, in particular, for strengthening the water barrier function of the skin or for the preparation of a skin cell culture medium, as well as to the compositions. United States Patent: 5609873.
- [99] BERNARD, B.; GAUTIER, B. 2005. Use of *ecdysteroids* for preparing dermatological or cosmetological anti-hair loss compositions. United States Patent Application: 20050137175.
- [100] BEHR, S.; DURET, P.; GENDRON, N.; GUAY, J.; LAVALLEE, B.; PAGE, BR. 2007. Plant extracts and dermatological uses thereof. United States Patent Application: 20070122492.
- [101] KAWASAKI, Y.; HORI, M.; YAMAMOTO, Y.; HIRAKI, J. 2006. Cosmetic composition and production thereof. United States Patent Application: 20060018867.
- [102] BARRERA-ARELLANO, D.; POLEZEL, M.A.; NOGUEIRA, C.; VELAZQUEZ, M.D.C.; SILVA, C.R. 2006. Uso de composição cosmética compreendendo extrato de plantas marapuma (*Ptycopelatum olacoides*) e catuaba (*Trichilla catigua* Juss; *Juniperus brasiliensis*; *Eriotheca candolleana*; *Anemopaegma mirandum*) e suma (*Pfaffia paniculata*, *Pfaffia estenofila* e *Pfaffia* sp.) para uso no tratamento cosmético de lipodistrofia ginóide (celulite). BRP10403155.
- [103] YOSHIDA, S.; KOBAYASHI, A. 2007. Termite control agent. JP2007070351.
- [104] MATSUMOTO, T.; TANAKA, N. 1990. Production of 20-hydroxyecdysone. JP2240096.
- [105] SUGIYAMA, H. 1990. Prevention for deterioration of royal jelly. JP2145161.
- [106] KUGA, T.; INOUE, M.; IMURA, T.; AOYAMA, Y.; KURATSU, Y. 1993. Process for producing astaxanthin by fermentation. EP0543023.
- [107] SHIBUYA, T.; ARIO, T.; SFUKUDA, S. 1999. New composition containing flavonoid and *Pfaffia* plant product. DE19834717.
- [108] HONDA, Y.; YOU C.R. 1988. Preparation of tissue culture product of brazilian carrot. JP63216478.
- [109] MEYBECK, A.; BONTE, F. 1993. Hydrated lipidic lamellar phases or liposomes based on ecdysteroids. United States Patent: 5198225.
- [110] SAKAI, Y.; YOKOO, Y. 2004. Process for producing a plant extract containing plant powder. United States Patent Application: 20040161524.
- [111] GOW, R.; PIERCE, J.; PIERCE, B.; BIRDSALL, W. 2004. Kavalactone product. United States Patent Application: 20040071794.
- [112] GOW, R.; PIERCE, J.; PIERCE, B.; BIRDSALL, W. 2004. Oral delivery of a botanical. United States Patent Application: 20040081664.
- [113] GOW, R.; PIERCE, J.; PIERCE, B.; BIRDSALL, W. 2006. Oral delivery of a botanical. United States Patent Application: 20060251715.

- [114] GOW, R.; PIERCE, J.; PIERCE, B.; BIRDSALL, W. 2006. Kavalactone product. United States Patent Application: 20060251742.
- [115] DINAN, L. 2001. Phytoecdysteroids: biological aspects. *Phytochemistry*, 57:325-339.
- [116] MARQUES, L.C.; GALVÃO, S.M.P.; ESPÍNOLA, E.; DIAS, R.F.; MATTEI, R.; OLIVEIRA, M.G.M.; CARLINI, E.L.A. 2004. Psychopharmacological assessment of *Pfaffia glomerata* roots (Extract BNT-08) in rodents. *Phytother. Res.*, 18:566-572.
- [117] FIGUEIREDO, L.S.; TEIXEIRA, S.L.; FREITAS, S.P.; VIEIRA, I.J.C.; MARTINS, E.R. 2004. Comportamento de acessos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae) nas condições de Campos dos Goytacazes – RJ. *Rev. Bras. Pl. Med.*, 7(1):67-72.
- [118] FREITAS, C.S.; BAGGIO, C.H.; SILVA-SANTOS, J.E.; RIECK, L.; SANTOS, C.A.M.; CORRÊA JR., C.; MING, L.C.; CORTEZ, D.A.G.; MARQUES, M.C.A. 2004. Involvement of nitric oxide in the gastroprotective effects of an aqueous extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, Amaranthaceae, in rats. *Life Sci.*, 74:1167-1179.
- [119] GOSMANN, G.; GATTUSO, S.; GATTUSO, M.; FENNER, R.; PACHECO, E.F.; FERRAZ, A.; SAVI, L.A.; BARARDI, C.R.M.; SIMÕES, C.M.O.; SORTINO, M.; ZACCHINO S.; GNERRE, C.; TESTA, B.; RATES, S.M.K. 2003. Botanical (Morphological, micrographic), chemical and pharmacological characteristics of *Pfaffia* species (Amaranthaceae) native to South Brazil. *Braz. J. Pharmac. Sci.*, 39(2)141-147.
- [120] FREITAS, C.S.; PAULA, M.F.R.; RIECK, L.; MARQUES, M.C.A. 2003. Actions of crude hydroalcoholic extract of *Pfaffia* sp. on gastrointestinal tract. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 46(3):355-360.
- [121] MARQUES, L.C.; DANUCALOV, M.A.; TORRES, F.; GALDURÓZ, J.C.F.; CARLINI, E.L.A.; SILVA, A.C. 2002. Estudo clínico duplo-cego de extrato padronizado (BNT-08) das raízes de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen: avaliação do efeito tônico em atividade física. *Rev. Bras. Farmacog.*, 12:44-47.
- [122] TOLEDO, M.R.S.; SILVA, C.C.A.; ANTONELLO, D.; PIMENTA, K.R.; VIEIRA, M.C.; RAMOS, M.B.M.; HEREDIA, Z.N.A.Z.; SCALON, S.P.Q.; BAZZANO, T.S.C. 2004. Extratos aquosos de *Pfaffia glomerata* Spreng e seu efeito tóxico em ratas prenhez. Disponível em: www.abhorticultura.com.br/Biblioteca - Anais CBO 2004, Acesso em 30/07/2007.
- [123] DE-PARIS, F.; NEVES, G.; SALGUEIRO, J.B.; QUEVEDO, J.; IZQUIERDO, I.; RATES, S.M. 2000. Psychopharmacological screening of *Pfaffia glomerata* Spreng. (Amaranthaceae) in rodents. *J. Ethnopharmacol.*, 73:261-269.
- [124] FARIAS, N.C.; COSTA, M.C.C.D.C. 2005. Avaliação de atividades antimicrobiana e citotóxica de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. 3ª Semana de Integração Universidade Sociedade e 7ª Jornada de Iniciação Científica, RECIFE: UNICAP, p.66-71.
- [125] NETO, A.G.; DA SILVA FILHO, A.A.; COSTA, J.M.L.C.; VINHÓLIS, A.H.C.; SOUZA, G.H.B.; CUNHA, W.R.; SILVA, M.L.A.E.; ALBUQUERQUE, S.; BASTOS, J.K. 2004. Evaluation of the trypanocidal and leishmanicidal *in vitro* activity of the crude hydroalcoholic extract of *Pfaffia glomerata* (Amaranthaceae) roots. *Phytomedicine*, 11:662-665.
- [126] TANAKA, N.; YAHASHITA, M.T.; MATSUMOTO, T. 1995. Clonal propagation of 20-hydroxyecdysone producing plant, *Pfaffia iresinoides*. *Plant Tiss. Cult. Lett.*, 12(2):187-191.
- [127] GRAHAM, J.G.; QUINN, M.L.; FABRICANT, D.S.; FARNSWORTH, N.R. 2000. Plants used against cancer – an extension of the work of Jonathan Hartwell. *J. Ethnopharm.*, 73:347-377.
- [128] MAZZANTI, G.; BRAGHIROLI, L.; TITA, B.; BOLLE, P.; PICCINELLI, D. 1993. Anti-inflammatory activity of *Pfaffia paniculata* (Martius) Kuntze and *Pfaffia Stenophylla* (Sprengel) Stuehl. *Pharmacol. Res.*, 27(1):91-92.
- [129] MATSUZAKI, P.; AKISUE, G.; OLORIS, S.C.S.; GÓRNIK, S.L.; DAGLI, M.L.Z. 2003. Effect of *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) on the Ehrlich tumor in its ascitic form. *Life Sci.*, 74:573-579.

- [130] MATSUZAKI, P.; HARAGUCHI, M.; AKISUE, G.; OLORIS, S.C.S.; NAGAMINE, M.K.; DA SILVA, T.C.; SAKAI, M.; FONSECA, E.S.M.; PALERMO-NETO, J.; LIMA GÓRNIAC, S.; DAGLI, M.L.Z. 2006. Antineoplastic effects of butanolic residue of *Pfaffia paniculata*. *Cancer Lett.*, 238:85-89.
- [131] COLIC, M.; PAVELIC, K. 2000. Molecular mechanisms of anticancer activity of natural dietetic products. *J. Mol. Med.*, 78:333-336.
- [132] CARNEIRO, C.S.; COSTA-PINTO, F.A.; SILVA, A.P.; PINELLO, K.C.; SILVA, T.C.; MATSUZAKI, P.; NAGAMINE, M.K.; GÓRNIAC, S.L.; HARAGUCHI, M.; AKISUE, G.; DAGLI, M.L.Z. 2007. *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) methanolic extract reduces angiogenesis in mice. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 58(6):427-431.
- [133] FLORES, R.; NICOLOSO, F.T.; VASCONCELLOS, N.J.S. 2006. Indução de calos e aspectos morfo genéticos de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. *Rev. Bras. Pl. Med.*, 8(3):89-95.
- [134] KAGIKI, F.O. 1996. Estudo das condições para indução de calos e produção de compostos secundários em *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/Universidade de São Paulo, Piracicaba, 96p. (Master Dissertation).
- [135] FLORES, R.; MALDANER, J.; NICOLOSO, F. T. 2006. Otimização da micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. *Ciência Rural*, 36(3):845-851.
- [136] OLIVEIRA, C.M.F. 1998. Estudo sobre a reprodução da fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 87p. (Master Dissertation).
- [137] GEORGE, E.F. 1993. *Plant propagation by tissue culture*. Part 1: The technology., London: Exegetics Limited, (2nd ed.), 574 p.
- [138] VILLALOBOS, V.M.; ENGELMANN, F. 1995. *Ex situ* conservation of plant germplasm using biotechnology. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 11:375-382.
- [139] BIONDO, R.; SOUZA, A.V.; BERTONI, B.W.; SOARES, A.M.; FRANÇA, S.C.; PEREIRA, A.M.S. 2007. Micropropagation, seed propagation and germplasm bank of *Mandevilla velutina* (Mart.) Woodson. *Sci. Agricola*, 64(3):263-268.
- [140] MONTANARI JR., I. 2002. Aspectos do cultivo comercial de plantas medicinais nativas. CPQBA-UNICAMP, 7p. Disponível em: www.cpqba.unicamp.br/plmed/artigos/produção. Acesso em 20/08/2007.
- [141] NICOLOSO, F.T.; FERRÃO, G.E. 2001. Fontes e doses de ferro na micropropagação de *Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen (Amaranthaceae). IV Encontro Latino Americano de Biotecnologia Vegetal. Disponível em: www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001. Acesso em 25/07/2007.
- [142] HUGHES, K.W. 1981. *In vitro* ecology: exogenous factors affecting growth and morphogenesis in plant culture systems. *Environm. Exp. Bot.*, 21(3/4):281-288, 1981.
- [143] LEE, N.; WETZSTEIN, Y.; SOMMER, H.E. 1985. Effects of quantum flux density on photosynthesis and chloroplast ultrastructure in tissue-cultured plantlets and seedlings of *Liquidambar styraciflua* L. towards improved acclimatization and field survival. *Plant Physiol.*, 78:637-641.
- [144] VIÑA, G. de la; PLIEGO-ALFARO, F.; DRISCOLL, S.P.; MITCHELL, V.J.; PARRY, M.A.; LAWLOR, W. 1999. Effects of CO₂ and sugars on photosynthesis and composition of avocado leaves grown *in vitro*. *Plant Physiol. Biochem.*, 37(7/8):587-595.
- [145] VIÑA, G. de la; BARCELÓ-MUNOZ, A.; PLIEGO-ALFARO, F. 2001. Effects of culture media and irradiance level on growth and morphology of *Persea americana* Mill. microcuttings. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 65:229-237.
- [146] KOZAI, T., AFREEN, F., ZOBAYED, S.M.A. 2005. Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new propagation and transplant production system. Springer, Dordrecht. 315p.

- [147] ZOBAYED, S.M.A.; SAXENA, P.K. 2004. Production of St. John's wort plants under controlled environment for maximizing biomass and secondary metabolites. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 40: 108-114.
- [148] COUCEIRO, M.A.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S.M.A.; KOZAI, T. 2006. Variation in concentrations of major bioactive compounds of St. John's wort: Effect of harvesting time, temperature and germplasms. *Plant Sci.*, 170:128-134.
- [149] COUCEIRO, M.A.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S.M.A.; KOZAI, T. 2006. Enhanced growth and quality of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) under photoautotrophic *in vitro* conditions. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, v. 42, p.1-6.
- [150] COUCEIRO, M.A.; ZOBAYED, S.M.A.; AFREEN, F.; GOTO, E.; KOZAI, T. 2006. Optimizing the duration of acclimatization under artificial light for St. John's wort plantlets grown photoautotrophically and photomixotrophically *in vitro*. *Environm. Control Biol.*, v. 44, p. 63-70.
- [151] CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. 1998. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds.) *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq. v.1, p.87-132.
- [152] NICOLOSO, F.T.; SARTORI, J.S.; ARAUJO, W.L.; LUCIO, A.D.C. 2001. Citocininas no crescimento e desenvolvimento de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen). IV Encontro Latino Americano de Biotecnologia Vegetal. Disponível em: www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001. Acesso em 25/07/2007.
- [153] FLORES, R.; BRONDANI, D.; CEZAROTTO, V.; MALDANER, J.; GIACOMELLI, S.; NICOLOSO, F.T.; GARLET, T.M.B. 2006. Propagação *in vitro* e produção de β -ecdisona em *Pfaffia glomerata* (Amaranthaceae). In: 57º Congresso Nacional de Botânica, Gramado. CD.
- [154] FLORES, R.; NICOLOSO, F.T.; MALDANER, J. 2007. Propagação clonal rápida de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken utilizando thidiazuron. *Rev. Bras. Pl. Med.*, 9(1):1-7.
- [155] FLORES, R.; VASCONCELLOS, N.J.; MALDANER, J.; GARLET, T.M.B.; NICOLOSO, F.T. 2006. Embriogênese somática e organogênese indireta em *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. In: 57º Congresso Nacional de Botânica, Gramado. CD.
- [156] MARKS, T. R.; SIMPSON, S. E. 1999. Effect of irradiance on shoot development *in vitro*. *Plant Growth Reg.*, 28:133-142.
- [157] LEIFERT, C. et al. 1995. Mineral and carbohydrate nutrition of plant cell and tissue cultures. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 14(2):83-109.
- [158] MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15:473-497.

Capítulo 2

Enxertia *in vitro* em fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]

Introdução

Pfaffia glomerata, pertencente à família Amaranthaceae, é uma planta medicinal que possui grande importância comercial (Vigo et al., 2004; Figueiredo et al., 2004; Zimmer et al., 2006), sendo utilizada por várias indústrias farmacêuticas devido à atividade de seus fitofármacos (Zimmer et al., 2006).

Suas raízes são ricas em saponinas triterpênicas e ecdisteróides, das quais se destaca a β -ecdisona ou hidroxiecdisona (20E), citada como o principal composto ativo (Shiobara et al., 1993). A produção dos metabólitos é a principal característica relacionada ao aspecto medicinal da fáfia, sendo o teor de 20E frequentemente utilizado nas avaliações de cultivo e seleção de genótipos (Magalhães, 2000; Corrêa Jr., 2003; Figueiredo, 2004), uma vez que esse apresenta variações de acordo com o acesso (Figueiredo et al., 2004; Kamada, 2006).

O Brasil é o mais importante centro de coleta de espécies desse gênero (Corrêa Júnior et al., 2006a; 2006b), sendo conhecidas principalmente como ginseng-brasileiro e fáfia (Oliveira, 1986). A utilização das raízes nas indústrias farmacêutica, química, cosmética e alimentar tem ocasionado intensa exploração nas reservas naturais. O crescente interesse pelas espécies de *Pfaffia* levou à sua inclusão na relação das espécies prioritárias para estudos de conservação (Vieira et al., 2002).

A importância de suas propriedades medicinais vem acompanhada da necessidade de se desenvolver estratégias de otimização da produção dos compostos de interesse. Porém, o cultivo de plantas medicinais exige a domesticação da espécie e requer conhecimento da forma de propagação, que implica no domínio tecnológico de todas as etapas de desenvolvimento da espécie (Reis & Mariot, 2002).

Em *P. glomerata* uma única população pode apresentar ampla variabilidade fenotípica associada a diferenças no desenvolvimento, na resistência às pragas e doenças, nas respostas à fertilidade do solo e na produtividade individual; da mesma forma, a variabilidade genética pode ser expressa nas plantas com diferentes conteúdos

de constituintes bioativos, sendo estas populações difíceis de cultivar (Montanari Jr., 2005; Montanari Jr. & Perecin, 2006).

A domesticação desta espécie aumenta as possibilidades de obtenção de plantas mais homogêneas e produtivas. Acessos de *P. glomerata* propagados por estacas produzem baixo número de mudas (Nicoloso et al., 1999), mas os acessos conservados em bancos de germoplasma são propagados com sucesso pelas técnicas *in vitro* (Nicoloso et al., 2001; Nicoloso & Erig, 2002; Alves et al., 2006).

Dessa forma, a utilização da técnica de enxertia *in vitro* como método de propagação é uma ferramenta importante para estudos de produção dos metabólitos secundários nessa planta medicinal. Estudos anteriores realizados por Kamada (2006) revelaram que os acessos de *P. glomerata* apresentam diferenças genotípicas na produção de β -ecdisona e massa seca de raízes. A propagação vegetativa de acessos selecionados de *P. glomerata*, em função do teor de β -ecdisona, via enxertia *in vitro* pode ser uma alternativa para o aumento significativo na produção de 20E. Outra vantagem da enxertia *in vitro* é sua utilização em qualquer período do ano, pois segundo Araújo & Castro-Neto (2002) a época da realização encontra-se entre os fatores externos que podem afetar o pegamento dos enxertos, e a velocidade na obtenção dos resultados (Pathirana & McKenzie, 2005).

Essa técnica consiste em enxertar, sob condições assépticas, um meristema ou ápice caulinar (epibioto) obtido de plantas adultas sobre um porta-enxerto (hipobioto) estabelecido *in vitro*. Inicialmente desenvolvida por Murashige et al. (1972) foi aperfeiçoada por Navarro et al. (1975) para a produção de plantas cítricas livres de vírus. Apresenta muitas vantagens sobre a técnica de propagação convencional por combinar as vantagens obtidas na enxertia com aquelas da propagação *in vitro* (Navarro, 1988; Richardson et al., 1996).

A enxertia *in vitro* tem sido utilizada para muitas outras aplicações, como na obtenção de plantas isentas de vírus e outros patógenos (Paiva et al., 1993; Mukhopadhyay et al., 1997; Katoh et al., 2004), associada à termoterapia (Carvalho et al., 2002; Sharma et al., 2008), indexação (Pathirana & McKenzie, 2005), além da propagação de espécies frutíferas, florestais, ornamentais e medicinais (Kretzschmar & Ewald, 1994; Monteuis, 1994, 1995; Ramanayake & Kovoov, 1999; Troncoso et al., 1999; Mneney & Mantell, 2001; Thimmappaiah et al., 2002, Sanjaya et al., 2006; Wu et al., 2007). Também tem contribuído para a detecção precoce de incompatibilidade entre epibiotos e hipobiotos, com abordagens dos aspectos fisiológicos e histológicos

envolvidos neste processo (Jonard, 1986; George, 1993; Errea et al., 1994; 2001; Richardson et al., 1996; Estrada-Luna et al., 2002).

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo analisar a eficiência da enxertia *in vitro* na propagação de dois acessos de *P. glomerata* utilizados na combinação de epibioto e hipobioto, visando aumentar a produção do princípio ativo.

Material e Métodos

1. Origem do material vegetal e condições de crescimento

Os genótipos utilizados de *P. glomerata* são procedentes de coletas em duas populações na bacia do rio Paraná, Brasil, e oriundas da coleção de germoplasma de plantas medicinais do Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia (Embrapa/Cenargen). Os locais de coleta com as respectivas características encontram-se descritos no Quadro 1.

Quadro 1 – Descrição das populações de *Pfaffia glomerata* avaliadas no estudo

Local de coleta	Coordenadas geográficas	Identificação BG*
Rio Ivaí (Querência do Norte, PR)	Lat 23 ⁰ 13' 09,2'' Long 53 ⁰ 34' 07,6'' - Alt. 233 m	2202-15 (Ac 22)
Estrada entre Porto Primavera e São José (Baitaporã, MS)	Lat 22 ⁰ 33' 24,1'' Long 53 ⁰ 06' 13,9'' - Alt. 239 m	2209-09 (Ac 43)

BG*: Banco de Germoplasma/coleção de plantas medicinais do Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Para estabelecimento do material estoque, os indivíduos foram multiplicados vegetativamente *in vitro*, via segmento nodal. Os genótipos foram cultivados em meio de cultura contendo os sais e vitaminas MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 8 g L⁻¹ de ágar (Merck), mantidos em sala de crescimento, à temperatura de 25 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 16 horas com irradiância de 50 μmol m⁻² s⁻¹, por 30 dias e, posteriormente, submetidos à enxertia *in vitro*.

2. Seleção do material

Os genótipos utilizados foram previamente selecionados por apresentarem teores de produção de princípio ativo divergentes. Segundo Kamada (2006) o acesso 2202-15 (Ac 22) apresenta média de 0,749% na produção de β-Ecdisona, enquanto que o acesso 2209-09 (Ac 43) apresenta 0,346% em relação à massa seca da raiz.

O experimento consistiu de seis tratamentos: acesso 2202-15 sem enxerto (testemunha – Ac 22); acesso 2209-09 sem enxerto (testemunha – Ac 43); 2202-15 como hipobioto e 2209-09 como epibioto (cv 22); 2209-09 como hipobioto e 2202-15

como epibioto (cv 43); 2202-15 como hipobioto e epibioto (ct 22); e, 2209-09 como hipobioto e epibioto (ct 43).

3. Enxertia *in vitro*

Ápices caulinares com aproximadamente 1 cm de comprimento e contendo um ou dois pares de folhas foram utilizados como epibioto e segmentos internodais alongados da porção basal da planta com aproximadamente 1,5 cm de comprimento foram utilizados como hipobiotos.

O preparo dos epibiotos para a enxertia constitui-se de uma excisão na porção proximal na forma de duplo bisel. Para assegurar a ausência de gemas pré-existentes no hipobioto procedeu-se retirada das porções proximal e distal do segmento internodal, e, posteriormente realizou-se a abertura da fenda na região distal, visando receber o enxerto.

Depois do preparo do hipobioto e do epibioto, sob lupa binocular e com o auxílio de pinças, foi realizada a enxertia, constituída pela união do hipobioto e epibioto, conforme metodologia proposta por Bandeira et al. (2006). Todos os procedimentos foram realizados sob condições assépticas, com auxílio de lupa binocular (Olympus, SZ60), com utilização de papel filtro e água.

As plantas enxertadas foram transferidas para tubos de ensaio, sob as mesmas condições de cultivo da etapa de multiplicação dos genótipos.

4. Características avaliadas *in vitro*

Aos 30 dias de cultivo, as plantas enxertadas foram retiradas da condição *in vitro*, avaliadas e submetidas ao processo de aclimatização para estabelecimento em campo.

Os critérios considerados na avaliação foram: nível de pegamento e mortalidade do enxerto, altura das plantas enxertadas, número de brotações, de nós e de raízes. Para avaliação de pegamento foram adotados níveis (0-4) ficando assim definidos: 0 - senescência do hipo ou epibioto; 1 - conexão frágil, apresentando instabilidade na união, como abertura do hipobioto e inclinação do epibioto; 2 - conexão regular apresentando desalinhamento lateral e calejamento na região do enxerto; 3 - conexão excelente, porém apresentando alta taxa de calejamento; 4 - conexão excelente apresentando baixa taxa de calejamento.

5. Delineamento Experimental

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por 3 plantas enxertadas.

Os valores dos índices de pegamento e mortalidade foram expressos em percentagem. Sendo submetidos à análise de variância, e aplicado o teste de Tukey para comparação das médias dos tratamentos a 5% de significância, utilizando o programa estatístico GENES (Cruz, 2006). O experimento foi repetido por duas vezes.

Resultados

Enxertia *in vitro*

O sucesso na enxertia *in vitro* foi observado pela qualidade na união dos enxertos (Quadro 2) e o subsequente crescimento das plantas. Aos 30 dias de cultivo *in vitro* as plantas enxertadas, independente da combinação realizada (Fig. 1), apresentaram índice de crescimento satisfatório, comparado ao crescimento da espécie quando propagada via segmento nodal e cultivada na condição *in vitro* tradicional.

As diferentes combinações de enxertos realizadas com os dois acessos de *P. glomerata* mostraram-se viáveis na fase inicial do estabelecimento *in vitro*. A capacidade de união entre os acessos utilizados apresentou variação de 82,5% a 97,5% no índice de pegamento entre os tratamentos (Quadro 2), demonstrando a eficiência na propagação via enxertia *in vitro*. Também, houve variação no percentual de mortalidade das plantas enxertadas, sendo esta verificada nos níveis 0 e 1 de pegamento.

A metodologia de enxertia *in vitro* adotada mostrou-se eficiente, uma vez que todos os tratamentos apresentaram somatório do índice de pegamento de níveis regular e excelente igual ou superior a 80% (Quadro 2). Os menores índices de pegamento foram obtidos quando o acesso 2209-09 foi utilizado como hipobioto. Conseqüentemente, nessas condições foram observados os maiores índices de mortalidade.

Quadro 2 – Avaliação da percentagem de pegamento das plantas de *P. glomerata*, após 30 dias da realização da enxertia *in vitro*

Epibioto	Hipobioto	Pegamento dos enxertos <i>in vitro</i> (%)					Mortalidade (%)
		0	1	2	3	4	
2202-15	2202-15	2	2	32	16	48	2,5
	2209-09	12	8	16	16	48	17,5
2209-09	2202-15	0	4	44	4	48	5,0
	2209-09	8	12	16	16	48	10,0

Níveis de pegamento de acordo com a qualidade da conexão: 0 - ausente (apresentando senescência do hipo ou epibioto ou não desenvolvimento da planta); 1 - frágil; 2 -regular (apresentando desalinhamento lateral e calejamento na região do enxerto); 3 - excelente (apresentando alta taxa de calejamento), 4 - excelente (apresentando baixa taxa de calejamento).

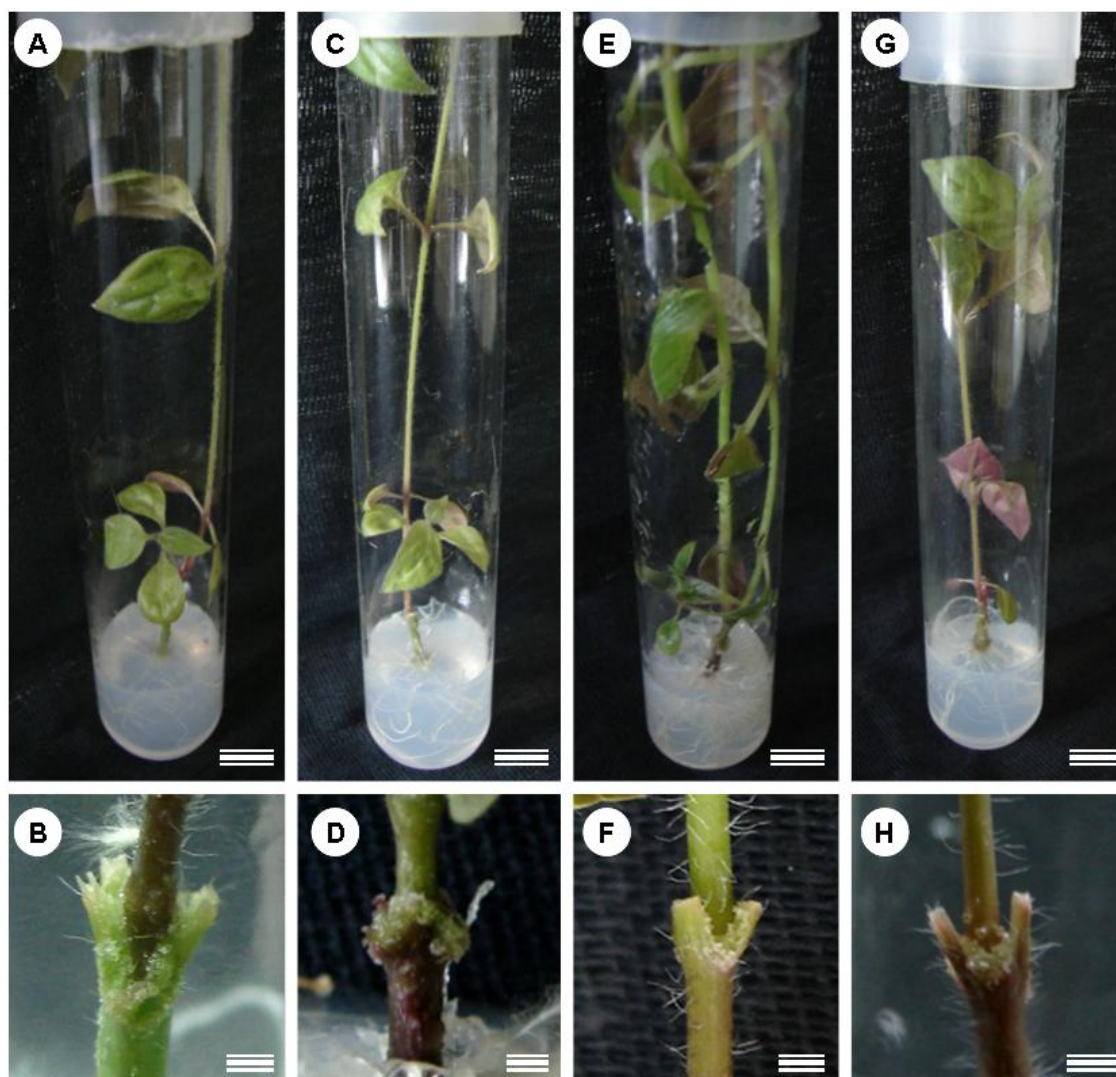


Figura 1. Plantas de *P. glomerata* enxertadas *in vitro* após 30 dias de cultivo. **A e B.** hipobioto 2202-15 e epibioto 2209-09; **C e D.** hipobioto 2209-09 e epibioto 2202-15; **E e F.** hipobioto e epibioto 2202-15; **G e H.** hipobioto e epibioto 2209-09; **B, D, F e H.** detalhe da região de conexão da enxertia. Barras: 10 mm (A, C, E e G) e 2 mm (B, D, F e H).

As plantas que apresentaram ausência de conexão (Figs. 2A-D) ou conexão frágil (Figs. 2E-H) foram consideradas indesejáveis sob o aspecto morfológico. Não houve desenvolvimento das plantas na ausência da conexão e, portanto, estas não se estabeleceram.

Na maioria das plantas em que o hipobioto senesceu o epibioto emitiu raízes, alcançando o meio de cultura tanto pela projeção sobre o hipobioto (Fig. 2C) quanto através deste (Fig. 2D). Isso demonstra a capacidade de regeneração da espécie às condições adversas às quais foram submetidas.

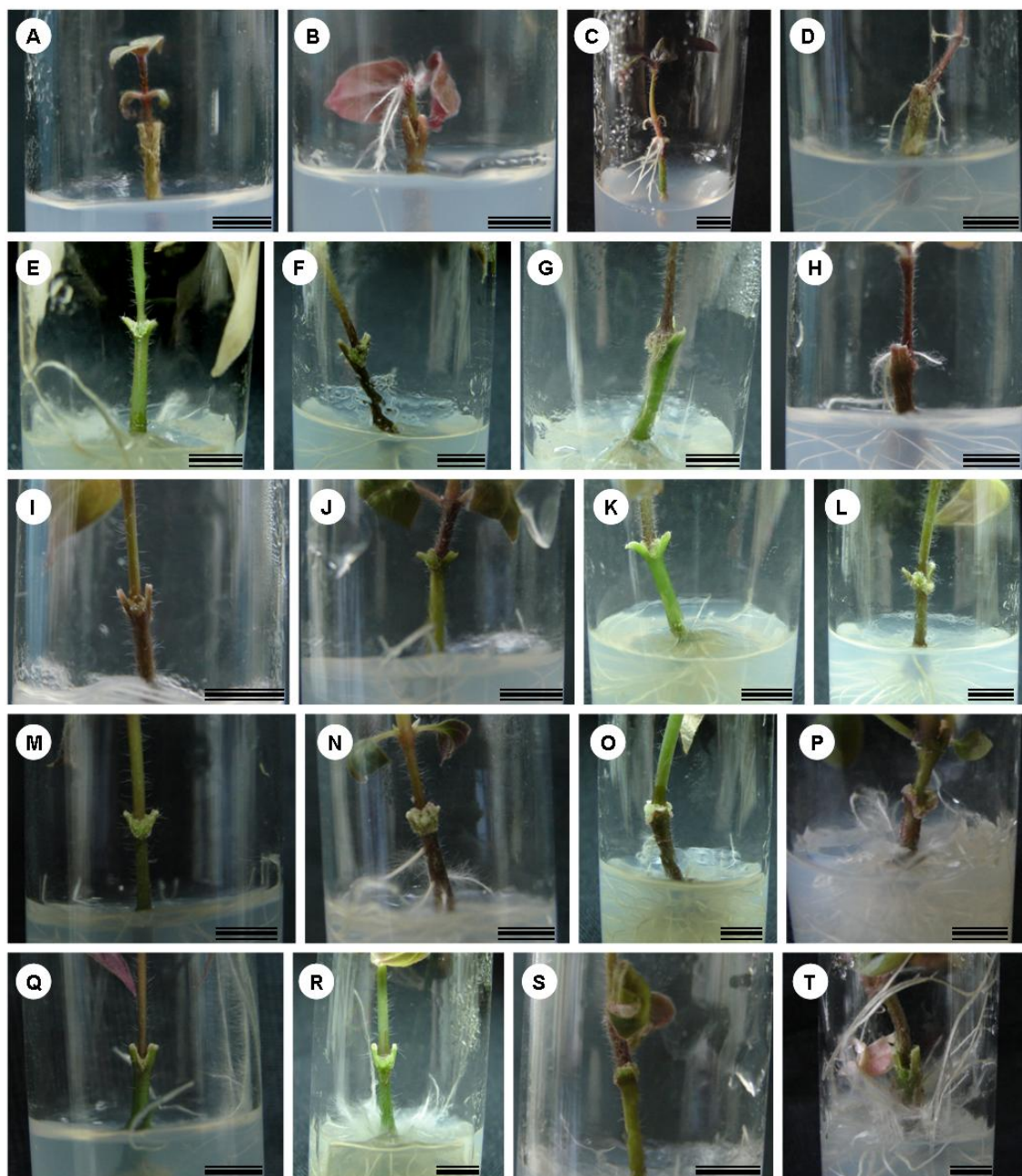


Figura 2. Níveis de pegamento de acordo com a qualidade da conexão na enxertia *in vitro* de *P. glomerata*. **A-D.** nível 0 (ausente); **E-H.** nível 1 (frágil); **I-L** nível 2 (regular); **M-P.** nível 3 (excelente); **Q-T.** nível 4 (excelente). As figuras de cada linha representam as variações existentes dentro de cada nível de pegamento. Barras = 5 mm.

Quando as plantas enxertadas apresentaram conexão frágil observou-se formação reduzida de calo e, ou, abertura do hipobioto, comprometendo a superfície de contato entre hipo e epibioto. Também ocorreu dificuldade de cicatrização dos tecidos na região do enxerto, retardando o desenvolvimento e tornando as plantas pouco vigorosas.

O pegamento regular (Figs. 2I-L) ficou caracterizado pelo desalinhamento lateral de uma das partes do epibioto, pela abertura do hipobioto e pela taxa de calejamento média ou intensa. A formação do calo favoreceu o rápido desenvolvimento das plantas sem comprometer o seu vigor.

O alinhamento perfeito entre o hipo e epibioto caracterizou o excelente pegamento. A taxa de calejamento diferiu os níveis 3 (Figs. 2M-P) e 4 (Figs. 2Q-T), porém, em ambos, a conexão ocorreu de forma satisfatória e evidente, favorecendo o rápido desenvolvimento das plantas.

Após uma semana, as plantas enxertadas apresentaram sinais evidentes de crescimento como emissão de novas gemas e desenvolvimento de primórdios foliares. A adesão entre hipo e epibioto foi constatada pela presença de calo na região da conexão, caracterizando a união física do enxerto, sendo difícil de separar os dois componentes quando o nível de pegamento foi regular ou excelente.

Aos 30 dias de cultivo *in vitro* as plantas enxertadas apresentaram-se bem desenvolvidas (Fig. 1). Porém, as testemunhas apresentaram melhores resultados para as características número de raízes e de nós, e altura da planta (Quadro 3).

Quadro 3. Características avaliadas nas plantas de dois acessos de *P. glomerata* submetidas à técnica de enxertia *in vitro*, após 30 dias de cultivo

Epibioto	Hipobioto	Características avaliadas <i>in vitro</i>				
		Nº raízes	Altura (cm)	Nº nós	Nº ramos	MS (mg)
Testemunhas	2202-15	4,72 a	14,48 a	4,93 a	1,60 a	178,29
	2209-09	4,03 b	14,72 a	4,67 ab	1,30 b	152,32
2202-15	2202-15	1,76 c	11,43 b	3,57 c	1,79 a	139,65
	2209-09	1,37 d	7,57 c	3,13 c	1,60 a	158,49
2209-09	2202-15	1,57 cd	8,82 c	3,93 bc	1,60 a	140,24
	2209-09	1,37 d	6,47 c	3,18 c	1,63 a	172,47

As médias seguidas de uma mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância. MS = massa seca.

Quanto ao número de ramificações, apenas a testemunha 2209-09 apresentou média inferior às demais plantas dos tratamentos (Quadro 3). No entanto, quando observados somente os tratamentos do material enxertado verificou-se que não houve diferença significativa para número de nós e ramificação (Quadro 3).

Quando o acesso 2202-15 constituiu o hipo e epibioto, a média no número de raízes foi maior em relação aos tratamentos constituídos pelo acesso 2209-09 como hipobioto. No entanto, a combinação constituída pelo hipobioto 2202-15 e epibioto 2209-09 não diferiu dos demais tratamentos submetidos à enxertia (Quadro 3).

As testemunhas apresentaram as maiores médias em altura seguidas pelas plantas enxertadas da combinação 2202-15, como hipo e epibioto (Quadro 3). A mesma tendência foi observada para o número de raízes (Quadro 3). No entanto, a presença de raízes foi significativa em todos os tratamentos o que possibilitou a transferência das plantas para a condição *ex vitro*, 30 dias após a realização da enxertia *in vitro*. Da mesma forma, a produção de massa seca *in vitro* não diferiu estatisticamente entre os tratamentos (Quadro 3).

Discussão

As diferentes combinações de enxertia estabelecidas com dois acessos de *P. glomerata* não apresentaram sintomas de incompatibilidade na fase inicial de estabelecimento *in vitro*, observando-se vigoroso crescimento das plantas. As populações de *P. glomerata* apresentam diversidade genética (Figueiredo et al., 2004), estabelecida por análises de caracteres morfológicos, moleculares e químicos (Kamada, 2006). Essa variabilidade genética existente entre as populações pode influenciar no grau de rejeição das combinações realizadas. No entanto, neste trabalho ficou caracterizada a viabilidade da enxertia *in vitro* entre os acessos utilizados, não sendo observados sintomas morfológicos de incompatibilidade.

A enxertia *in vitro* é utilizada para estudar precocemente plantas com problemas de incompatibilidade, podendo ser detectada em questão de meses, enquanto que, em campo, seus sintomas podem levar anos para se manifestarem (Navarro, 1988). A incompatibilidade tem sido estabelecida em duas categorias, sendo caracterizada por alterações fisiológicas, baseada nos padrões de translocação, e alterações anatômicas, evidenciada pela quebra na região de união resultante da frágil conexão estabelecida (Errea et al., 1994). A detecção precoce de possíveis sintomas de rejeição, entre os acessos de *P. glomerata* selecionados, foi eficientemente caracterizada em função da rapidez no desenvolvimento obtido nas plantas sob condições *in vitro*.

Diante do fato de que as interações recíprocas entre epi e hipobiotos influenciam os padrões de crescimento e desenvolvimento, a adequação da técnica de enxertia *in vitro* para a espécie permitirá futuros estudos envolvendo a melhor caracterização do envolvimento da parte aérea sobre a dinâmica da formação de raízes tuberiformes e o acúmulo de massa seca e de metabólitos secundários nas raízes.

O interesse medicinal na espécie está concentrado principalmente em suas raízes, sendo suas propriedades confirmadas com o isolamento de compostos bioativos neste órgão. A preferência na utilização das raízes está baseada na proporção de biomassa produzida, sendo superior em relação aos demais órgãos da planta, assim como, na extração e isolamento do princípio ativo que é facilitada, pois não têm interferência de outros constituintes, como por exemplo, os pigmentos cloroplastídicos presentes na parte aérea. No entanto, a variabilidade genética existente entre as populações de *P. glomerata* pode ser expressa nas plantas com diferentes conteúdos de constituintes bioativos, responsáveis pelos efeitos terapêuticos, ou na produção de biomassa de suas raízes (Figueiredo et al., 2004; Kamada, 2006).

Em alguns casos, os hipobiotos afetam diretamente o vigor da variedade da copa enxertada, estando relacionados diretamente ao genótipo e suas relações, induzindo diferenças marcantes na produção (Schafer et al., 2001). Assim, a aplicação da enxertia *in vitro* em *P. glomerata* pode também ser uma alternativa para a otimização da produção do princípio ativo, utilizando genótipos divergentes. A combinação ideal entre um bom produtor de sistema radicular e um bom produtor do princípio ativo possibilita analisar possíveis interações fisiológicas, abrindo, portanto, possibilidades para estudos relacionados à produção do princípio ativo, bem como para a seleção de plantas resistentes a pragas e doenças.

Como enxertias incompatíveis ocorrem frequentemente em árvores frutíferas, usualmente formadas pela combinação de dois indivíduos: o hipobio que provém o sistema radicular e o epibio que produz o cultivo comercial (Errea et al., 2001), e são analisadas precocemente utilizando a enxertia *in vitro*, buscou-se obter respostas rápidas do comportamento dos acessos de *P. glomerata* submetidos a essa técnica. A incompatibilidade fisiológica é associada aos sintomas de envelhecimento foliar e alterações no sistema radicular (Errea, 1998), não desenvolvimento do epibio, necrose na região do enxerto, morte da enxertia. Nas combinações de *P. glomerata* não foram verificados tais sintomas, garantindo assim, o sucesso na utilização da enxertia *in vitro*. Esses dados possibilitam a realização de outras combinações com diferentes acessos, bem como, a aplicação dessa metodologia para testar combinações com diferentes espécies, objetivando a produção do princípio ativo de interesse.

Os níveis de pegamento obtidos em *P. glomerata* foram satisfatórios, ficando acima de 80%. Errea et al. (2001), analisando diferentes combinações de genótipos, verificaram, na segunda semana da enxertia, que 60% das combinações compatíveis a união foi muito forte, refletindo afinidade entre os genótipos envolvidos. Ao contrário, todas as combinações incompatíveis foram facilmente separadas. Plantas enxertadas emitiram novas gemas axilares que se desenvolveram normalmente após 3-4 semanas da realização da enxertia *in vitro*, apresentando desenvolvimento superior quando utilizado hipocótilo sem radícula (Jin et al., 2006).

O tamanho do epibio e a idade do hipobio são fatores determinantes para o desenvolvimento da planta enxertada. Em *P. glomerata*, as plantas matrizes utilizadas foram propagadas por trinta dias, período ideal para o hipobio apresentar diferenciação dos tecidos de sustentação suficiente para suportar o epibio e não comprometer o processo de reconexão. Em *Santalum album* os melhores resultados foram observados quando utilizado como hipobio plântulas com 45 dias (Sanjaya et

al., 2006), enquanto que em *Vitis vinifera* (Pathirana & McKenzie, 2005) e em *Gossypium hirsutum* (Jin et al., 2006) esses resultados foram obtidos com plântulas entre 5-12 dias, respectivamente. Portanto, o sucesso da enxertia é dependente do estágio de desenvolvimento fisiológico e estrutural de cada espécie.

Torna-se essencial a adequada união entre o hipo e epibioto para o sucesso na combinação (Errea et al., 2001; Wu et al., 2007). Em *P. glomerata* a união entre hipo e epibioto foi bem caracterizada nas combinações realizadas, com o início da cicatrização de algumas plantas ao final de trinta dias. Murashige et al. (1972), estudando a enxertia *in vitro* em *Citrus*, destacaram que embora o método de inserção tenha sido importante, pois a maior exposição da superfície cambial do hipobioto foi o melhor lugar para inserir o epibioto, o local da incisão foi decisivo para estabelecer melhor contato entre as partes.

Navarro et al. (1975), analisando a região de contato entre epibioto e hipobioto o qual envolveu diversos tecidos do hipobioto, obtiveram maior sucesso na enxertia quando o epibioto foi colocado sobre o cilindro vascular da superfície decapitada do epicótilo. Frequências aceitáveis na enxertia também foram obtidas quando colocados sobre o córtex ou sobre a medula. Em *P. glomerata* o corte em duplo bisel na base do epibioto proporcionou íntimo contato dos tecidos vasculares, contribuindo para seu rápido desenvolvimento.

A conexão dos tecidos no ponto da enxertia resulta em maior sobrevivência dos enxertos, sendo que o período crítico para garantir a viabilidade dos microenxertos é o momento da realização da enxertia *in vitro* (Nunes et al., 2005). Para conseguir satisfatórios índices de pegamento são requeridos materiais especializados e, sobretudo, treinamento do operador (Paiva & Carvalho, 1993). O epibioto se torna dependente do hipobioto, pois o contato celular precisa ser estabelecido para capacitar a formação do sistema de transporte simplástico ou apoplástico entre as partes envolvidas (Richardson et al., 1996). A qualidade da resposta histológica é influenciada diretamente pela seleção do material vegetal e pela precisão com que a técnica é conduzida. Os cortes bem orientados no hipo e epibioto e a perfeita união entre eles, proporcionam uma região de contato maior e, conseqüentemente, melhores respostas no processo de cicatrização em *P. glomerata*.

Sintomas visíveis de falha na enxertia ou atraso na união das partes enxertadas são geralmente expressos pelo epibioto, provavelmente, devido ao insuficiente contato celular entre hipo e epibioto para o transporte de água e nutrientes e inadequadas reservas no epibioto para suportar a proliferação celular na superfície do corte

(Richardson et al., 1996). Esses sintomas ficaram bem caracterizados em *P. glomerata* quando os níveis de pegamento foram 0 (ausência) e 1 (frágil) (Figs. 2A-D e 2E-H, respectivamente).

A senescência do hipo ou epibioto, observadas no nível 0 de pegamento, também pode ter correlação entre a baixa eficiência técnica da enxertia e a maior sensibilidade às injúrias do acesso 2209-09, uma vez que a senescência do epibioto foi constatada por desalinhamento lateral, em sua maioria, e pela abertura do hipobioto.

A presença de raízes na base do epibioto pode ser explicada pelo balanço hormonal e seu fluxo em fáfia. Segundo Barlow (2005) a polaridade que acompanha o gradiente parece ser estável, e a reorientação pela enxertia revela que o desenvolvimento dos tecidos derivados seguem a orientação original, no entanto, um corte ou um anelamento pode provocar uma desordem na orientação do crescimento cambial e na diferenciação celular, este resultado é atribuído ao redimensionamento do fluxo de auxina.

Assim como ocorreu em *P. glomerata*, outras espécies também não necessitam de suporte na região de conexão desde que a justaposição do material seja exata, como verificado em videira (Pathirana & McKenzie, 2005) e eucalipto (Bandeira et al., 2006).

O desalinhamento do epibioto pode provocar a quebra da enxertia e levá-lo a morte, como observado em *Anacardium occidentale* (Ramanayake & Kovoov, 1999) e *Protea cynaroides* (Wu et al., 2007). Em *P. glomerata*, o desalinhamento lateral, quando acompanhado de um bom calejamento, não comprometeu a sobrevivência e o desenvolvimento das plantas (Figs. 2J e 2L).

Em *P. glomerata*, a formação do calo ocorreu de forma satisfatória, sendo evidente em todos os tratamentos até o sétimo dia. Sua rápida formação na região de conexão constitui reposta natural das células e tecidos vegetais para a cicatrização das regiões injuriadas como mecanismo de defesa da planta, visando prevenir a entrada de patógenos (Barnett & Weatherhead, 1988; Hartmann et al., 1997). A desdiferenciação celular, com a formação de calo é a primeira resposta da enxertia, sendo um bom indicador de sucesso, visto que o calo inicialmente é a ligação que possibilita o transporte de água e posteriormente, a diferenciação de suas células, resulta na reconexão vascular entre hipo e epibioto (Hartmann et al., 1997).

A formação de calo em *P. glomerata* contribuiu significativamente para a cicatrização na região do enxerto, facilitando o desenvolvimento das plantas (Figs. 2M-P). Tal fato foi verificado também em *Vitis vinifera*, que continuaram crescendo com o desenvolvimento da planta (Pathirana & McKenzie, 2005).

As maiores médias obtidas pelas testemunhas de *P. glomerata* quanto ao número de raízes e de nós, e altura da planta, torna-se uma tendência natural, pois as testemunhas se encontram em condição favorável, uma vez que não precisam restabelecer nenhuma união física antes de iniciarem seu desenvolvimento. Porém, as plantas enxertadas apresentaram desenvolvimento semelhante entre as combinações. Diferença significativa foi observada quanto à altura das plantas enxertadas. Quando o acesso 2202-15 constituía tanto o hipo quanto o epibioto, essa combinação apresentou maior crescimento em altura comparado aos demais enxertos. Essa característica pode ser devido a rapidez com que esse material respondeu às injúrias resultantes da técnica. A diferença das respostas fisiológicas na fase inicial do estabelecimento da enxertia provavelmente facilitou o seu crescimento, no entanto, as demais combinações não ficaram comprometidas.

Os índices de sobrevivência obtidos em *P. glomerata* estão dentro dos padrões considerados de sucesso para a técnica utilizada em outras espécies como videira (Pathirana & McKenzie, 2005), macieiras (Nunes et al., 2005) e algodoeiro (Jin et al., 2006).

A utilização de segmentos internodais em *P. glomerata* pode ter facilitado o processo de crescimento das plantas, uma vez que, não houve competição entre epibioto com o hipobioto na emissão de ramificações. Resultados semelhantes foram obtidos em *Anacardium occidentale*, utilizando hipocótilo como hipobioto, onde obtiveram melhor contato cambial, indicada pela formação do calo e pela ausência de gemas axilares (Thimmappaiah et al., 2002).

A enxertia *in vitro* é uma técnica que requer destreza e especial habilidade (Navarro et al., 1975; Bandeira et al., 2006). Seu sucesso incide na precisão com que é realizada, bem como, as condições fisiológicas, manutenção e seleção do material a ser utilizado (Navarro et al., 1975; Navarro, 1988). Dessa forma, os resultados ressaltam a eficiência da aplicação da enxertia *in vitro* para estabelecer diferentes combinações de acessos de *P. glomerata* agregando valor comercial a esta importante espécie medicinal.

Referências Bibliográficas

- ALVES, R.B.N.; MENDES, R.A.; MENDES, M.A.; CARNEIRO, R.M.D.G.; SILVA, D.B.; CARDOSO, L.D.; SALOMÃO, A.N.; VIEIRA, R.F. 2006. Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] germplasm conservation. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 8 (Esp.):1-4.
- ARAÚJO, F.P.; CASTRO-NETO, M.T. 2002. Influência dos fatores fisiológicos de plantas-matrizes e de épocas do ano no pegamento de diferentes métodos de enxertia do umbuzeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 24:752-755.
- BANDEIRA, F.S.; XAVIER, A.; OTONI, W.C.; DIAS, J.M.M. 2006. Enxertia *in vitro* na propagação de clones de *Eucalyptus urophylla* e *E.grandis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 41:223-232.
- BARNETT, J.R.; WEATHERHEAD, I. 1988. Graft formation in sitka spruce: a scanning electron microscope study. **Annals of Botany**, 61:581-587.
- BARLOW, P. 2005. From cambium to early cell differentiation within the secondary vascular system. In: HOLBROOK, N.M. & ZWIENIECKI, M.A (Eds.) *Vascular transport in plants*. Elsevier Inc.: London, 279-306.
- CARVALHO, S.A.; SANTOS, F.A.; MACHADO, M.A. 2002. Eliminação de vírus do complexo sorose dos citros por microenxertia associada à termoterapia. **Fitopatologia Brasileira**, 27:306-308.
- CORRÊA JR., C. 2003. **Estudo agrônômico da fáfia (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen): sazonalidade na produção de raízes e conteúdos de beta-ecdisona em diferentes indivíduos de São Paulo, Paraná e Mato Grosso do Sul**. Doutorado (Horticultura), Botucatu: UNESP/FCA. 94 p.
- CORRÊA JR., C.; CORTEZ, D.A.G.; MING, L.C.; SOARES, W. 2006a. **Fáfia – O ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Sprengel) Pedersen): Aspectos Agrônômicos e Fitoquímicos**. Curitiba: Clichetec, 22p.
- CORRÊA JR., C.; MING, L.C. 2006b. Fáfia, ginseng brasileiro. In: LÓPEZ, C.; SHANLEY, P.; CRONKLETON. (Org.). **Riquezas del bosque: frutas, remedios y artesanías en América Latina**. Santa Cruz: Centro para la investigación forestal internacional, p.82-86. Disponível em: www.cifor.cgiar.org/publications, Acesso em: 20/07/2007.
- CRUZ, C.D. 2006. **Programa GENES. Versão Windows**. Editora UFV, Minas Gerais. 642p., (Versão 2006.4.1).
- ERREA, P.; FELIPE, A.; HERRERO, M. 1994. Graft establishment between compatible and incompatible *Prunus* spp. **Journal of Experimental Botany**, v. 45:393-401.
- ERREA, P. 1998. Implications of phenolic compounds in graft incompatibility in fruit tree species. **Scientia Horticulturae**, 74:195-205.
- ERREA, P.; GARAY, L.; MARÍN, J.A. 2001. Early detection of graft incompatibility in apricot (*Prunus armeniaca*) using *in vitro* techniques. **Physiologia Plantarum**, 112:135-141.
- ESTRADA-LUNA, A.A.; LÓPEZ-PERALTA, C.; SORIANO-CÁRDENAS, E. 2002. *In vitro* micrografting and the histology of graft union formation of selected species of prickly pear cactus (*Opuntia* spp.). **Scientia Horticulturae**, 92:317-327.
- FIGUEIREDO, L.S.; TEIXEIRA, S.L.; FREITAS, S.P.; VIEIRA, I.J.C.; MARTINS, E.R. 2004. Comportamento de acessos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae) nas condições de Campos dos Goytacazes/RJ. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 7:67-72.
- GEORGE, E.F. 1993. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. England: Exegetics, 575 p.

- HARTMANN, N.T.; KESTER, D.E.; DAVIES, F.T.; GENEVE, R.L. 1997. **Plant propagation: principles and practices**. Englewood Cliffs: Regents/Prentice-Hall, Upper Saddle River, 757p.
- JIN, S.; LIANG, S.; ZHANG, X.; NIE, Y.; GUO, X. 2006. An efficient grafting system for transgenic plant recovery in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 85:181-185.
- JONARD, R. 1986. Micrografting and its applications to tree improvement. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.), **Biotechnology in agriculture and forestry**. Springer-Verlag, Berlin, p. 31-48.
- KAMADA, T. 2006. **Avaliação da diversidade genética de populações de fáfia (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) por RAPD, caracteres morfológicos e teor de β -ecdisona**. Doutorado (Genética e Melhoramento), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 106p.
- KATOH, N.; YUI, M.; SATO, S.; SHIRAI, T.; YUASA, H.; HAGIMORI, M. 2004. Production of virus-free plants from virus-infected sweet pepper by in vitro grafting. **Scientia Horticulturae**, 100:1-6.
- KRETZSCHMAR, U.; EWALD, D. 1994. Vegetative propagation of 140-year-old *Larix decidua* trees by different *in vitro* techniques. **Journal of Plant Physiology**, 144:627-630.
- MAGALHÃES, P.M. 2000. Agrotecnología para el cultivo de fáfia o ginseng brasileiro. In: MARTÍNEZ, J.V.; BERNAL, H.Y.; CÁCERES, A. (Eds.) **Fundamentos de Agrotecnología de cultivo de plantas medicinales iberoamericanas**. Colombia: Convenio Andres Bello e CYTED (Serie Ciencia Y Tecnología, N° 83). p. 323-332.
- MNENEY, E.E.; MANTELL, S.H. 2001. *In vitro* micrografting of cashew. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 66:49-58.
- MONTANARI JR., I. 2005. **Avaliação de genótipos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen visando seu cultivo comercial**. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical/Melhoramento Genético Vegetal). Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, 63p.
- MONTANARI JR., I.; PERECIN, M.B. 2006. Evaluation of morphological and agricultural characteristics and their phenotypic correlations in genotypes of a *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen population. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 8:46-48.
- MONTEUUIS, O. 1994. Effect of technique and darkness on the success of meristem micrografting of *Picea abies*. **Silvae Genetica**, 43:91-95.
- MONTEUUIS, O. 1995. *In vivo* grafting and *in vitro* micrografting of *Acacia mangium*: impact of ortet age. **Silvae Genetica**, 44:190-193.
- MUKHOPADHYAY, S.; JAISHREE RAI, B.C.; SHARMA, A.G.; SENGUPTA, R.K.; NATH, P.S. 1997. Micropropagation of darjeeling orange (*Citrus reticulata* Blanco) by soot-tip grafting. **Journal of Horticultural Science**, 72:493-499.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15:473-497.
- MURASHIGE, T.; BITTERS, W.P.; RANGAN, T.S.; NAUER, E.M.; ROISTACHER, C.N.; HOLLIDAY, P.B. 1972. A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free citrus clones. **HortScience**, 7:118-119.
- NAVARRO, L.; ROISTACHER, C.N.; MURASHIGE, T. 1975. Improvement of shoottip grafting *in vitro* for virus-free citrus. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 100:471-479.
- NAVARRO, L. 1988. Application of shoot-tip grafting *in vitro* to wood species. **Acta Horticulturae**, 227:43-55.
- NICOLOSO, F.T.; FORTUNATO, R.P.; FOGAÇA, M.A.F. 1999. Influência da posição da estaca no ramo sobre o enraizamento de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen em dois substratos. **Ciência Rural**, 29(2):277-283.

- NICOLOSO, F.T.; ERIG, A.C.; MARTINS, C.F.; RUSSOWSKI, D. 2001. Micropropagação do ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 3(2):11-18.
- NICOLOSO, F.T.; ERIG, A.C. 2002. Efeito de tipo de segmento nodal e tamanho do recipiente no crescimento de plantas de *Pfaffia glomerata in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Ed. Especial : 1499-1506.
- NUNES, J.C.O.; ABREU, M.F.; DANTAS, A.C.M.; PEREIRA, A.J.; PEDROTTI, E.L. 2005. Caracterização morfológica de microenxertia em macieira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 27:80-83.
- OLIVEIRA, F. 1986. *Pfaffia paniculata* (Martius) Kuntze - O ginseng brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 1:86-92.
- PAIVA, L.V.; CARVALHO, S.A.; SOUZA, M. 1993. Limpeza clonal da laranjeira “seleta folha murcha” através da microenxertia *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 28:1341-1344.
- PATHIRANA, R.; MCKENZIE, M.J. 2005. Early detection of grapevine leafroll virus in *Vitis vinifera* using *in vitro* micrografting. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 81:11-18.
- RAMANAYAKE, S.M.S.D.; KOVOOR, A. 1999. *In vitro* micrografting of cashew (*Anacardium occidentale* L.). **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, 74:265-268.
- REIS, M.S.; MARIOT, A. 2002. Diversidade natural e aspectos agrônômicos de plantas medicinais. In: SIMÕES, C.M.O; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R (Eds.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. P. 41-62. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/UFSC.
- RICHARDSON, F.V.M.; tSAOIR, S.M.A.; HARVEY, B.M.R. 1996. A study of the graft union in *in vitro* micrografted apple. **Plant Growth Regulation**, 20:17-23.
- SANJAYA, T.S.R.; SANJAYA, B.M.; RAI, V.R. 2006. Factors influencing *in vivo* and *in vitro* micrografting of sandalwood (*Santalum album* L.): an endangered tree species. **Journal of Forest Research**, 11:147-151.
- SCHÄFER, G.; BASTIANEL, M.; DORNELLES, A.L.C. 2001. Porta-enxertos utilizados na citricultura. **Ciência Rural**, Santa Maria, 31:723-733.
- SHARMA, S.; SINGH, B.; RANI, G.; ZAIDI, A.A.; HALLAN, V.K.; NAGPAL, A.K.; VIRK, G.S. 2008. *In vitro* production of *Indian citrus ringspot virus* (ICRSV) free Kinnow plants employing thermotherapy coupled with shoot tip grafting. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 92:85-92.
- SHIOBARA, Y.; INOUE, S-S.; KATO, K.; NISHIGUCHI, Y.; OISHI, Y; NISHIMOTO, N.; OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K; HASHIMOTO, G. 1993. A nortriterpenoid, triterpenoids and ecdysteroids from *Pfaffia glomerata*. **Phytochemistry**, 32:1527-1530.
- THIMMAPPAIAH; PUTHRA G.T.; ANIL, S.R. 2002. *In vitro* grafting of cashew (*Anacardium occidentale* L.). **Scientia Horticulturae**, 92:177-182.
- TRONCOSO, A.; LINAN, J.; CANTOS, M.; ACEBEDO, M.M. 1999. Feasibility and anatomical development of an *in vitro* olive cleft-graft. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, 74:584-587.
- VIEIRA, R.E., SILVA, S.R., ALVES, R.B.N., SILVA, D.B., WETZEL, M.M.V.S., DIAS, T.A.B., UDRY, M.C.; MARTINS, R.C. 2002. Estratégias para conservação e manejo de recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas: **Resultados da 1ª Reunião Técnica. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Ibama, CNPq, Brasília, 184p.
- VIGO, C.L.S.; NARITA, E.; MILANEZE-GUTIERRE, M.A.; MARQUES, L.C. 2004. Caracterização farmacognóstica comparativa de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Hebanthe paniculata* Martius – *Amaranthaceae*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 6(2):7-19.

WU, H.C.; DU TOIT, E.S.; REINHARDT, C.F. 2007. Micrografting of *Protea cynaroides*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 89:23-28.

ZIMMER, A.R.; BRUXEL, F.; BASSANI, V.L.; GOSMANN, G. 2006. HPLC method for the determination of ecdysterone in extractive solution from *Pfaffia glomerata*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 40:450-453.

Capítulo 3

Desenvolvimento *ex vitro* de fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] propagadas pela enxertia *in vitro*

Introdução

Utilizada há séculos pelos índios brasileiros na cura e prevenção de doenças, a fáfia ou “ginseng brasileiro” (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen – Amaranthaceae) só teve suas propriedades medicinais comprovadas cientificamente depois de levada ao Japão e submetida à análise pelo laboratório “Rhoto Pharmaceutical Co Ltda” (Ming & Corrêa Jr., 2004; Corrêa Jr. et al., 2006a, 2006b).

Com a validação científica das propriedades terapêuticas, o extrativismo foi intensificado, colocando-a em risco de extinção, e, conseqüentemente, comprometendo o fornecimento de matéria-prima (Corrêa Jr., 2003).

O uso de *Pfaffia* continua despertando atenção dos japoneses, que importam quantidades crescentes de raízes, porém, a União Européia e os Estados Unidos da América, recentemente demonstraram interesse na sua importação, e estima-se um crescimento anual de 10% no consumo de *P. glomerata* (Corrêa Jr. & Ming, 2004).

Atualmente, o Brasil é o maior produtor e exportador de *Pfaffia*. Entretanto, como existem vários fatores fitossanitários limitantes que podem prejudicar o cultivo do ginseng brasileiro (Carneiro et al., 2007), há a necessidade de se buscar alternativas para a produção de matéria-prima homogênea e de qualidade (Flores et al., 2006). Sua domesticação aumenta as possibilidades de obtenção de plantas mais homogêneas e produtivas, podendo ser facilitada pela utilização da técnica de enxertia *in vitro* como método de propagação.

A enxertia une dois materiais vegetais geneticamente distintos, porém compatíveis, que passam a compartilhar uma série de fatores essenciais à sobrevivência de ambos, determinando assim o seu sucesso (Zaccaro et al., 2006). O hipobioto, obtido por meio de propágulos vegetativos, proporciona uniformidade e manutenção das características desejáveis (Jonard, 1986), merecendo destaque a resistência a certas doenças (Hartmann et al., 1997), tolerância a estresses abióticos, além da influência que exercem sobre o crescimento e o desenvolvimento dos epibiotos (Bandeira, 2006). Em

alguns casos, os hipobiotos afetam diretamente o vigor da variedade da copa enxertada, estando relacionados diretamente ao genótipo e suas relações, induzindo diferenças marcantes no tamanho da copa e de sua produção (Schafer et al., 2001). Dessa forma, a enxertia *in vitro* pode também ser uma alternativa para a otimização da produção do princípio ativo de plantas medicinais que possuem genótipos divergentes na produção, bem como, na seleção de plantas resistentes a pragas e doenças.

O procedimento padrão da enxertia *in vitro* é usado em muitos laboratórios e consiste em preparar o hipobiotos e o epibiotos, realizar a enxertia, cultivar *in vitro* as plantas propagadas e transferir para o solo (Navarro et al., 1975; Navarro, 1988). A aclimatização é um aspecto de grande importância para o completo sucesso no uso desta técnica (Paiva & Carvalho, 1993).

A fase de transferência das plantas estabelecidas *in vitro*, visando à rustificação e aclimatização em condições *ex vitro*, constitui importante etapa na formação de mudas de qualidade, uma vez que este material passa de uma condição heterotrófica para a autotrófica, sofrendo estresses fisiológicos (Bandeira et al., 2007).

As plantas cultivadas *in vitro* crescem em condições específicas, em sua maioria não encontram condições de luz e concentração de CO₂ adequadas e, às vezes, não apresentam teores de clorofila suficientes para realizar fotossíntese que sustente o crescimento (Hughes, 1981; Lee et al., 1985; Viña et al., 1999; Viña, 2001). Comumente, crescem sob elevadas concentrações de fontes de carbono no meio de cultura, baixas irradiâncias, com limitada concentração de CO₂ na fase gasosa (Viña et al., 1999) e com alta umidade relativa (Galzy & Compan, 1992). A ação em conjunto desses fatores resulta em baixo desempenho fotossintético, que pode influenciar o crescimento e a morfogênese *in vitro* (Hughes, 1981), bem como, sua sobrevivência à aclimatização (Lee et al., 1985).

Considerando a importância do cultivo *in vitro* de espécies ameaçadas, tanto para propagação em larga escala, bem como, para estudos fisiológicos, vias biossintéticas, melhoramento genético, dentre outros, a cultura de tecidos torna-se uma importante ferramenta para obtenção de respostas rápidas e determinação de técnicas como propagação vegetativa viáveis.

O cultivo de plantas medicinais envolve a possibilidade de domesticação e implica no domínio tecnológico de todas as etapas de desenvolvimento da espécie. Assim, a estratégia de obtenção de biomassa requer um conhecimento da forma de propagação, adaptação ao ambiente de cultivo, forma de crescimento e senescência, etc

(Reis & Mariot, 2002), tornando-se essencial o estabelecimento das plantas enxertadas na condição *ex vitro* e o acompanhamento de suas fases de desenvolvimento no campo.

Nesse contexto, este trabalho objetivou avaliar a sobrevivência e o crescimento das plantas de *P. glomerata*, obtidas pela enxertia *in vitro* por meio da combinação de acessos distintos na produção de massa seca da raiz e teor do princípio ativo, durante a fase de aclimatização e no decorrer do seu ciclo de desenvolvimento.

Material e Métodos

Foram utilizadas plantas enxertadas *in vitro* de dois acessos de *P. glomerata* da coleção de germoplasma de plantas medicinais do Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia (Embrapa/Cenargen) identificadas sob n.º. 2202-15 e 2209-09, coletadas em duas populações na bacia do rio Paraná.

Os seis tratamentos consistiram em: acesso 2202-15 sem enxerto (testemunha – ac 22); acesso 2209-09 sem enxerto (testemunha – ac 43); 2202-15 como hipobioto e 2209-09 como epibioto (cv 22); 2209-09 como hipobioto e 2202-15 como epibioto (cv 43); 2202-15 como hipobioto e epibioto (ct 22); e, 2209-09 como hipobioto e epibioto (ct 43).

Indivíduos propagados vegetativamente *in vitro* via segmento nodal foram utilizados para obtenção das plantas enxertadas. Ápices caulinares com aproximadamente 1 cm de comprimento e contendo um ou dois pares de folhas foram utilizados como epibioto, e, segmentos internodais alongados da porção basal da planta com aproximadamente 1,5 cm de comprimento foram utilizados como hipobioto.

Foi incisada a porção proximal na forma de duplo bisel no epibioto, e, no hipobioto procedeu-se retirada das porções proximal e distal do segmento internodal, realizando a abertura da fenda na região distal, para receber o enxerto. Procedeu-se a realização da enxertia *in vitro* conforme metodologia de Bandeira (2006).

As plantas enxertadas foram transferidas para tubos de ensaio, e cultivadas por 30 dias em meio de cultura contendo os sais e vitaminas MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 8 g L⁻¹ de ágar (Merck), mantidos em sala de crescimento, à temperatura de 25 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 16 horas com irradiância de 50 µmol m⁻² s⁻¹.

Aclimatização

As plantas com 30 dias foram transferidas para recipientes (copo plástico - 300 mL) contendo substrato (Plantmax[®]), tutoradas e os recipientes foram envolvidos com sacos plásticos, que foram sendo removidos gradualmente até a retirada total. Esta etapa foi realizada em condições de laboratório por 30 dias. Após esse período, as plantas aclimatizadas foram transferidas para casa de vegetação, e posteriormente transplantadas para condição de campo em vasos plásticos com capacidade para 18 L, contendo mistura de solo, areia e substrato (Plantmax[®]) (2:2:1). Durante o período de

campo, as plantas foram adubadas duas vezes com o fertilizante (Ouro Verde[®] 1 g L⁻¹) no primeiro e no quinto mês após o transplântio. As plantas foram mantidas durante oito meses nessa condição até finalizar o ciclo da cultura. Em todas as etapas de transferência, observou-se a região do enxerto, ficando esta sempre acima do nível do substrato e sendo retirado todos os ramos ladrões.

Avaliação de parâmetros fisiológicos

As plantas com 30 (condição *in vitro*), 60 (aclimatização em laboratório), 120 (casa de vegetação) e 240 (condição de campo) dias após o enxerto foram submetidas à determinação dos teores de pigmentos foliares, trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*.

Pigmentos cloroplastídicos

A concentração de clorofilas *a* e *b*, e carotenóides foram determinadas utilizando-se 6 discos foliares com 5 mm de diâmetro, retirados da 3^a folha totalmente expandida, e incubados em 5 mL de DMSO (saturado com CaCO₃), à temperatura ambiente por 48 horas. A absorvância das amostras foi obtida em espectrofotômetro (Hitachi U-2000 Spectrophotometer, Tóquio, Japão). Os comprimentos de onda e as equações para o cálculo das concentrações de clorofila *a*, *b* e carotenóides foram baseados na metodologia de Wellburn (1994).

Determinação das trocas gasosas

Avaliações em condições *ex vitro*

A avaliação dos parâmetros de trocas gasosas nas plantas nas condições de laboratório, casa de vegetação e campo foi realizada em folhas completamente expandidas com auxílio de um analisador de gás no infravermelho (LI-6400, Li-Cor Inc., Lincoln, Nebraska, EUA). Os parâmetros avaliados foram: taxa de fotossíntese (*A*), condutância estomática (*g_s*), transpiração (*E*) e calculadas a razão *C_i/C_a* (concentração interna/atmosférica de CO₂). As medições nas plantas foram feitas entre 8:00 e 10:00 h, nas condições descritas no quadro 1.

Avaliações da taxa fotossintética *in vitro*

A taxa fotossintética nas plantas de *P. glomerata* cultivadas *in vitro* foi avaliada em sistema fechado onde o tubo de cultivo foi acoplado a um analisador de gases no infravermelho modelo S152 (Qubit Systems, Kingston, ON Canadá). O ar de referência, com concentração conhecida de CO₂ (385 μmol mol⁻¹), foi bombeado para o tubo de cultivo sob taxa constante de fluxo de 0,5 L min⁻¹. Previamente e durante as análises, a planta foi submetida à irradiância de 300 μmol m⁻² s⁻¹ (Quadro 1). Após passar pelo tubo contendo a planta, o ar de saída ou ar de análise passou pelo IRGA, onde foi medida a concentração de CO₂. A diferença entre a concentração de CO₂ do ar de referência e do ar de análise (ΔCO₂) foi utilizada para o cálculo da taxa fotossintética.

Determinação da fluorescência da clorofila *a*

Silmultaneamente às trocas gasosas foram avaliados os parâmetros de fluorescência da clorofila *a*, sendo utilizado o fluorômetro modulado MINI-PAM (Heinz Walz, Effeltrich, GmbH, Alemanha), que determinou a eficiência quântica máxima do PSII (F_v/F_m), em folhas adaptadas ao escuro por 30 minutos e, em seguida, o rendimento quântico efetivo do fotossistema II (ΔF/F_m'), e coeficientes de extinção fotoquímica (qP), e não-fotoquímica (qN e NPQ) e a taxa de transporte de elétrons (ETR), sob as condições descritas no quadro 1.

Quadro 1. Condições do ambiente no momento das análises dos parâmetros fisiológicos em *Pfaffia glomerata*, nas diferentes condições de cultivo a que foram submetidas

Condições Ambientais	Condições de Cultivo			
	<i>In vitro</i>	Laboratório	C. Vegetação	Campo
Temperatura Ambiente (°C)	24,01	28,07	29,71	22,86
Umidade Relativa (%)	84,58	52,43	41,57	53,37
Déficit de Pressão de Vapor (mmol mol ⁻¹)	3,190	1,649	2,049	1,016
Irradiância (μmol m ⁻² s ⁻¹) contínua utilizada	300	200	1.000	1.000

Análises de campo

O material de campo foi avaliado considerando a presença de insetos, predadores e visitantes, assim como presença de fitopatógenos, deficiência nutricional e

observação do desenvolvimento da parte aérea das plantas em função dos tratamentos aplicados.

Características agronômicas

Na avaliação final do experimento foram determinadas a produção floral e produção de raízes tuberosas, cujo valor médio expresso em kg planta^{-1} , obtido pela pesagem das inflorescências e raízes das plantas, presentes em todas as unidades experimentais.

Determinação do índice de galhas

As plantas foram removidas dos vasos e suas raízes lavadas em água corrente para atribuição de classes de infecção, sendo avaliado todo o sistema radicular da planta de acordo com o número de galhas presentes em cada raiz, em uma escala de 0 a 10, onde 0 = ausência de galhas, 1 = 1-10% de galhas, 2 = 11-20% de galhas, até 10 = 91-100% de galhas nas raízes (Adaptado de Barker et al., 1986).

Delineamento Experimental

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições por tratamento, sendo cada unidade amostral constituída por um vaso com uma planta.

A produção de inflorescências e raízes em campo foi submetida à análise de variância, sendo aplicado o teste de Tukey para comparação das médias dos tratamentos.

Os valores dos índices de pegamento e mortalidade foram expressos em percentagem. Os dados referentes a análises de campo, foram submetidos ao teste de qui-quadrado e os dados relativos à presença de *Diabrotica speciosa* (vaquinha) e inflorescência foram submetidos à análise de regressão, ajustando-se a equação em função do período de avaliação. Todas as análises foram realizadas a 5% de significância, utilizando o programa estatístico GENES (Cruz, 2006). O experimento foi repetido por duas vezes, sendo que o primeiro experimento foi realizado ao longo de um ano, enquanto que o segundo experimento durou oito meses.

Resultados

Aclimatização

Durante o estabelecimento dos enxertos *in vitro*, as plantas de *P. glomerata* responderam de forma satisfatória à enxertia *in vitro*. O percentual de pegamento aos 30 dias de cultivo variou de 82,5 a 97,5% entre os tratamentos, confirmando a eficiência da técnica utilizada. Essa resposta inicial refletiu no sucesso da aclimatização das plantas.

A mortalidade observada na fase de cultivo *in vitro* foi resultante da qualidade do pegamento. Aos 30 dias de cultivo, as plantas enxertadas que possuíam frágil pegamento ou ausência deste apresentaram mortalidade. Esta foi decorrente do insucesso na conexão durante a fase de estabelecimento *in vitro*. No entanto, pode-se considerar que a técnica foi bem sucedida na fase inicial de cultivo *in vitro*, pois apresentou boa união dos enxertos na maioria das plantas, resultando em robusto crescimento.

A qualidade dos enxertos estabelecidos *in vitro* foi fundamental na obtenção de plantas vigorosas *ex vitro*, pois a fase de aclimatização não comprometeu seu estabelecimento, não sendo registrada mortalidade durante a etapa de aclimatização. As plantas cresceram de forma robusta na condição *ex vitro* (Fig. 1) independente da combinação de enxertia realizada.

Após a transferência das plantas da condição *in vitro* para a *ex vitro*, o desenvolvimento foi evidente sendo observado todo o ciclo de vida. Inicialmente, o que se destaca nas plantas são as folhas (Figs. 1A, 1E e 1H); no período reprodutivo, foi intensa a emissão de inflorescências (Figs. 1I-J), ficando escassas as folhas; nas raízes, a tuberização foi evidente (Figs. 1F e 1L).

Na condição de laboratório (Figs. 1A-D) foi possível verificar o início da cicatrização na região do enxerto (Fig. 1D), ficando bem caracterizada em casa de vegetação (Figs. 1E-G). Na transferência para o campo, a região do enxerto se demonstrou pouco perceptível (Fig. 1K).

Parâmetros fisiológicos

Na determinação dos pigmentos cloroplastídicos clorofila *a*, *b* e carotenóides não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos quando submetidos à mesma condição de cultivo (*in vitro*, aclimatização em laboratório, casa de vegetação e

campo), observando a mesma tendência em todos os tratamentos (Fig. 2).

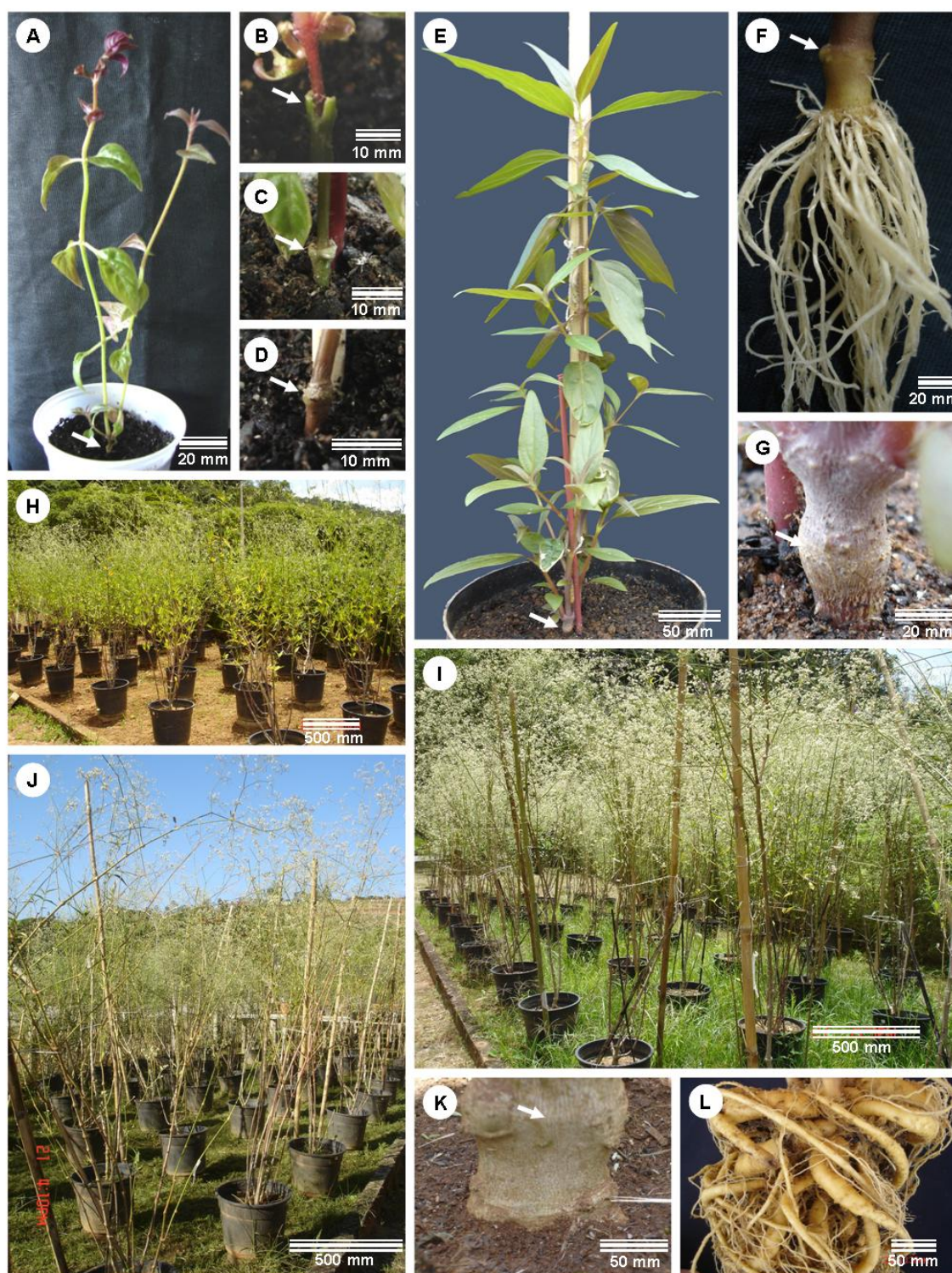


Figura 1. Etapas de aclimatização de *P. glomerata* enxertadas *in vitro*. **A-D.** Aclimatização em laboratório; **B-D.** detalhe da região de conexão e sua gradativa cicatrização; **E-G.** planta em casa de vegetação com 100 dias; **F.** detalhe da raiz; **G.** detalhe da região de conexão já cicatrizada; **H.** transferência para a condição de campo com 120 dias; **I.** plantas no pico da floração; **J-L.** plantas com 360 dias; **K.** detalhe da região de conexão; **L.** sistema radicular. As setas indicam a região de união dos enxertos.

As condições de cultivo influenciaram na concentração de pigmentos foliares. As menores concentrações foram observadas na condição *in vitro*, enquanto que as maiores concentrações foram observadas em casa de vegetação (Fig. 2).

As plantas do acesso 2202-15 quando propagadas *in vitro* apresentaram coloração verde escura na face adaxial da folha e levemente violácea na face abaxial, enquanto que o acesso 2209-09 apresentou, em ambas as faces, coloração verde claro. No entanto, quando submetida à enxertia, as plantas cuja parte aérea foi constituída pelo acesso 2209-09 se apresentaram mais amareladas, porém esta diferença não foi significativa para ser detectada na análise dos pigmentos. Cabe ressaltar que o referido acesso é mais sensível ao estresse hídrico, tanto em condição *in vitro* quanto em condições de campo, podendo esta clorose ser uma resposta fisiológica resultante da injúria a que foi submetido.

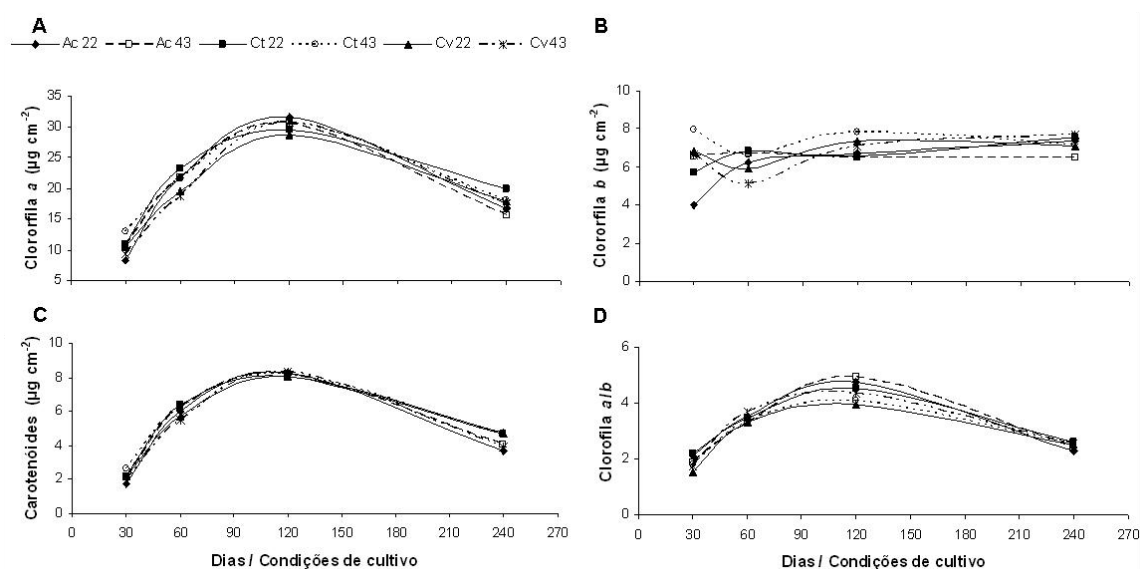


Figura 2. Pigmentos cloroplásticos. Teor de clorofila *a* (A), *b* (B), carotenóides (C) e razão Clorofila *a/b* (D) em *P. glomerata* submetidas à enxertia *in vitro*. Os dias correspondem às diferentes fases de aclimatização da planta: 30 dias (condição de cultivo *in vitro*), 60 dias (fase em laboratório); 120 dias (plantas mantidas em casa de vegetação); e, 240 dias (plantas em condição de campo). Legenda: Ac 22 = testemunha 2202-15; Ac 43 = testemunha 2209-09; Ct 22 = 2202-15 como hipo e epibioto; Ct 43 = 2209-09 como hipo e epibioto; Cv 22 = 2202-15 como hipo e 2209-09 como epibioto; Cv 43 = 2209-09 como hipo e 2202-15 como epibioto.

Analisando os parâmetros de trocas gasosas entre os tratamentos em diferentes condições de cultivo, observou-se diferença apenas para as variáveis fotossíntese e condutância estomática quando as plantas foram cultivadas em casa de vegetação. A taxa fotossintética do acesso 2209-09 quando enxertado sobre ele mesmo foi superior à

testemunha do acesso 2202-15 e à enxertia do acesso 2202-15 sobre 2209-09. Respostas semelhantes foram obtidas para condutância estomática, à exceção da testemunha 2202-15, que não diferiu dos demais tratamentos (Quadro 2).

A taxa fotossintética das plantas cultivadas *in vitro* não apresentou diferença estatística significativa entre os tratamentos (Fig. 3A). Observou-se aumento acentuado na taxa fotossintética da fase de aclimatização em laboratório para o cultivo das plantas em casa de vegetação. No entanto, quando as plantas foram cultivadas no campo, a taxa fotossintética não apresentou incremento significativo (Fig. 3B). Essa tendência foi também observada para condutância estomática (Fig. 3C), enquanto que a taxa de transpiração em campo tendeu a diminuir (Fig. 3D).

A concentração interna de CO₂ (C_i - Fig. 3E) e a concentração interna/atmosférica (C_i/C_a - Fig. 3F) decresceram quando as plantas foram transferidas do laboratório para a casa de vegetação, e se mantiveram estáveis no campo.

Na determinação dos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* avaliando os tratamentos, na mesma condição de cultivo, foram observadas diferenças apenas para a eficiência quântica máxima do PSII - Fv/Fm (Quadro 1).

Quadro 2. Parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*, avaliados sob diferentes condições de cultivo de *Pfaffia glomerata*

Epibioto	Hipobioto	A		----- Fv/Fm -----		
		Casa vegetação	gs	<i>In vitro</i>	Lab.	Campo
Testemunhas	2202-15	13,13 b	0,144 ab	0,738 ab	0,829 a	0,794 a
	2209-09	16,67ab	0,236 ab	0,674 b	0,815 bc	0,749 b
2202-15	2202-15	13,66 ab	0,163 ab	0,707 ab	0,829 a	0,791 a
	2209-09	13,48 b	0,135 b	0,757 a	0,821 ab	0,789 ab
2209-09	2202-15	15,98 ab	0,216 ab	0,708 ab	0,806 c	0,759 ab
	2209-09	17,66 a	0,251 a	0,744 ab	0,814 bc	0,759 ab

A = fotossíntese; gs = condutância estomática; Fv/Fm = eficiência quântica máxima do PSII. As médias seguidas de uma mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

O rendimento quântico potencial (Fv/Fm) *in vitro* diferiu em dois tratamentos, sendo a testemunha 2209-09 apresentou menor rendimento, e a combinação 2209-09 como hipobioto e 2202-15 como epibioto apresentou maior rendimento (Quadro 2).

Na fase de aclimatização no laboratório os maiores valores de Fv/Fm foram observados nas plantas cuja parte aérea foi constituída pelo acesso 2202-15, enquanto que, o tratamento constituído pelo hipobioto 2202-15 e pelo epibioto 2209-09 apresentou um dos menores valores de Fv/Fm (Quadro 2). Em condição de campo a testemunha 2209-09 diferiu tanto da testemunha 2202-15 quanto da combinação de hipo e epibioto do acesso 2202-15 (Quadro 2).

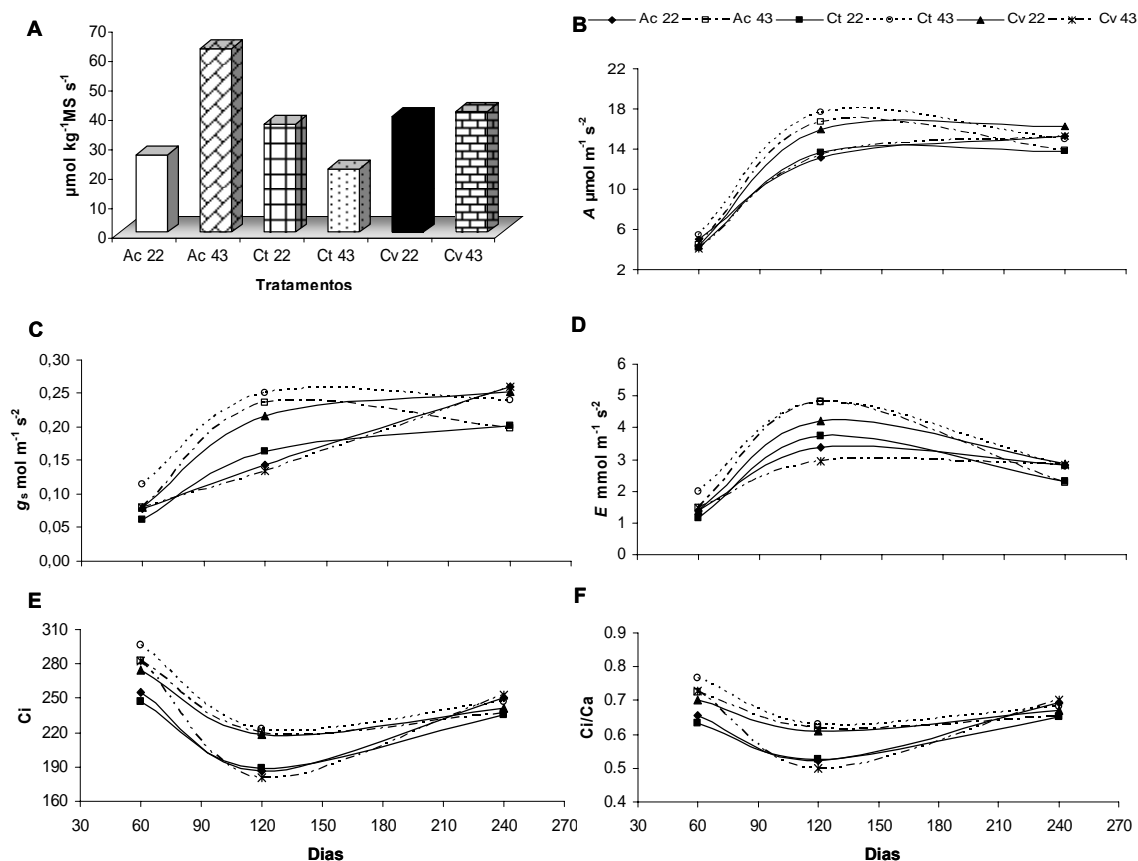


Figura 3. Trocas gasosas. **A** - taxa fotossintética na condição *in vitro*, **B** - taxa fotossintética (A), **C** - condutância estomática (g_s), **D** - transpiração (E), **E** - C_i (concentração interna de CO_2) e **F** - C_i/C_a (concentração interna/atmosférica de CO_2), em *P. glomerata* propagadas via enxertia *in vitro*. Os dias correspondem as diferentes fases de aclimatização da planta: 60 dias fase em laboratório; 120 dias plantas mantidas em casa de vegetação; e, 240 dias plantas em condição de campo. Legenda: Ac 22 = testemunha 2202-15; Ac 43 = testemunha 2209-09; Ct 22 = 2202-15 como hipo e epibioto; Ct 43 = 2209-09 como hipo e epibioto; Cv 22 = 2202-15 como hipo e 2209-09 como epibioto; Cv 43 = 2209-09 como hipo e 2202-15 como epibioto.

As plantas submetidas à enxertia combinada com dois acessos não apresentaram diferenças quanto aos parâmetros nas diferentes condições de cultivos submetidas, com exceção ao Fv/Fm em fase de laboratório (Quadro 2). No entanto, houve diferenças

significativas entre as testemunhas na condição *ex vitro*, demonstrando as diferenças fisiológicas entre os acessos, que foram minimizadas em função da enxertia (Quadro 2).

As demais variáveis relacionadas à fluorescência da clorofila *a* não apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos, que podem ser observadas pelo comportamento padrão estabelecido entre os mesmos (Fig. 4).

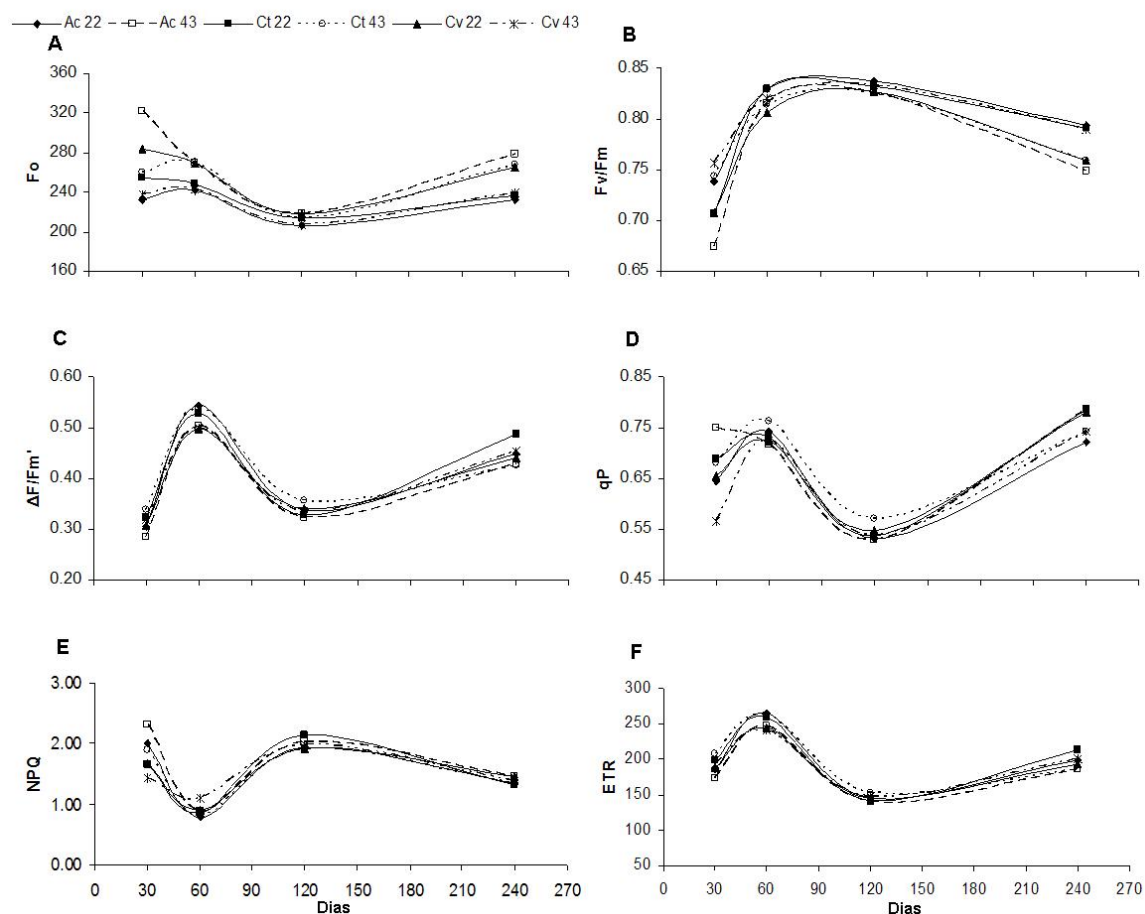


Figura 4. Fluorescência da clorofila *a*. **A** – fluorescência inicial (F_o), **B** - rendimento quântico potencial do PSII (F_v/F_m), **C** - rendimento quântico efetivo do PSII ($\Delta F/F_m'$), **D** - coeficiente de extinção fotoquímica (q_P), **E** – coeficiente de extinção não fotoquímica (NPQ), e, **F** - taxa de transporte de elétrons (ETR), em *P. glomerata* propagadas via enxertia *in vitro*. Os dias correspondem as diferentes fases de aclimatização da planta: 30 dias condição de cultivo *in vitro*, 60 dias fase em laboratório; 120 dias plantas mantidas em casa de vegetação; e, 240 dias plantas em condição de campo. Legenda: Ac 22 = testemunha 2202-15; Ac 43 = testemunha 2209-09; Ct 22 = 2202-15 como hipo e epibioto; Ct 43 = 2209-09 como hipo e epibioto; Cv 22 = 2202-15 como hipo e 2209-09 como epibioto; Cv 43 = 2209-09 como hipo e 2202-15 como epibioto.

Analisando a evolução das demais características nas diferentes condições de cultivo verificou-se que a fluorescência inicial (F_o) se mantém praticamente estável em

todas as condições, sendo relativamente menor apenas quando cultivadas em casa de vegetação (Fig. 4A).

As plantas cultivadas *in vitro* apresentaram o menor rendimento quântico potencial (Fv/Fm), no entanto, na etapa de aclimatização houve aumento significativo nesta relação permanecendo praticamente estáveis nas etapas subseqüentes do cultivo (Fig. 4B).

Em relação ao rendimento quântico efetivo do PSII ($\Delta F/F_m'$), ao coeficiente de extinção fotoquímica (qP), e a taxa de transporte de elétrons (ETR), observou-se aumento significativo da condição *in vitro* para a fase de aclimatização, ocorrendo decréscimo quando transferidas para casa de vegetação e, em campo voltou a ascender (Figs. 4C e 4D).

As plantas, dentre aquelas cultivadas *in vitro*, quando mantidas em casa de vegetação e no campo apresentaram coeficiente de extinção não-fotoquímica (NPQ) semelhantes, ficando evidente a alteração somente durante o processo de aclimatização (Fig. 4E).

Análises de campo

A presença de ácaros, antracnose, cercosporiose, pulgões pretos, moscas, aranhas, besouros, joaninhas, percevejos, louva-a-Deus, mariposas e pássaros foi característica observada em todos os tratamentos de forma homogênea no campo (Fig. 5). As análises das variáveis relativas aos fitopatógenos, predadores e polinizadores não apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos.

Comparando-se par a par a variável ápice devorado e caule perfurado, observou-se que houve diferença significativa entre os tratamentos a 1% de probabilidade, (Quadro 3). Essas características foram observadas quando o acesso 2202-15 constituía a parte aérea da planta, sendo esta relação inversa quando observada a presença de vespas. Esse acesso apresentou maior susceptibilidade ao ataque de insetos, não sendo atrativo aos seus predadores.

No experimento de oito meses, a senescência das inflorescências foi observada com maior frequência quando o acesso 2209-09 constituía a parte aérea da planta. No entanto, para o experimento de doze meses essa diferença não foi significativa entre os tratamentos, indicando que a variação sazonal pode influenciar na fenologia dos acessos de forma diferenciada.

O início da floração foi influenciado diretamente pela enxertia. As plantas cujo

tratamento foi constituído pela enxertia do acesso 2209-09 sobre 2202-15 foram as primeiras a alcançarem o estágio reprodutivo. No entanto, a testemunha (acesso 2209-09) foi a última a atingir esta fase.

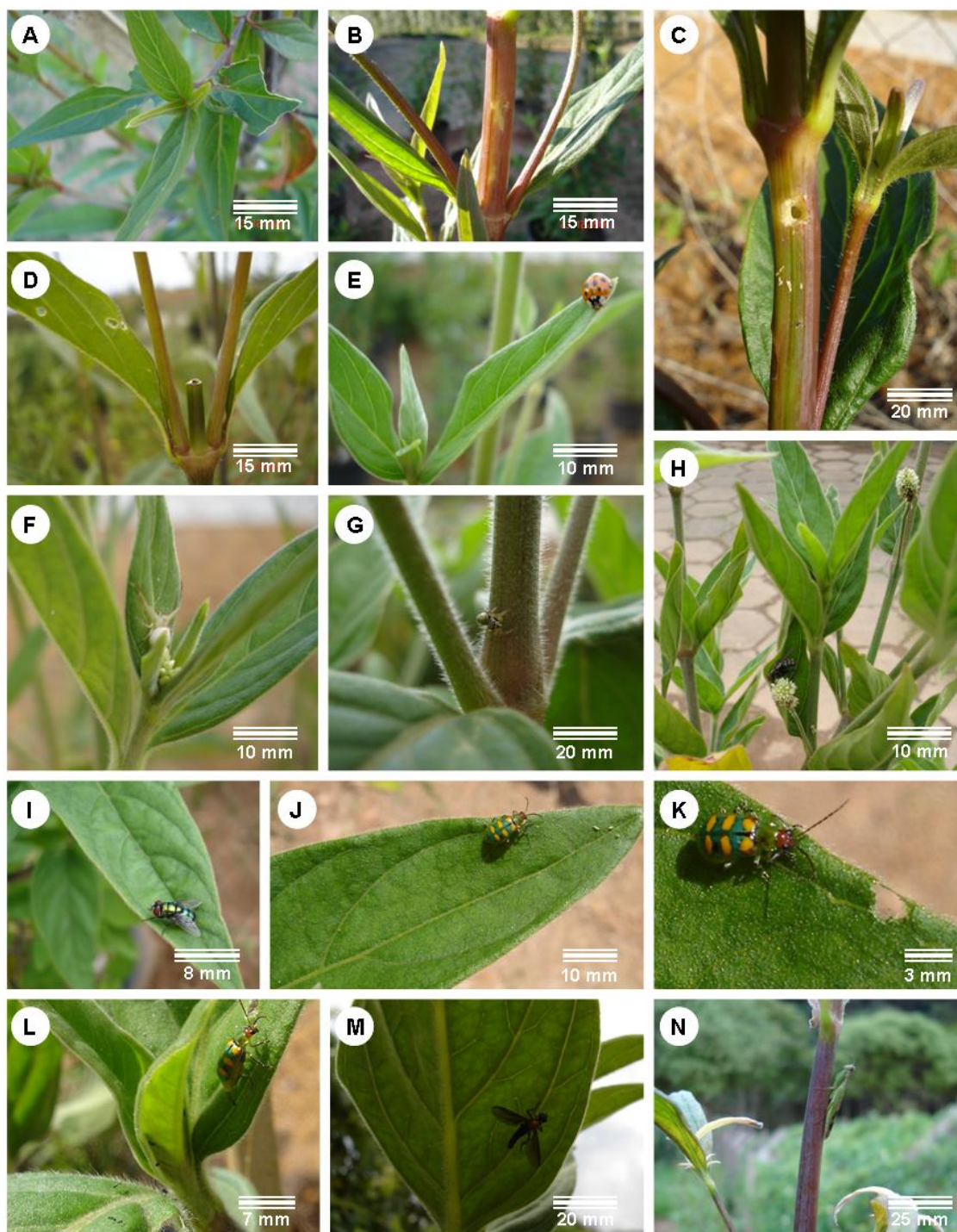


Figura 5. Aspectos ecológicos de *P. glomerata* em condições de campo. **A.** folhas, **B** e **C.** caule danificados; **D.** ápice devorado; **E.** Polyphaga (joaninha); **F** e **G.** aranha na inflorescência e no caule; **H** e **I.** moscas visitando a inflorescência e a folha; **J, K** e **L.** *Diabrotica speciosa* predando a folha; **L.** pulgão preto nas folhas; **M.** abelha-cachorro na folha; **N.** Orthoptera (louva-a-Deus) devorando o caule.

Quadro 3. Análise de campo das plantas de *P. glomerata* enxertadas *in vitro*, após a etapa de aclimatização

	Tratamentos						χ^2
	Ac 22	Ac 43	Ct 22	Ct 43	Cv 22	Cv 43	
Ápice devorado							44.4939*
Presença	7	0	8	0	0	8	
Ausência	1	8	0	8	8	0	
Caule perfurado							48.0000*
Presença	8	0	8	0	0	8	
Ausência	0	8	0	8	8	0	
Hymenoptera (vespas)							5.3333 ^{ns}
Presença	1	3	0	3	3	2	
Ausência	7	5	8	5	5	6	
Morte de inflorescência (8 meses)							14.1176*
Presença	5	7	2	8	7	5	
Ausência	3	1	6	0	1	3	
Morte de inflorescência (12 meses)							7.6658 ^{ns}
Presença	3	5	1	2	1	1	
Ausência	5	3	7	6	7	7	

* Significativo e ns = não significativo a 5% de probabilidade. Legenda: Ac 22 = testemunha 2202-15; Ac 43 = testemunha 2209-09; Ct 22 = 2202-15 como hipo e epibioto; Ct 43 = 2209-09 como hipo e epibioto; Cv 22 = 2202-15 como hipo e 2209-09 como epibioto; Cv 43 = 2209-09 como hipo e 2202-15 como epibioto.

A produção de inflorescência nas plantas cuja parte aérea foi constituída pelo acesso 2209-09 aumentou num menor espaço de tempo, enquanto que as plantas constituídas pelo acesso 2202-15 aumentaram gradativamente e apresentaram declínio no período da coleta (Fig. 6). Esta diferença pode estar diretamente associada ao ataque de insetos que ocorreu no acesso 2202-15. O ataque foi destrutivo e localizado, principalmente, nas porções terminais da planta, as quais, no período reprodutivo, são constituídas pelas inflorescências. Entretanto, os tratamentos não diferiram estatisticamente quanto ao número de inflorescência.

A cercosporiose e antracnose foram observadas somente no terço inferior das plantas, independente do tratamento. Os predadores e polinizadores estavam associados às inflorescências, sendo observada maiores frequências após o início da antese. As moscas são prováveis polinizadores, pelo odor fétido emanado pelas inflorescências no período reprodutivo das plantas.

Foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos para as variáveis: número de folhas danificadas por vaquinha (*Diabrotica speciosa*), produção de inflorescência por planta e produção de raízes por planta (Quadro 4).

O número de folhas atacadas por vaquinha apresentou diferença significativa entre os tratamentos (Quadro 4), mas não houve significância para o número de folhas atacadas em função do tempo de aclimatização das plantas e seu crescimento em campo.

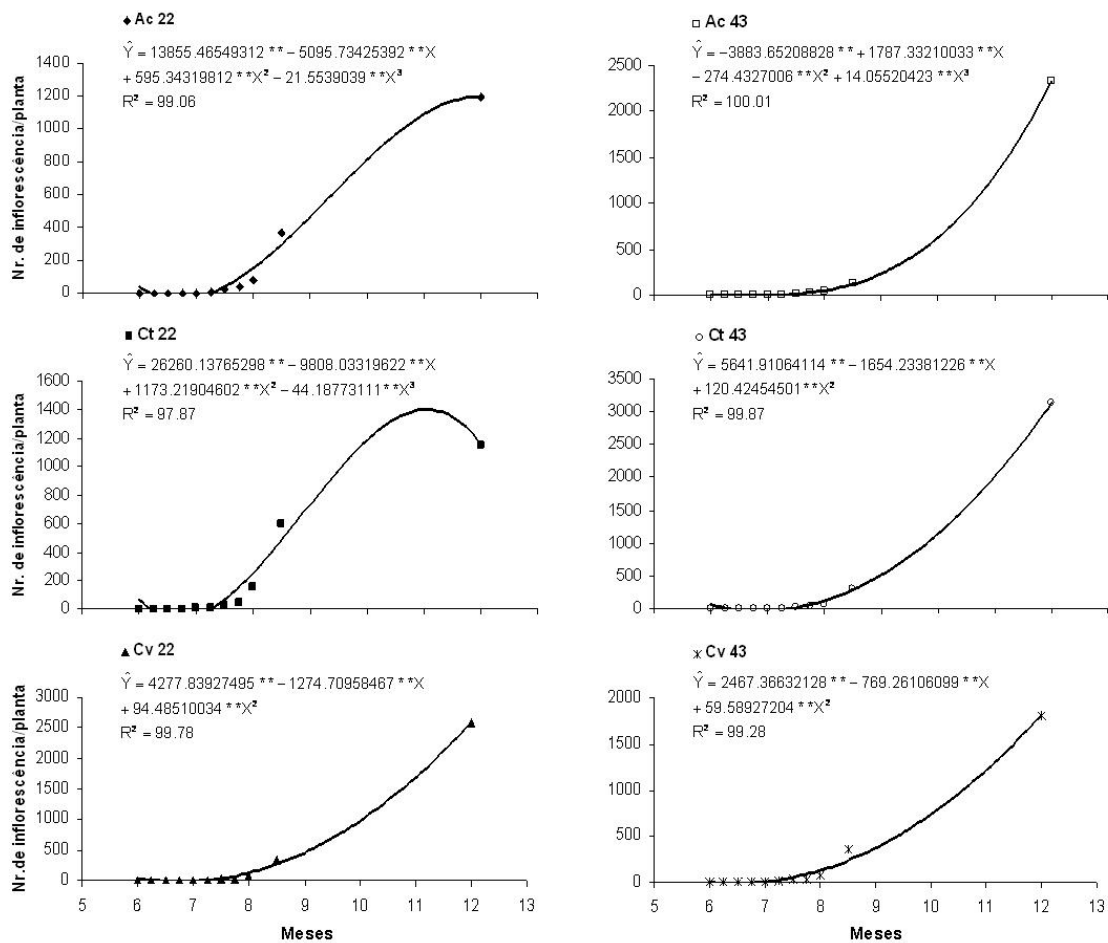


Figura 6. Número de inflorescência por plantas em *P. glomerata*, considerando o tempo da propagação pela enxertia *in vitro*. Legenda: Ac 22 = testemunha 2202-15; Ac 43 = testemunha 2209-09; Ct 22 = 2202-15 como hipo e epibioto; Ct 43 = 2209-09 como hipo e epibioto; Cv 22 = 2202-15 como hipo e 2209-09 como epibioto; Cv 43 = 2209-09 como hipo e 2202-15 como epibioto.

Os tratamentos que apresentaram parte aérea constituída pelo acesso 2202-15 foram os mais danificados, diferindo dos demais. Exceção à combinação 2202-15 (epibioto) e 2209-09 (hipobioto), que não diferiu de nenhum tratamento. Esta observação reforça novamente a influência direta da enxertia em todos os aspectos do crescimento e desenvolvimento da planta.

Cabe ressaltar que, no período reprodutivo, *P. glomerata* perde a maioria de suas folhas e mesmo nessa condição, o número de folhas atacadas manteve distribuição normal, seguindo o comportamento padrão.

Quadro 4. Número de folhas danificadas (NFD) por vaquinha (*Diabrotica speciosa*), produção de inflorescência e raízes de *P. glomerata*, por planta, oito e 12 meses após a propagação via enxertia *in vitro*

Epibioto	Hipobioto	NFD	Massa seca (g)			
			----- 8 meses -----		----- 12 meses -----	
			Inflor.	Raízes	Inflor.	Raízes
Testemunhas	2202-15	34,7 a	3,32 ab	74,90 cd	14,51 a	154,97 b
	2209-09	6,44 b	2,63 bc	129,23 a	23,49 a	212,94 a
2202-15	2202-15	45,55 a	4,17 a	68,55 d	12,39 a	98,15 c
	2209-09	26,43 ab	3,17 ab	84,28 cd	15,54 a	96,41 c
2209-09	2202-15	6,38 b	1,81 c	97,69 bc	21,97 a	133,62 b
	2209-09	6,93 b	1,80 c	122,58 ab	30,94 a	164,57 b

As médias seguidas de uma mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Após oito meses da enxertia, as plantas com a parte aérea constituída pelo acesso 2209-09 foram as que produziram menor quantidade de inflorescência (Quadro 4). Tal comportamento não ocorreu aos 12 meses, quando os tratamentos não apresentaram diferença estatística significativa para a produção de massa seca de inflorescência (Quadro 4).

Com oito meses de cultivo, a massa seca das raízes apresentou diferença significativa entre os tratamentos (Quadro 4). A testemunha e o controle do acesso 2209-09 foram os tratamentos com maior produção de raízes, enquanto que a testemunha e o controle do acesso 2202-15 obtiveram a menor produção. Valores intermediários foram obtidos com a enxertia combinada desses acessos. Quando o acesso 2209-09 foi utilizado como hipobioto houve diferença entre a testemunha e o controle deste, e não nos demais tratamentos (Quadro 4). Porém, o acesso 2202-15, na mesma condição, diferiu do controle desse acesso assim como do acesso 2209-09 (Quadro 4). Esses resultados demonstram a influência direta da enxertia na produção de massa seca da raiz.

Observou-se aumento significativo na produção de inflorescência e na massa seca das raízes entre oito e doze meses (Quadro 4). O acréscimo no peso das inflorescências ocorreu principalmente nos tratamentos constituídos pelo acesso 2209-09 na parte aérea.

Nesse período, o acréscimo de massa seca da raiz também foi superior nas testemunhas. O desenvolvimento da planta foi alterado em função da técnica utilizada na propagação, e não pelas combinações realizadas entre os acessos.

No momento da coleta das raízes (Fig. 7), as galhas evidenciaram a presença de nematóides: *Meloidogyne javanica* (fenótipos de Esterase J3 e J2), *Meloidogyne arenaria* (A2) e *Helicotylenchus* sp., somente nas raízes das plantas cujo acesso 2202-15 a constituía, enquanto que, as raízes do acesso 2209-09 não apresentaram nenhum sintoma de galha (Figs. 7A e 7C).

A presença de galhas foi característica em todos os tratamentos cujo sistema radicular foi constituído pelo acesso 2202-15, no entanto não foi possível inferir a produção de massa da raiz, do referido acesso, por não se obter material sem infestação nesse experimento. Não houve diferença estatística entre os tratamentos infectados pelos nematóides, contudo, o índice de galha com maior frequência observada foi entre 30 a 80% das raízes infectadas (Quadro 5).

Quadro 5. Índice de galhas causadas por *Meloidogyne* spp. nas plantas de *P. glomerata* infectadas (Ac 22 = testemunha acesso 2202-15; Ct 22 = hipo e epibioto constituído pelo acesso 2202-15; e, Cv 22 = hipobioto 2202-15 e epibioto 2209-09)

Tratamentos	% de indivíduos infectados									
	0-10	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60	61-70	71-80	81-90	
Ac 22	12,5	0,0	0,0	0,0	0,0	37,5	12,5	37,5	0,0	
Ct 22	0,0	0,0	0,0	12,5	12,5	37,5	12,5	12,5	12,5	
Cv 22	0,0	0,0	12,5	37,5	0,0	12,5	12,5	12,5	12,5	

Os sintomas morfológicos nas raízes infectadas foram similares entre os tratamentos. Foi observada grande variação no índice de galhas entre as repetições de um mesmo tratamento, entre as raízes de uma mesma planta, assim como, ao longo de uma única raiz.

Os diferentes percentuais de infecção foram observados em todos os tratamentos, sendo analisado pelo sintoma de galha, assim regiões das raízes com poucas galhas, parcialmente cobertas (Figs. 7D e 7 E) ou regiões completamente preenchida por galhas (Fig. 7F), foram utilizadas para determinação da média geral de contaminação nas plantas.

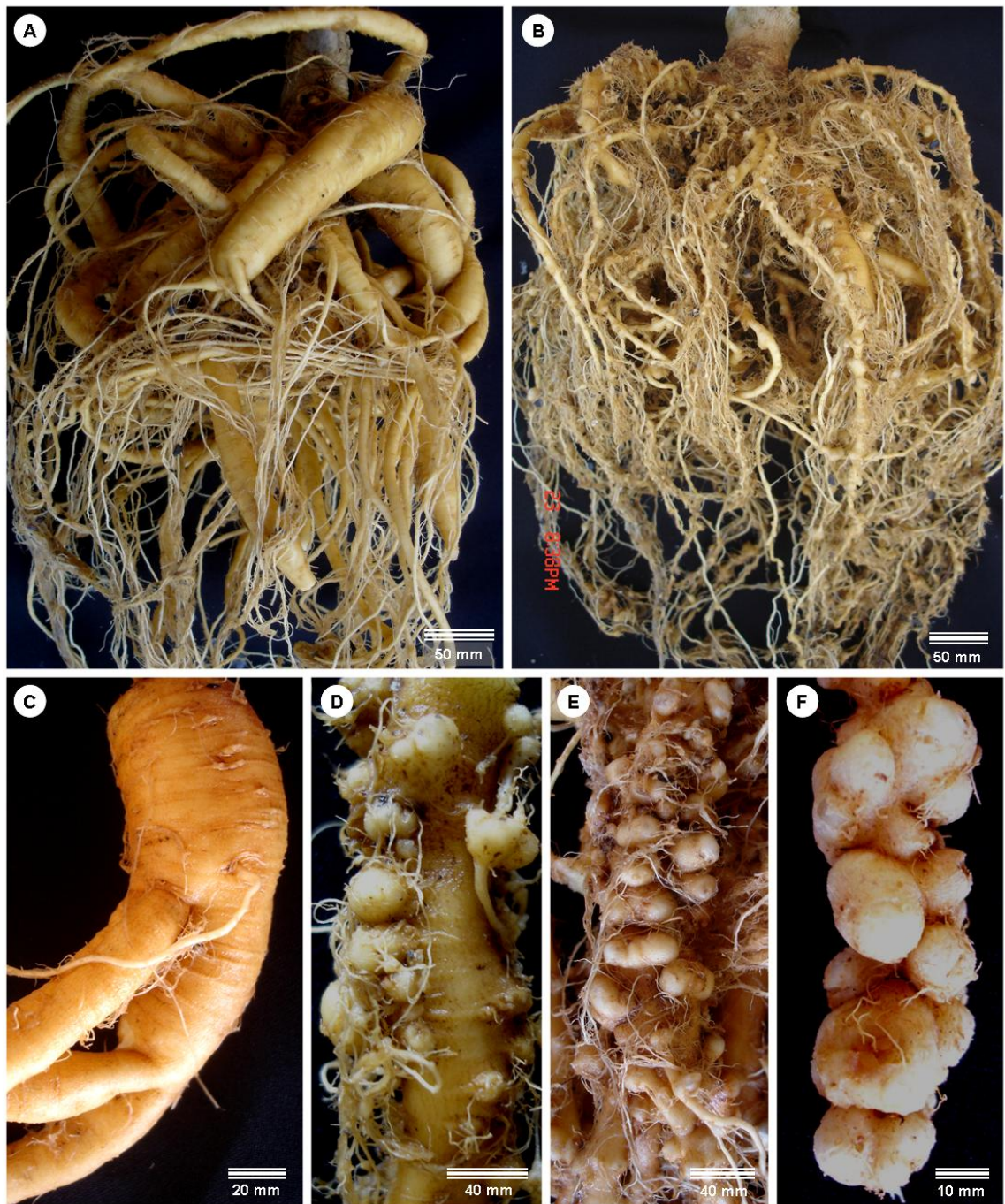


Figura 7. Raízes com 360 dias de cultivo. **A e B** – Aspecto geral do sistema radicular; **A.** Acesso 2209-09 sem a presença de nematóides; **B.** Acesso 2202-15 infectada com *Meloidogyne javanica*, *Meloidogyne arenaria* e *Helicotylenchus* sp.; **C–F** - Detalhe da raízes; **C.** raiz pertencente a classe 0; **D.** raiz pertencente a classe 4; **E.** raiz pertencente a classe 6; **F.** região da raiz apresentando 100% de infecção.

A parte aérea das plantas não ficou comprometida durante a realização dos experimentos e com a proximidade do término da fase reprodutiva, foi possível observar novas brotações. Sugere-se, portanto que o acesso 2202-15 é tolerante (Figs. 7B e 7D-F), enquanto que o acesso 2209-09 é resistente, uma vez que todos os tratamentos

estavam sob as mesmas condições e não foi detectada a presença de nenhuma espécie de nematóides nas raízes do acesso 2209-09 (Figs. 7A e 7C).

Esses resultados demonstram a influência direta da enxertia nas variáveis estudadas, assim como a interação fisiológica existente entre as partes enxertadas.

Discussão

Os resultados obtidos no cultivo *in vitro* e também na etapa de transferência *ex vitro* das plantas enxertadas confirmam a viabilidade na utilização da técnica para combinações de diferentes acessos de *P. glomerata*. Os indivíduos que apresentaram bom nível de pegamento não apresentaram dificuldades na fase de transferência, nem mesmo em condição de campo (Fig. 1). Dessa forma, o sucesso na fase inicial caracterizou o resultado final obtido em condições de campo para todos os tratamentos.

O sucesso da enxertia *in vitro* é a etapa inicial de grande relevância para o estabelecimento da planta. Para Nunes et al. (2005) sua viabilidade é garantida no momento da execução. Quando o encaixe é conduzido corretamente, as plantas se desenvolvem normalmente e não ocorrem dificuldades na transferência destes para a casa de vegetação (Zanol et al., 1997). No entanto, quando não realizada adequadamente, pode resultar em perdas consideráveis do material propagado (George, 1993), sendo a aclimatização uma etapa fundamental para contornar estresses fisiológicos impostos às plantas cultivadas *in vitro* e assegura o desenvolvimento da capacidade autotrófica, essencial para a sobrevivência das plantas *ex vitro* (Carvalho & Amâncio, 2002).

Na condição *ex vitro* a umidade relativa tende a ser menor do que *in vitro*, os níveis de luz são muito maiores, havendo variação na temperatura e o substrato é capaz de reter água, condições estas que tornam necessária a rápida conversão da condição mixotrófica para a completamente autotrófica, garantindo assim a nutrição e a sobrevivência (Donnelly & Tisdall, 1993).

As plantas de *P. glomerata* enxertadas *in vitro* com sucesso e transferidas para o campo apresentaram 100% de sobrevivência. Resultados semelhantes foram obtidos em *Lens culinaris* (Gulati et al., 2001), *Opuntia* spp. (Estrada-Luna et al., 2002), *Pistacia vera* (Onay et al., 2004), *Garcinia indica* (Chabukswar & Deodhar, 2006) e *Gossypium hirsutum* (Jin et al., 2006). Em citros, 95% das plantas transplantadas para o solo sobreviveram e apresentaram bom crescimento (Navarro et al., 1975). Em *Camellia sinensis*, a enxertia *in vitro* reduziu significativamente o tempo de transferência das plantas para o campo alcançando 88,33% de sobrevivência (Prakash et al., 1999); percentuais semelhantes foram obtidos em *Eucalyptus* (Bandeira et al., 2007).

Jin et al. (2006) verificaram que as raízes emitidas após a enxertia foram mais eficientes durante o processo de aclimatização e as plantas cresceram mais vigorosas do que aquelas cujo hipobioto utilizado foram hipocótilos com radícula, reflexo da

provável diminuição da atividade fisiológica durante o longo período mantidas *in vitro* no meio para germinação. A utilização de segmentos internodais em *P. glomerata* pode ter auxiliado na aclimatização, pois as raízes emitidas durante o cultivo das plantas enxertadas apresentaram viabilidade, favorecendo, assim, a transferência.

As plantas cultivadas *in vitro* podem apresentar certas características que são inconsistentes com o desenvolvimento em casa de vegetação ou em campo (Donnelly & Tisdall, 1993; Zobayed et al., 2001), pois se desenvolvem em recipiente de cultivo sob baixos níveis de luz, condições assépticas, meio de cultivo contendo nutrientes e açúcares que permitem o crescimento heterotrófico e uma atmosfera com alta umidade relativa (Hazarika, 2006), resultando em reduzido desenvolvimento do maquinário fotossintético.

Dentre os parâmetros cloroplastídicos avaliados em *P. glomerata*, diferenças foram constatadas apenas quanto ao ambiente de cultivo. Os menores valores dos pigmentos cloroplastídicos observados *in vitro* estão relacionados às condições peculiares dessa forma de cultivo, que podem prejudicar a síntese de pigmentos (Donnelly & Tisdall, 1993). A presença de açúcar no meio reduz a concentração de clorofila, podendo ser influenciada também pela fonte de carboidratos, concentração de reguladores de crescimento e material de suporte dos explantes (Xiao & Kozai, 2006).

Resultados semelhantes foram observados em *Hypericum perforatum* cultivadas *in vitro* quando comparadas com plantas em casa de vegetação e câmara controlada por computador (Zobayed & Saxena, 2004). E também em *Doritaenopsis*, durante a aclimatização, onde houve acréscimo na concentração dos pigmentos cloroplastídicos das plantas submetidas à baixa (175) e intermediária (270 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) irradiâncias (Jeon et al., 2005), sob alta umidade (90%) e temperatura (25-30°C), houve aumento no conteúdo de clorofilas e carotenóides, indicando aclimatação das plantas às novas condições (Jeon et al., 2006).

A luz pode interferir na formação da clorofila pela inibição direta (Van Assche & Clijsters, 1990), sendo uma resposta comum à degeneração de clorofila e carotenóides em plantas expostas a elevadas intensidades luminosas (Demming-Adams & Adams, 1992), pois as clorofilas são pigmentos instáveis (Streit et al., 2005). A redução na concentração de pigmentos cloroplastídicos verificados em condição de campo para *P. glomerata* pode ser atribuída ao estresse induzido pelo ambiente.

O aumento gradual na razão a/b de acordo com as etapas de aclimatização está diretamente relacionada com as atividades fotossintéticas (Figs. 2D e 3B-D), refletindo na organização dos sistemas antena de absorção de luz. Pois, a concentração de clorofila

representa um importante papel na absorção de luz durante a fotossíntese (Xiao & Kozai, 2006). O ambiente de luz em que a planta cresce é de fundamental importância, pois a adaptação das plantas a este ambiente depende do ajuste de seu sistema fotossintético, de modo que a luminosidade ambiental seja utilizada de maneira mais eficiente possível (Streit et al., 2005). E a razão fotossintética, geralmente, é inadequada nas plantas propagadas *in vitro*, ocorrendo em menor magnitude do que em plantas crescidas nas condições normais (Viña et al., 1999), o que explica os dados relativos aos pigmentos cloroplásticos obtidos em *P. glomerata* nas diferentes condições de cultivo.

As condições de cultivo influenciaram as trocas gasosas nas folhas de *P. glomerata*, sendo este comportamento característico às plantas cultivadas *in vitro*, como observado em videira (Carvalho et al., 2001) e morango (Zhou et al., 2005), que aumentaram gradativamente, mas de forma significativa, a taxa fotossintética líquida durante a aclimatização. Pois, em condições convencionais de cultivo *in vitro* os estômatos podem permanecer abertos, não respondendo normalmente ao fechamento no escuro ou sob baixa umidade relativa, comprometendo as atividades fotossintéticas na aclimatização quando a taxa de transpiração aumenta (Zobayed et al., 2001).

A estabilidade obtida nas trocas gasosas, na transferência da casa de vegetação para o campo, demonstra a plasticidade foliar apresentada pelas diferentes condições submetidas. As diferenças observadas nas taxas de fotossíntese e condutância estomática em *P. glomerata* podem estar associadas à distribuição das plantas na casa de vegetação ou mesmo na posição das folhas em relação às demais plantas, uma vez que não foi observado o mesmo comportamento entre os tratamentos controle e testemunha do mesmo acesso. Todos os tratamentos em todas as condições de cultivo apresentaram padrão de homogeneidade nas características morfológicas e demais fisiológicas observadas.

A exposição total da planta ao ambiente, possivelmente diminuindo os espaços intercelulares e incrementando a camada cuticular das folhas em *P. glomerata*, levou à diminuição na taxa de transpiração em campo, e aumentou a concentração interna de CO₂, assim como a razão Ci/Ca, pois, na transferência *ex vitro* a taxa de evapotranspiração é extrema devido ao reduzido controle dos estômatos e a grande perda de água cuticular (Donnelly & Tisdall, 1993).

O aumento da condutância estomática e da taxa de transpiração está associado à função dos estômatos em resposta à condição de luz submetida (Santamaria & Kersteins, 1994), após a aclimatização. O aumento na taxa de transpiração em *Doritaenopsis*, aclimatizadas sob diferentes intensidades luminosas em casa de

vegetação, foi associado às câmaras sub-estomáticas (Jeon et al., 2005).

Em casa de vegetação, as plantas de *P. glomerata* apresentaram os melhores resultados dos parâmetros cloroplastídicos analisados, pertinentes com as condições desse ambiente, que favorece suas atividades fisiológicas. A temperatura é um dos principais fatores ambientais que interferem nos processos fisiológicos das plantas (Zobayed et al., 2005).

Compreender a fisiologia da planta cultivada *in vitro* e suas alterações durante o processo de aclimatização pode facilitar o desenvolvimento e o sucesso no protocolo de transferência (Hazarika, 2006). A intensidade da luz no ambiente *ex vitro* tem significativa influência na fotossíntese (Zhou et al., 2005). A transferência, de forma gradativa, de *P. glomerata* para a condição *ex vitro* minimizou o estresse causado por este processo.

A fluorescência da clorofila possibilita examinar o desempenho fotossintético. Dessa forma, analisando alguns parâmetros como, razão Fv/Fm e o coeficiente de NPQ de *P. glomerata*, foram verificados que houve melhor desempenho em casa de vegetação quando comparadas às demais condições. As análises de Fv/Fm foram realizadas após o período de aclimatização em todas as condições e as transferências ocorreram gradualmente, assim os melhores resultados na relação Fv/Fm foram obtidos sob condições *ex vitro* mais homogêneas, determinando que as condições de estresse diminuíam essa relação nos acessos analisados da espécie. Em *Doritaenopsis* (Jeon et al., 2006), *Fragaria ananassa* (Zhou et al., 2005) e *Knipholia leucocephala* (McCartan et al., 2004), verificou-se que houve redução nos primeiros dias após a transferência para casa de vegetação, voltando a se estabilizar no final do período de aclimatização; podendo ser resultante do estresse nas plantas (He et al., 1998), como a luz e a temperatura. Essa redução sugere o reflexo do balanço entre o dano induzido pela luz e o reparo do fotodano (Aro et al., 1993). Redução nesse parâmetro também foi observada em folhas de espinafre com o aumento dos níveis de luz, sendo esta mais drástica com a elevação da temperatura (Ohira et al., 2005).

Os parâmetros fisiológicos indicam a eficiência fotossintética de *P. glomerata* nas diferentes condições de cultivo, não diferindo os tratamentos e contribuindo para seu desenvolvimento *ex vitro*. O desempenho observado na condição *in vitro* é característico para espécies nestas condições, pois o meio de cultura contém altas concentrações de sacarose e de sais minerais e restrita condição de luz, podendo restringir a eficiência fotossintética nas plantas propagadas *in vitro* (Hazarika, 2006).

Em *P. glomerata*, a adaptação ao ambiente *ex vitro* foi favorável ao crescimento

das plantas sem interferência no seu ciclo produtivo, que pôde ser comprovado pelos visitantes, predadores e/ou polinizadores observados. Dados semelhantes foram obtidos por Leite et al. (2005) quando avaliaram artrópodes associados às inflorescência de três acessos desta espécie e constataram a presença de diversos insetos, aranhas, abelha cachorro (*Trigona spinipes*), que pousava constantemente nas inflorescência, mas não as danificava, tendo destaque o pulgão (*Aphis gossypii*) e a vaquinha (*Diabrotica speciosa*) pelas maiores densidades.

Assim como os relatos de Leite et al. (2005), neste trabalho foram observados, principalmente nas inflorescências de *P. glomerata*, inimigos naturais como aranhas, sendo sua presença correlacionada com fitófagos, provavelmente atuando como um predador importante.

As plantas do acesso 2202-15 apresentaram maior susceptibilidade ao ataque de insetos, não sendo atrativas aos predadores destes. Talvez a maior concentração de β -ecdisona presente neste acesso (Kamada, 2006) possa estar diretamente associada a esta interação inseto-planta.

O crescimento das plantas enxertadas em campo foi mais intenso nos primeiros meses de cultivo. Após esse período, o crescimento tornou-se estável, não diferenciando os tratamentos. Resultados semelhantes foram obtidos por Ming & Corrêa Jr. (2004), os quais, analisando a evolução do desenvolvimento de plântulas de *P. glomerata*, verificaram vigoroso crescimento inicial (2 a 6 meses após o transplântio), demonstrando estabilidade nos estádios intermediário e no final do primeiro ano.

Assim como neste experimento, que a produção de massa seca da raiz variou, aumentando com o tempo de cultivo em campo, Montanari Jr. et al. (1999) observaram que esta característica foi influenciada não só pela idade da planta como pelo espaçamento utilizado no plantio. Montanari Jr. & Perecin (2006) estabeleceram uma correlação das características consideradas relevantes para prognosticar valores agricultáveis dos indivíduos e constataram que dados da parte aérea estão relacionados positivamente com a massa da raiz e com o índice de colheita.

Kamada (2006) analisando os mesmos acessos utilizados neste trabalho obteve para o acesso 2202-15 (ac 22) 141,33 g e para o acesso 2209-09 (Ac 43) 326,21 g de massa seca da raiz. A diferença observada para o acesso 2209-09 pode ser explicada por alterações fisiológicas influenciadas pela época de cultivo, uma vez que em ambos os experimentos as plantas estavam expostas à condição de campo e, conseqüentemente, houve alterações sazonais. Já a diferença encontrada em relação ao 2202-15 pode ter sido influenciada diretamente pela presença dos nematóides.

Plantas oriundas de populações de Cáceres/MT e Mogi das Cruzes/SP tiveram média da massa seca das raízes de 329,5 g (Montanari Jr. & Perecin, 2006). Essa variação observada na produção de raízes de *P. gomerata* pode ser influenciada por condições de solo, clima e até fatores genéticos (Mattos & Salis, 2005).

Características importantes, que aumentam o potencial produtivo dos materiais cultivados como o peso, número de raízes e índice de produtividade apresentam também maior amplitude de variação (Montanari Jr. & Perecin, 2006). A produção de raízes em *P. glomerata* parece ser favorável com a redução do período de florescimento (Kamada, 2006), não sendo esta característica observada no acesso 2209-09.

P. glomerata, quando cultivada na sua região de ocorrência natural ou em ambientes com solo com bom teor de umidade, não apresenta problemas com pragas e doenças (Corrêa Jr. et al., 2006a). No entanto, em outras condições, são susceptíveis à ferrugem (*Uromyces platensis* Speg.) e a nematóides (Corrêa Jr. et al., 2006a) do gênero *Meloidogyne* (Araújo et al., 1994), *M. incognita*, *M. javanica*, *Meloidogyne* sp. detectados em raízes (Mesquita et al., 2005; Alves et al., 2006). O nematóide *M. javanica* é uma praga que preocupa por comprometer diretamente as raízes de *P. glomerata* e por ser de difícil controle (Montanari Jr., 2005), sendo este um dos nematóides encontrados nas plantas cujo sistema radicular se constituía pelo acesso 2202-15.

A ocorrência de nematóides em *P. glomerata* já foi relatada por outros autores (Araújo et al., 1994; Mesquita et al., 2005; Alves et al., 2006; Gomes et al., 2006; Carneiro et al., 2007). Diferentes níveis quanto à resistência e suscetibilidade ao nematóide de galhas (*M. incognita* raça 1) foram observados em acessos de *P. glomerata*, que demonstraram acentuada variabilidade para a resistência (Gomes et al., 2006).

Carneiro et al. (2007) avaliando os danos causados por *M. javanica* em *P. glomerata* verificaram a ocorrência de galhas nas plantas parasitadas e as massas frescas médias de raiz estatisticamente inferiores às plantas testemunhas. Não houve influência na altura da planta, nem redução de porte e nenhum outro sintoma de meloidoginose na parte aérea foi observado. Entretanto, estes autores sugerem que os danos dos nematóides ao longo do tempo podem ser maiores do que os observados.

Dessa forma, a enxertia *in vitro* torna-se uma importante ferramenta para a seleção de acessos resistentes e susceptíveis aos nematóides. A combinação de acessos divergentes em teor do princípio ativo e produção de massa das raízes podem resultar na manutenção e, ou otimização do teor de princípio ativo, sem comprometer a produção.

Referências Bibliográficas

- ALVES, R.B.N.; MENDES, R.A.; MENDES, M.A.; CARNEIRO, R.M.D.G.; SILVA, D.B.; CARDOSO, L.D.; SALOMÃO, A.N.; VIEIRA, R.F. 2006. Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] germplasm conservation. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 8:1-4.
- ARAÚJO, W.P.; MATTOS, J.K.A.; SOUZA, R.M. 1994. Fontes de resistência a *Meloidogyne javanica* entre procedências de *Pfaffia glomerata*. **Fitopatologia Brasileira**, 19:322-323.
- ARO, E.M.; VIRGIN, I.; ANDERSSON, B. 1993. Photoinhibition of Photosystem II - Inactivation protein damage and turnover. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1143:113-134.
- BANDEIRA, F.S.; XAVIER, A.; OTONI, W.C.; DIAS, J.M.M. 2006. Enxertia *in vitro* na propagação de clones de *Eucalyptus urophylla* e *E.grandis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 41:223-232.
- BANDEIRA, F.S.; XAVIER, A.; OTONI, W.C.; LANI, E.R.G. 2007. Aclimatização *ex vitro* de plantas propagadas pela enxertia *in vitro* de clones de *Eucalyptus urophylla* X *E. grandis*. **Revista Árvore**, 31:773-781.
- BARKER, K.R.; TOWNSHEND, J.L.; BIRD, G.W.; THOMASON, I.J. DICKSON, D.W. 1986. Determining nematode population responses to control agents. In: HICKEY, K.D., ed. **Methods for evaluating pesticides for control of plants pathogens**. St. Paul Mn; APS Press. p. 283-296.
- CARVALHO, L.C.; OSÓRIO M.L.; CHAVES, M.M.; AMÂNCIO, S. 2001. Chlorophyll fluorescence as an indicator of photosynthetic functioning of *in vitro* grapevine and chestnut plantlets under *ex vitro* acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 67: 271-280.
- CARVALHO, L.; AMÂNCIO, S. 2002. Effect of *ex vitro* conditions on growth and acquisition of autotrophic behavior during the acclimatization of chestnut regenerated *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, 95:151-164.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; MESQUITA, L.F.G.; CIROTTO, P.A.S.; PEREIRA, S.I.V.; PEREIRA, P.S.; SILVA, D.B.; VIEIRA, R.F. 2007. Detecção de *Meloidogyne* spp. em *Pfaffia* spp. no Distrito Federal e patogenicidade de *M. javanica* a *Pfaffia glomerata* e *P. paniculata*. **Nematologia Brasileira**, 30:159-163.
- CHABUKSWAR, M.M.; DEODHAR, M.A. 2006. Restoration of rooting competence in a mature plant of *Garcinia indica* through serial shoot tip grafting *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, 108:194-199.
- CORRÊA JR., C. 2003. **Estudo agrônomico da fáfia (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen): sazonalidade na produção de raízes e conteúdos de beta-ecdisona em diferentes indivíduos de São Paulo, Paraná e Mato Grosso do Sul**. Doutorado (Horticultura), Botucatu: UNESP/FCA. 94 p.
- CORRÊA JR., C.; MING, L.C. 2004. Fáfia (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen): o ginseng brasileiro. In: ALEXIADES, M.N.; SHANLEY, P. (Org.). **Productos florestales, medios de subsistencia y conservacion: estudios de caso sobre sistemas de manejo de productos florestales no maderables**. Jacarta: CIFOR. 3:349-363.
- CORRÊA JR., C.; CORTEZ, D.A.G.; MING, L. C.; SOARES, W. 2006a. **Fáfia – O ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Sprengel) Pedersen): Aspectos Agronômicos e Fitoquímicos**. Curitiba: Clichetec, 22p.
- CORREA JR., C.; MING, L.C. 2006b. Fáfia, ginseng brasileiro. In: LÓPEZ, C.; SHANLEY, P.; CRONKLETON. (Org.). **Riquezas del bosque: frutas, remedios y artesanías en América Latina**. Santa Cruz: Centro para la investigación forestal internacional, p.82-86. Disponível em: www.cifor.cgiar.org/publications, Acesso em: 20/07/2007.
- CRUZ, C.D. 2006. **Programa GENES. Versão Windows**. Editora UFV, Minas Gerais. 642p. (Versão 2006.4.1).

- DEMMIG-ADAMS B.; ADAMS W.W. 1992. Carotenoids composition in sun and shade leaves of plants with different life forms. **Plant Cell and Environment**, 15:411-419.
- DONNELLY, D.J.; TISDALL, L. 1993. Acclimatization strategies for micropropagated plants. In: AHUJA, M. R. (Ed.). **Micropropagation of wood plants**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p.153-166.
- ESTRADA-LUNA, A.A.; LÓPEZ-PERALTA, C.; SORIANO-CÁRDENAS, E. 2002. *In vitro* micrografting and the histology of graft union formation of selected species of prickly pear cactus (*Opuntia* spp.). **Scientia Horticulturae**, 92:317-327.
- FLORES, R. 2006. **Cultura de tecidos e produção de β -ecdisona em *Pfaffia glomerata* e *Pfaffia tuberosa* (Amaranthaceae)**. Doutorado (Agronomia), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 168p.
- GALZY, R.; COMPAN, D. 1992. Remarks on mixotrophic and autotrophic carbon nutrition of *Vitis* plantlets cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 31:239-244.
- GEORGE, E.F. 1993. **Plant propagation by tissue culture: The technology**. 2. ed. England: Exegetics, v.1. 575p.
- GOMES, A.C.M.M.; MATTOS, J.C.; CIROTO, P.A.S.; CARNEIRO, R.M.D.G. 2006. Resistência de acessos de *Pfaffia glomerata* a *Meloidogyne incognita* Raça 1. **Nematologia Brasileira**, 30:189-194.
- GULATI, A.; SCHRYER, P.; McHLGHEN, A. 2001. Regeneration and micrografting of lentil shoots. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, 37:798-802.
- HARTMANN, N.T.; KESTER, D.E.; DAVIES, F.T.; GENEVE, R.L. 1997. **Plant propagation: principles and practices**. Englewood Cliffs: Regents/Prentice-Hall, Upper Saddle River, 757p.
- HAZARIKA, B.N. 2006. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, 108:105-120.
- HE J.; KHOO, G.H.; HEW, C.S. 1998. Susceptibility of CAM *Dendrobium* leaves and flowers to high light and high temperature under natural tropical conditions. **Environmental and Experimental of Botany**, 40:255-264.
- HUGHES, K.W. 1981. *In vitro* ecology: exogenous factors affecting growth and morphogenesis in plant culture systems. **Environmental and Experimental Botany**, 21:281-288.
- ITO, H.; OHTSUKA, T.; TANAKA, A. 1996. Conversion of chlorophyll *b* to chlorophyll *a* via 7-hydroxymethyl chlorophyll. **Journal of Biological Chemistry**. 271:1475-1479.
- JEON, M.; ALI, M.B.; HAHN, E.; PAEK, K. 2005. Effects of photon flux density on the morphology, photosynthesis and growth of a CAM orchid, *Doritaenopsis* during post-micropropagation acclimatization. **Plant Growth Regulation**, 45:139-147.
- JEON, M.; ALI, M.B.; HAHN, E.; PAEK, K. 2006. Photosynthetic pigments, morphology and leaf gas exchange during *ex vitro* acclimatization of micropropagation CAM *Doritaenopsis* plantlets under relative humidity and air temperature. **Environmental and Experimental Botany**, 55:183-194.
- JIN, S.; LIANG, S.; ZHANG, X.; NIE, Y.; GUO, X. 2006. An efficient grafting system for transgenic plant recovery in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 85:181-185.
- JONARD, R. 1986. Micrografting and its applications to tree improvement. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.), **Biotechnology in agriculture and forestry**. Springer-Verlag, Berlin, p. 31-48.
- KAMADA, T. 2006. **Avaliação da diversidade genética de populações de fáfia (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) por RAPD, caracteres morfológicos e teor de β -ecdisona**. Doutorado (Genética e Melhoramento), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 106p.
- LEE, N.; WETZSTEIN, Y.; SOMMER, H.E. 1985. Effects of quantum flux density on photosynthesis and chloroplast ultrastructure in tissue-cultured plantlets and seedlings of

- Liquidambar styraciflua* L. towards improved acclimatization and field survival. **Plant Physiology**, 78:637-641.
- LEITE, G.L.D.; PIMENTA, M.; FERNANDES, P.L.; MARTINS, E.R.; TATIANNE GIZELLE MARQUES SILVA, T.G.M. 2005. Artrópodes associados às flores de *Pfaffia glomerata* em montes claros. **Agropecuária Técnica**, 26:138-141.
- MATTOS, P.P.; SALIS, S.M. 2005. Resultados preliminares do plantio de Ginseng-do-Pantanal (*Pfaffia glomerata*) no Pantanal. **Embrapa: Comunicado Técnico 49**. 4p.
- McCARTAN, S.A.; BECKETT, R.P.; IVANOVA, V.; STADEN, J.V. 2004. *In vitro* hardening: the role of ventilation on acclimation stress in *Kniphofia leucocephala*. **Plant Growth Regulation**, 43:49-55.
- MESQUITA, L.F.G.; ALMEIDA, M.R.A.; SILVA, D.B.; CIROTO, P.A.S.; CARNEIRO, R.M.D.G. 2005. Patogenicidade de *M. javanica* em *Pfaffia glomerata* e *P. paniculata*. **Nematologia Brasileira**, 29:118.
- MING, L.C.; CORRÊA JR., C. 2004. Evaluation of the development of fafia - *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Acta Horticulturae**, 629:273-275.
- MONTANARI JR., I.; MAGALHAES, P.M.; QUEIROGA, C.L. 1999. Influence of plantation density and cultivation cycle on root productivity and tenors of β -ecdysone in *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Acta Horticulturae**, 502:125-128.
- MONTANARI JR., I. 2005. **Avaliação de genótipos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen visando seu cultivo comercial**. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical/Melhoramento Genético Vegetal). Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, 63 p.
- MONTANARI JR., I.; PERECIN, M.B. 2006. Evaluation of morphological and agricultural characteristics and their phenotypic correlations in genotypes of a *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen population. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 8:46-48.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15:473-497.
- NAVARRO, L.; ROISTACHER, C.N.; MURASHIGE, T. 1975. Improvement of shoot tip grafting *in vitro* for virus-free citrus. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 100:471-479.
- NAVARRO, L. 1988. Application of shoot-tip grafting *in vitro* to wood species. **Acta Horticulturae**, 227:43-55.
- NUNES, J.C.O.; ABREU, M.F.; DANTAS, A.C.M.; PEREIRA, A.J.; PEDROTTI, E.L. 2005. Caracterização morfológica de microenxertia em macieira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 27:80-83.
- OHIRA, S.; MORITA, N.; SUH, H.J.; JUNG, J.; YAMAMOTO, Y. 2005. Quality control of photosystem II under light stress – Turnover of the aggregates of the D1 protein *in vivo*. **Photosynthesis Research**, 84:29-33.
- ONAY, A.; PIRINÇ, V.; YILDIRIM, H.; BASARAN, D. 2004. *In vitro* micrografting of mature pistachio (*Pistacia vera* var. Siirt). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 77:215-219.
- PAIVA, L.V.; CARVALHO, S.A. 1993. Alternativa para promoção do crescimento *in vitro* de microenxertos de citros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 28:1095-1099.
- PRAKASH, O.; SOOD, A.; SHARMA, M.; AHUJA, P.S. 1999. Grafting micropropagated tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntza] shoots on tea seedlings – a new approach to tea propagation. **Plant Cell Reports**, 18:883-888.
- REIS, M.S.; MARIOT, A. 2002. Diversidade natural e aspectos agronômicos de plantas medicinais. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. P. 41-62. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/UFSC.

- SANTAMARIA J.M.; KERSTIENS G. 1994. The lack of control of water loss in micropropagated plants is not related to poor cuticle development. **Physiologia Plantarum**, 91:465-472.
- SCHÄFER, G.; BASTIANEL, M.; DORNELLES, A.L.C. 2001. Porta-enxertos utilizados na citricultura. **Ciência Rural**, Santa Maria, 31:723-733.
- STREIT, N.M.; CANTERLE, L.P.; CANTO, M.W.; HECKTHEUER, L.H.H. 2005. As clorofilas. **Ciência Rural**, 35:748-755.
- VAN ASSCHE, F.; CLIJSTERS, H. 1990. Effect of metals on enzyme activity in plants. **Plant Cell and Environment**, 13: 95–206.
- VIÑA, G.; PLIEGO-ALFARO, F.; DRISCOLL, S.P.; MITCHELL, V.J.; PARRY, M.A.; LAWLOR, W. 1999. Effects of CO₂ and sugars on photosynthesis and composition of avocado leaves grown *in vitro*. **Plant Physiology and Biochemistry**, 37:587-595.
- VIÑA, G.; BARCELÓ-MUNOZ, A.; PLIEGO-ALFARO, F. 2001. Effects of culture media and irradiance level on growth and morphology of *Persea americana* Mill. microcuttings. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 65:229-237.
- XIAO, Y.; KOZAI, T. 2006. In vitro multiplication of statice plantlets using sugar-free media. **Scientia Horticulturae**, 109:71–77.
- WELLBURN, A.R. 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, 144:307–313.
- ZACCARO, R.P.; DONADIO, L.C.; LEMOS, E.G.M. 2006. Microenxertia em cultivares de manga. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 28:533-535.
- ZANOL, G.C.; FORTES, G.R.L.; SILVA, J.B.; CAMPOS, A.D.; CENTELLAS, A.Q.; MÜLLER, N.T.; GOTTINARI, R.A. 1997. Escuro e ácido indolbutírico no enraizamento *in vitro* e atividade da peroxidase de porta-enxertos de macieira, Cv. Marubakaido (*Malus prunifolia*). **Revista Brasileira de Agrociência**, 3:23-30.
- ZHOU, Y.; GUO, D.; ZHU, Z.; QIAN, Q. 2005. Effects of *in vitro* rooting environments and irradiance on growth and photosynthesis of strawberry plantlets during acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 81:105-108.
- ZOBAYED, S.M.A.; ARMSTRONG, J.; ARMSTRONG, W. 2001. Leaf anatomy of in vitro tobacco and cauliflower plantlets as affected by different types of ventilation. **Plant Science**, 161:537-548.
- ZOBAYED, S.M.A.; SAXENA, P.K. 2004. Production of St. John's wort plants under controlled environment for maximizing biomass and secondary metabolites. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, 40:108-114.
- ZOBAYED, S.M.A.; AFREEN, F.; KOZAI, T. 2005. Temperature stress can alter the photosynthetic efficiency and secondary metabolite concentrations in St. John's wort. **Plant Physiology and Biochemistry**, 43:977-984.

Capítulo 4

Caracterização histológica da enxertia *in vitro* de fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]

Introdução

Espécies do gênero *Pfaffia* (Amaranthaceae) são utilizadas por apresentarem propriedades medicinais marcantes (Martins & Nicoloso, 2004). O interesse pela *Pfaffia glomerata* (Ginseng brasileiro) teve origem no uso popular de suas raízes (Gomes et al., 2006), e a validação científica das propriedades terapêuticas de *Pfaffia* intensificou o extrativismo colocando-a em risco (Corrêa Jr., 2003; Figueiredo et al., 2004).

P. glomerata apresenta variabilidade genética tanto para produção de raízes quanto para concentração de princípio ativo (Montanari Jr. et al., 1999; Figueiredo et al., 2004; Kamada, 2006). Populações que apresentam variação genética são difíceis de cultivar (Montanari Jr., 2005; Montanari Jr. & Perecin, 2006), sendo o cultivo *in vitro* uma alternativa, que pode ser associada à enxertia para explorar a diversidade genética existente entre as populações da espécie. A utilização da enxertia recíproca de genótipos divergentes na produção tanto de biomassa quanto de princípio ativo de *P. glomerata* pode ser uma ferramenta eficiente para subsidiar o estudo da produção dos metabólitos secundários em outras plantas medicinais.

As técnicas da cultura de tecidos são ferramentas interessantes no estudo dos fenômenos de compatibilidade e incompatibilidade provendo uma boa correlação entre os sistemas que ocorrem *in vivo* e *in vitro*, podendo reduzir drasticamente o tempo e os esforços necessários para determinar estas respostas (Errea et al., 2001). Estudos histológicos em macieira confirmaram a formação comparável da união *in vitro* à enxertia convencional, assim como maior rapidez no processo (Richardson et al., 1996).

Dessa forma, citam-se diversas aplicações da enxertia *in vitro*: obtenção de plantas isenta de vírus e outros patógenos (Murashige et al., 1972; Navarro et al., 1975; Katoh et al., 2004; Suarez et al., 2005) em associação com a termoterapia (Carvalho et al., 2002; Sharma et al., 2008); utilização em processos de indexação (Pathirana & McKenzie, 2005); propagação de espécies frutíferas, florestais, ornamentais e medicinais (Monteuuis, 1994; 1995; Troncoso et al., 1999; Mnene & Mantell, 2001;

Abreu et al., 2003; Bandeira et al., 2006; Sanjaya et al., 2006; Wu et al., 2007); rejuvenescimento (Pliegro-Alfaro & Murashige, 1987; Thimmappaiah et al., 2002; Chabukswar e Deodhar, 2006); recuperação de plantas geneticamente modificadas (Peña et al., 1995; Jin et al., 2006); estabelecimento de plantas regeneradas (Raharjo & Litz, 2005; Khalafalla & Daffalla, 2008); incremento na produtividade por meio de combinações entre genótipos adaptados a condições edáficas, tolerantes ou resistentes (Prakash et al., 1999; Can et al., 2006; Rhoupael et al., 2008); e detecção precoce de incompatibilidade entre epibioto e hipobioto, com abordagens fisiológicas, histológicas e genéticas (Jonard, 1986; Errea et al., 1994; 2001; Richardson et al., 1996; Estrada-Luna et al., 2002; Pina & Errea, 2005; 2008a; 2008b).

Estudos anatômicos no processo de formação de união dos enxertos têm sido utilizados em várias espécies lenhosas de angiospermas e gimnospermas, como pré-requisito para determinar o sucesso na união (Barnett & Weatherhead, 1988; Errea et al., 1994, 2001). Alterações morfológicas e fisiológicas, resultante de desordens funcionais das novas células cambiais formadas na região do enxerto, ausência de diferenciação dos novos tecidos para perfeita lignificação e ausência de continuidade vascular, possibilitam a quebra na região de conexão que podem demorar alguns anos para se manifestar (Errea et al., 1998).

Em damasco (*Prunus armeniaca*), estudos prévios no estabelecimento precoce do enxerto indicaram que em curto espaço de tempo não foram encontradas diferenças no processo de cicatrização dos enxertos, diferenças existem no nível de diferenciação do calo em ambas as combinações compatíveis e incompatíveis (Errea et al., 1994). A detecção precoce de anormalidades celulares associadas com os tecidos do enxerto quando a união é formada, sugerem a fusão do calo *in vitro* como um valioso método para estudos de enxertias incompatíveis em combinações de hipo e epibioto de *Prunus* (Errea et al., 2001). O comportamento deste calo determina as futuras respostas da união do enxerto, como a ausência de diferenciação destas células em algumas áreas da região de união que podem afetar a atividade de formação de novas células de xilema e floema, causando descontinuidade na formação do câmbio por uma linha parenquimatosa interrompendo a conexão vascular (Errea et al., 1994; Hartmann et al., 1997).

Nas plantas enxertadas, a regeneração vascular pode restabelecer a continuidade dos sistemas de transporte por meio de processos complexos de desenvolvimento envolvendo diferenciação fisiológica e estrutural de parênquima dos elementos de xilema e floema (Jeffree & Yeoman, 1983), podendo ser analisada precocemente por meio de estudos anatômicos. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo caracterizar

histologicamente a região de união da enxertia *in vitro*, nas diferentes combinações de hipo e epibioto de *P. glomerata*, detectando possíveis sintomas de incompatibilidade durante e diferenciação do tecido vascular e sua reconexão nas plantas enxertadas *in vitro*.

Material e Métodos

Os acessos de *P. glomerata* identificados sob nº 2202-15 e 2209-09 da coleção de germoplasma de plantas medicinais do Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia (Embrapa/Cenargen), foram utilizados para propagação via enxertia *in vitro*, realizando as combinações: 2202-15 como hipobioto e 2209-09 como epibioto (cv 22); 2209-09 como hipobioto e 2202-15 como epibioto (cv 43); 2202-15 como hipobioto e epibioto (ct 22); e, 2209-09 como hipobioto e epibioto (ct 43).

As plantas enxertadas foram obtidas utilizando indivíduos propagados *in vitro* via segmento nodal. Os ápices caulinares de aproximadamente 1 cm de comprimento constituíram o epibioto, e segmentos internodais alongados da porção basal da planta com aproximadamente 1,5 cm de comprimento foram utilizados como hipobioto.

Foram realizados cortes em fenda simples na região distal do hipobioto e em duplo bisel na porção basal do epibioto, para realização da enxertia *in vitro* por garfagem, conforme metodologia proposta por Bandeira (2006).

As plantas enxertadas foram transferidas para tubos de ensaio em meio de cultura contendo os sais e vitaminas MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 8 g L⁻¹ de ágar (Merck), mantidos em sala de crescimento, à temperatura de 25 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 16 horas com irradiância de 50 µmol m⁻² s⁻¹.

Após 30 dias, as plantas foram transferidas para condição *ex vitro*, em recipientes (copo plástico) contendo substrato (Plantmax[®]), tutoradas, e envolvidas com sacos plásticos, que foram sendo removidos gradualmente. Após a aclimatização em laboratório, por 30 dias, as plantas enxertadas foram transferidas para vasos (5 L) contendo mistura de solo, areia e substrato (Plantmax[®]) (2:2:1) e mantidas em casa de vegetação. A região do enxerto foi monitorada para permanecer acima do nível do substrato.

Análise Histológica

Para análise dos processos de cicatrização e reconstituição vascular das plantas enxertadas, amostras da região de união entre epi e hipobioto das plantas de todas as combinações foram coletadas aos 7, 14, 21, 28, 35, 70 e 100 dias (Fig. 1) após a realização da enxertia para análise histológica.

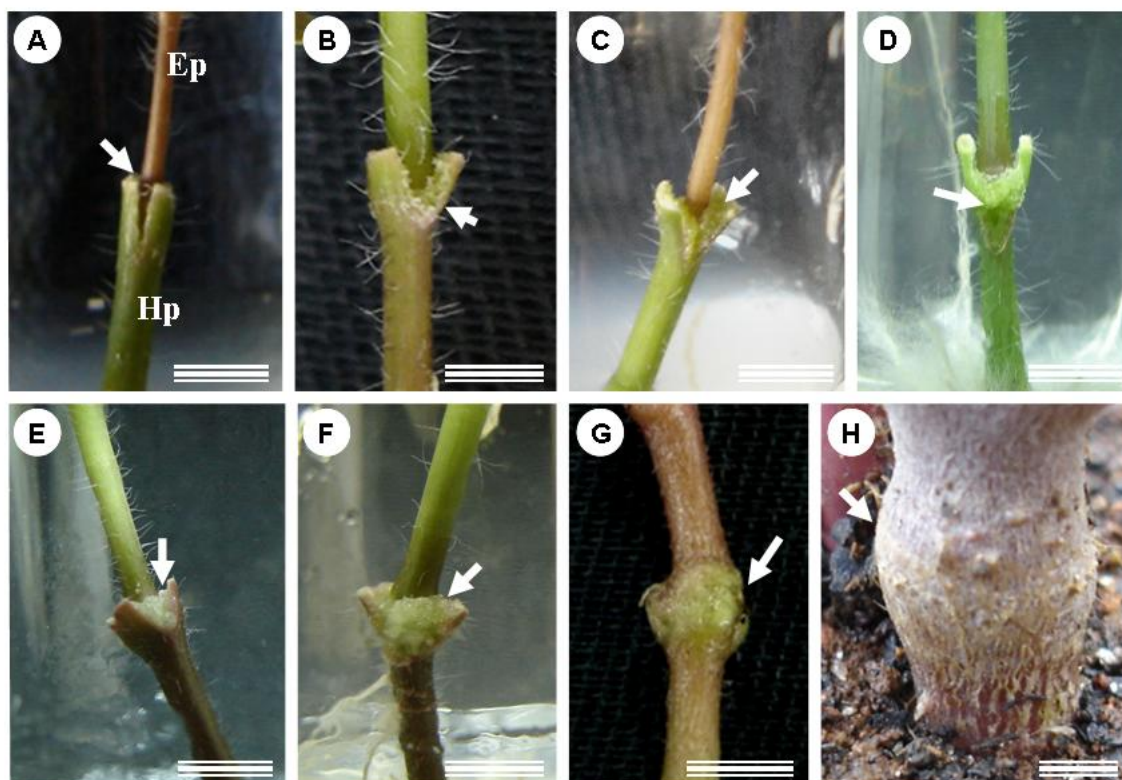


Figura 1. Eventos morfológicos que caracterizaram a região de conexão das plantas de *P. glomerata* propagadas pela técnica da enxertia *in vitro*. **A.** momento da enxertia; **B.** 7 dias; **C.** 14 dias; **D.** 21 dias; **E.** 28 dias; **F.** 35 dias; **G.** 70 dias; e, **H.** 100 dias após a realização da enxertia. As setas indicam a região de conexão; B-F. presença de massa celular evidenciando a formação do calo; G. início da cicatrização do sistema dérmico; H. completa cicatrização na região de conexão. Barra = 4 mm (A-G) e 1 mm (H). Ep = epibiot; Hp = hipobiot.

Foram retiradas, aleatoriamente, três amostras por coleta, fixadas em FAA₅₀ (Johansen, 1940) por 24 horas, sob vácuo, e estocadas em etanol 70%. Posteriormente, foram desidratadas em série etílica e incluídas em metacrilato (Historesin, Leica, Alemanha). Secções longitudinais foram obtidas em micrótomo rotativo de avanço automático (RM2155, Leica Microsystems, Alemanha), com utilização de navalhas de aço descartáveis. Os cortes (8 µm de espessura) foram corados com Azul de Toluidina pH 4,0 (O'Brien & McCully, 1981), e as lâminas montadas em resina sintética (Permout).

Para caracterização histoquímica, os cortes longitudinais foram realizados em micrótomo de mesa (LPC, Rolemberg e Bhering, Comércio e Importação Ltda, Belo Horizonte, Brasil) e submetidos ao Floroglucinol (Johansen, 1940) para evidenciar a presença de lignina nas células da região do enxerto.

Todas as lâminas foram examinadas e fotografadas em fotomicroscópio (AX70TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) equipado com o sistema U-Photo.

Delineamento Experimental

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com 3 repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por 10 plantas enxertadas. Foram retiradas aleatoriamente de cada repetição uma amostra por coleta. O experimento foi repetido por duas vezes.

Resultados

Não se observaram diferenças morfológicas e anatômicas, entre os tratamentos, nas preparações histológicas da região do enxerto. Considerando estes aspectos, as combinações realizadas entre os acessos de *P. glomerata* uniram-se entre si num padrão semelhante, sendo amostrado de maneira aleatória o desenvolvimento da conexão vascular nos períodos estabelecidos (Figs. 2 e 3).

O cultivo *in vitro* foi favorável ao desenvolvimento das plantas enxertadas não sendo observada desidratação das mesmas, nem dos tecidos na região de união do enxerto nem mesmo no dia zero (Fig. 1A).

Aos 7 dias (Fig. 1B), após a realização da enxertia *in vitro*, a análise histológica evidenciou uma camada de células necrosadas delimitando a região de contato entre epi e hipobioto (Fig. 2A), ficando fortemente coradas.

A adesão inicial das partes enxertadas foi seguida por intensas divisões celulares que ocorreram nas camadas celulares imediatamente adjacentes à superfície lesionada do hipo (Fig. 2B) e epibioto (Fig. 2C), resultando na formação do calo. Na primeira semana após a realização da enxertia, a proliferação celular na superfície de contato foi observada em todas as combinações realizadas entre os acessos de *P. glomerata*, caracterizando a adesão dos componentes da enxertia. O desenvolvimento do calo cicatricial preencheu os espaços existentes na região de conexão.

O estabelecimento da união física do material iniciou com a expansão das células parenquimáticas, deposição de parede e subsequente divisão no sentido anti e periclinal (Figs. 2B e 2C). A massa celular na superfície de contato apresentou arranjo homogêneo e organizado.

Com 14 dias de cultivo, constatou-se intensa atividade celular na região de conexão (Figs. 2D e 2E). Os planos de divisão no epibioto foram observados tanto no sentido anticlinal quanto periclinal (Fig. 2E), enquanto que no hipobioto o plano de divisão predominante foi periclinal (Fig. 2D). A presença das células alongadas em plena divisão na região de contato demonstra a ausência de necrose nesta região.

Nesse período também foi possível observar o início da diferenciação celular, representada pela formação de tecidos vasculares, tanto xilema quanto floema, na região do calo (Figs. 2D e 2E), caracterizando assim o início da reconexão vascular na planta enxertada. A diferenciação ocorre a partir das células do calo que estão em contato direto com o sistema vascular intacto no hipo e epibioto.

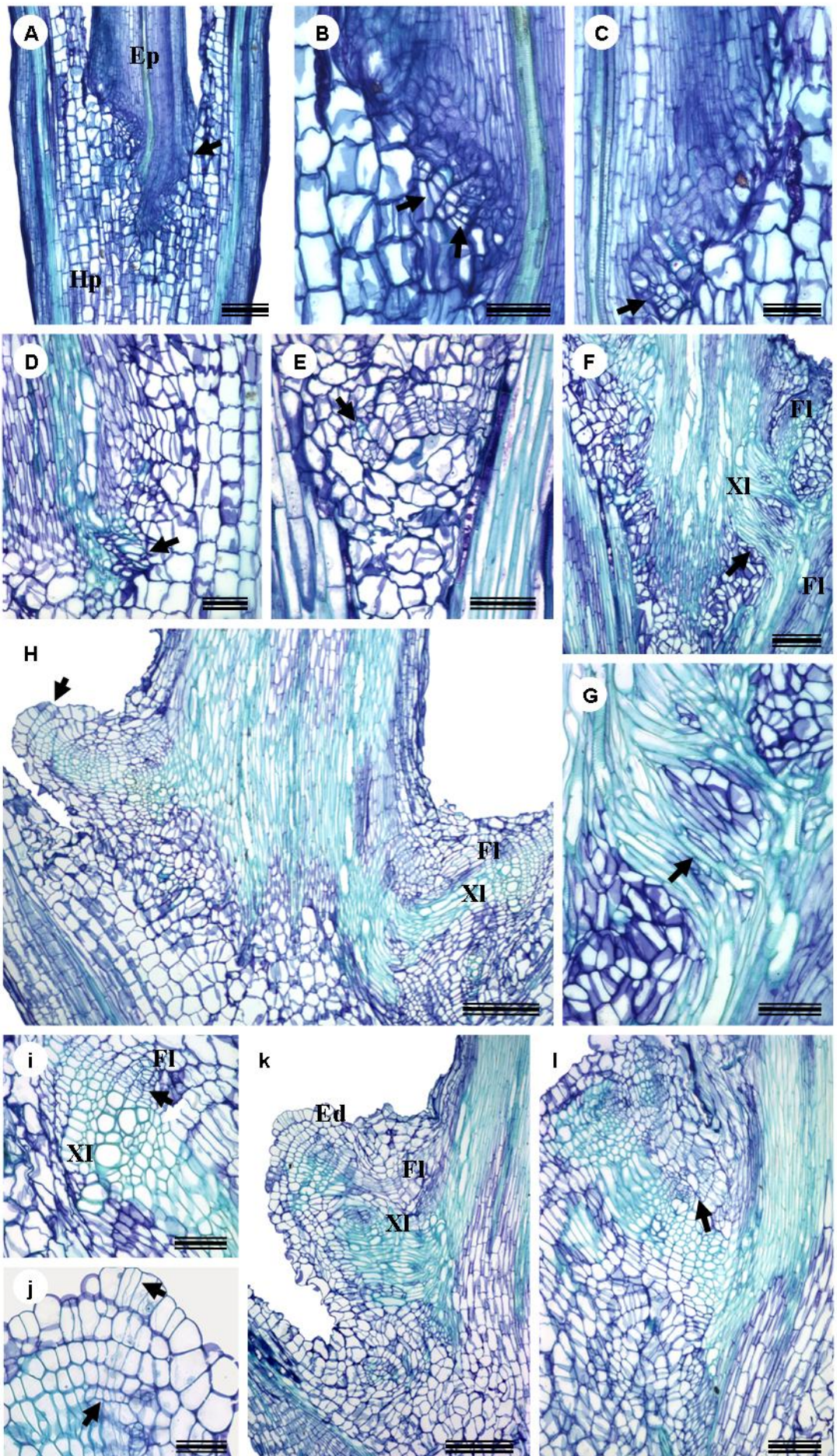


Figura 2. Cortes histológicas em secções longitudinais da região de conexão das plantas de *P. glomerata* enxertadas *in vitro*. **A-C.** 7 dias; **D e E.** 14 dias; **F e G.** 21 dias; **H e I.** 28 dias; **J-L.** 35 dias após a realização da enxertia. **A.** Aspecto geral da região de conexão com formação da camada de células necrosadas (seta); **B.** proliferação do calo evidenciando o plano de divisão celular (periclinal e anticlinal - setas) no hipobioto; **C.** região de intensa atividade celular no epibioto (seta); **D e E.** início de diferenciação celular (setas) e plano de divisão celular (periclinal e anticlinal) no epibioto; **F.** reconexão vascular no enxerto; **G.** diferenciação dos elementos de vaso (seta) na região do calo; **H.** início da regeneração epidérmica (seta); **I.** detalhe do sistema vascular formado na região do calo, com presença de procâmbio (seta); **J.** detalhe da região epidérmica e sub-epidérmica com divisões anticlinais e periclinais (setas) e núcleos evidentes; **K.** estágio avançado de reconstituição da epiderme; **L.** intensa divisão celular na região do calo (seta). Ed = epiderme; Ep = epibioto; Fl = floema; Hp = hipobioto; Xl = xilema. [Barra = 400 µm (F); 200 µm (A, E e J); 100 µm (B, C, D, G, H, I, K, L)].

A completa reconexão vascular foi observada aos 21 dias após a realização da enxertia. A diferenciação das células do calo, localizadas na região de adesão entre hipo e epibioto, estabeleceram a continuidade vascular (Figs. 2F e 2G), interligando o sistema vascular inicial dos componentes da planta enxertada. Nesse período foi possível observar predomínio na diferenciação do sistema vascular e maior organização dos tecidos na região de união.

Mesmo após o estabelecimento da reconexão, a atividade celular continuou intensa na região de união, pois o processo de cicatrização ocorreu de forma centrífuga (Figs. 1A-1H). Aos 28 dias de cultivo (Fig. 1E), o sistema vascular na região do calo de cicatrização apresentava xilema com células bem diferenciadas e elemento de vaso de grosso calibre, procâmbio e células de floema bem definidas, sendo possível identificar áreas crivadas (Figs. 2H e 2I). Evidências da diferenciação celular, também foram confirmadas pelo início da reconstituição do sistema dérmico na planta (Fig. 2 H). Nesse período, as células da região do calo, localizadas na porção externa, apresentavam-se organizadas e sofrendo divisões anticlinais caracterizando o processo de regeneração da epiderme na região do enxerto.

Aos 35 dias de cultivo (Fig. 1F) a reconstituição do tecido de revestimento na área do calo apresenta maior organização e as células mantêm o plano de divisão anticlinal (Fig. 2J). Na região subepidérmica ocorrem divisões celulares tanto no plano anticlinal quanto periclinal e as células organizam-se em camadas formando a região cortical (Fig. 2J). A evolução no processo de cicatrização do sistema dérmico é evidente nesse período (Fig. 2K). No tecido vascular, as células podem ser observadas tanto em corte transversal quanto longitudinal, indicando que a diferenciação celular ocorre em todos os sentidos a fim de se restabelecer a completa reconexão e cicatrização, mantendo intensa atividade celular na região do calo (Fig. 2L). Nesse período, as plantas foram transferidas para substrato, com o processo de cicatrização concluído entre 35 e 70 dias de cultivo, observando-se, neste local, aumento da espessura no enxerto (Fig. 1G).

Após a etapa de aclimatização, as plantas enxertadas com 70 dias apresentaram reconstituição do tecido dérmico de forma integral, bem como, os demais tecidos internos da planta (Fig. 3A). Na região de união pôde-se verificar feixe vascular do tipo colateral e também início de crescimento secundário (Figs. 3A-B), mantendo a continuidade vascular entre hipo e epibioto. É possível observar a diferenciação celular em todos os sentidos (Fig. 3B) circundando toda a região de união do enxerto.

Aos 100 dias de cultivo (Fig. 1H), as plantas estabelecidas em casa de vegetação, apresentaram evolução no desenvolvimento da região de união (Figs. 3C-F), com avançado crescimento secundário não usual e a presença de muitos idioblastos contendo cristais de oxalato de cálcio do tipo drusa e areia cristalina (Fig. 3C). O crescimento secundário não usual produz sucessivos câmbios (Fig. 3C), onde a diferenciação celular de xilema e floema secundário (Fig. 3D) é intercalada por faixas de células parenquimáticas de paredes delgadas.

Entre o córtex e a região parenquimática observou-se células com intensa atividade, caracterizada por núcleos evidentes, indicando a formação de novo câmbio vascular (Figs. 3C e 3F). Outra característica que evidencia o crescimento secundário na região da enxertia é a presença da periderme na porção externa do córtex (Fig. 3E), completando o desenvolvimento estrutural na região do enxerto, que acompanha o padrão das plantas enxertadas nas regiões intactas.

Os cortes da região de conexão aos 70 dias após a enxertia submetidos à floroglucina ácida reagiram fortemente (Fig. 4), evidenciando a lignificação contínua do sistema vascular na região do enxerto (Figs. 4A e 4 B), podendo ser observado elementos de vaso diferenciados (Figs. 4C-E). As duas conexões iniciais estabelecidas a emergencial, na porção externa, e a definitiva, porção interna do caule, reagiram fortemente (Fig. 4B), indicando que a lignificação ocorre de forma semelhante em ambas.

A reação com floroglucina nas células parenquimáticas produzidas alternadamente com os sucessivos câmbios indica o início do espessamento das suas paredes (Fig. 4E).

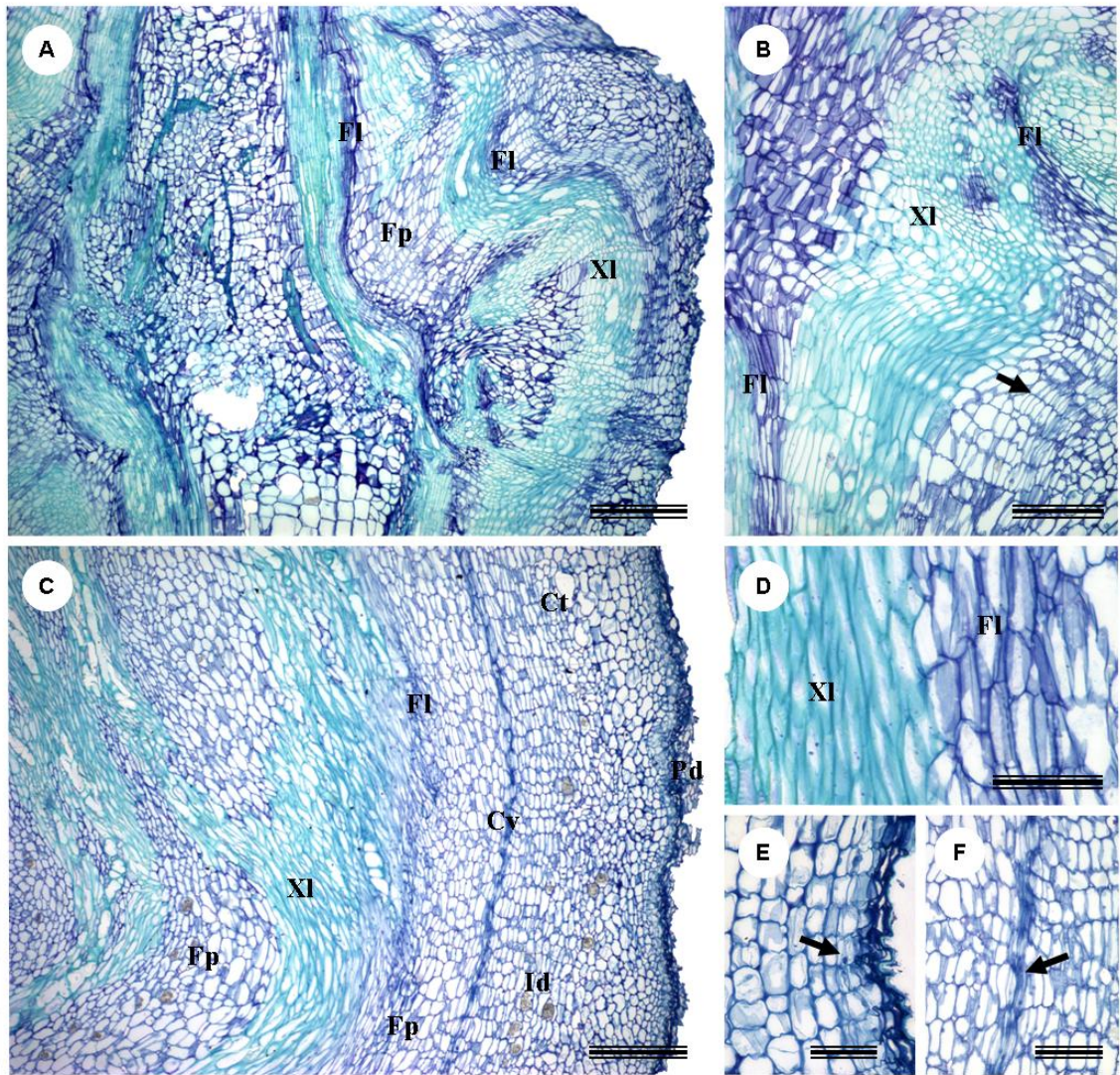


Figura 3. Secções longitudinais da região de conexão de plantas de *P. glomerata* enxertadas *in vitro*. **A-B.** aos 70 dias; **C-F.** aos 100 dias após a realização da enxertia. **A.** aspecto geral da reconexão vascular; **B.** detalhe do sistema vascular, a seta indica região de intensa atividade celular; **C.** aspecto geral da região cicatrizada; **D.** detalhe do sistema vascular, onde podem ser observadas áreas crivadas; **E.** detalhe do início da formação da periderme (seta); **F.** detalhe do cambio recém formado (seta). Ct = córtex; Cv = câmbio vascular; Fl = floema; Fp = faixa parenquimática; Id = idioblastos contendo areia cristalina; Pd = periderme; Xl = xilema. [Barra = 400 μ m (A , C); 200 μ m (B); 100 μ m (D, E e F)].

A proporção das células lignificadas na região de união está compatível com o sistema vascular intacto do hipo e do epibioto, o que confirma o sucesso no estabelecimento da conexão vascular.

O alinhamento e a justaposição do tecido cambial das partes envolvidas na enxertia facilitaram o processo de reconexão, pois a propagação celular do calo, a diferenciação dessas células e a cicatrização ocorrem de forma centrífuga e contínua a partir dos tecidos pré-existentes no epi e hipobioto.

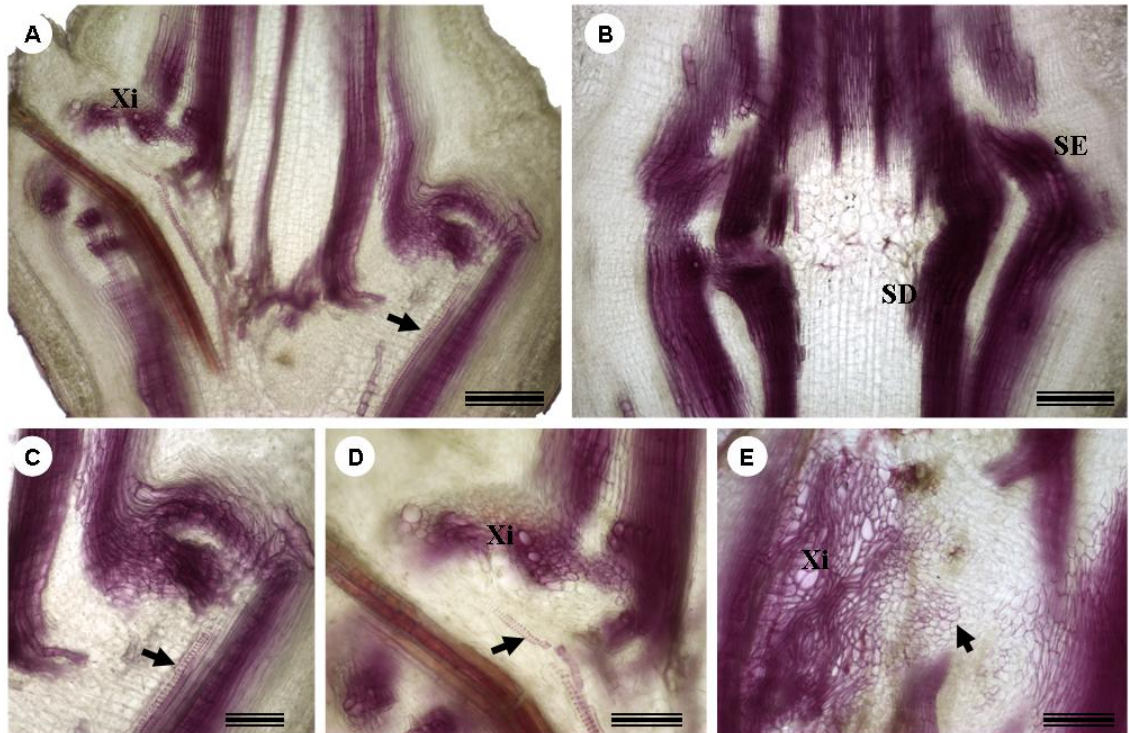


Figura 4. Secções longitudinais da região de conexão, após 70 dias da enxertia *in vitro* de *P. glomerata* submetidos à floroglucina ácida. **A e B.** Aspecto geral da continuidade vascular (Barra = 400 μm); **C-E.** Detalhe do sistema vascular (Barra = 200 μm); **C e D.** detalhe dos elementos de vaso (seta); **E.** elementos de vaso em início de espessamento de parede (seta). Xi – xilema em corte transversal; SE – sistema vascular emergencial; SD – sistema vascular definitivo.

Discussão

A adesão inicial das partes enxertadas seguida pela formação de calo na região de conexão oriundo da proliferação celular do hipo e epibioto verificada em *P. glomerata* também foi observada em outras espécies como *Picea sitchensis* (Barnett & Weatherhead, 1988), *Prunus* spp. (Errea et al., 1994) e *Pyrus communis* e *Cydonia oblonga* (Ermel et al., 1997).

A intensa atividade celular na superfície de contato está relacionada ao processo inicial de cicatrização. Os primeiros sinais dessa atividade podem ser observados em poucos dias após a enxertia (Jonard, 1986), com o crescimento celular acompanhado de intensa divisão (Yeoman & Brown, 1976). Em *P. glomerata*, as divisões celulares na junção entre hipo e epibioto favoreceram o preenchimento dos espaços existentes na região do enxerto.

O desenvolvimento de uma camada de células necrosadas delimitando a região de contato observado é considerado como o primeiro estágio da união da enxertia anterior à formação do calo (Tiedemann, 1989; Asante & Barnett, 1997; Ermel et al., 1997; Troncoso et al., 1999; Estrada-Luna et al., 2002), essa demarcação é formada pela ruptura celular (Gebhardt & Goldbach, 1988), ocasionada pela lâmina do bisturi no preparo do material.

Segundo Dickison (2000) ocorre morte de camadas celulares na interface do enxerto e formação do calo, com células parenquimáticas, que preenchem a fenda no ponto da enxertia. A proliferação do calo observada em poucos dias em *P. glomerata* corrobora com as observações realizadas em diferentes espécies (Errea et al., 2001; Thimmappaiah et al., 2002; Pathirana & McKenzie, 2005; Chabukswar e Deodhar, 2006, Wu et al., 2007, entre outros), sendo a formação do calo na interface um estágio inicial no desenvolvimento da união entre os componentes da enxertia (Tiedemann, 1989; Errea et al., 1994; Hartmann et al., 1997; Pina & Errea, 2005).

A formação do calo caracteriza a união física do material enxertado, sendo um processo fundamental na conexão das plantas (Jeffree & Yeoman, 1983; Moore, 1984). Embora ocorra como uma resposta natural de cicatrização à injúria sofrida pelos tecidos (Barnett e Weatherhead, 1988; Asante & Barnett, 1997; Hartmann et al., 1997; Pina & Errea, 2005), o desenvolvimento das futuras conexões vasculares depende do contato célula a célula. Em *P. glomerata*, as células do calo proporcionaram contato direto entre os tecidos, resultando na adesão entre as partes, que ficou evidenciada pelo restabelecimento do crescimento imediato do epibioto e o enraizamento do hipobioto.

Logo, o calo é o primeiro contato (Pina & Errea, 2008b) para formar um único tecido em regiões adjacentes ao câmbio (Dickison, 2000).

O calo cicatricial produzido por divisões celulares, nos planos anticlinal e periclinal, visualizadas nas camadas celulares imediatamente adjacentes a lesão foi também relatado por Ermel et al. (1997). As divisões predominantemente periclinais observadas no hipobioto de *P. glomerata* foram relatadas para *Mangifera indica* na região do calo (Asante & Barnett, 1997). A massa de células desorganizadas observada em algumas regiões do calo também foi verificada em *Opuntia* spp. (Estrada-Luna et al., 2002).

O alongamento e a formação de novas camadas celulares asseguram a continuidade vascular entre os componentes da enxertia, estabelecendo o desenvolvimento do epibioto (Jeffree & Yeoman, 1983; Dickison, 2000). Este crescimento foi observado logo na primeira semana em *P. glomerata*, caracterizando o desenvolvimento padrão dos estágios iniciais da cicatrização.

O padrão de diferenciação depende da difusão de substâncias que promovem o desenvolvimento do enxerto emanado pelo corte dos feixes vasculares (Moore, 1984). A organização das células do calo é o primeiro passo na formação do novo câmbio e subsequente conexão vascular (Barnett & Weatherhead, 1988; Errea et al., 1994; Hartmann et al., 1997). A capacidade das plantas enxertadas de estabelecer a continuidade vascular é atribuída à presença inicial do calo (Jeffree & Yeoman, 1983; Thimmappaiah et al., 2002; Wu et al., 2007), sendo um bom indicador do sucesso na enxertia (Hartmann et al., 1997).

Após a fase inicial de divisão celular, os enxertos de *P. glomerata* apresentaram arranjo celular homogêneo e organizado, características essenciais para o desenvolvimento da sólida união (Errea et al., 2001). A disposição das células do calo representa uma orientação espacial precisa, que pode implicar na forma de comunicação e no estabelecimento da união (Moore & Walker, 1981). O comportamento dessas células, a produção de células parenquimáticas e sua diferenciação em conexões vasculares, determinam futuras respostas da enxertia (Tiedemann, 1989).

As células do calo em *P. glomerata* apresentaram potencial para diferenciação, porém não foi possível identificar qual tipo celular se diferenciou primeiro, pois tanto a presença de xilema quanto de floema foi observada aos 14 dias de cultivo. Indicando que a diferenciação dos tecidos vasculares ocorreu no período entre 7 e 14 dias, sendo necessário o acompanhamento neste intervalo para determinar qual o primeiro tipo celular a se diferenciar.

A diferenciação celular observada aos 14 dias, demonstrou que o método utilizado proporcionou boa adesão entre epi e hipobioto, resultando na formação de calo meristemático com potencial de diferenciação. Esse processo, geralmente é estabelecido nas primeiras semanas, mas pode sofrer variações de acordo com a espécie em questão. Em *Malus domestica* células com paredes espessadas e lignificadas, diferenciando xilema secundário foram observadas aos 10 dias (Richardson et al., 1996), período semelhante ao requerido para diferenciação celular em oliveira (Troncoso et al., 1999) e *Opuntia* spp. (Estrada-Luna et al., 2002) e, para a formação do câmbio vascular, em *Camellia sinensis* (Prakash et al., 1999).

Em *P. glomerata*, aos 21 dias da enxertia, a reconexão vascular estava estabelecida, mesmo período requerido por *Pistacia vera* (Abousalim & Mantell, 1992) e oliveira (Troncoso et al., 1999). Em *Sedum telephoides* (Moore & Walker, 1981), a reconexão ocorreu com 14 dias, em *Prunus* (Gebhardt & Goldbach, 1988) e em *Opuntia* spp. (Estrada-Luna et al., 2002) com 27 e 28 dias, respectivamente, e em *Camellia sinensis* (Prakash et al., 1999) com 40 dias, confirmando tratar-se de um evento característico de cada espécie analisada.

A diferenciação de algumas células do calo, a partir de novas células cambiais, forma uma conexão contínua de tecidos condutores, assegurando uma sistematização da vascularização entre as partes envolvidas na enxertia (Jeffree & Yeoman, 1983). Gebhardt & Goldbach (1988) observaram que o início do câmbio vascular na zona interfascicular não foi um pré-requisito para o estabelecimento da conexão vascular.

A grande atividade celular persistente na região de interface após a reconexão vascular em *P. glomerata* tende a circundar os caules formando sólida união e obtendo completo restabelecimento vascular. As novas células produzidas pela intensa atividade do câmbio vascular podem interligar completamente os componentes da enxertia (Barnett & Weatherhead, 1988). Abundante diferenciação, mesmo após a reconexão inicial, pode ser observada (Troncoso et al., 1999), pois o processo é contínuo e demora vários meses (Richardson et al., 1996) para o estabelecimento completo da conexão.

A continuidade vascular na zona de interface é considerada um evento crítico que determina a formação de combinações compatíveis entre hipo e epibioto durante a reconexão (Yeoman & Brown, 1976; Moore, 1984). A verdadeira união só é encontrada após o xilema e floema produzirem perfeito contato (Moore & Walker, 1981). Porém, plantas enxertadas podem sobreviver normalmente por alguns anos, mesmo na ausência de continuidade vascular (Herrero, 1951; Asante & Barnett, 1997), sem qualquer indicação externa de redução no crescimento até eventualmente ocorrer a quebra da

planta na união do enxerto (Errea et al., 1994). A falta de diferenciação das células do calo em algumas áreas da união pode afetar a formação de xilema e floema, causando descontinuidade no câmbio e a formação de linhas parenquimáticas interrompendo a conexão vascular (Errea et al., 1994; Hartmann et al., 1997), tornando-as frágeis.

Após longo período de aparente sucesso no crescimento do enxerto, as reações de incompatibilidade podem se manifestar. Esse atraso nos sintomas aparentes requeridos para detectar a incompatibilidade torna lenta a seleção do material vegetal a ser utilizado (Errea et al., 2001). Estudos anatômicos revelam o desenvolvimento anormal da união do enxerto quando ocorre incompatibilidade, podendo ser representada pela pobre conexão vascular, degeneração do floema, e descontinuidade cambial ou vascular na área de união, causando fraqueza mecânica e subsequente colapso da união (Herrero, 1951; Hartmann et al., 1997). Dessa forma, a união, a cicatrização e a completa reconexão vascular em plantas enxertadas de *P. glomerata* demonstram a eficiência do método utilizado, evidenciada pelos aspectos histológicos.

A enxertia compatível consiste no alinhamento e adesão entre hipo e epibioto, proliferação do calo na região de interface, diferenciação do câmbio vascular que se conectará ao câmbio original, alcançando crescimento secundário e na continuidade dos tecidos epidérmicos (Moore, 1984; Errea et al., 1994; Hartmann et al., 1997). Entretanto, alguns autores discutem a necessidade de diferenciação vascular como etapa essencial para o sucesso da enxertia (Moore & Walker, 1981; Moore, 1984; Pina & Errea, 2005). A restauração da continuidade vascular é importante uma vez que assegura o transporte eficiente de água e nutrientes entre as partes enxertadas (Moore & Walker, 1981; Asante & Barnett, 1997) e o suporte mecânico (Herrero, 1951), garantindo sucesso na condição de campo (Moore, 1991).

A compatibilidade na enxertia ocorre com união e desenvolvimento satisfatório na composição de uma planta, esse mecanismo está associado a diferentes fatores genéticos existentes entre hipo e epibioto (Hartmann et al., 1997). Fatores fisiológicos, bioquímicos e anatômicos são relacionados, com inúmeras possibilidades de interação, tanto favoráveis quanto desfavoráveis (Suguino et al., 2003).

A reconstituição do sistema dérmico é caracterizada como o último estágio no processo de cicatrização estrutural da enxertia. Em *P. glomerata* ficou evidente a regeneração da epiderme que, posteriormente, foi substituída pela periderme. O restabelecimento da epiderme também foi observado em *Malus domestica* (Richardson et al., 1996) e *Opuntia* spp. (Estrada-Luna et al., 2002); em *Mangifera indica* houve a formação da periderme (Asante & Barnett, 1997), enquanto em *Prunus* (Gebhardt &

Goldbach, 1988) a formação da periderme foi suprimida na área do calo coberta com anéis de silicone, utilizados para dar suporte às plantas enxertadas.

Em *P. glomerata* foi possível observar maior atividade celular do câmbio na área de união do enxerto. A formação do câmbio e sua diferenciação celular permitiram o realinhamento e a reconexão do tecido vascular tornando a união do enxerto funcional. Essa característica também foi observada em *Malus domestica* aos 90 dias após a realização da enxertia (Richardson et al., 1996).

Na união compatível, o contato cambial é estabelecido logo após a enxertia e a atividade associada de ambos os câmbios produzem uma contínua vascularização entre hipo e epibioto, durante o subsequente crescimento, quando ocorre boa união interna sem distorção dos tecidos a linha exata da união torna-se indistinguível (Herrero, 1951). A dificuldade na identificação do ponto exato da enxertia também é resultante do eficiente processo de cicatrização da lesão na interface.

O sistema vascular na região do enxerto em *P. glomerata* apresenta uma organização diferente do padrão para a espécie, pois a reconexão ocorre, num primeiro momento, a partir das células oriundas do calo na região proeminente. Assim, a reconexão acompanha a curvatura estabelecida pela expansão na região do calo. No entanto, na região mais interna do caule, o sistema vascular pré-existente no hipo e epibioto está em contato direto com o tecido meristemático do calo, este se diferencia em tecido vascular, e aos 70 dias de cultivo essa conexão está restabelecida de forma contínua e linear. Portanto, a região de união da enxertia apresenta duas conexões no sistema vascular, a primeira a se estabelecer é a conexão emergencial na região do calo e a segunda é a conexão definitiva na porção interna do caule.

O aumento da lignificação no tecido regenerado do ferimento após a enxertia é um processo observado em uniões compatíveis (Gebhardt & Goldbach, 1988). A formação de uma sólida união depende mecanicamente da diferenciação dos elementos de vaso no ferimento e de novos elementos vasculares que atravessam a união do enxerto. O crescimento secundário não usual observado na região do enxerto de *P. glomerata* está de acordo com características anatômicas relatadas para a família Amaranthaceae (Rajput, 2002), assim como para *P. glomerata* (Vigo et al., 2004).

Os compostos fenólicos representam um importante papel na lignificação na região de união do enxerto (Hartmann et al., 1997). A atividade de biossíntese de lignina ocorre nas células da região da enxertia poucos dias após sua realização (Fernández-García et al., 2004), podendo ser a lignificação das paredes celulares o principal evento na enxertia compatível (Pina & Errea, 2008b).

A diferenciação de elementos de vaso a partir de células do calo nos primeiros dias após a enxertia também foi observada em outros trabalhos (Ermel et al., 1997; Gebhardt & Goldbach, 1998; Fernández-García et al., 2004). A lignificação das paredes das células adjacentes intensifica a coesão entre hipo e epibioto (Yeoman & Brown, 1976). Como esse processo ocorre de forma contínua, pode-se afirmar que o estabelecimento da vascularização em *P. glomerata* seguiu os padrões observados em outras espécies enxertadas *in vitro*. A continuidade vascular entre hipo e epibioto ficou evidenciada pelo grau de lignificação na região do enxerto observada aos 70 dias.

Produtos da rota metabólica dos fenilpropanóides, como ligninas, flavonas e antocianinas, estão envolvidos nas respostas ao estímulo de estresse como lesão, bem como, nos primeiros estádios do desenvolvimento da união do enxerto (Pina & Errea, 2008b). As peroxidases, envolvidas no processo de lignificação, podem apresentar maior atividade na região de união dos enxertos do que em plantas controles (Fernández-García et al., 2004). Isto pode justificar a intensa atividade celular na região da enxertia e a rápida diferenciação dessas células em componentes estruturais fundamentais para o estabelecimento das plantas enxertadas de *P. glomerata*.

Em pêra-marmelo, os enxertos compatíveis apresentaram quantidade de lignina nas paredes celulares da união do enxerto comparável às células adjacentes externas à união, enquanto que, em enxertos incompatíveis essas células não continham lignina, sendo sustentadas, por fibras de celulose (Pina & Errea, 2008b). Em união compatível, a lignificação do tecido regenerado no local da lesão ocorre até o estabelecimento completo da reconexão do xilema (Gebhardt & Goldbach, 1988). A lignificação na região do enxerto, observada em *P. glomerata* é mais uma indicação do sucesso no estabelecimento das plantas enxertadas.

As análises histológicas observadas na formação da união das plantas enxertadas foram comparáveis às observações realizadas em outras espécies *in vitro* (Asante & Barnett, 1997; Estrada-Luna et al., 2002), incluindo os estágios de desenvolvimento da camada de necrose, adesão dos componentes da enxertia proliferação do calo na interface da enxertia, diferenciação de novo câmbio vascular, estabelecimento do câmbio e continuidade vascular, restauração da continuidade da epiderme e, posterior desenvolvimento de periderme na região de união.

Portanto, os sucessivos eventos estruturais ocorridos na formação da união das plantas enxertadas de *P. glomerata* evidenciam a enxertia funcional e compatível. A diferenciação e reconexão dos elementos vasculares nas plantas enxertadas demonstram a eficiência na utilização da enxertia *in vitro* para a propagação da espécie.

Referências Bibliográficas

- ABOUSALIM, A.; MANTELL, S.H. 1992. Micrografting of pistachio (*Pistacea vera* L.cv. Mateur). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 29:231-234.
- ABREU, M.F.; NUNES, J.C.O.; SANTOS, M.; PEDROTTI, E.L. 2003. Estudos histológicos preliminares na microenxertia de plantas micropropagadas de macieira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 25:195-196.
- ASANTE, A.K.; BARNETT, J.R. 1997. Graft union formation in mango (*Mangifera indica* L.). **Journal of Horticultural Science**, 72:781-790.
- BANDEIRA, F.S.; XAVIER, A.; OTONI, W.C.; DIAS, J.M.M. 2006. Enxertia *in vitro* na propagação de clones de *Eucalyptus urophylla* e *E.grandis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 41:223-232.
- BARNETT, J.R.; WEATHERHEAD, I. 1988. Graft formation in sitka spruce: a scanning electron microscope study. **Annals of Botany**, 61:581-587.
- CAN, C.; OZASLAN, M.; TOREMEN, H.; SARPKAYA, K.; ISKENDER, E. 2006. *In vitro* micrografting of pistachio, *Pistacia vera* L. var. Siirt, on wild pistachio rootstocks. **Journal of Cell and Molecular Biology**, 5:25-31.
- CARVALHO, S.A.; SANTOS, F.A.; MACHADO, M.A. 2002. Eliminação de vírus do complexo sorose dos citros por microenxertia associada à termoterapia. **Fitopatologia Brasileira**, 27:306-308.
- CHABUKSWAR, M.M.; DEODHAR, M.A. 2006. Restoration of rooting competence in a mature plant of *Garcinia indica* through serial shoot tip grafting *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, 108:194-199.
- CORRÊA JR., C. 2003. **Estudo agrônomico da fáfia (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen): sazonalidade na produção de raízes e conteúdos de beta-ecdisona em diferentes indivíduos de São Paulo, Paraná e Mato Grosso do Sul**. Doutorado (Horticultura), Botucatu: UNESP/FCA. 94 p.
- DICKISON, W.C. 2000. **Integrative plant anatomy**. Hartcourt: Academic Press, 533p.
- ERMEL, F.F.; POESSEL, J.L.; FAUROBERT, M.; CATESSON, A.M. 1997. Early scion/stock junction in compatible and incompatible pear/pear and pear/quince grafts: a histo-cytological study. **Annals of Botany**, 79:505-515.
- ERREA, P.; FELIPE, A.; HERRERO, M. 1994. Graft establishment between compatible and incompatible *Prunus* spp. **Journal of Experimental Botany**, 45:393-401.
- ERREA, P. 1998. Implications of phenolic compounds in graft incompatibility in fruit tree species. **Science Horticulturae**, 74:195-205.
- ERREA, P.; GARAY, L.; MARÍN, J.A. 2001. Early detection of graft incompatibility in apricot (*Prunus armeniaca*) using *in vitro* techniques. **Physiologia Plantarum**, 112:135-141.
- ESTRADA-LUNA, A.A.; LÓPEZ-PERALTA, C.; SORIANO-CÁRDENAS, E. 2002. *In vitro* micrografting and the histology of graft union formation of selected species of prickly pear cactus (*Opuntia* spp.). **Scientia Horticulturae**, 92:317-327.
- FERNÁNDEZ-GARCÍA, N.; CARVAJAL, M.; OLMOS, E. 2004. Graft union formation in tomato plants: peroxidase and catalase involvement. **Annals of Botany**, 93:53-60.
- FIGUEIREDO, L.S.; TEIXEIRA, S.L.; FREITAS, S.P.; VIEIRA, I.J.C.; MARTINS, E.R. 2004. Comportamento de acessos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae) nas condições de Campos dos Goytacazes – RJ. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 7:67-72.
- GEBHARDT, K.; GOLDBACH, H. 1988. Establishment, graft union characteristics and growth of *Prunus* micrografts. **Physiologia Plantarum**, 72:153-159.

- GOMES, A.C.M.M.; MATTOS, J.C.; CIROTO, P.A.S.; CARNEIRO, R.M.D.G. 2006. Resistência de acessos de *Pfaffia glomerata* a *Meloidogyne incognita* Raça 1. **Nematologia Brasileira**, 30:189-194.
- HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES JUNIOR, F.T.; GENEVE, R.L. 1997. **Plant propagation: principles and practices**. 6 ed. New Jersey: Prentice-Hall, 770 p.
- HERRERO, J. 1951. Studies of compatible and incompatible graft combinations with special reference to hardy fruit trees. **Journal of Horticultural Science**, 26:186-237.
- JEFREE, C.E.; YEOMAN, M.M. 1983. Development of intercellular connections between opposing cells in a graft union. **New Phytologist**, 93:491-509.
- JIN, S.; LIANG, S.; ZHANG, X.; NIE, Y.; GUO, X. 2006. An efficient grafting system for transgenic plant recovery in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 85:181-185.
- JOHANSEN, D.A. 1940. **Plant microtechnique**. Mc Graw-Hill Book Co. Inc., New York. 523p.
- JONARD, R. 1986. Micrografting and its applications to tree improvement. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.), **Biotechnology in agriculture and forestry**. Springer-Verlag, Berlin, p. 31-48.
- KAMADA, T. 2006. **Avaliação da diversidade genética de populações de fáfia (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) por RAPD, caracteres morfológicos e teor de β -ecdisona**. Doutorado (Genética e Melhoramento), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 106p.
- KATOH, N.; YUI, M.; SATO, S.; SHIRAI, T.; YUASA, H.; HAGIMORI, M. 2004. Production of virus-free plants from virus-infected sweet pepper by in vitro grafting. **Scientia Horticulturae**, 100:1-6.
- KHALAFALLA, M.M.; DAFFALLA, H.M. 2008. *In vitro* micropropagation and micrografting of gum arabic tree [*Acacia Senegal* (L.) Wild]. **Journal of Sustainable Crop Production**, 3:19-27.
- MARTINS, C.F.; NICOLOSO, F.T. 2004. Micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 6(3):53-61.
- MNENEY, E.E.; MANTELL, S.H. 2001. In vitro micrografting of cashew. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 66:49-58.
- MONTANARI JR., I.; MAGALHAES, P.M.; QUEIROGA, C.L. 1999. Influence of plantation density and cultivation cycle on root productivity and tenors of b-ecdysone in *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Acta Horticulturae**, 502(3):125-128, 1999.
- MONTANARI JR., I. 2005. **Avaliação de genótipos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen visando seu cultivo comercial**. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical/Melhoramento Genético Vegetal). Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, 63 p.
- MONTANARI, JR. I.; PERECIN, M.B. 2006. Evaluation of morphological and agricultural characteristics and their phenotypic correlations in genotypes of a *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen population. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 8(esp.):46-48.
- MONTEUUIS, O. 1994. Effect of technique and darkness on the success of meristem micrografting of *Picea abies*. **Silvae Genetica**, 43:91-95.
- MONTEUUIS, O. 1995. *In vivo* grafting and *in vitro* micrografting of *Acacia mangium*: impact of ortet age. **Silvae Genetica**, 44:190-193.
- MOORE, R. 1984. A model for graft compatibility-incompatibility in higher plants. **American Journal of Botany**, 71:752-758.
- MOORE, R. 1991. Graft compatibilities *in vitro*. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry. v. 17: high-tech and micropropagation I**. Springer-Verlag, Berlin, p.71-84.

- MOORE, R.; WALKER, B. 1981. Studies of vegetative compatibility-incompatibility in higher plants. I. A structural study of a compatible autograft in *Sedum telephoides* (Crassulaceae). **American Journal of Botany**, 68:820-830.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15:473-497.
- MURASHIGE, T.; BITTERS, W.P.; RANGAN, T.S.; NAUER, E.M.; ROISTACHER, C.N.; HOLLIDAY, P.B. 1972. A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free citrus clones. **HortScience**, 7:118-119.
- NAVARRO, L.; ROISTACHER, C.N.; MURASHIGE, T. 1975. Improvement of shoottip grafting *in vitro* for virus-free citrus. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 100:471-479.
- O'BRIEN, T.P.; McCULLY, M.E. 1981. **The study of plant structure principles and selected methods**. Termarcaphi Pty. Ltda, Melbourne – Australia. 45p.
- PATHIRANA, R.; McKENZIE, M.J. 2005. Early detection of grapevine leafroll virus in *Vitis vinifera* using *in vitro* micrografting. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 81:11-18.
- PEÑA, L.; CERVERA, M.; JUÁREZ, J.; ORTEGA, C.; PINA, J.A.; DURÁN-VILA, N.; NAVARRO, L. 1995. High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of citrus. **Plant Science**, 104:183-191.
- PINA, A.; ERREA, P. 2005. A review of new advances in mechanism of graft compatibility-incompatibility. **Scientia Horticulturae**, 106:1-11.
- PINA, A.; ERREA, P. 2008a. Differential induction of phenylalanine ammonia-lyase gene expression in response to *in vitro* callus unions of *Prunus* spp. **Journal of Plant Physiology**, 165:705-714.
- PINA, A.; ERREA, P. 2008b. Influence of graft incompatibility on gene expression and enzymatic activity of UDP-glucose pyrophosphorylase. **Plant Science**, 174:502-509.
- PLIEGO-ALFARO, F.; MURASHIGE, T. 1987. Possible rejuvenation of adult avocado by graftage onto juvenile rootstocks *in vitro*. **HortScience**, 22:1321-1324.
- PRAKASH, O.; SOOD, A.; SHARMA, M.; AHUJA, P.S. 1999. Grafting micropropagated tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntza] shoots on tea seedlings – a new approach to tea propagation. **Plant Cell Reports**, 18:883-888.
- RAHARJO, S.H.T.; LITZ, R.E. 2005. Micrografting and *ex vitro* grafting for somatic embryo rescue and plant recovery in avocado (*Persea americana*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 82:1-9.
- RAJPUT, K.S. 2002. Stem anatomy of Amaranthaceae: rayless nature of xylem. **Flora**, 197:224-232.
- RICHARDSON, F.V.M.; TSAOIR, S.M.A.; HARVEY, B.M.R. 1996. A study of the graft union in *in vitro* micrografted apple. **Plant Growth Regulation**, 20:17-23.
- ROUPHAEL, Y.; CARDARELLI, M.; REA, E.; COLLA, G. 2008. Grafting of cucumber as a means to minimize copper toxicity. **Environmental and Experimental Botany**, 63:49-58.
- SANJAYA, T.S.R.; SANJAYA, B.M.; RAI, V.R. 2006. Factors influencing *in vivo* and *in vitro* micrografting of sandalwood (*Santalum album* L.): an endangered tree species. **Journal of Forest Research**, 11:147-151.
- SHARMA, S.; SINGH, B.; RANI, G.; ZAIDI, A.A.; HALLAN, V.K.; NAGPAL, A.K.; VIRK, G.S. 2008. *In vitro* production of Indian citrus ringspot virus (ICRSV) free Kinnow plants employing thermotherapy coupled with shoot tip grafting. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 92:85-92.
- SUAREZ, I.E.; SCHNELL, R.A.; KUHN, D.N.; LITZ, R.E. 2005. Micrografting of ASBVd-infected avocado (*Persea americana*) plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 80:179-185.

- SUGUINO, E.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; ARAÚJO, P.S.R.; SIMÃO, S. 2003. Propagação vegetativa de camu-camu por meio de enxertia intergenérica na família Myrtaceae. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 38:1477-1482.
- THIMMAPPAIAH; PUTHRA, G.T.; ANIL, S.R. 2002. In vitro grafting of cashew (*Anacardium occidentale* L.). **Scientia Horticulturae**, 92:177-182.
- TIEDEMANN, R. 1989. Graft union development and symplastic phloem contact in the heterograft *Cucumis sativus* on *Curcubita ficifolia*. **Journal Plant Physiology**, 134:427-440.
- TRONCOSO, A.; LINAN, J.; CANTOS, M.; ACEBEDO, M.M.; RAPOPORT, H.F. 1999. Feasibility and anatomical development of an in vitro olive cleft-graft. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, 74:584-587.
- VIGO, C.L.S.; NARITA, E.; MILANEZE-GUTIERRE, M.A.; MARQUES, L.C. 2004. Caracterização farmacognóstica comparativa de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Hebanthe paniculata* Martius – Amaranthaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 6(2):7-19.
- WU, H.C.; DU TOIT, E.S.; REINHARDT, C.F. 2007. Micrografting of *Protea cynaroides*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 89:23-28.
- YEOMAN, M. M.; BROWN, R. 1976. Implications of the formation of the graft union for organisation in the intact plant. **Annals of Botany**, 40:1265-1276.

Capítulo 5

Produção de β -ecdisona em acessos de *Pfaffia glomerata* propagados via enxertia *in vitro*

Introdução

O gênero *Pfaffia* (Amaranthaceae) possui importância, atribuída às suas propriedades medicinais (Siqueira, 1988), que desperta interesse mundial. Diferentes espécies do gênero apresentam elevado potencial para o desenvolvimento de fitoterápicos e fitocosméticos, sendo objeto de estudos químicos e pesquisa de atividades biológicas (Cortez et al., 1998). Devido às substâncias presentes em suas raízes (Mattos & Salis, 2004), tem sido usada como tônico (Vigo et al., 2004), afrodisíaco (Taniguchi et al., 1997; Magalhães, 2000), calmante e contra úlceras há mais de 300 anos por populações indígenas da América (Lorenzi & Matos, 2002). As raízes de *Pfaffia* são amplamente utilizadas na medicina popular no tratamento de doenças reumáticas (Taniguchi et al., 1997), dentre inúmeras outras aplicações.

Entre os principais constituintes isolados das raízes de *Pfaffia* estão relacionados estigmasterol, sitosterol, alantoína, ecdisteróides, triterpenóides e nortriterpenóides (Takemoto et al., 1983; Nakai et al., 1984; Nishimoto et al., 1984; 1988; Shiobara et al., 1992; 1993). Os ecdisteróides extraídos da *Pfaffia* são de interesse farmacológico com utilização no preparo de produtos cosméticos e dermatológicos, sendo β -ecdisona (20E) um importante esteróide empregado em formulações cosméticas (Cortez et al., 1998).

Os estudos sobre o gênero *Pfaffia* são escassos, considerando a potencialidade do seu uso (Rates & Gosman, 2002). *Pfaffia glomerata* é conhecida pelos seus efeitos medicinais, sendo a espécie mais estudada do gênero (Smith & Downs, 1998). Quimicamente, é rica em saponinas triterpênicas, sendo 20E seu principal ingrediente ativo (Sanches et al., 2001; Vigo et al., 2003). O teor deste composto é frequentemente utilizado em avaliações de cultivo e seleção de genótipos (Magalhães, 2000; Corrêa Júnior, 2003; Figueiredo, 2004).

O interesse por *P. glomerata* teve origem no uso popular de suas raízes, recebendo o nome popular ginseng brasileiro (Gomes et al., 2006), também denominada fáfia, paratudo, corango, corrente, sempre-viva (Magalhães, 2000), batata-do-mato e, no

mercado internacional, suma (Corrêa Jr. et al., 2006). Possui grande potencial para consumo no mercado interno e externo (Vieira et al., 2002; Nascimento et al., 2007) e sua exploração no Brasil é atribuída às suas propriedades medicinais, realizada por grupos comerciais para extração de substâncias ativas (Taschetto & Pagliarini, 2003).

Ocorre endemicamente nas regiões tropicais do Brasil, é muito adaptativa, possui variabilidade de produção, com diferentes teores de princípios ativos de valor fitoterápico (Montanari Jr. et al., 1999; Montanari Jr. & Perecin, 2006), resultantes da variabilidade genética existente entre as populações (Figueiredo et al., 2004; Kamada, 2006).

A exploração de *P. glomerata* em ambientes naturais tem sido realizada de forma predatória, justificando planos de manejo e projetos de cultivos comerciais. A degradação poderia ser minimizada pelo processo de domesticação e cultivo dessa espécie, tornando-a disponível para uma parcela maior da população (Montanari Jr. et al., 1999; Ming & Côrrea Jr., 2002; Côrrea Jr., 2003) reduzindo a exploração das populações naturais (Alves et al., 2006). Dessa forma, a enxertia *in vitro* pode ser a técnica apropriada para essa finalidade, pois geralmente une dois materiais vegetais geneticamente distintos (Pina & Errea, 2005) que passam a compartilhar uma série de fatores essenciais à sobrevivência e crescimento de ambos (Oliveira et al., 2002).

As plantas enxertadas são amplamente utilizadas como forma de propagação e de controle no crescimento, possuindo considerável importância na adaptação de cultivares de interesse em áreas apropriadas (Pina & Errea, 2005; 2008), pois são formadas pela combinação de dois indivíduos, um que constitui o sistema radicial (hipobioto) e o outro, a parte aérea (epibioto). A capacidade que cada cultivar tem na adaptação a diferentes condições de solo é obtida por intermédio do uso de diferentes genótipos como hipobioto (Errea et al., 1994) e, a produção em árvores frutíferas, por exemplo, é determinada em função da seleção do epibioto (Errea et al., 2001).

Tradicionalmente, as técnicas de enxertia têm sido adaptadas para o cultivo de plantas com uma variedade de aplicações (Lou & Gould, 1999). No entanto, não existem relatos na literatura da união de materiais geneticamente distintos em plantas medicinais que investiguem a influência da enxertia *in vitro* na concentração do princípio ativo produzido. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar os teores de β -ecdisona na enxertia recíproca de acessos de *P. glomerata* que diferem na produção dos teores de princípio ativo e produtividade de raízes.

Material e Métodos

Dois acessos de *P. glomerata* coletados em populações distintas na bacia do rio Paraná e pertencentes à coleção de germoplasma de plantas medicinais do Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia (Embrapa/Cenargen), identificados sob nº 2202-15 e 2209-09, foram utilizados para realizar a enxertia *in vitro*.

Na propagação, foram utilizados seis tratamentos que consistiram: acesso 2202-15 sem enxerto (testemunha – ac 22); acesso 2209-09 sem enxerto (testemunha – ac 43); 2202-15 como hipobioto e 2209-09 como epibioto (cv 22); 2209-09 como hipobioto e 2202-15 como epibioto (cv 43); 2202-15 como hipobioto e epibioto (ct 22); e, 2209-09 como hipobioto e epibioto (ct 43).

Os clones foram propagados *in vitro* mediante o cultivo de segmentos nodais foram utilizados para a realização da enxertia *in vitro*. Ápices caulinares constituíram o epibioto e segmentos internodais alongados, o hipobioto. A enxertia *in vitro* foi realizada pelo método de garfagem, conforme metodologia proposta por Bandeira (2006).

As plantas enxertadas foram cultivadas em tubos de ensaio em meio de cultura contendo os sais e vitaminas MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 8 g L⁻¹ de ágar (Merck), mantidos em sala de crescimento, à temperatura de 25 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 16 horas com irradiância de 50 µmol m⁻² s⁻¹.

Após 30 dias de cultivo, as plantas foram aclimatizadas em condições de laboratório em sistema de prateleiras sob irradiância de 85 µmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 12 horas, utilizando lâmpadas fluorescentes (Osram® - Luz do Dia Especial, 20 W) e, posteriormente, transferidas para vasos (18 L) contendo mistura de solo, areia e substrato (Plantmax®) (2:2:1) e mantidas em condição de campo. O experimento foi realizado por duas vezes.

As plantas foram coletadas aos 360 dias, no primeiro experimento, e aos 240 dias, no segundo experimento, após a realização da enxertia *in vitro*. Foi determinado o teor de β-ecdisona nas raízes, folhas e inflorescências, bem como, produção de massa seca das raízes tuberosas e das inflorescências.

As folhas e as inflorescências foram coletadas e submetidas à secagem em estufa de ventilação forçada (50 °C) durante 8 dias. As raízes foram retiradas do solo e lavadas em água corrente, fragmentadas na seção de maior diâmetro em aproximadamente 5mm e colocadas em estufa pelo mesmo período (Figueiredo et al., 2004). Posteriormente, foram trituradas em moinho do tipo Willey e armazenadas em freezer (-20 °C). Todas

as raízes e inflorescências de cada unidade amostral foram coletadas e pesadas individualmente para determinar a produção da massa seca, sendo expressa em kg planta⁻¹. Esse procedimento não foi adotado para as folhas, uma vez que, na época de coleta do experimento com 360 dias as plantas praticamente não apresentavam mais folhas, apenas inflorescências. Dessa forma, a coleta e subsequente determinação do princípio ativo nas folhas só foram realizadas no experimento com 240 dias, onde foram coletados os três primeiros pares das folhas totalmente expandidas no ápice de cada ramificação.

Análise Química

As amostras foram submetidas ao processo de extração, segundo o método de Kamada (2006), com algumas modificações. Cada amostra foi preparada a partir de 200 mg de matéria seca e 20 mL de metanol, as quais ficaram armazenadas em temperatura ambiente (25 ± 2 °C), durante oito dias sob agitação diária do extrato. Após esse período, os extratos foram centrifugados (5.000 rpm/20 minutos) e o sobrenadante coletado.

Obtido o extrato metanólico, este foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para determinação do teor do fitoesteróide 20-hidroxicdisona ou β -ecdisona utilizando as seguintes condições: equipamento da Shimadzu (LC 10AD, Shimadzu, Kyoto Japão), equipado com detector SPD 10AV, CBM 10A; coluna Bomdesil C 18 (5,0 μ m x 4,6 mm x 250 mm); volume de amostra injetada de 20 μ L; leitura em $\lambda = 245$ nm. Para amostras de raízes a fase móvel utilizada foi o metanol (100%), grau HPLC, com fluxo de 1 mL/min e tempo de corrida da amostra de 10 minutos. Para as amostras de folhas e inflorescências, a fase móvel foi composta por metanol-água na proporção 50:50 (v/v), com fluxo de 1,2 mL/min e tempo de corrida da amostra de 15 minutos. Toda a fase móvel foi filtrada com membrana Millipore de 0,45 μ m e degaseificada com gás hélio. Os dados foram integrados por meio do "software" Shimadzu SPD.

Para obtenção da curva de calibração, foi utilizada amostra padrão com 97% de pureza de β -ecdisona (Sigma Chem. Co., EUA), em concentrações de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 e 120 mg.L⁻¹ em metanol. As soluções foram injetadas (20 μ L) em triplicatas, nas diferentes condições da fase móvel. Os valores obtidos nos cromatogramas, correspondentes às concentrações das amostras-padrão, foram plotados nos gráficos obtendo-se, assim, a equação para cálculo do teor de β -ecdisona dos

indivíduos. A equação de regressão obtida para calcular o teor de β -ecdisona utilizando a fase móvel metanol (100%) foi: Teor de β -ecdisona = (área do pico - 1473) / 28623 ($r^2 = 0,9995$); e, com a fase móvel metanol (50%) - água (50%): Teor de β -ecdisona = (área do pico - 26930) / 16323 ($r^2 = 0,9985$).

Delineamento Experimental

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com 8 repetições por tratamento, sendo cada unidade experimental constituída por um vaso, contendo uma planta.

Os dados foram submetidos à análise de variância, seguidos pelo teste de Tukey a 5% de significância. Para esclarecimento do grau de relação direta entre as características avaliadas foram calculados os coeficientes de correlação de Pearson para as características avaliadas, utilizando o programa estatístico GENES (Cruz, 2006).

Resultados

A produção de massa seca das raízes e das inflorescências apresentou variações de acordo com o tempo de cultivo, sendo observado um aumento significativo entre 240 e 360 dias (Quadro 1 e Quadro 2).

Analisando a massa seca das inflorescências aos 240 dias constatou-se que as plantas com a parte aérea constituída pelo acesso 2202-15 produziram maior índice (Quadro 1). Porém, considerando o teor de β -ecdisona o único tratamento a diferenciar foi a combinação 2202-15 como hipo e 2209-09 como epibioto, apresentando o menor índice nas análises. Nesse período, também foram observadas as menores produtividades por planta do princípio ativo nas enxertias cuja parte aérea foi constituída pelo acesso 2209-09 (Quadro 1).

Aos 240 dias os maiores teores de β -ecdisona foram encontrados nas folhas dos tratamentos constituídos pelo acesso 2202-15, independente da combinação do sistema radicular realizado na enxertia *in vitro*. Na combinação 2202-15 como hipo e 2209-09 como epibioto foi observada a menor concentração do princípio ativo, no entanto, na enxertia recíproca um dos maiores índice foi observado.

Quadro 1. Produção de massa seca (MS), teor de β -ecdisona (20E %) e quantidade de β -ecdisona por planta (20E/P) nas inflorescências de *P. glomerata* após 240 e 360 dias da realização da enxertia *in vitro*, e teor de β -ecdisona (20E %) nas folhas aos 240 dias

Epib.	Hip.	----- 240 dias -----				----- 360 dias -----		
		Inflorescência			Folha	Inflorescência		
		MS (g)	20E (%)	20E/P (g)	20E (%)	MS (g)	20E (%)	20E/P (g)
Test.	2202	3,32 ab	1,03 a	0,035 a	1,90 a	14,51 a	1,63 b	0,21 b
Test.	2209	2,63 bc	1,01 a	0,027 ab	1,49 bc	23,49 a	2,66 a	0,59 ab
2202	2202	4,17 a	0,95 a	0,040 a	1,74 ab	12,39 a	1,97 ab	0,24 b
	2209	3,17 ab	1,10 a	0,036 a	1,89 a	15,54 a	2,00 ab	0,30 b
2209	2202	1,81 c	0,52 b	0,009 c	1,13 c	21,97 a	2,26 ab	0,49 ab
	2209	1,80 c	1,04 a	0,019 bc	1,36 bc	30,94 a	2,85 a	0,78 a

As médias seguidas de uma mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Não houve diferença estatística entre os tratamentos na produção de massa das inflorescências aos 360 dias (Quadro 1), devido à variabilidade existente entre as

plantas do mesmo tratamento. Analisando o teor de β -ecdisona apenas a testemunha 2202-15 diferiu da testemunha 2209-09 e do acesso 2209-09 na condição de hipo e epibioto, apresentando o menor percentual. No entanto, pode se observar que os tratamentos que apresentaram a melhor produção de massa seca no período foram também os que apresentaram maior concentração do princípio ativo.

Analisando a quantidade de β -ecdisona nas inflorescências por planta, os tratamentos constituídos pelo acesso 2209-09 na parte aérea, quando enxertado nele mesmo ou na combinação com o acesso 2202-15, apresentaram menor produtividade em relação aos demais tratamentos aos 240 dias (Quadro 1). No entanto, com 360 dias um dos tratamentos que apresentaram maior produtividade foi a combinação 2209-09 como hipo e epibioto (Quadro 1), sendo os menores índices de produtividade por planta na inflorescência obtidos quando a parte aérea foi constituída pelo acesso 2202-15 (Quadro 1).

Aos 240 dias de cultivo, a produção de massa seca das raízes apresentou diferença significativa entre os tratamentos (Quadro 2). A testemunha e o controle do acesso 2209-09 foram os tratamentos com maior produção de raízes e menor produção de β -ecdisona (Quadro 2), enquanto que a testemunha e o controle do acesso 2202-15 obtiveram os menores teores de massa seca de raiz e maior teor de β -ecdisona (Quadro 2). Portanto, o acúmulo de β -ecdisona foi inversamente proporcional à produção de massa seca de raízes nestes tratamentos. Valores intermediários foram obtidos com a enxertia combinada desses acessos, tanto para a produção de massa seca da raiz quanto para o teor de β -ecdisona (Quadro 2).

Analisando a produção de massa seca das raízes aos 360 dias verificou-se a influência direta da enxertia nesta variável. O acesso 2209-09 apresentou maior quantidade de massa seca em relação aos demais tratamentos, inclusive quando utilizado como hipo e epibioto. Influência esta também observada em relação ao acesso 2202-15, onde o tratamento testemunha apresentou produção intermediária de massa seca de raiz, entretanto, quando este acesso constituiu o sistema radicular das plantas enxertadas, independente da combinação do enxerto, este apresentou menor produção (Quadro 2).

A determinação do teor de β -ecdisona nas raízes aos 360 dias demonstrou que as plantas constituídas pelo acesso 2202-15 apresentaram os maiores índices em relação aos demais tratamentos. A enxertia 2209-09 (hipobioto) e 2202-15 (epibioto) apresentou teor inferior apenas à combinação 2202-15 (como hipo e epibioto), equiparando-se a testemunha 2202-15 e a combinação 2202-15 (hipobioto) e 2209-09 (epibioto). No

entanto, apresentou teor superior aos demais tratamentos cujas plantas foram constituídas inteiramente pelo acesso 2209-09, o que demonstra a influência da enxertia no acúmulo do princípio ativo nas raízes de *P. glomerata*.

Quadro 2. Produção de massa seca (MS), teor de β -ecdisona (20E %) e quantidade de β -ecdisona por planta (20E/P) nas raízes de *P. glomerata* após 240 e 360 dias da realização da enxertia *in vitro*

Epib.	Hipob.	Raiz					
		----- 240 dias -----			----- 360 dias -----		
		MS (g)	20E (%)	20E/P (g)	MS (g)	20E (%)	20E/P (g)
Test.	2202-15	74,90 cd	1,20 a	0,89 a	154,97 b	1,58 ab	2,41 a
Test.	2209-09	129,23 a	0,64 c	0,83 a	212,94 a	0,86 c	1,83 bc
2202-15	2202-15	68,55 d	1,13 a	0,77 a	98,15 c	1,72 a	1,70 bc
	2209-09	84,28 cd	0,92 b	0,76 a	96,41 c	1,24 b	1,15 d
2209-09	2202-15	97,69 bc	0,81 b	0,79 a	133,62 b	1,42 ab	1,90 b
	2209-09	122,58 ab	0,65 c	0,79 a	164,57 b	0,81 c	1,33 cd

As médias seguidas de uma mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

A quantidade de β -ecdisona nas raízes por planta não diferiu entre os tratamentos com 240 dias. No entanto, com 360 dias, a testemunha 2202-15 apresentou maior produtividade, enquanto a combinação 2209-09 (hipobioto) e 2202-15 (epibioto) apresentou a menor produtividade. Os demais tratamentos apresentaram valores intermediários (Quadro 2).

Todas as plantas cujo sistema radicular foi constituído pelo acesso 2202-15 apresentaram galhas, evidenciando a presença de nematóides do tipo *Meloidogyne javanica* (fenótipos de Esterase J3 e J2) *Meloidogyne arenaria* (A2) e *Helicotylenchus* sp., enquanto nas plantas cujo sistema radicular foi constituído pelo acesso 2209-09 não foi detectada a presença destes.

A figura 1 mostra que os cromatogramas da amostra padrão de β -ecdisona e das soluções extrato dos diferentes órgãos de *P. glomerata* foram semelhantes, de acordo com a fase móvel específica. Comparando estes cromatogramas observa-se um coincidente tempo de retenção, indicando que outros componentes não interferem de forma significativa no perfil do pico de β -ecdisona.

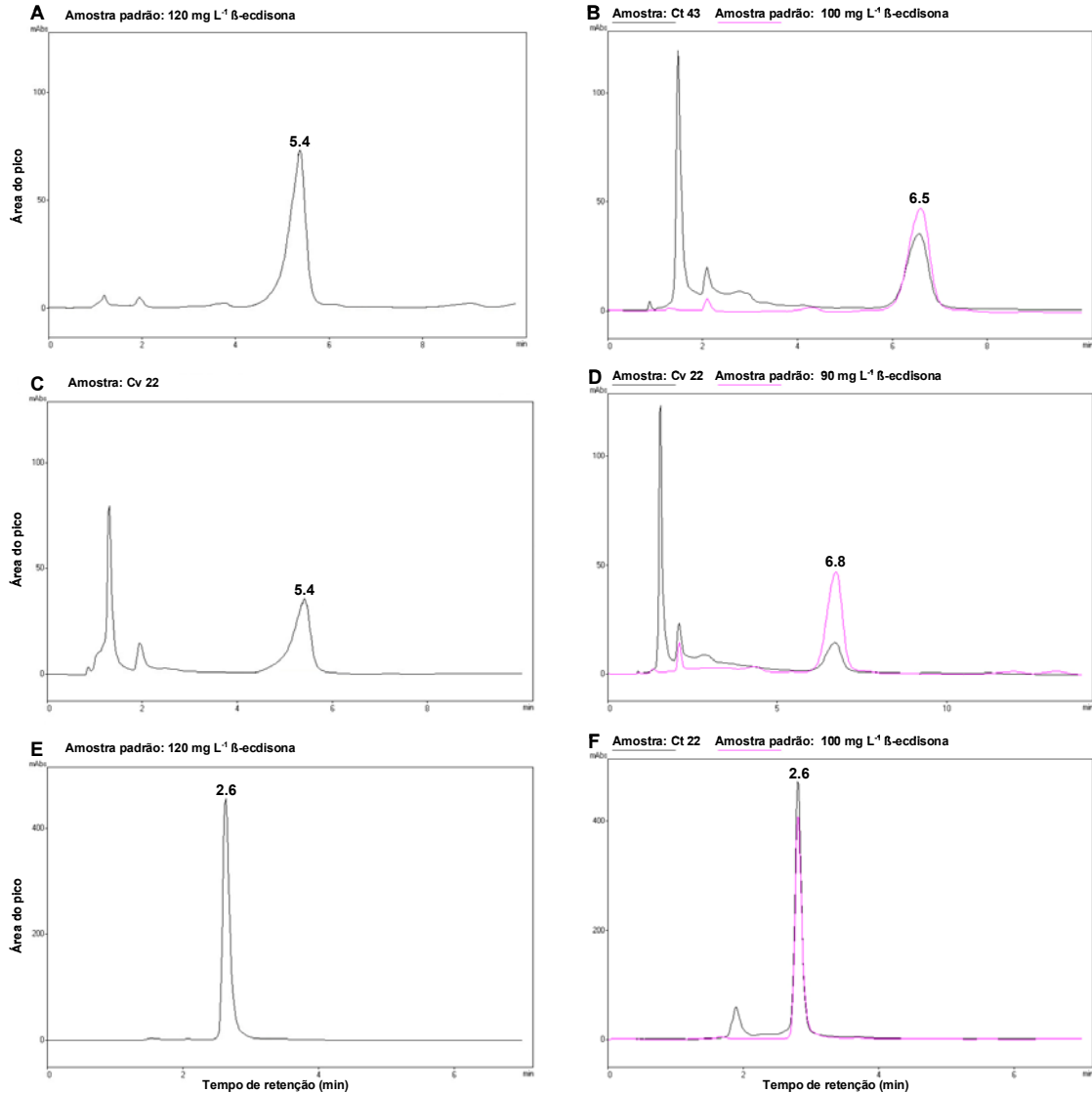


Figura 1. Cromatogramas obtidos por HPLC com leitura em $\lambda = 245$ nm. **A.** amostra padrão de 120 mg L^{-1} de β -ecdisona na fase móvel metanol(50):água(50); **B.** amostra do extrato metanólico da folha (Ct 43) com 240 dias de cultivo; **C.** amostra do extrato metanólico da inflorescência (Cv 22) com 360 dias; **D.** amostra do extrato metanólico da inflorescência (Cv 22) com 240 dias; **E.** amostra padrão de 120 mg L^{-1} de β -ecdisona na fase móvel metanol (100 %); **F.** amostra do extrato metanólico da raiz (Ct 22) com 240 dias.

O coeficiente de correlação determinado entre a produção de massa seca (raízes e inflorescências), teor de β -ecdisona (inflorescência, folhas e raízes) e índice de nematóides aos 240 dias demonstrou que houve relação entre as características avaliadas (Quadro 3).

Valores significativos de correlação para teor de β -ecdisona foram detectados em vários caracteres, destacando-se os maiores valores entre: índice de nematóide e % β -ecdisona na raiz; % β -ecdisona na raiz e massa seca de raiz; e, % β -ecdisona na

inflorescência e % β -ecdisona na folha (Quadro 3).

Foi estabelecida correlação positiva e relevante com % β -ecdisona no sistema radicular, demonstrando incremento no teor de β -ecdisona na presença de nematóides. Entretanto, correlação negativa foi observada para massa seca da raiz e % de β -ecdisona na inflorescência (Quadro 3), ou seja, a tendência estabelecida na presença de nematóides foi a diminuição na produção de massa seca da raiz e no teor de β -ecdisona nas inflorescências.

Quadro 3. Correlação das características analisadas em plantas aclimatizadas de *P. glomerata* após propagação via enxertia *in vitro*, utilizando o Coeficiente de Correlação de Pearson (CCP)

Variáveis	CCP	
	240 dias	360 dias
Índice de nematóide X % β -ecdisona na raiz	0,635 **	-
Índice de nematóide X massa seca de raiz	-0,484 **	-
Índice de nematóide X % β -ecdisona na inflorescência	-0,310 *	-
Índice de nematóide X massa seca de inflorescência	0,233 ns	-
Índice de nematóide X % β -ecdisona na folha	0,059 ns	-
% β -ecdisona na raiz X massa seca de raiz	-0,787 **	-0,553 **
% β -ecdisona na raiz X % β -ecdisona na inflorescência	0,019 ns	-0,480 **
% β -ecdisona na raiz X massa seca de inflorescência	0,532 **	-0,330 *
% β -ecdisona na raiz X % β -ecdisona na folha	0,402 **	-
Massa seca da raiz X % β -ecdisona na inflorescência	0,089 ns	0,347 **
Massa seca da raiz X massa seca da inflorescência	-0,398 **	0,167 ns
Massa seca da raiz X % β -ecdisona na folha	-0,456 **	-
% β -ecdisona na inflorescência X massa seca da inflorescência	0,272 ns	-0,053 ns
% β -ecdisona na inflorescência X % β -ecdisona na folha	0,649 **	-
Massa seca da inflorescência X % β -ecdisona na folha	0,500 **	-

** , * : significativo a 1 e 5% de probabilidade pelo teste t; ^{NS}: não significativa; -: variáveis não correlacionadas.

A correlação negativa observada entre % β -ecdisona na raiz e massa seca da raiz, indicou que quanto maior a produção de massa, menor o acúmulo de % β -ecdisona na raiz (Quadro 3). Seguindo a mesma tendência nos dois períodos de cultivo. Não houve correlação entre % β -ecdisona da raiz e da inflorescência com 240, mas com 360 dias a correlação estabelecida foi negativa, indicando que as plantas que apresentaram maiores

teores do princípio ativo na raiz tendem a apresentar menores teores na inflorescência.

Com 240 dias de cultivo o % β -ecdisona na raiz apresentou correlação positiva tanto com a massa seca da inflorescência quanto com o % de β -ecdisona na folha. No entanto, houve inversão na correlação estabelecida com a massa seca da inflorescência, passando a ser negativa aos 360 dias (Quadro 3).

A correlação entre a massa seca da raiz e % β -ecdisona na inflorescência foi significativa e positiva apenas aos 360 dias. No entanto, a correlação da massa da raiz com a massa da inflorescência e com % β -ecdisona na folha foi negativa (Quadro 3).

Foi observada também correlação positiva entre o percentual de β -ecdisona na folha, com o percentual de β -ecdisona na inflorescência e com a massa seca da inflorescência (Quadro 3).

Todas as correlações estabelecidas nos dois períodos de cultivo sofreram variações (Quadro 3), indicando alterações que podem ter sido influenciadas tanto pelo tempo quanto pela época de cultivo das plantas.

As características índice de nematóide e % β -ecdisona na raiz, % β -ecdisona na raiz e massa seca da raiz, % β -ecdisona na inflorescência e % β -ecdisona na folha, e, massa seca da inflorescência e % β -ecdisona na folha, apresentaram os maiores valores de correlação e significativos a 1%, refletindo as relações entre as características do grupo dos tratamentos avaliados.

Discussão

Ecdisteróides são encontrados em algumas espécies de certos gêneros da família Amaranthaceae em teores consideráveis (Savchenko et al., 1998), incluindo o gênero *Pfaffia* (Nishimoto et al., 1987; 1988; Shiobara et al., 1993; Baltaev, 2000). Dentre as espécies encontra-se *P. glomerata* (Shiobara et al., 1993), cuja determinação do teor de β -ecdisona, ecdisteróide de interesse, vem sendo realizada principalmente nas raízes.

Os resultados deste experimento demonstraram que as folhas e inflorescências de *P. glomerata*, independente do tratamento submetido, apresentaram os maiores teores de β -ecdisona, quando comparados com o sistema radicular. A maior produção deste ecdisteróide na parte aérea de espécies do gênero foi relatada inicialmente em *P. iresinoides*, que apresentou maior produção nas folhas (0,92%) quando comparada às raízes (0,62%) e caule (0,17%) (Nishimoto et al., 1987). Dados semelhantes foram obtidos para *P. tuberosa* e *P. glomerata* (Flores, 2006), corroborando com os dados obtidos neste estudo para folhas e inflorescências (Festucci-Buselli, 2008; Festucci-Buselli et al., 2008). Em *Potamogeton pectinatus* os maiores níveis de ecdisteróides foram observados nos órgãos reprodutivos e nas partes jovens da planta (Chadin et al., 2003).

Os diferentes órgãos da planta diferem na capacidade de acumular ecdisteróides (Tomás et al., 1992; 1993; Savchenko et al., 1998). Em geral, alguns tecidos/órgãos contêm maior concentração destes, no entanto, a expressão dos genes envolvidos na sua biossíntese e acúmulo não foi totalmente esclarecida (Dinan, 2001). Esses metabólitos, podem exercer papel ecológico na proteção de órgãos suscetíveis ao ataque de insetos (Savchenko et al., 1998; 2001). Tal papel de proteção contra a herbivoria, atribuído aos fitoecdisteróides, foi verificado apenas no acesso 2209-09 de *P. glomerata*. No outro acesso, embora tenha apresentado maior concentração de β -ecdisona nas folhas, foram observados danos nas folhas, caules e nos ápices.

Os acessos utilizados neste experimento, apresentam características morfológicas distintas, dentre estas, a visível diferença relativa ao número de tricomas, o acesso 2209-09 apresenta folhas e caules extremamente pilosos, enquanto o acesso 2202-15 o número de tricomas é reduzido. Dessa forma, a secreção de compostos através dessas estruturas secretoras, como forma de defesa ao ataque de insetos, pode exercer importante papel ecológico em *P. glomerata*, atribuído aos fitoecdisteróides, bem como pode ser uma forma de extravasamento deste material, resultando na diminuição do teor de β -ecdisona nas folhas do acesso 2209-09. No entanto, estudos específicos devem ser

conduzidos com este objetivo.

A concentração e a natureza química dos fitoecdisteróides nas plantas podem variar de acordo com a parte da planta, estágio de desenvolvimento e condições ambientais (Dinan, 2001), e inclusive ter implicações biossintéticas (Tomás et al., 1993). A evidência é o acúmulo gradual com maior concentração em diferentes tecidos da planta, pois são biossintetizados, transportados e acumulados em diferentes órgãos (Dinan, 2001; Tomás et al., 1992).

Plantas perenes podem reciclar seus ecdisteróides entre os órgãos decíduos e perenes para outra estação de crescimento (Adler & Grebenok, 1995). A época de colheita pode influenciar diretamente no conteúdo do princípio ativo, pois decréscimo progressivo no conteúdo de ecdisteróides ocorre das folhas novas para as maduras, onde a translocação dos metabólitos pode acontecer (Tomás et al., 1992). Assim, as diferenças fenológicas existentes entre os acessos envolvidos na enxertia podem ter contribuído de forma significativa na concentração de β -ecdisona na parte aérea das plantas. Os tratamentos que apresentaram maiores massa seca e teores do princípio ativo nas inflorescências contrastaram com menor teor desse princípio nas folhas. As diferenças não foram estabelecidas pelas combinações na enxertia e sim pelo acesso que constituiu a parte aérea das plantas.

A maioria dos compostos presentes na parte aérea de *P. glomerata* devem ser translocados para as raízes, seu principal órgão de reserva, antes da senescência foliar e floral. A espécie ao fim do ciclo anual perde praticamente todas as folhas (Côrrea Júnior; 2003; Ming & Corrêa Jr., 2004; Mattos & Salis, 2005), sendo constatada diminuição no teor de β -ecdisona nas raízes na época da máxima produção de inflorescência (Guerreiro, 2006).

O aumento nos teores de β -ecdisona encontrado nas raízes de *P. glomerata* infectadas por nematóides corroboram com os resultados obtidos por Carneiro et al. (2007) para a espécie, assim como para *Pfaffia paniculata* parasitadas por *Meloidogyne javanica*. No entanto, estes autores apontam para um aumento relativo em *P. glomerata*, uma vez que o nematóide reduziu significativamente a massa fresca das raízes parasitadas. Essa característica não foi possível observar em nosso experimento devido a contaminação integral dos tratamentos cujo sistema radicular foi constituído pelo acesso 2202-15.

A alta atividade biológica dos ecdisteróides sugere um papel de defesa contra ataque de insetos e nematóides, assim como funções fisiológicas e bioquímicas nas plantas (Tomás et al., 1993), podendo ser utilizado como base para o desenvolvimento

de cultivares resistentes (Soriano et al., 2004). O estímulo ao aumento no teor de β -ecdisona pode estar relacionado à resposta química da planta ao ataque dos nematóides (Carneiro et al., 2007), pois este composto é induzido por insetos e nematóides (Soriano et al., 2004). Em espinafre, o acúmulo de ecdisteróides nas raízes foi induzido por insetos (Schmelz et al., 1999) ou por danos mecânicos (Schmelz et al., 1998). Associado às características genéticas, estes fatores podem ter contribuído diretamente na maior produção do princípio ativo no acesso 2202-15 nas folhas pelo ataque de insetos, e nas raízes pela presença de nematóides. Nas inflorescências, ao contrário, não foram observados danos físicos em nenhum dos tratamentos analisados.

O estado fisiológico da planta tem forte efeito no conteúdo total de fitoecdisteróide (Tomás et al., 1992). A interação fisiológica nas plantas enxertadas foi observada com o aumento no teor do princípio ativo nas raízes da enxertia entre 2209-09 (hipobioto) e 2202-15 (epibioto), no entanto, este não resultou na melhor produtividade, uma vez que a produção de massa seca da raiz foi diretamente afetada nesta combinação. Confirmando a influência recíproca entre hipo e epibioto na produtividade do sistema radicular.

Os hipobiotos afetam diretamente o vigor da copa enxertada, estando diretamente relacionados ao genótipo e suas relações, induzindo diferenças marcantes também na produção (Schäfer et al., 2001). Como os acessos combinados de *P. glomerata* apresentam diferenças morfológicas, genéticas e químicas (Kamada, 2006), as respostas obtidas ressaltam a interação existente entre hipo e epibioto, tanto na produção da massa seca do sistema radicular, quanto no teor do princípio ativo.

As variações no conteúdo de β -ecdisona presentes nas raízes de diferentes acessos de *P. glomerata* são atribuídas, principalmente, à variabilidade genética das plantas, a condições ambientais de cultivo (solo, clima, manejo da cultura, época de colheita, etc.) e até mesmo a diferenças na metodologia de análise (Magalhães, 2000; Corrêa Jr., 2003; Figueiredo et al., 2004). Neste experimento, as mesmas condições foram estabelecidas para todos os tratamentos, dessa forma, a diferença genética e a interação fisiológica das partes envolvidas na enxertia influenciaram o desenvolvimento das plantas.

Diferentes espécies podem sintetizar ecdisteróides em vários órgãos e distribuí-los para outros (Adler & Grebenok, 1995). O conteúdo de ecdisteróides nas plantas varia de traços para várias percentagens, usualmente ocorre na ordem de 0,01-0,1% do peso seco da planta (Baltaev, 2000; Dinan, 2001), podendo alcançar concentrações de cerca de 1-2% (Lafont, 1998; Dinan, 2001; Lafont & Dinan, 2003). Porém, espécies com habilidade de biossintetizar maiores níveis de ecdisteróides (0.1-3.0%) são classificadas

como superacumuladoras (Timofeev, 2007).

As raízes de *P. glomerata*, sem contaminação por nematóide, apresentaram teores de β -ecdisona compatíveis com o padrão de variação (0,15% - 0,76%) observado por diversos autores em diferentes acessos e condições de cultivo (Montanari Jr. et al., 1999; Corrêa Jr., 2003; Figueiredo et al., 2004; Freitas et al., 2004; Marques et al., 2004; Guerreiro, 2006; Kamada, 2006; Zimmer et al., 2006). Em amostras comerciais o teor de β -ecdisona flutua entre 0,3-0,5% (Figueiredo et al., 2004).

O teor de β -ecdisona nas raízes de *P. glomerata* tem sido um indicador de qualidade das raízes produzidas (Montanari et al., 1999; Magalhães, 2000), dessa forma, os trabalhos agrônômicos, em sua maioria, realizam abordagens químicas, sendo constatados uma diversidade de valores em função da variabilidade existente entre populações de *P. glomerata*.

A quantidade de β -ecdisona observada nas raízes de *P. glomerata* não infectadas, encontra-se entre os típicos padrões de registro na literatura. No entanto, os dados observados na parte aérea e raízes infectadas por nematóides superam os referidos índices. Acessos que apresentam maior produção de massa seca da raiz ou teores elevados de β -ecdisona, não resultam necessariamente, naqueles com maior produção total de β -ecdisona/planta, pois a produtividade é dependente de ambos os fatores. Dessa forma, os maiores teores do princípio ativo na parte aérea não refletem maior produtividade do órgão, devido à proporção de massa seca produzida. Sendo assim, o sistema radicular continua sendo o principal órgão de interesse da espécie.

A produção de raízes em *P. gomerata* pode ser influenciada por condições de solo, clima e até fatores genéticos (Mattos & Salis, 2004). Todas as correlações estabelecidas nos dois períodos de cultivo analisados neste experimento sofreram variações, indicando alterações que podem ter sido influenciadas tanto pelo tempo quanto pela época de cultivo das plantas.

Dentre as características dos materiais utilizados em programas de melhoramento, inclui-se resistência a fungos e nematóides, e alto conteúdo de β -ecdisona (Alves et al., 2006). Dessa forma, a redução na produção de massa seca da raiz do acesso 2209-09 quando combinado com o acesso 2202-15, não se torna uma barreira para a realização da enxertia em *P. glomerata*, uma vez que o teor de β -ecdisona nesta combinação foi superior aos demais tratamentos constituído pelo acesso 2209-09 no sistema radicular. A produtividade por planta foi menor, entretanto, houve maior concentração de β -ecdisona, essa característica é relevante para a indústria, pois o seu maior interesse é a obtenção de produtos de qualidade com altos índices na obtenção do princípio ativo.

Kamada (2006), analisando os mesmos acessos utilizados neste experimento, obteve em oito meses de cultivo maior massa seca das raízes, no entanto, o teor de β -ecdisona foi menor. Estes dados explicam a grande influência que os tratamentos culturais, época de cultivo e colheita podem exercer sobre a produtividade de um mesmo acesso de *P. glomerata*, bem como, cabe ressaltar a presença de nematóides no acesso 2202-15, não constatado por Kamada (2006). As raízes de *P. glomerata* respondem às variações sazonais (Côrrea Jr., 2003; Vigo et al., 2004), influenciando na produtividade em fitomassa e no teor de β -ecdisona, sendo os melhores resultados obtidos aos 12 meses de cultivo (Côrrea Jr.; 2003).

A maior concentração de ativos ocorre no inverno e na primavera (Vigo et al., 2004). Na primavera a planta direciona suas reservas para o desenvolvimento vegetativo (Côrrea Jr., 2003). Doses de adubação e a idade da colheita das plantas não influenciaram o teor de β -ecdisona, mas a quantidade de β -ecdisona por planta (Guerreiro, 2006). Ensaio de campo demonstram que o teor de β -ecdisona se apresenta constante (em torno de 0,7 %) em plantas com um ano e mantêm-se em plantas com dois e três anos de idade (Montanari Jr. et al., 1999). Por isso, recomenda-se que a colheita das raízes de *P. glomerata* seja realizada ao final do inverno, depois de 1, 2 ou 3 anos, quando as reservas sintetizadas pela planta já foram translocadas para as raízes (Magalhães, 2000). O que pode justificar o significativo aumento tanto no teor quanto na quantidade de β -ecdisona nas raízes no intervalo de 240 e 360 dias de cultivo, neste experimento. No entanto, não existem estudos sobre o local de biossíntese dos fitoecdisteróides na espécie.

Embora a correlação positiva entre a parte aérea de *P. glomerata* com a massa seca de raízes por planta e com o índice de colheita tenha sido relatada (Montanari Jr. & Perecin, 2006), e entre o peso de matéria seca de raiz e o teor de β -ecdisona nas raízes (Figueiredo et al., 2004), neste experimento essa correlação foi negativa. No entanto, a contaminação por nematóide deve ter influenciado de forma decisiva nestes resultados, uma vez que alta correlação positiva foi observada entre o índice de nematóides e a produção de β -ecdisona nas raízes.

Comparando as quantidades de β -ecdisona por planta encontrada nesse experimento com resultados obtidos por Figueiredo et al. (2004) e Guerreiro (2006), observa-se semelhança aos 240 dias, no entanto, aos 360 dias os valores são superiores, para a produção de massa seca das raízes, porém trata-se de acessos diferentes.

Como já mencionado, o local de biossíntese de fitoecdisteróides nas plantas não é conhecido, pois as rotas não estão definidas. A presença de fitoecdisteróides em várias

partes das plantas em concentrações muito diferentes não permite tirar qualquer conclusão sobre o tecido ou órgão nos quais estes compostos são produzidos (Tomás et al., 1993; Dinan, 2001).

Notável diferença no conteúdo e distribuição de ecdisteróides em todas as partes dos tecidos de *Ajuga reptans* foi observada, sendo que o baixo conteúdo nas folhas de plantas propagadas *in vitro* pode indicar que as raízes são o mais provável sítio de produção (Tomás et al., 1992). O fato das raízes que produziram brotações apresentarem conteúdos superiores àquelas que não produziram, sugere que a atividades nas folhas podem ser dependente de algum produto intermediário da raiz ou que desta maneira o aumento no resultado dos brotos produz composto estimulatório (Tomás et al., 1993).

O cultivo *in vitro* de raízes e brotos de *A. reptans* revelou que as raízes produziram ecdisteróides quando cultivadas isoladamente, sendo que estes compostos não foram detectados nas culturas com ausência de raiz, revelando que os fitoecdisteróides em *A. reptans* são biossintetizados nas raízes (Tomás et al., 1992; 1993). Nesta espécie a produção de β -ecdisona está diretamente associada com o crescimento das raízes, sendo um processo dinâmico durante o desenvolvimento e que ocorre provavelmente em órgãos ou tecidos específicos (Matsumoto & Tanaka, 1991).

Em *Gomphrena* spp. (Amaranthaceae) entre os diferentes órgãos da planta analisados (sementes, raízes, caules, folhas e inflorescências), as sementes apresentaram os maiores, e as raízes os menores, níveis de ecdisteróides, apesar da significância biológica não ser clara, pode indicar que as folhas e raízes são os maiores sítios do metabolismo (Savchenko et al., 1998).

A produção de β -ecdisona em calos de *P. tuberosa* cultivados *in vitro* foi influenciada pela presença de brotações e pela concentração de auxina no meio nutritivo, sendo os tratamentos com maiores frequências de regeneração os maiores produtores (Flores, 2006). No entanto, em *P. glomerata* o acúmulo de β -ecdisona nos calos parece estar associado à friabilidade e à presença de brotações, as quais são determinadas pelas combinações e concentrações de diferentes fitorreguladores no meio de cultura, sendo os maiores teores detectados em calos isentos de raízes (Flores, 2006). Esta autora sugere a possibilidade da parte aérea ser um dos principais locais de biossíntese dos ecdisteróides em *P. glomerata*.

O balanço auxina/citocinina pode ser um fator determinante na rota biossintética de β -ecdisona em *P. glomerata*, podendo ser um dos fatores de influência nas diferenças observadas nas plantas enxertadas.

Se os metabólitos são produzidos principalmente nas raízes e transportados para as folhas, ou se, são biossintetizados nas folhas e seletivamente transportados das folhas para as raízes e toda a planta, é uma questão aberta para futuras discussões. Portanto, cabe ressaltar que a produção do princípio ativo na parte aérea de *P. glomerata* se manteve estável e semelhante ao material testemunha do acesso que a constituía, enquanto que, nas raízes foram observadas alterações no padrão de produtividade de acordo com as combinações realizadas na enxertia. Indicando que a parte aérea da planta está diretamente associada a produção dos compostos de interesse da espécie, seja por indução de estímulos ou mesmo como local de síntese. No entanto, estudos visando esclarecer a rota biossintética dos ecdisteróides em *P. glomerata* são necessários para se obter uma resposta conclusiva.

Da mesma forma, estudos posteriores devem ser conduzidos a fim de examinar os tricomas em *P. glomerata*, correlacionando com o papel ecológico dos fitoecdisteróides, o que pode contribuir para o esclarecimento do local de síntese desses compostos na espécie. Bem como, são necessários estudos visando quantificar os constituintes químicos e relacioná-los com os nematóides no sistema radicular, o que possibilitará futuros trabalhos de otimização na produção do princípio ativo, que é de grande interesse no mercado mundial.

Referências Bibliográficas

- ADLER, J.H. GREBENOK, R.J. 1995. Biosynthesis and distribution of insect-molting hormones in plants – a review. **Lipids**, 30:257-262.
- ALVES, R.B.N.; MENDES, R.A.; MENDES, M.A.; CARNEIRO, R.M.D.G.; SILVA, D.B.; CARDOSO, L.D.; SALOMÃO, A.N.; VIEIRA, R.F. 2006. Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] germplasm conservation. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 8 (Esp.):1-4.
- BALTAEV, U.A. 2000. Phytoecdysteroids: structure, sources, and biosynthesis in plants. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, 26:799-831.
- BANDEIRA, F.S.; XAVIER, A.; OTONI, W.C.; DIAS, J.M.M. 2006. Enxertia *in vitro* na propagação de clones de *Eucalyptus urophylla* e *E.grandis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 41:223-232.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; MESQUITA, L.F.G.; CIROTTO, P.A.S.; PEREIRA, S.I.V.; PEREIRA, P.S.; SILVA, D.B.; VIEIRA, R.F. 2007. Detecção de *Meloidogyne* spp. em *Pfaffia* spp. no Distrito Federal e patogenicidade de *M. javanica* a *Pfaffia glomerata* e *P. paniculata*. **Nematologia Brasileira**, 30:159-163.
- CHADIN, I.; VOLODIN, V.; WHITING, P.; SHIRSHOVA, T.; KOLEGOVA, N.; DINAN, L. 2003. Ecdysteroid content and distribution in plants of genus *Potamogeton*. **Biochemical Systematics and Ecology**, 31:407-415.
- CORRÊA JR., C. 2003. **Estudo agrônômico de fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]: sazonalidade na produção de raízes e conteúdos de β -ecdisona em diferentes acessos de São Paulo, Paraná e Mato Grosso do Sul**. Tese de doutorado (Horticultura). UNESP/Botucatu, 96p.
- CORRÊA JR., C.; CORTEZ, D.A.G.; MING, L. C.; SOARES, W. 2006. **Fáfia – O ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Sprengel) Pedersen): Aspectos Agrônômicos e Fitoquímicos**. Curitiba: Clichetec, 22p.
- CORTEZ, D.A.G.; TRUITI, M.C.T.; CORTEZ, L.E.R. 1998. Ginseng brasileiro: revisão bibliográfica. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, 2:299-306.
- CRUZ, C.D. 2006. **Programa GENES. Versão Windows**. Editora UFV, Minas Gerais. 642p., (Versão 2006.4.1).
- DINAN, L. 2001. Phytoecdysteroids: biological aspects. **Phytochemistry**, 57:325-339.
- ERREA, P.; FELIPE, A.; HERRERO, M. 1994. Graft establishment between compatible and incompatible *Prunus* spp. **Journal of Experimental Botany**, 45:393-401.
- ERREA, P.; GARAY, L.; MARÍN, J.A. 2001. Early detection of graft incompatibility in apricot (*Prunus armeniaca*) using *in vitro* techniques. **Physiologia Plantarum**, 112:135-141.
- FESTUCCI-BUSELLI, R.A. 2008. **Accumulation pattern of the phytoecdysteroid 20-hydroxyecdysone in different organs of *Pfaffia glomerata***. Doutorado em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa, MG. 83p.
- FESTUCCI-BUSELLI, R.A.; CONTIM, L.A.S.; BARBOSA, L.C.A.; STUART, J.J.; VEIRA, R.F.; OTONI, W.C. 2008. Level and distribution of 20-hydroxyecdysone during *Pfaffia glomerata* development. **Botany**, 86:978-987.
- FIGUEIREDO, L.S.; TEIXEIRA, S.L.; FREITAS, S.P.; VIEIRA, I.J.C.; MARTINS, E.R. 2004. Comportamento de acessos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae) nas condições de Campos dos Goytacazes – RJ. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 7:67-72.
- FLORES, R. 2006. **Cultura de tecidos e produção de β -ecdisona em *Pfaffia glomerata* e *Pfaffia tuberosa* (Amaranthaceae)**. Doutorado (Agronomia), Universidade Federal de Santa Maria, RS. 168p.

- FREITAS, C.S.; BAGGIO, C.H.; SILVA-SANTOS, J.E.; RIECK, L.; SANTOS, C.A.M.; CORRÊA JUNIOR, C.; MING, L.C.; CORTEZ, D.A.G.; MARQUES, M.C.A. 2004. Involvement of nitric oxide in the gastroprotective effects of an aqueous extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, Amaranthaceae, in rats. **Life Sciences**, 74:1167-1179.
- GOMES, A.C.M.M.; MATTOS, J.C.; CIROTO, P.A.S.; CARNEIRO, R.M.D.G. 2006. Resistência de acessos de *Pfaffia glomerata* a *Meloidogyne incognita* Raça 1. **Nematologia Brasileira**, 30:189-194.
- GUERREIRO, C.P.V. 2006. **Análise de crescimento, curva de absorção de macronutrientes (N, P e K) e teor de β -ecdisona em fáfia (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen): em função de adubação orgânica.** Mestrado (Agronomia/Horticultura), Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 124p.
- KAMADA, T. 2006. **Avaliação da diversidade genética de populações de fáfia (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) por RAPD, caracteres morfológicos e teor de β -ecdisona.** Doutorado (Genética e Melhoramento), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 106p.
- LAFONT, R. 1998. Phytoecdysteroids in the World flora: diversity, distribution, biosynthesis and evolutions. **Russian Journal of Plant Physiology**, 45:276-295.
- LAFONT, R.; DINAN, L. 2003. Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: and update. **Journal of Insect Science**, 3:7, Available online: insectscience.org/3.7.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. 2002. **Plantas medicinais no Brasil – nativas e exóticas.** Nova Odessa: Instituto Plantarum. p.45-46.
- LOU, J.; GOULD, J.H. 1999. *In vitro* shoot-tip grafting improves recovery of cotton plants from culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 57:211-213.
- MAGALHÃES, P.M. 2000. Agrotecnología para el cultivo de fáfia o ginseng brasileiro. In: MARTÍNEZ, J.V.; BERNAL, H.Y.; CÁCERES, A. **Fundamentos de Agrotecnología de cultivo de plantas medicinales iberoamericanas.** Colombia: Convenio Andres Bello e CYTED (Serie Ciencia Y Tecnología, N° 83). p. 323-332.
- MARQUES, L.C.; GALVÃO, S.M.P.; ESPÍNOLA, E.; DIAS, R.F.; MATTEI, R.; OLIVEIRA, M.G.M.; CARLINI, E.L.A. 2004. Psychopharmacological assessment of *Pfaffia glomerata* roots (Extract BNT-08) in rodents. **Phytotherapy Research**, 18:566-572.
- MATSUMOTO, T.; TANAKA, N. 1991. Production of phytoecdysteroids by hairy root cultures os *Ajuga reptans* var. *atropurpurea*. **Agricultural and Biological Chemistry**, 55:1019-1025.
- MATTOS, P.P.; SALIS, S.M. 2004. Características de *Pfaffia glomerata* (Sprengel) Pedersen cultivada no Pantanal, sub-região do Paraguai, Corumbá, Mato Grosso do Sul. **IV Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-econômico do Pantanal**, Corumbá, 7p.
- MATTOS, P.P.; SALIS, S.M. 2005. Resultados preliminares do plantio de Ginseng-do-Pantanal (*Pfaffia glomerata*) no Pantanal. **Embrapa: Comunicado Técnico 49**. 4p.
- MING, L.C.; CORRÊA JR, C. 2002. Collection of fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] in north-western state of Paraná - Brazil. **Acta Horticulturae**, 576:29-32.
- MING, L.C.; CORRÊA JR, C. 2004. Evaluation of the development of fáfia - *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Acta Horticulturae**, 629:273-275.
- MONTANARI JR., I.; MAGALHAES, P.M.; QUEIROGA, C. L. 1999. Influence of plantation density and cultivation cycle on root productivity and tenors of b-ecdysone in *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Acta Horticulturae**, 502(3):125-128, 1999.
- MONTANARI JR., I.; PERECIN, M.B. 2006. Evaluation of morphological and agricultural characteristics and their phenotypic correlations in genotypes of a *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen population. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, 8(esp.):46-48.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15:473-497.

- NAKAI, S.; TAKAGI, N.; MIICHI, H.; HAYASHI, S.; NISHIMOTO, N.; TAKEMOTO, T.; KIZU, H. 1984. Pfaffosides, nortriterpenoid saponins, from *Pfaffia paniculata*. **Phytochemistry**, 23(8):1703-1705.
- NASCIMENTO, E.X.; MOTA, J.H.; VIEIRA, M.C.; ZÁRATE, N.A.H. 2007. Produção de biomassa de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Plantago major* L. em cultivo solteiro e consorciado. **Ciência e Agrotecnologia**, 31:724-730.
- NISHIMOTO, N.; NAKAI, S.; TAKAGI, N.; HAYASHI, S.; TAKEMOTO, T.; ODASHIMA, S.; KIZU, H.; WADA, Y. 1984. Pfaffosides and nortriterpenoid saponins from *Pfaffia paniculata*. **Phytochemistry**, 23(1):139-142.
- NISHIMOTO, N.; SHIOBARA, Y.; FUJINO, M.; INOUE, S-S.; TAKEMOTO, T.; OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K.; HASHIMOTO, G.; TANAKA, O.; KASAI, R.; MATSUURA, H. 1987. Ecdysteroids from *Pfaffia iresinoides* and reassignment of some ¹³C-NMR chemical shifts. **Phytochemistry**, 26(9):2505-2507.
- NISHIMOTO, N.; SHIOBARA, Y.; INOUE, S-S.; FUJINO, M.; TAKEMOTO, T.; YEOH, C.L.; OLIVEIRA, F. de; AKISUE, G.; AKISUE, M.K.; HASHIMOTO, G. 1988. Three ecdysteroid glycosides from *Pfaffia iresinoides*. **Phytochemistry**, 27(6):1665-1668.
- OLIVEIRA, I.V.M.; DAMIÃO, C.F.; CARVALHO, S.A. 2002. Enxertia em citros por substituição de ápice caulinar. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 24:744-747.
- PINA, A.; ERREA, P. 2005. A review of new advances in mechanism of graft compatibility-incompatibility. **Scientia Horticulturae**, 106:1-11.
- PINA, A.; ERREA, P. 2008. Influence of graft incompatibility on gene expression and enzymatic activity of UDP-glucose pyrophosphorylase. **Plant Science**, Article in press.
- RATES, S.M.K.; GOSMANN, G. 2002. Gênero *Pfaffia*: aspectos químicos, farmacológicos e implicações para seu emprego terapêutico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 12(2):85-93.
- SANCHES, N.R.; GALLETTO, R.; OLIVEIRA, C.E.; BAZOTTE, R.B.; CORTEZ, D.A.G. 2001. Avaliação do potencial anti-hiperglicemiante da *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). **Acta Scientiae**, 23(2):613-617.
- SHIOBARA, Y.; INOUE, S-S.; NISHIGUCHI, Y.; KATO, K.; TAKEMOTO, T.; NISHIMOTO, N.; OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K.; HASHIMOTO, G. 1992. Pfaffane-type nortriterpenoids from *Pfaffia pulverulenta*. **Phytochemistry**, 31(5):1737-1740.
- SHIOBARA, Y.; INOUE, S-S.; KATO, K.; NISHIGUCHI, Y.; TAKEMOTO, T.; OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K.; HASHIMOTO, G. 1993. Pfaffane-type nortriterpenoids from *Pfaffia pulverulenta*. **Phytochemistry**, 33(4):897-899.
- SIQUEIRA, J.C. 1988. Considerações taxonômicas sobre as espécies brasileiras do gênero *Pfaffia* Mart. (Amaranthaceae). **Acta Biologica Leopoldensia**, 10(2):269-278.
- SMITH, L.B.; DOWNS, R.J. 1998. *Amaranthaceae*. In: Reitz PR, ed. **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí, Brazil: Herbário Barbosa Rodrigues.
- SAVCHENKO, T.; WHITING, P.; SARKER, S.D.; DINAN, L. 1998. Distribution and identity of phytoecdysteroids in *Gomphrena* spp. (Amaranthaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, 26:337-346.
- SAVCHENKO, T.; BLACKFORD, M.; SARKER, S.D.; DINAN, L. 2001. Phytoecdysteroids from *Lamium* spp: identification and distribution within plants. **Biochemical Systematics and Ecology**, 29:891-900.
- SCHÄFER, G.; BASTIANEL, M.; DORNELLES, A.L.C. 2001. Porta-enxertos utilizados na citricultura. **Ciência Rural**, 31:723-733.
- SCHMELZ, E.A.; GREBENOK, R.J.; GALBRAITH, D.W.; BOWERS, W.S. 1998. Damage-induced accumulation of phytoecdysteroids in spinach: a rapid root response involving the octadecanoic acid pathway. **Journal of Chemical Ecology**, 24:339-360.

- SCHMELZ, E.A.; GREBENOK, R.J.; GALBRAITH, D.W.; BOWERS, W.S. 1999. Insect-induced synthesis of phytoecdysteroids in spinach, *Spinacia oleracea*. **Journal of Chemical Ecology**, 25:1739-1757.
- SORIANO, I.R.; RILEY, I.T.; POTTER, M.J.; BOWERS, W.S. 2004. Phytoecdysteroids: a novel defense against plant-parasitic nematodes. **Journal of Chemical Ecology**, 30:1885-1898.
- TASCETTO, O.M.; PAGLIARINI, M.S. 2003. Chromosome numbers in Brazilian and Argentine populations of *Pfaffia glomerata* (Amaranthaceae). **Cytologia**, 68: 147–152.
- TANIGUCHI, S.F.; BERSANI-AMADO, C.A.; SUDO, L.S.; ASSEF, S.M.C.; OLGA, S. 1997. Effect of *Pfaffia iresinoides* on the experimental inflammatory process in rats. **Phytotherapy Research**, 11:568-571.
- TAKEMOTO, T.; NISHIMOTO, N.; TAKAGI, N.; HAYASHI, S.; ODASHIMA, S.; WADA, Y. 1983. Pfaffic acid, a novel nortriterpene from *Pfaffia paniculata* Kuntze. **Tetrahedron Letters**, 24:1057-1060.
- TIMOFEEV, N. 2007. **Studies on ecdysteroids: usage in medicine, internet-resources, sources, and biological activity – Phyto-Ecdysteroids and their sources – Part II.** 25p. Disponível em: http://leuzea.ru/leuzea_ecdysteroids.htm. Acesso em 28.11.2007.
- TOMÁS, J.; CAMPS, F.; CLAVERIA, E.; COLL, J.; MELÉ, E.; MESSEGUER, J. 1992. Composition and location of phytoecdysteroids in *Ajuga reptans* *in vivo* and *in vitro* cultures. **Phytochemistry**, 31:1585-1591.
- TOMÁS, J.; CAMPS, F.; COLL, J.; MELÉ, E.; MESSEGUER, J. 1993. Phytoecdysteroid production by *Ajuga reptans* tissue culture. **Phytochemistry**, 32:317-324.
- VIEIRA, R.F.; SILVA, S.R.; ALVES, R.B.N.; SILVA, D.B.; WETZEL, M.M.V.S.; DIAS, T.A.B.; UDRY, M.C.; MARTINS, R.C. 2002. Estratégias para conservação e manejo de recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas: **Resultados da 1ª Reunião Técnica. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Ibama, CNPq, Brasília. 184p.
- VIGO, C.L.S.; NARITA, E.; MARQUES, L.C. 2003. Validação da metodologia de quantificação espectrofotométrica das saponinas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen – Amaranthaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 13(2):46-49.
- VIGO, C.L.S.; NARITA, E.; MILANEZE-GUTIERRE, M.A.; MARQUES, L.C. 2004. Caracterização farmacognóstica comparativa de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Hebanthe paniculata* Martius – Amaranthaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 6(2):7-19.
- ZIMMER, A.R.; BRUXEL, F.; BASSANI, V.L.; GOSMANN, G. 2006. HPLC method for the determination of ecdysterone in extractive solution from *Pfaffia glomerata*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 40:450-453.

Capítulo 6

Propagação *in vitro* de fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]

Introdução

O Brasil é o mais importante centro de coleta de espécies do gênero *Pfaffia* (Amaranthaceae), para fins medicinais, alimentícios e cosméticos (Corrêa Jr. et al., 2006). *Pfaffia glomerata* é nativa e possui amplo uso popular, sendo submetida à alta pressão antrópica, devido ao intenso extrativismo e à grande demanda dos mercados interno e externo, foi incluída na relação de espécies prioritárias para estudos (Vieira et al., 2002), pois há ameaças às suas populações naturais (Figueiredo et al., 2004).

A grande demanda de *P. glomerata* para a produção de medicamentos levou à busca por alternativas para a produção de matéria-prima homogênea e de qualidade (Flores et al., 2006). A propagação *in vitro* é uma técnica de clonagem e constitui-se como alternativa promissora para o suprimento constante e homogêneo de material vegetal, com qualidade sanitária e tempo reduzido (Mosaleeyanon, 2004). Em plantas de interesse medicinal, o cultivo *in vitro* tem sido aplicado mediante a propagação clonal, cultura de calos e de células em suspensão, visando à produção de compostos secundários de interesses farmacêutico, cosmético e alimentar (Rout et al., 2000; Gómez-Galera et al., 2007). Buscando maximizar o processo de propagação *in vitro* de *P. glomerata*, alguns estudos avaliaram a presença de carvão ativado e concentração de macronutrientes (Nicoloso et al., 2001), fontes e doses de ferro (Nicoloso & Ferrão, 2001), níveis de nitrogênio associados a fósforo e, ou, a sacarose (Russowski & Nicoloso, 2003; Maldaner et al., 2007) e a concentração de carboidratos visando à aclimatização (Skrebsky et al., 2004).

Tipicamente, plantas propagadas *in vitro* possuem características peculiares como: parte aérea pouco desenvolvida, menor quantidade de cêra cuticular e epicuticular nas folhas, redução nos tecidos com resistência mecânica, maior conteúdo de água, estômatos não-funcionais, folhas delgadas e pequenas, poucos tricomas e baixa atividade fotoautotrófica (Kozai, 1991; Kozai & Kubota, 2001). No cultivo *in vitro*, as plantas perdem parcialmente o autotrofismo e, conseqüentemente, necessitam de fonte exógena de carboidratos, sendo a sacarose o carboidrato mais apropriado para a multiplicação *in*

vitro de *P. glomerata* (Nicoloso et al., 2003). O aumento, a eliminação e, ou, a redução da concentração de carboidratos no meio de cultura pode ser um dos fatores determinantes no sucesso da aclimatização (Pospíšilová et al., 1999; Skrebsky et al., 2004). A redução de carboidratos no meio de cultivo possui diversas vantagens, dentre estas, destaca-se a prevenção do rápido crescimento de microrganismos, redução de custos e aumento na sobrevivência das plantas durante o estágio de aclimatização (Kozai & Kubota, 2001; Mosaleeyanon, 2004; Xiao & Kozai, 2006).

Outro fator que pode ser determinante é o tipo de vedação utilizado no recipiente de cultura. Geralmente, os explantes *in vitro* são mantidos em frascos vedados, porém, dependendo do tipo de vedação há baixa troca de ar entre o ambiente externo e interno (Chen, 2004; Tsay et al., 2006). As modificações da concentração destes gases afetam o crescimento e a morfogênese de algumas espécies de plantas em vários sistemas de cultivo *in vitro* (Marino & Berardi, 2004; Gonçalves et al., 2008).

A elevada umidade relativa e a concentração de CO₂ no ambiente interno dos frascos podem influenciar as características anatômicas (Dami & Hugles, 1995), fisiológicas (Ogasawara, 2003; Kitaya et al., 2005) e morfológicas das plantas (Mitra et al., 1998), resultando em elevada perda destas após a transferência para as condições *ex vitro*. A promoção do metabolismo fotoautotrófico e o decréscimo da taxa transpiratória no início da aclimatização são importantes estratégias para garantir a sobrevivência das plantas propagadas *in vitro* (Kirdmanee et al., 1997).

A propagação fotoautotrófica representa alternativa para melhorar o desenvolvimento das plantas *in vitro* e diminuir os custos de sua produção em escala comercial. Nessa, há eliminação de sacarose, vitaminas e reguladores de crescimento das formulações de meios, incremento na concentração de CO₂ no recipiente de cultivo, aumento no fotoperíodo e na irradiância, decréscimo na umidade relativa nos recipientes de cultivo, e uso de suporte poroso ou fibroso em substituição ao agente gelificante (Kozai & Kubota; 2001; Mosaleeyanon, 2004).

Estudos de fatores ambientais ligados à atividade fotossintética de plantas em cultura de tecidos são fundamentais para explorar o potencial fotoautotrófico de espécies na propagação *in vitro*. A utilização de fatores ambientais como trocas gasosas no ambiente de cultivo e a adequação de compostos orgânicos como a sacarose, podem aproximar as condições do ambiente *in vitro* do *ex vitro*. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo analisar o potencial autotrófico de *P. glomerata* propagadas *in vitro*, comparando parâmetros fisiológicos e estruturais das plantas propagadas sob condições heterotrófica, fotomixotrófica e fotoautotrófica.

Material e Métodos

Material Vegetal

O acesso de *P. glomerata* utilizado neste trabalho foi coletado na bacia do rio Paraná, Brasil (Baitaporã/MS) e pertence à coleção de germoplasma de plantas medicinais da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, identificado sob o n° 2209-09. As plantas foram propagadas via segmento nodal, adaptando-se aos protocolos descritos por Nicoloso et al. (2001) e Kagiki et al. (2004), e mantidas *in vitro* no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária da Universidade Federal de Viçosa.

Os ápices das plantas regeneradas, com 30 dias de cultivo e contendo um par de folhas, foram utilizados como explantes. O meio de cultura consistiu de sais e vitaminas MS (Murashige & Skoog, 1962), mio-inositol 100 mg L⁻¹, 0 ou 30 g L⁻¹ de sacarose, pH 5,7 ± 0,1, e 7 g L⁻¹ de ágar (Merck, Alemanha). O meio foi acondicionado em frascos de vidro com 12 cm de altura e 5 cm de diâmetro interno, contendo 50 mL de meio e autoclavados a 121°C e pressão de 1,5 kgf cm⁻², durante 20 minutos.

Os explantes foram inoculados nos dois diferentes meios de cultura e os frascos foram vedados com quatro tipos de vedações, sendo estas: 1. duas camadas de filme plástico de PVC transparente (Alpfilm, Brasil) (PVC); 2. tampa rígida de polipropileno (TR) autoclavável (TSO); 3. TR com um orifício de 10 mm (T1O); e 4. TR com dois furos de 10 mm (T2O), cobertos por membrana fluoroporo hidrofóbica (PTFE) para trocas gasosas (MilliSeal[®] Air Vent, Tóquio, Japão) de 0,22 µm de poro. O experimento foi mantido em sala de crescimento, à temperatura de 25 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 16 horas com irradiância de 50 µmol m⁻² s⁻¹.

Características Avaliadas

Foram avaliadas as seguintes características: porcentagem de sobrevivência das plantas; altura das plantas; número de folhas e de brotações; porcentagem de enraizamento, comprimento das raízes (cm), massas fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular; área foliar; determinação de pigmentos foliares (clorofilas *a* e *b* e carotenóides); fluorescência da clorofila *a*; atividade fotossintética; macro e micronutrientes na parte aérea da planta; perda de água do sistema; análises anatômicas em microscopia de luz e eletrônica de varredura.

Área Foliar

As folhas foram fixadas em papel branco com fita transparente e digitalizadas na resolução de 600 dpis. As imagens foram submetidas a ajustes e transformadas em binárias, utilizando o programa Adobe® Photoshop® CS, e processadas no programa QUANTIPORO (Fernandes Filho & Viana, 2001) para geração do atributo área.

Pigmentos Cloroplastídicos

As concentrações de clorofilas *a* e *b*, e carotenóides foram determinadas utilizando-se 6 discos foliares com 5 mm de diâmetro, retirados da terceira folha totalmente expandida a partir do meristema apical, e incubados em 5 mL de DMSO (saturado com CaCO₃), à temperatura ambiente por 48 horas. A absorvância das amostras foi realizada em espectrofotômetro (Hitachi U-2000 Spectrophotometer, Tóquio, Japão). Os comprimentos de onda e as equações para o cálculo das concentrações dos pigmentos foram baseados na metodologia de Wellburn (1994).

Avaliações da Taxa Fotossintética

A taxa fotossintética nas plantas de *P. glomerata* cultivadas *in vitro* foi avaliada em sistema fechado onde o frasco de cultivo foi acoplado a um analisador de gases no infravermelho modelo LCA 2 (Licor Inc., Lincoln, Nebraska, EUA). O ar de referência, com concentração conhecida de CO₂ (500 µmol mol⁻¹), foi bombeado para o frasco de cultivo sob taxa constante de fluxo de 0,5 L min⁻¹. Previamente e durante as análises, a planta foi submetida à irradiância de 500 µmol m⁻² s⁻¹. Após passar pelo frasco contendo a planta, o ar de saída ou ar de análise passou pelo IRGA, onde foi medida a concentração de CO₂. A diferença entre a concentração de CO₂ do ar de referência e do ar de análise (ΔCO₂) foi utilizada para o cálculo da taxa fotossintética.

Determinação da Fluorescência da Clorofila *a*

Os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* foram determinados no primeiro par de folhas totalmente expandidas da porção apical da planta. Sendo utilizado um fluorômetro modulado MINI-PAM (Heinz Walz, Effeltrich, GmbH, Alemanha), para

avaliar a eficiência quântica máxima do fotossistema II (F_v/F_m), em folhas adaptadas ao escuro por 30 minutos e, o rendimento quântico efetivo do PSII ($\Delta F/F_m'$), utilizando pulso de luz saturante de $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, os coeficientes de extinção fotoquímico (qP), e não-fotoquímico (NPQ) e a taxa de transporte de elétrons (ETR) também foram analisados.

Determinação de Macro e Micronutrientes

A parte aérea das plantas foi desidratada em estufa de circulação forçada de ar a $70 \text{ }^\circ\text{C}$, moídas e submetidas à digestão nítrico-perclórica para a determinação dos nutrientes. Os teores de P, K, Ca, Mg, S, Fe, Mn, B e Zn foram determinados por espectrometria de emissão ótica em plasma induzido (ICP-OES), e N pelo método semi-micro-Kjeldahl (Embrapa, 1999).

Análise em Microscopia de Luz

Amostras da lâmina (região mediana) de folhas totalmente expandidas foram fixadas em FAA₅₀ por 24 horas, estocadas em etanol 70% (Johansen, 1940), desidratadas em série etílica e incluídas em metacrilato (Historesin, Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha). Para montagem de lâminas permanentes, cortes transversais das folhas, com $8 \mu\text{m}$ de espessura, obtidos em micrótomo rotativo de avanço automático (RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, EUA), foram corados com Azul de Toluidina pH 4,0 (O'Brien & McCully, 1981) e montados em Permount, para a caracterização estrutural. As observações e registros fotográficos foram realizadas em fotomicroscópio (AX70TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) equipado com o sistema U-Photo.

Análise em Microscopia Eletrônica de Varredura

Para análise em microscopia eletrônica de varredura amostras da porção mediana das folhas (aproximadamente $0,5 \text{ cm}$) do segundo nó foram coletadas e fixadas em Karnovsky (glutaraldeído 2,5% + paraformaldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,05M, pH 7,2 – Karnovsky, 1965) e pós-fixado em tetróxido de ósmio (1%). Após desidratação em série etílica, os fragmentos foram secos a ponto crítico, utilizando CO_2 no equipamento Balzers (CPD 020, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). Procedeu-se a

deposição metálica com ouro nas amostras utilizando o equipamento Sputter Coater (FDU 010, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). As observações e documentação fotográfica foram realizadas usando o microscópio eletrônico de varredura (Leo 1430 VP, Zeiss, Cambridge, Reino Unido).

Perda de Água do Sistema

A perda de água do sistema (%) foi determinada a cada quatro dias, perfazendo 9 leituras. Os frascos, com e sem explantes, foram identificados e pesados individualmente em balança analítica (Marte Instrumentos de Precisão, São Paulo, Brasil), sendo desconsideradas as massas do frasco e da vedação.

Delineamento Experimental

O experimento foi realizado em esquema fatorial 4 x 2, sendo quatro tipos de vedações (PVC, TSO, T1O e T2O) e duas concentrações de sacarose (0 e 30 g L⁻¹), em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com seis repetições, sendo cada unidade experimental constituída por 5 frascos, com 5 plantas por frasco. Todas as variáveis, quando possível, foram submetidas à análise de variância, e aplicado o teste de Tukey para comparação das médias dos tratamentos.

Os dados referentes à massa seca da raiz foram submetidos à transformação \sqrt{x} . Para determinar a perda de água do sistema, os dados relativos ao peso e altura do meio de cultura foram submetidos à análise de regressão, ajustando-se a equação em função dos dias de cultivo. O mesmo procedimento foi adotado para o crescimento em altura das plantas. Sendo realizado o teste de identidade de modelos para definir as semelhanças e diferenças dos coeficientes das equações de regressão entre as classes.

Todas as análises estatísticas foram realizadas à 5% de significância, utilizando o programa GENES (Cruz, 2006). O experimento foi repetido por duas vezes.

Resultados

As plantas cultivadas sob diferentes concentrações de sacarose e tipos de vedação dos frascos apresentaram diferenças morfológicas significativas (Fig. 1). Nos tratamentos em que as trocas gasosas foram incrementadas houve melhor desenvolvimento das plantas cultivadas sob essas condições (Fig. 1A e 1F). Porém, na ausência da fonte de carboidrato e sem a utilização de membrana permeável, o desenvolvimento das plantas ficou completamente comprometido (Fig. 1F). O desenvolvimento do sistema radicular na presença da sacarose foi mais representativo (Fig. 1A-E). Essas variações foram confirmadas pelas análises dos componentes estruturais e fisiológicos das plantas.

Analisando os parâmetros fotoquímicos, observou-se que não houve interação significativa entre os fatores (vedação x sacarose) para as variáveis relacionadas à fluorescência da clorofila *a*. No entanto, examinando isoladamente esses fatores, houve significância, quanto à concentração de sacarose para as variáveis Fv/Fm, $\Delta F/Fm'$ e ETR; e, quanto à tampa para as variáveis Fv/Fm e qP. Porém, embora os fatores vedação e sacarose, tenham sido significativos para alguns desses parâmetros, quando os dados foram submetidos ao teste de médias não demonstraram diferenças entre os tratamentos (Quadro 1). A variável NPQ não apresentou significância para a interação e nem para os fatores isolados (Quadro 1).

Quadro 1. Parâmetros da fluorescência da clorofila *a* em *P. glomerata* cultivadas *in vitro* sob diferentes tipos de vedação e concentração de sacarose

Variáveis	Fatores					
	Sacarose (g L ⁻¹)		----- Vedação -----			
	0	30	PVC	TSO	T10	T20
Fv/Fm	0,710	0,772	0,693	0,695	0,781	0,795
$\Delta F/Fm'$	0,150	0,168	0,160	0,170	0,153	0,153
qP	0,289	0,274	0,318	0,318	0,250	0,241
ETR	41,86	47,29	45,56	47,82	42,55	42,38
NPQ	1,189	1,078	1,161	0,947	1,226	1,200

As médias na linha, considerando cada fator, não diferiram estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Legenda: Fv/Fm = rendimento quântico potencial do PSII; $\Delta F/Fm'$ = rendimento quântico efetivo do PSII; qP = coeficiente de extinção fotoquímica; NPQ = coeficiente de extinção não fotoquímica; e, ETR = taxa de transporte de elétrons.

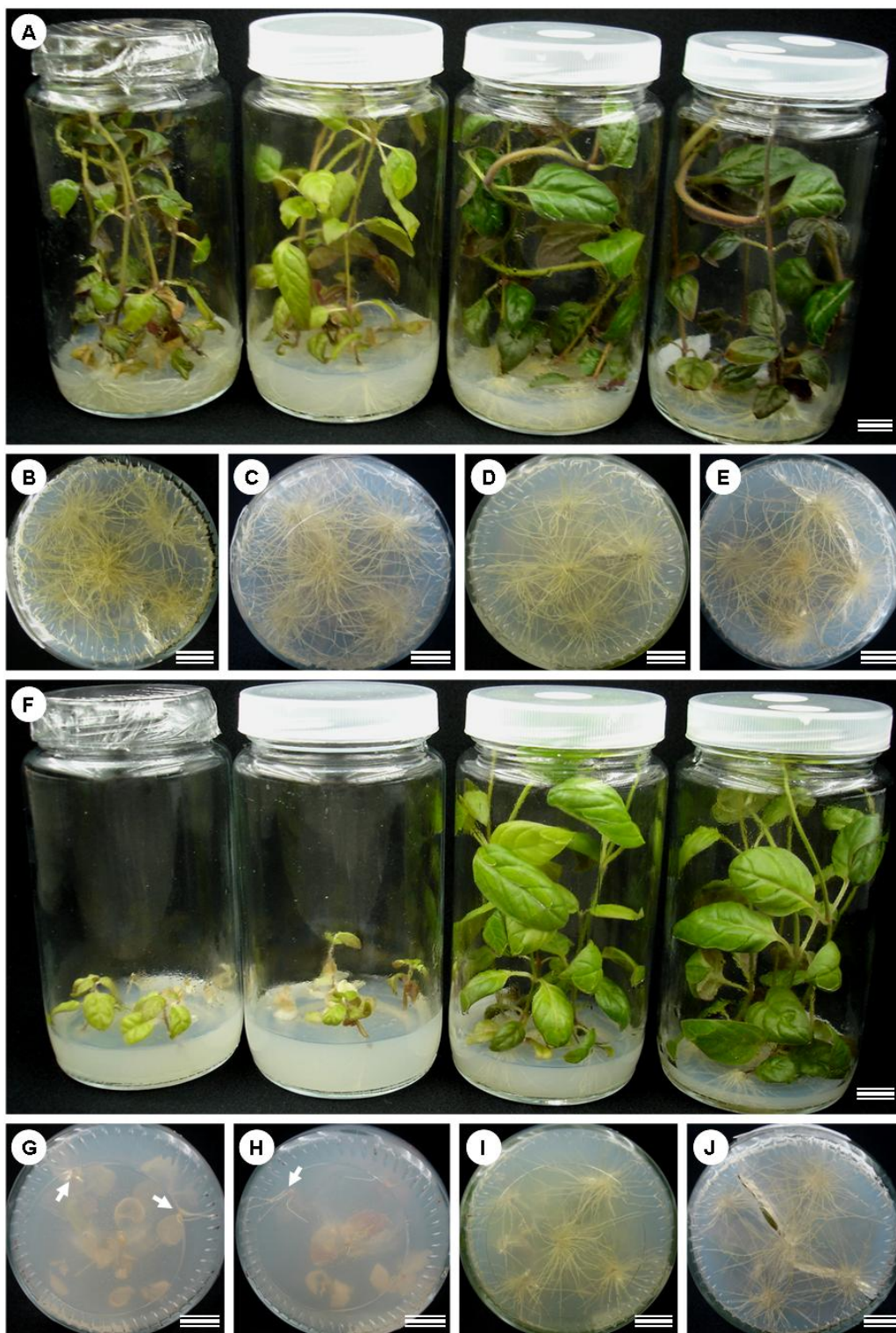


Figura 1. Aspectos das plantas de *P. glomerata* propagadas *in vitro*, aos 32 dias, sob diferentes vedações: filme plástico de PVC; tampa plástica de polipropileno; tampa plástica de polipropileno contendo um orifício coberto com membrana permeável; e, tampa plástica de polipropileno contendo dois orifícios cobertos com membrana permeável a trocas gasosas (da esquerda para a direita, respectivamente) com adição de 30 g L⁻¹ de sacarose ao meio de cultura (A); detalhe do sistema radicular (B-E); e, com 0 g L⁻¹ de sacarose (F); detalhe do desenvolvimento do sistema radicular (G-J). As setas (G e H) indicam a emissão de algumas poucas raízes. Barras = 10 mm.

As taxas de fotossíntese foram influenciadas pela concentração de sacarose no meio de cultivo, sendo as maiores taxas fotossintéticas obtidas nas plantas cultivadas na ausência deste carboidrato. Considerando o tipo de vedação nesta condição, observou-se que o tratamento TSO apresentou a melhor resposta (Quadro 2).

Na análise dos pigmentos cloroplásticos, observou-se a interação entre os fatores vedação e sacarose. Considerando o comportamento da vedação dentro da sacarose, verificou-se que apenas a clorofila *a* e a clorofila total diferiram estatisticamente (Quadro 2). Os tratamentos sem utilização de membranas, independente da concentração de sacarose, apresentaram os menores valores. Entretanto, considerando os teores de clorofila *a*, clorofila *b*, carotenóides e clorofila total em função da concentração de sacarose, verificaram-se as maiores médias na adição deste carboidrato ao meio (Quadro 2).

Quanto à área foliar os menores valores foram obtidos na ausência de sacarose combinada com as vedações PVC e tampa sem membrana (Quadro 2). Na presença de uma ou duas membranas, também sem adição de sacarose ao meio de cultura, verificou-se as maiores médias entre todos os tratamentos. Considerando a presença da sacarose em função do tipo de vedação observou-se que não houve diferença estatística.

Todas as demais características de crescimento avaliadas demonstraram que nos tratamentos em que não houve adição de carboidrato ao meio de cultura e que não possuíam membranas na vedação nos frascos apresentaram os menores valores, comprometendo o desenvolvimento das plantas nessas condições, apresentando índice de mortalidade de 80%. Os tratamentos com PVC e TSO sem sacarose apresentaram diferenças significativas em relação aos demais para as características: altura, número de folhas, número de segmentos nodais, massa fresca e seca da parte aérea, e massa fresca e seca da raiz (Quadro 2). A ausência de sacarose no meio, nos tratamentos com utilização de membranas, também influenciou a obtenção de valores intermediários nas três últimas variáveis mencionadas (Quadro 2). Na presença de sacarose, foram obtidas as maiores médias, para todas as variáveis acima mencionadas, não sendo estabelecidas diferenças em função da vedação (Quadro 2).

Analisando a perda de água do sistema, considerando os frascos com e sem brotações, observou-se progressiva evapotranspiração nos tipos de vedação PVC, T10 e T20 (Fig. 2). O peso do meio de cultivo na vedação TSO se manteve linear, demonstrando assim que a perda de água ocorrida foi a menor entre os tratamentos analisados (Fig. 2A). Entretanto, ao final do experimento, observou-se que nos frascos vedados com T20 a perda de água foi maior, seguido pelo tratamento T10 e PVC (Fig.

2A). A perda de água entre os frascos com e sem sacarose, independente da variável vedação, não diferiu no decorrer das análises (Fig. 2B).

Quadro 2. Parâmetros fisiológicos relativos à fotossíntese e análise de crescimento de *P. glomerata* propagadas *in vitro* sob diferentes tipos de vedação e concentração de sacarose

Variáveis	Sacarose (g L ⁻¹)	Tratamentos			
		PVC	TSO	T10	T20
Fotossíntese ($\mu\text{mol kg}^{-1} \text{ms}^{-1}$)	0	70,29 B a	90,93 A a	65,39 B a	60,94 B a
	30	32,25 A b	20,14 A b	30,17 A b	24,14 A b
Clorofila <i>a</i> ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	0	7,11 B b	6,13 B b	15,80 A b	20,47 A b
	30	20,26 B a	18,99 B a	38,01 A a	44,51 A a
Clorofila <i>b</i> ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	0	2,50 A b	2,30 A b	4,78 A b	6,50 A b
	30	6,48 A a	5,86 A a	12,39 A a	14,65 A a
Clorofila total ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	0	9,61 B b	8,43 B b	20,58 A b	26,97 A b
	30	26,74 B a	24,86 B a	50,40 A a	59,16 A a
Carotenóides ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	0	1,76 A b	1,49 A b	3,01 A b	3,89 A b
	30	3,87 A a	3,65 A a	6,69 A a	7,78 A a
Área foliar (cm ²)	0	0,77 B b	0,97 B b	3,03 A a	3,21 A a
	30	1,51 A a	1,49 A a	2,04 A b	2,29 A b
Altura (cm)	0	3,30 B b	3,78 B b	13,29 A a	14,21 A a
	30	14,10 A a	15,24 A a	13,47 A a	11,12 A b
Nº folhas	0	1,73 B b	2,25 B b	10,73 A a	11,87 A a
	30	13,87 A a	14,47 A a	12,40 A a	9,80 A a
Nº segmento nodal	0	2,17 A b	2,83 A b	4,73 A a	4,77 A a
	30	6,90 A a	6,80 A a	5,27 A a	4,57 A a
Massa fresca parte aérea (g)	0	0,160 B b	0,205 B b	2,364 A a	2,868 A a
	30	2,291 A a	2,846 A a	2,756 A a	2,432 A a
Massa fresca raiz (g)	0	0,053 B b	0,095 B b	0,314 A b	0,319 A b
	30	1,027 A a	1,122 A a	1,280 A a	1,586 A a
Massa seca parte aérea (g)	0	0,004 B b	0,005 B b	0,045 A b	0,058 A b
	30	0,062 A a	0,068 A a	0,091 A a	0,126 A a
Massa seca raiz (g)	0	0,006 B b	0,014 B b	0,049 A b	0,051 A b
	30	0,175 A a	0,167 A a	0,200 A a	0,194 A a

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na linha e médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna, em cada variável, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Os dados relativos ao peso do meio de cultivo foram condizentes com o registro da altura dos meios de cultivo (Fig. 2C e 2D). Os tratamentos seguiram a mesma tendência tanto na análise da vedação, independente da concentração de sacarose utilizada (Fig. 2C), assim como, quanto na análise dos meios na presença ou ausência de sacarose, independente da vedação utilizada (Fig. 2D), em função dos dias de cultivo *in vitro*.

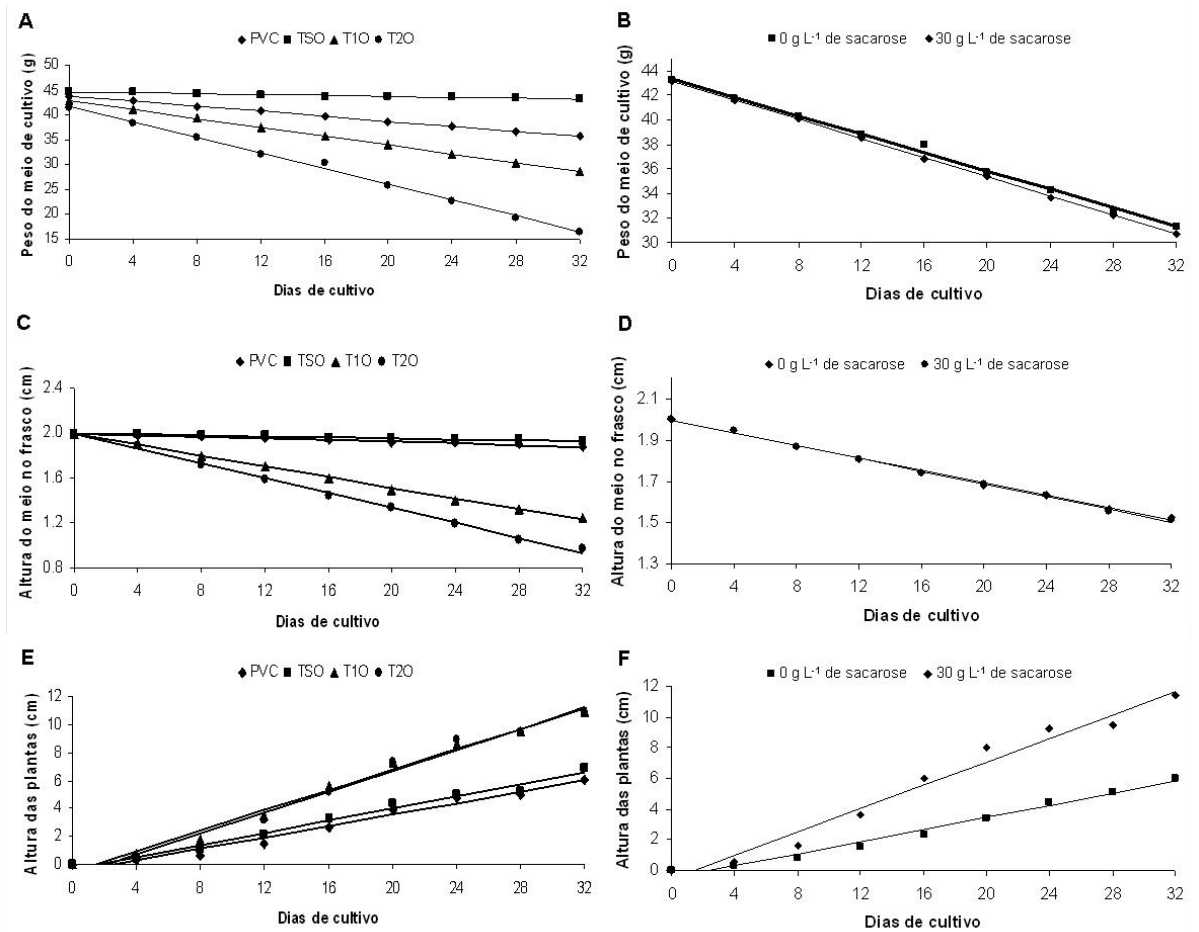


Figura 2. Perda de água do sistema e crescimento em altura de *P. glomerata* propagadas *in vitro* sob diferentes tipos de vedação e concentração de sacarose. A-B: peso do meio de cultivo; C-D: altura do meio de cultivo; E-F: altura das plantas; A,C e E – tipos de vedação em função dos dias de cultivo; B, D e F: concentração da fonte de carboidrato (0 ou 30 g L⁻¹ de sacarose) em função dos dias de cultivo.

Analisando tanto os tipos de vedações quanto a presença de sacarose no meio, observou-se que o crescimento em altura das plantas ocorreu de forma linear durante a realização do experimento (Fig. 2E e 2F). Nas vedações PVC e TSO o crescimento foi reduzido (Fig. 2F) em função da ausência de sacarose, que nestas condições limitam o

desenvolvimento de *P. glomerata*. Analisando o crescimento em altura, na presença ou ausência de sacarose em função do tempo, verificou-se redução no crescimento na ausência deste carboidrato no meio de cultivo (Fig. 2F), confirmando dessa forma, a interação existente entre a fonte de carboidrato e o tipo de vedação no desenvolvimento *in vitro* de *P. glomerata*.

Quadro 3. Equações de regressão, referentes ao peso e altura do meio de cultivo, e altura das plantas de *P. glomerata* propagadas *in vitro* sob diferentes tipos de vedação e concentração de sacarose

Característica avaliada	Equações	R ²
Peso do meio de cultivo (PVC)	$\hat{Y} = 43,829^{**} - 0,256^{**}x$	99,97
Peso do meio de cultivo (TSO)	$\hat{Y} = 44,665^{**} - 0,045^{**}x$	98,62
Peso do meio de cultivo (T1O)	$\hat{Y} = 42,845^{**} - 0,445^{**}x$	99,99
Peso do meio de cultivo (T2O)	$\hat{Y} = 41,741^{**} - 0,787^{**}x$	99,60
Peso do meio de cultivo (0 g L ⁻¹ Sacarose)	$\hat{Y} = 43,352^{**} - 0,375^{**}x$	99,58
Peso do meio de cultivo (30 g L ⁻¹ Sacarose)	$\hat{Y} = 43,188^{**} - 0,391^{**}x$	99,97
Altura do meio de cultivo (PVC)	$\hat{Y} = 1,997^{**} - 0,004^{**}x$	99,21
Altura do meio de cultivo (TSO)	$\hat{Y} = 2,002^{**} - 0,002^{**}x$	96,18
Altura do meio de cultivo (T1O)	$\hat{Y} = 1,990^{**} - 0,024^{**}x$	99,79
Altura do meio de cultivo (T2O)	$\hat{Y} = 1,990^{**} - 0,033^{**}x$	99,69
Altura do meio de cultivo (Sacarose)	$\hat{Y} = 1,996^{**} - 0,015^{**}x$	99,99
Altura da planta (PVC)	$\hat{Y} = -0,492 + 0,204^{**}x$	97,30
Altura da planta (TSO)	$\hat{Y} = -0,334 + 0,218^{**}x$	98,10
Altura da planta (T1O)	$\hat{Y} = -0,483 + 0,364^{**}x$	98,76
Altura da planta (T2O)	$\hat{Y} = -0,812 + 0,375^{**}x$	97,71
Altura da planta (0 g L ⁻¹ Sacarose)	$\hat{Y} = 0,493^{**} - 0,198^{**}x$	98,17
Altura da planta (30 g L ⁻¹ Sacarose)	$\hat{Y} = 0,567 - 0,383^{**}x$	97,39

** e * significativo ao nível de 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F.

Considerando os tipos de vedação em função do período de cultivo, o teste de identidade de modelos apresentou diferença estatística entre o intercepto dos tipos de vedação para a variável peso do meio (Fig. 2A), entre todas as combinações, não houve diferença para altura do meio e da planta (Figs. 2C e 2E). Considerando a inclinação das retas houve diferença estatística entre todos os tipos de vedação para as características peso e altura do meio de cultivo (Figs. 2A e 2C). Entretanto, considerando a altura da

planta não houve diferença estatística entre os tratamentos PVC e TSO, e entre T1O e T2O, os demais tratamentos apresentaram diferenças estatísticas entre si (Fig. 2E). Os ajustes das equações de todas as variáveis analisadas em função do período de cultivo estão descritas no quadro 3.

O teste de identidade de modelos demonstrou que os coeficientes da equação de regressão não diferem estatisticamente entre si apenas para a variável altura do meio, considerando a concentração de sacarose no meio em função do tempo de cultivo (Fig. 2D). Para as variáveis peso do meio (Fig. 2B) e altura da planta (Fig. 2F), considerando o mesmo fator, o intercepto não difere entre as classes, mas a inclinação das retas difere entre si para a característica altura da planta (Fig. 2F).

Os teores de macro e micronutrientes presente na parte aérea de *P. glomerata* propagadas *in vitro* apresentaram interação significativa entre os fatores analisados (vedação e sacarose). Analisando a influência dos tipos de vedações dentro de cada concentração de sacarose detectou-se que apenas os nutrientes Fe, B, Mn, Zn, K e N foram diferentes estatisticamente (Quadro 4).

Os menores teores de Fe foram obtidos, dentro das duas concentrações de sacarose utilizadas, nas plantas cultivadas em frascos contendo tampa com duas membranas (Quadro 4). Os nutrientes B, Mn e Zn no meio sem adição de sacarose apresentaram suas maiores concentrações nos tratamentos utilizando membranas. No entanto, quando adicionada sacarose ao meio o teor desses nutrientes foi influenciado de forma negativa nos tratamentos com a utilização de tampa com membrana (Quadro 4). A concentração de K apresentou diferença significativa com a utilização de membrana associada à ausência de sacarose. O tratamento que diferiu dos demais em relação ao teor de N foi PVC sem adição de sacarose, apresentando o menor valor (Quadro 4).

Analisando a concentração dos macro e micronutrientes, dentro de cada tipo de vedação em função da concentração de sacarose utilizada, verificou-se que o B foi o único nutriente que não diferiu estatisticamente.

Nos tratamentos utilizando PVC o maior teor de Mo foi obtido na ausência de sacarose, enquanto que para Ca, Mg, S, K, P e N, essa relação foi inversa. Os teores dos demais nutrientes não foram influenciados pela sacarose (Quadro 4).

Na utilização de tampa sem membrana observaram-se maior teor de Ca na ausência de sacarose, e maior concentração de Mn, Zn, Mg, S e P na adição de sacarose ao meio. Os teores dos demais elementos analisados não apresentaram diferença estatística em função da sacarose (Quadro 4).

Quadro 4. Teores de macro e micronutrientes na parte aérea de *P. glomerata* cultivadas *in vitro* sob diferentes tipos de vedação e concentração de sacarose, e nas folhas e caules das plantas cultivadas na condição de campo

Teor	Sac. g L ⁻¹	----- Cultivo <i>in vitro</i> -----				---- Campo ----	
		PVC	TSO	T10	T20	Folha	Caule
Fe	0	180,00 Aa	162,67 ABa	151,33 ABa	144,33 Ba	605,29	179,28
	30	141,67 Aa	140,00 Aa	111,00 Aa	77,67 Bb		
B	0	167,00 Ba	135,00 Ba	233,33 Aa	216,33 Aa	7400	48,67
	30	171,67 Aa	185,67 Aa	154,00 ABa	127,00 Ba		
Cu	0	3,63 Aa	3,83 Aa	3,90 Aa	3,20 Aa	10,34	7,12
	30	2,70 Aa	3,00 Aa	1,93 Ab	1,57 Ab		
Mn	0	214,00 Ba	191,00 Cb	307,33 Aa	300,00 Aa	551,64	141,83
	30	325,67 Aa	330,67 Aa	237,00 Ba	159,00 Cb		
Mo	0	7,30 Aa	5,93 Aa	3,87 Aa	3,13 Aa	1,07	0,43
	30	5,70 Ab	6,03 Aa	3,80 Aa	2,30 Aa		
Zn	0	107,33 ABa	93,00 Bb	112,67 Aa	116,00 Aa	55,64	46,25
	30	142,67 Aa	148,00 Aa	98,00 Ba	55,33 Cb		
Ca	0	0,00 Ab	6,30 Aa	5,40 Aa	5,67 Aa	0,00	2,74
	30	4,80 Aa	4,30 Ab	3,60 Ab	2,77 Ab		
Mg	0	1,53 Ab	1,33 Ab	1,97 Aa	2,10 Aa	0,00	2,69
	30	3,23 Aa	3,40 Aa	2,37 Aa	1,50 Aa		
S	0	2,87 Ab	2,57 Ab	5,57 Aa	5,80 Aa	2,72	2,34
	30	7,27 Aa	6,77 Aa	4,63 Aa	2,50 Ab		
K	0	40,80 Bb	43,81 Ba	67,93 Aa	70,11 Aa	35,19	55,30
	30	59,78 Aa	55,83 Aa	53,32 Ab	44,35 Ab		
P	0	4,11 Ab	4,00 Ab	5,21 Aa	4,96 Aa	2,07	3,06
	30	7,78 Aa	7,13 Aa	4,93 Aa	3,35 Aa		
N	0	25,66 Bb	58,75 Aa	62,98 Aa	60,76 Aa	27,14	13,60
	30	61,52 Aa	66,13 Aa	54,52 Ab	50,49 Ab		

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na linha e médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna de cada elemento não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Legenda: Fé = ferro; B = boro; Cu = cobre; Mn = manganês ; Mo = molibdênio; Zn = zinco; Ca = cálcio; Mg = magnésio; S = enxofre; K = potássio, P = fósforo; N = nitrogênio.

Utilizando tampa com uma membrana, a sacarose influenciou o teor de Cu, Ca, K e N, sendo obtidos maiores concentrações na ausência desta fonte de carboidrato. Os

teores dos demais nutrientes, neste tipo de vedação, não foram influenciados pela sacarose (Quadro 4). Quando utilizada tampa com duas membranas os maiores concentrações para Cu, Ca, K, N, Fe, Mn, Zn e S também foram obtidos na ausência de sacarose no meio de cultivo. Os teores dos demais elementos analisados não apresentaram diferença estatística em função da sacarose utilizando esta vedação (Quadro 4).

Nas análises em microscopia de luz foi observada a formação estrutural usual nas folhas das plantas cultivadas com adição de sacarose ao meio, ou na ausência desta combinada com a vedação constituída por duas membranas (Figura 3).

A lâmina foliar de *P. glomerata*, nas plantas com desenvolvimento padrão, caracteriza-se pela presença de epiderme unisseriada, feixe vascular do tipo colateral na extremidade da margem (Figs. 3A, 3D, 3G, 3J, 3M, 3P, 3S e 3V), é anfiestomática e apresenta estrutura dorsiventral definida (Figs. 3B, 3H, 3N e 3T). O parênquima paliçádico apresenta uma única camada de células que ocupa, aproximadamente, um terço da espessura do mesofilo; o parênquima lacunoso, por sua vez, apresenta três ou quatro camadas de células. O feixe vascular da nervura mediana encontra-se circundado por parênquima fundamental e presença de colênquima nas regiões subepidérmicas (Figs. 3C, 3I, 3O, 3R, 3U e 3Y).

No tratamento com duas membranas e sem sacarose foi observado no mesofilo um desenvolvimento típico das plantas cultivadas *in vitro*; houve abundância de espaços intercelulares e as células do parênquima paliçádico apresentaram-se mais globulares (Fig. 3X) em relação às plantas cultivadas na mesma condição de vedação com adição de sacarose ao meio (Fig. 3T). Nos tratamentos com ausência de sacarose e vedação, as células do parênquima paliçádico apresentaram-se mais volumosas ocupando cerca da metade da porção do mesofilo (Fig. 3E e 3K). Nas plantas cultivadas sem sacarose e com uma membrana, o padrão dorsiventral não foi definido, sendo caracterizado pela dificuldade de delimitação entre os parênquimas paliçádico e lacunoso (Fig. 3Q); ainda, as células apresentaram paredes flácidas não sendo bem formadas, algumas células do mesofilo demonstraram-se hipertrofiadas e as células epidérmicas não diferenciaram no padrão usual, caracterizado pela irregularidade na forma e no tamanho. Foi também evidente a menor espessura do limbo nas regiões entre as nervuras de segunda ordem e a aparente característica de desidratação.

Foi observada coloração mais intensa nas folhas cultivadas na presença de sacarose (Fig. 3). A região da folha que apresentou a menor variação estrutural foi a margem (Figs. 3A, 3D, 3G, 3J, 3M, 3P, 3S e 3V), em todas as condições analisadas

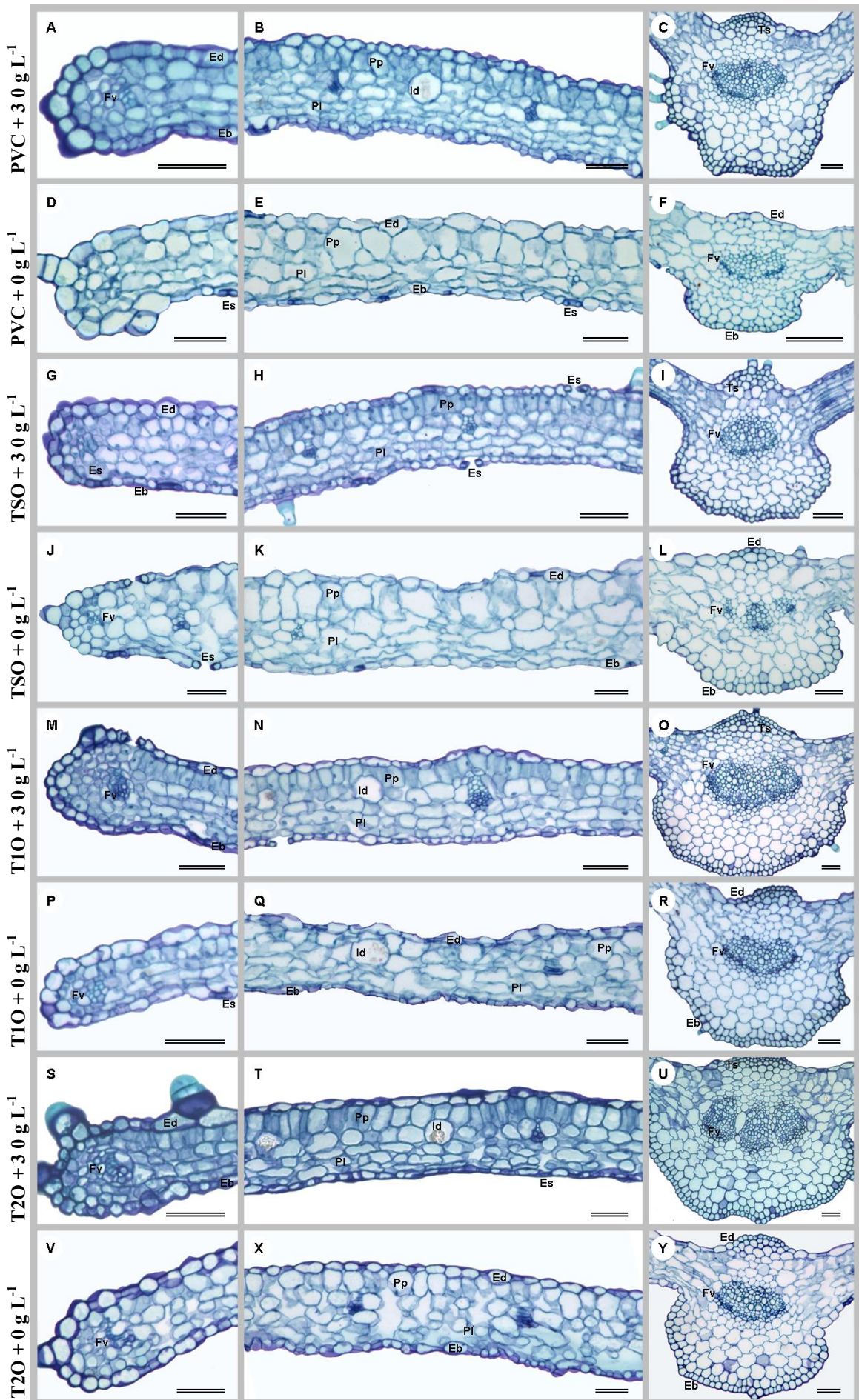


Figura 3. Secções transversais da porção mediana da folha de *P. glomerata* propagadas *in vitro* sob diferentes tipos de vedação e concentração de sacarose. A-F: PVC com (A-C) e sem (D-F) sacarose; G-L: tampa sem membrana com (G-I) e sem (J-L) sacarose; M-R: tampa com 1 membrana com (M-O) e sem (P-R) sacarose; S-Y: tampa com duas membranas com (S-U) e sem (V-Y) sacarose; A, D, G, J, M, P, S e V detalhe do bordo da folha; B, E, H, K, N, Q, T e X detalhe do limbo; C, F, I, L, O, R, U e Y: detalhe da nervura mediana. Eb = superfície abaxial da epiderme; Ed = superfície adaxial da epiderme; Es = estômato; Fv = feixe vascular; Id = idioblasto; Pp = parênquima paliçádico; Pl = parênquima lacunoso; Ts = tecido de sustentação. Barra = 50 µm.

verificou-se a presença de feixe vascular na extremidade, mas estes se apresentaram mais desenvolvidos na presença de sacarose. Nessa região, as células do limbo nos tratamentos com sacarose se apresentaram mais justapostas, com células epidérmicas mais homogêneas.

Na ausência de sacarose e de vedação não foi possível observar tecido de sustentação na região subepidérmica da nervura mediana (Figs. 3F e 3L). No entanto, na presença de membrana houve formação de colênquima, sendo mais desenvolvido no tratamento com duas membranas (Figs. 3R e 3Y).

Em todos os tratamentos com ausência de sacarose é visível a redução no tamanho dos feixes vasculares na nervura mediana (Figs. 3F, 3L, 3R e 3Y) quando comparado com os tratamentos na mesma condição de vedação com adição de sacarose.

Foram analisadas as superfícies abaxial e adaxial das folhas de todos os tratamentos em microscopia eletrônica de varredura que revelou diferenças estruturais entre eles (Fig. 4). Na presença de sacarose, independente da vedação utilizada, e na ausência de sacarose utilizando duas membranas, as células epidérmicas apresentaram paredes sinuosas (Figs. 4A, 4B, 4G, 4I, 4M, 4S e 4V) com inúmeros apêndices epidérmicos como tricomas tectores e secretores (Figs. 4B, 4C, 4O, 4T e 4V), sendo estes, assim como os estômatos (Figs. 4I, 4U e 4T), de maior ocorrência na superfície abaxial. Os estômatos apresentam forma elíptica típica e estão posicionados levemente acima das demais células epidérmicas na superfície abaxial (Fig. 4B). Os tricomas tectores e secretores são unisseriados. Os tricomas tectores são pluricelulares com células longas, apresentando ornamentações verrucosas por toda a sua extensão, inclusive na região de união celular, essas são tipicamente denteadas (Figs. 4B, 4C, 4M e 4Y).

As amostras das folhas das plantas cultivadas em meio contendo sacarose, independente da vedação, e na ausência de sacarose combinada com tampas possuindo uma ou duas membranas, apresentaram desenvolvimento estrutural foliar usual (Figs. 4A-C; 4G-I e 4M-Y).

As plantas cultivadas na ausência de sacarose e de vedação não apresentaram desenvolvimento usual (Figs. 4D-F e 4J-L). As células epidérmicas não apresentaram paredes definidas, impossibilitando a sua delimitação, o desenvolvimento dos estômatos foi anormal em sua maioria apresentando ostíolos protraídos, sendo visível a redução no número de tricomas, assim como a quebra ou mal formação destes (Figs. 4D e 4L).

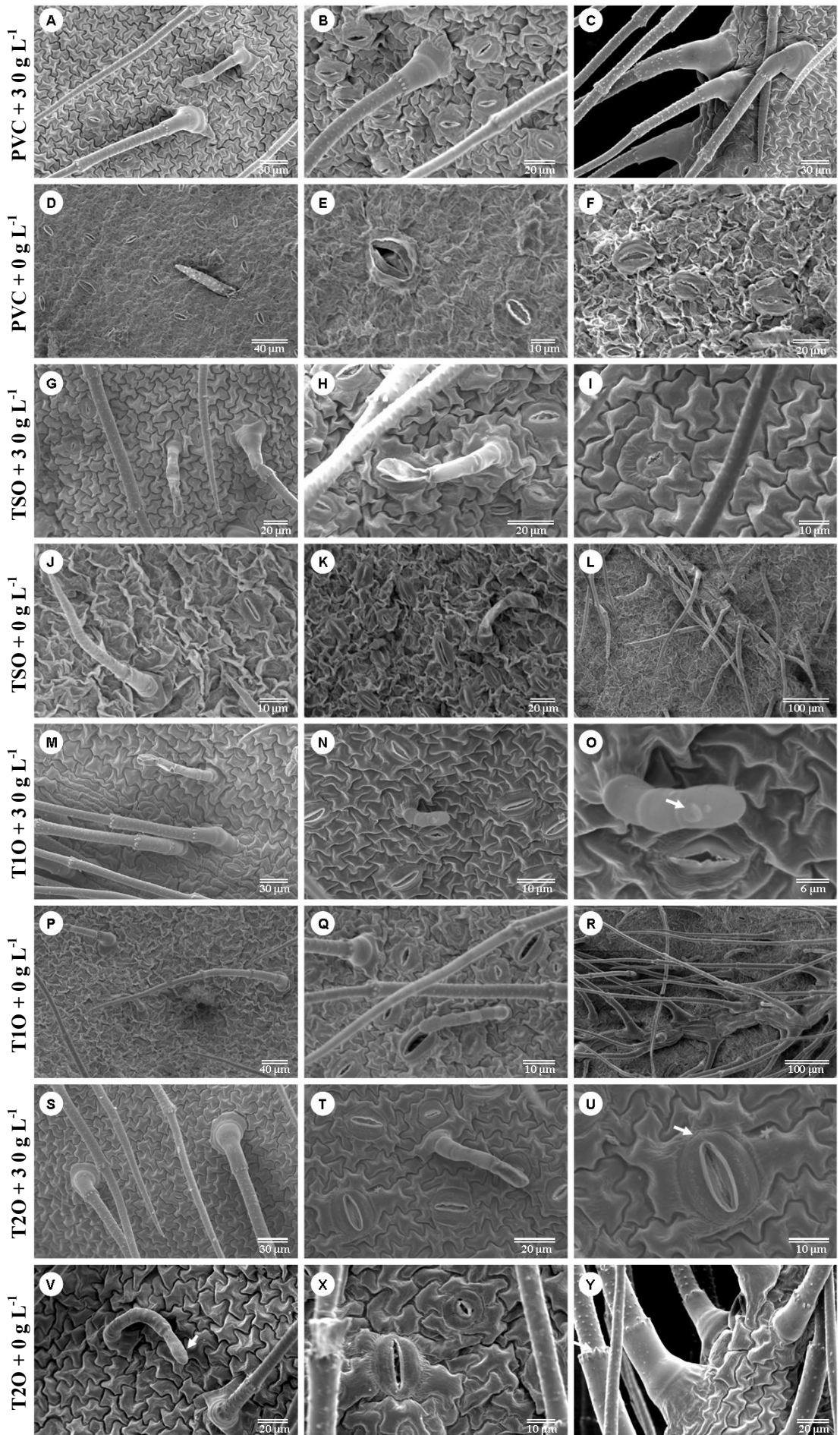


Figura 4. Eletromicrografias de varredura da superfície foliar de *P. glomerata* propagadas *in vitro* sob diferentes tipos de vedação e concentração de sacarose. A-F: PVC com (A-C) e sem (D-F) sacarose; G-L: tampa sem membrana com (G-I) e sem (J-L) sacarose; M-R: tampa com 1 membrana com (M-O) e sem (P-R) sacarose; S-Y: tampa com duas membranas com (S-U) e sem (V-Y) sacarose; A, D, G, J, M, P, S e V detalhes da superfície adaxial da folha; B, E, H, K, N, Q, T e X detalhes da superfície abaxial; C e Y: detalhe dos tricomas ornamentados na margem foliar; F: detalhe de estômatos mal formados apresentando ostíolos protraídos; I, O e U: detalhe de estômatos com desenvolvimento normal; O: seta indica provável início no processo de secreção do tricoma; U: seta indica início da formação de estrias; V: seta indica detalhe da célula da cabeça do tricoma; Y: seta indica as ornamentações denteadas nas células dos tricomas; L e R: detalhe da nervura, de segunda ordem, na superfície abaxial.

A diferença na aparência dos estômatos e das células epidérmicas, em relação aos demais tratamentos foi mais significativa quando as plantas foram cultivadas utilizando a tampa com duas membranas, sendo possível observar o início da formação de estrias nas células subsidiárias, bem como, em diferentes estádios de desenvolvimento (Figs. 4S-Y). Inúmeros tricomas tectores e secretores foram observados nos tratamentos contendo sacarose e, ou, vedação, sendo as ornamentações uma característica evidente não apenas nos tricomas tectores, assim como, na célula apical do tricoma secretor, inclusive em provável fase de secreção (Fig. 4O).

Discussão

A redução da eficiência quântica do fotossistema II, tradicionalmente conhecida como fotoinibição, é determinada por parâmetros de fluorescência da clorofila (Krause & Weis, 1991). Fatores ambientais que resultam na diminuição da eficiência quântica do PSII causam redução na razão Fv/Fm, (Björkman & Demmig, 1987) e a queda nessa relação pode indicar condições ambientais estressantes (Krause & Weis, 1991). Valores inferiores a 0,725 ou 0,80 (Björkman & Demmig, 1987) na razão Fv/Fm são considerados referência para indicar a fotoinibição (Critchley, 1998), sendo observado os menores valores em *P. glomerata* nos tratamentos na ausência de sacarose e de membranas, no entanto, estes não diferiram estatisticamente dos demais.

Outro fator que caracteriza condição de estresse biótico nas plantas é o aumento do coeficiente de extinção não-fotoquímica da fluorescência (NPQ) (Balachandran et al., 1997), sendo observado em tabaco cultivado *in vitro* na ausência de sacarose e com irradiância de $380 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mas não observado nas condições deste experimento. Portanto, considerando o conjunto de parâmetros da fluorescência da clorofila *a*, pode-se considerar que as condições deste experimento não ocasionaram danos na maquinaria fotossintética das folhas de *P. glomerata*. Pois, qP está relacionado com a conservação da energia fotoquímica (Turchetto et al., 2005).

Em tabaco (*Nicotiana tabacum*) valores semelhantes foram encontrados na relação Fv/Fm ao cultivá-los em meio na presença de sacarose, independente da irradiância utilizada (Kadleček et al., 2001). Similar eficiência fotoquímica do FSII (Fv/Fm) também foi obtida, independente das concentrações de sacarose, na irradiância de $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Kadleček et al., 2003). Valores próximos a 0,80 para a relação Fv/Fm foram encontrados em plantas de coco cultivadas *in vitro* sob irradiância de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fuentes et al., 2005), demonstrando que os dados obtidos em *P. glomerata* estão de acordo com outras espécies propagadas *in vitro*.

A influência dos tipos de vedação e da concentração de sacarose no meio na taxa fotossintética em *P. glomerata* reflete a condição heterotrófica nas quais as plantas cultivadas *in vitro*, de forma tradicional, são mantidas. Nas plantas cultivadas *in vitro* sob altas concentrações de sacarose, a síntese reduzida dos açúcares favorece o acúmulo de carboidratos no tecido, sugerindo reduzida taxa fotossintética, devido a esta condição ou à inibição da enzima Rubisco (Capellades et al., 1991; Hdider & Desjardins, 1994), e diminuição na fixação do carbono inorgânico (Neumann & Bender, 1987). Nas plantas cultivadas com vedações que permitiram maior troca gasosa não foram observadas

senescência foliar, diferente do observado nos tratamentos com ausência de sacarose e membrana. A perda de clorofila é um fenômeno típico de senescência foliar (Lu et al., 2003), justificando a diferença encontrada entre os tipos de vedação na ausência de sacarose.

O aumento das trocas gasosas, com incremento da concentração de CO₂ e conseguinte redução da umidade relativa e da concentração de etileno na atmosfera interna, têm sido conseguidos utilizando-se tampas de fechamento dos frascos de cultivo mais permeáveis (Kozai & Kubota, 2001; Marino & Berardi, 2004; Tsay et al., 2006). O acréscimo da concentração de CO₂ promove o aumento da fotossíntese (Bowes, 1993; Arigita et al., 2002), mas pode ter efeito adverso em alguns casos (Shim, et al., 2003), e a regulação estomática, promovendo aclimação das plantas às condições autotróficas (Arigita et al., 2002). O que pode explicar a homogeneidade obtidas nos resultados relativos as trocas gasosas em *P. glomerata* quando analisados os tipos de vedação em função da concentração de sacarose, confrontando com as diferenças observadas no crescimento e aclimatização das plantas analisadas sob o mesmo aspecto.

Maior taxa fotossintética obtida nas plantas de *P. glomerata* cultivadas na ausência de sacarose, quando comparada àquelas cultivadas na presença deste carboidrato na mesma condição de vedação, também foram observadas em videira, porém quando submetida as maiores troca gasosas (2,5 e 4,4 h⁻¹) (Shim et al., 2003). Quando a sacarose está presente no meio de cultura esta é preferencialmente absorvida pela planta como fonte de carboidrato, a qual inibe a atividade fotossintética desprezando a ventilação (Kozai & Sekimoto, 1988).

Nos sistemas de cultivo heterotrófico, a sacarose atua como principal fonte de energia metabólica (Arigita et al., 2002). Nessa condição, as plantas apresentam baixas taxas fotossintéticas (Kozai & Kubota, 2001) e elevado conteúdo de água, com grande risco de desidratação e morte durante a aclimatização (Kubota & Kozai, 1992), ou são portadoras de desordens anatômicas e fisiológicas que não possibilitam que o aparato fotossintético opere normalmente (Arigita et al., 2002). Essas desordens anatômicas ficaram bem evidentes em *P. glomerata* nos tratamentos com ausência de sacarose e de membranas.

A adição da sacarose ao meio pode inibir o acúmulo de clorofila *in vitro* (Neumann & Bender, 1987). No entanto, em *P. glomerata* a presença de sacarose induziu a maior síntese dos pigmentos cloroplastídicos e as membranas presentes nas tampas influenciaram positivamente o conteúdo de clorofila *a*, corroborando com

resultados obtidos em *Vitis vinifera* e *Scrophularia yoshimurae* (Gribaudo et al.; 2003; Tsay et al., 2006), onde ambientes de cultivo permeáveis a trocas gasosas favoreceram o incremento no conteúdo de clorofilas.

Os tratamentos com ausência de sacarose apresentaram maiores taxas fotossintéticas provavelmente em função da condição de saturação do CO₂ existentes nos tratamentos sem membrana. A queda da fotossíntese, devido à menor eficiência fotoquímica, pode ocasionar redução na atividade de algumas enzimas do ciclo de Calvin e mudanças nas rotas bioquímicas, como acúmulo de aminoácidos e ácidos orgânicos (Wright et al., 1995). Em *P. glomerata* a possibilidade de trocas gasosas estimulada pela presença da membrana permeável proporcionou o desenvolvimento das plantas sob condições fotoautotróficas.

Durante o cultivo *in vitro*, as células, tecidos e plantas, muitas vezes não encontram condições adequadas de iluminação e concentração de CO₂ e não apresentam teores de clorofila suficientes para realizarem fotossíntese de forma auto-suficiente. Nessa condição, a redução na concentração de sacarose ou mesmo a sua eliminação por completo, o aumento da concentração de CO₂ e a redução nas concentrações de O₂ são alternativas que melhoram o crescimento e a competência fotossintética de várias espécies, indicando que as condições tradicionais de cultivo podem diminuir a fotossíntese em *P. glomerata*, mas não limitar o seu crescimento.

No cultivo tradicional utilizam-se recipientes fechados, que dificultam as trocas gasosas entre a atmosfera do recipiente de cultivo e o meio exterior. Como resultado, o crescimento e o desenvolvimento das plântulas podem não se expressar plenamente, não em decorrência da composição dos nutrientes do meio, mas por limitações impostas pela composição da atmosfera dos frascos (Buddendorf-Joosten & Woltering, 1994). A redução do crescimento das plantas sob esse sistema de cultivo tem sido explicada pela baixa capacidade fotossintética, em função de uma rápida queda da concentração do CO₂ no recipiente, pela baixa irradiância, pelos altos níveis de açúcar do meio, pela alta umidade relativa e pela ação do etileno, gerado no interior dos frascos (Kozai et al., 1987). Fatores esses que não comprometeram o desenvolvimento de *P. glomerata*, sendo o cultivo fotoautotrófico uma alternativa viável para a propagação da espécie, uma vez que as plantas obtidas nesta condição e na condição fotomixotrófica apresentaram-se mais vigorosas.

No cultivo *in vitro*, as plantas perdem parcialmente o autotrofismo e, conseqüentemente, necessitam de uma fonte exógena de carboidratos, sendo a sacarose o carboidrato mais apropriado para a multiplicação *in vitro* de *P. glomerata* (Nicoloso et

al., 2003). Segundo Skrebsky et al. (2004), a concentração de carboidratos no meio de cultura pode ser um dos fatores determinantes no sucesso da aclimatização da espécie. No entanto, a eliminação da fonte de carboidrato no meio de cultura não comprometeu o crescimento quando utilizada vedação com membrana. No presente trabalho, quando plantas de fáfia crescidas nessa condição foram transferidas *ex vitro*, estas não apresentaram dificuldades na etapa de aclimatização (dados não apresentados).

A redução de açúcar no meio de cultivo possui diversas vantagens como a prevenção do rápido crescimento de bactérias e de fungos no meio, redução de custos e aumento na sobrevivência das plantas durante a aclimatização (Kozai & Kubota, 2001; Xiao & Kozai, 2006). Quando plantas são cultivadas *in vitro*, em meio de cultura sem açúcar, surge a necessidade de se aumentar a irradiância e as difusões de CO₂ e da umidade (Kozai & Kubota, 2001), para promover a fotossíntese, a transpiração e o acúmulo de matéria seca (Aitken Christie et al., 1995; Kitaya et al., 2005). Geralmente, os explantes *in vitro* são mantidos em frascos vedados, porém dependendo do tipo de vedação encontram-se baixas trocas de ar entre os ambientes externo e interno (Chen, 2004; Tsay et al., 2006). As modificações da concentração destes gases afetam o crescimento e a morfogênese de algumas espécies de plantas em vários sistemas de cultivo *in vitro* (Marino & Berardi, 2004). A propagação fotoautotrófica além de aumentar o crescimento dos explantes *in vitro* melhora as características fisiológicas da planta (Afreen et al., 2002). Essas condições foram essenciais para o sucesso na propagação de *P. glomerata*.

Kozai & Kubota (2001) verificaram que o crescimento de explantes da maioria das espécies lenhosas estudadas foi maior sob condições fotoautotróficas do que sob condições fotomixotróficas. Em *P. glomerata*, as plantas cultivadas na ausência de sacarose e com membranas não apresentaram diferenças nos parâmetros de crescimento em relação às plantas cultivadas na condição heterotrófica ou fotomixotrófica. No entanto, apresentaram maior área foliar e menor massa seca da parte aérea e do sistema radicular. Contudo, as respostas de crescimento em função das trocas gasosas no ambiente de cultivo são dependentes da espécie e o efeito das trocas gasosas varia de acordo com a presença ou ausência da sacarose no meio de cultura (Shim et al., 2003).

O uso da fonte de carbono estimula a produção de biomassa em *P. glomerata*. O incremento na matéria seca da espécie, propagada *in vitro*, já foi relatado por outros autores quando utilizaram concentrações crescentes de sacarose (Nicoloso et al., 2003; Skrebsky et al., 2004; Maldaner et al., 2006, 2007).

A elevada umidade relativa e a concentração de CO₂ no ambiente interno dos frascos podem influenciar características anatômicas (Dami & Hugles, 1995; Sciuti & Morini, 1995), fisiológicas (Ogasawara, 2003; Kitaya et al., 2005) e morfológicas (Kozai et al., 1987; Mitra et al., 1998). A promoção do metabolismo fotoautotrófico e o decréscimo da taxa transpiratória são importantes para o melhor crescimento e porcentagem de sobrevivência das plantas (Kirdmanee et al., 1997).

O estímulo à condição autotrófica *in vitro* melhora o estabelecimento *ex vitro* (Desjardins et al., 1987). A redução da umidade relativa favorece a formação de cutícula nas folhas e o funcionamento normal dos estômatos, aumentando a tolerância ao estresse hídrico (Zobayed et al., 2001). Alterações na composição química do meio de cultivo e no intercâmbio de gases entre a atmosfera de cultivo e o meio externo podem promover a rustificação ainda *in vitro*, melhorando a competência fotossintética e as relações hídricas, e reduzindo ou mesmo excluindo a necessidade da aclimatização *ex vitro* (Deng & Donnelly, 1993).

Em *P. glomerata* as membranas permeáveis a trocas gasosas e na presença de sacarose resultaram na organização celular típica de plantas na condição de campo. As plantas apresentaram reduzidos espaços intercelulares, mesofilo diferenciado, sistema vascular desenvolvido, presença de tecido de sustentação e estômatos funcionais. No entanto, na ausência de sacarose e com duas membranas a estrutura celular apresentou organização típica encontrada nas plantas desenvolvidas heterotroficamente.

Na propagação *in vitro* de *Herreria salsaparilha* a perda de água do sistema foi maior quando utilizada tampa de polipropileno com um filtro e permitiu o balanço de O₂ entre o ambiente interno e externo do frasco (Gonçalves et al., 2008). Concomitantemente, a troca gasosa com o uso de filme PVC foi suficiente para manter o processo fotossintético. Em *P. glomerata* a utilização de diferentes tipos de vedações na presença de sacarose não inviabilizou o seu desenvolvimento. No entanto, na ausência desta fonte de carboidrato, as trocas gasosas existentes nos tratamentos PVC e TSO não foram suficientes para suportar o crescimento da espécie.

A alta umidade relativa existente dentro dos frascos de cultivo pode reduzir a transpiração e conseqüentemente diminuir a concentração e o transporte de íons dependentes do fluxo de massa (Williams, 1993; Zobayed, 2006), sendo a ventilação forçada (Zobayed, 2000; 2006) uma alternativa para modificar esta condição. A utilização de fatores ambientais como trocas gasosas no ambiente de cultivo e a adequação de compostos orgânicos como a sacarose, podem aproximar as condições do ambiente *in vitro* do *ex vitro*.

Em ambos os tratamentos, as plantas de *P. glomerata* cultivadas com e sem sacarose, apresentaram o mesmo conteúdo de nutrientes, estando a maioria destes dentro das concentrações padrão encontrada nas plantas. Portanto, a absorção entre os tratamentos foi semelhante para a maioria dos nutrientes. Porém, a produção de massa seca foi maior na presença de sacarose. A resposta linear positiva obtida em *P. glomerata* cultivada *in vitro* à variação conjunta da concentração de todos macronutrientes do meio MS deve-se, possivelmente, ao rápido esgotamento dos nutrientes N, P e K do meio de cultivo, em função da elevada taxa de crescimento (Nicoloso et al., 2001; Russowski & Nicoloso, 2003).

O decréscimo na umidade relativa, com a maior troca gasosa no frasco, aumenta significativamente a taxa transpiratória da planta e, conseqüentemente, a absorção de água e de nutrientes (Aitken-Christie et al., 1995). Dessa forma, o rápido desenvolvimento também observado neste experimento, pode justificar a homogeneidade obtida entre os tratamentos nos resultados dos teores de macro e micronutrientes. A perda de água do sistema foi gradativa e durante o período analisado não influenciou diretamente a absorção de compostos pelas plantas.

Quando a fonte de N, adicionada ao meio de cultura, é o NH_4^+ este se torna acidificado, isto possibilita aumentos dos influxos de K e Na, diminuindo o pH intracelular do explante (Ramage & Williams, 2002). Os teores de N são muito elevados *in vitro* comparados ao campo, provavelmente pela alta disponibilidade deste composto no meio. Neste experimento foi possível verificar que a produção de matéria seca e o teor de N foram inversamente proporcionais quando utilizada vedação com membranas, corroborando com os dados de Russowski & Nicoloso (2003) e de Maldaner et al. (2006; 2007), que obtiveram maior produção de biomassa em *P. glomerata* quando reduziram N e aumentaram a concentração de sacarose.

Analisando o conteúdo de P sugere-se que houve esgotamento total deste composto nas plantas que apresentaram maior crescimento, devendo transcorrer da limitação do componente no meio, pela rápida absorção do mesmo. A rápida absorção de P nas plantas cultivadas *in vitro* é relatada por diversos autores, como por exemplo, em discos foliares de tabaco (Ramage & Williams 2002). O fosfato pode certamente atuar como fator limitante no crescimento de explantes em culturas prolongadas (Dantas et al., 2001).

Elevadas concentrações de P podem limitar a disponibilidade de outros íons minerais como Ca, Fe e micronutrientes (George, 1993). O ferro complexa com o fósforo no interior da planta e não consegue exercer o seu papel. Nos tratamentos de *P.*

glomerata apresentando duas membranas a absorção do fósforo provavelmente ocorreu com maior rapidez, impedindo este de se complexar com o ferro, assim estas plantas apresentaram menor quantidade desse composto.

O maior conteúdo de K nas plantas de *P. glomerata* cultivadas com sacarose é devido à ligação deste composto com o transporte de carboidratos na planta. O potássio apresenta papel predominantemente osmótico nas plantas e é altamente móvel no corpo da planta, embora apresente mecanismos seletivos de transporte, influencia no fluxo de outros minerais como o nitrogênio, carbono e fósforo e aumenta a translocação de fotossintatos (Marschner, 1995; Ramage & Williams, 2002).

O tempo de cultivo de *P. glomerata* deve ter influenciado na absorção do cálcio, resultando em teores homogêneos entre os tratamentos, pois o uso de frascos fechados com membranas semipermeáveis melhora a transpiração das plantas e, conseqüentemente, a absorção de nutrientes, principalmente cálcio (Podwyszynska & Olszewski, 1995). Dantas et al. (2001), constataram diferenças significativas na absorção P, Ca, Mg e K no cultivo de cravo em meio líquido sob diferentes condições de trocas gasosas, aos quinze dias de cultivo; no entanto, essas diferenças não persistiram quando analisadas aos 30 dias.

Teores elevados de boro foram encontrados em *P. glomerata*, porém não foram observados sintomas de toxicidade. O boro afeta a biossíntese e deposição da parede celular (Marschner, 1995), que na condição *in vitro* tem desenvolvimento reduzido.

O papel dos micronutrientes no controle da regeneração tem recebido pouca atenção, embora poucos micronutrientes demonstrem o aumento significativo na regeneração (Ramage & Williams, 2002).

As plantas *in vitro*, em geral, se apresentam pouco desenvolvidas, com menor quantidade de cêra nas folhas, redução nos tecidos de sustentação, maior conteúdo de água, estômatos não-funcionais, folhas delgadas, poucos tricomas e baixa atividade fotoautotrófica (Kozai, 1991; Kozai & Kubota, 2001). Tais características não foram observadas em condições tradicionais da cultura de tecidos em *P. glomerata*, e nem nos tratamentos sem sacarose, mas com maior potencial de troca gasosa (T2O). Observou-se também, que todos os tratamentos na ausência dessa fonte de carboidrato apresentaram sistema vascular e de tecidos de sustentação pouco desenvolvido. A adição de carboidratos ao meio de cultura ocorre para suprir as necessidades metabólicas, quer participando na geração de energia, quer como fonte de esqueletos carbônicos para vários processos biossintéticos envolvido na diferenciação e no crescimento celular (Leifert et al., 1995). Essa distribuição de energia ficou bem caracterizada em *P.*

glomerata na presença de sacarose, quando analisado o crescimento e a estrutura anatômica da folha. No entanto, na ausência de sacarose observou-se, nos tratamentos com membrana, que a energia produzida foi mais direcionada para rotas metabólicas envolvidas no crescimento do que na diferenciação celular dessas plantas.

A alta umidade do ar, característica da forma tradicional de cultivo, provoca mudanças na estrutura da cutícula, nos depósitos de cera, nas células do mesofilo e dos estômatos das folhas (Hempel, 1993), condicionando a planta a desenvolver uma frágil estrutura morfológica foliar, com dificuldade no controle de abertura e fechamento dos estômatos (Brainerd & Fuchigami, 1981) em razão da baixa absorção de cálcio (Cassels & Walsh, 1994). Em *P. glomerata*, os menores conteúdos de cálcio foram observados nas plantas que apresentaram alterações estruturais na folha, bem como estômatos mal formados.

Os estômatos diferenciados nas condições tradicionais de cultivo *in vitro* são muitas vezes insuficientes, mal formados e inábeis para a função (Desjardins, 1987; Santamaria & Kerstien, 1994; Pospíšilová et al., 1999), tornando as plantas suscetíveis a grandes perdas de água por transpiração, pois exercem papel na regulação das trocas gasosas e na transpiração, estando relacionados com a capacidade fotossintética e com a aclimatização. Nos tratamentos cujas membranas proporcionaram maior trocas gasosas, ou na presença de sacarose, essas características não foram observadas em *P. glomerata*. Resultados semelhantes foram obtidos em videira, quando cultivadas sob condição fotoautotrófica e com aumento da irradiância, os estômatos apresentaram desenvolvimento similar aos observados nas plantas cultivadas no campo (Shim et al., 2003), refletindo a importância dessa forma de cultivo no processo de aclimatização das plantas.

A redução do percentual de massa seca das plantas cultivadas fotoautotroficamente, em relação aos demais tratamentos, observada em *P. glomerata*, refletiu diretamente na anatomia foliar por ser o órgão mais susceptível às aclimações. A manutenção do pH do meio ou a redução do potencial osmótico refletem na expansão celular (Bolwell & Robertson, 1999). O acúmulo de água na planta é refletido em órgãos frágeis com tecidos de reduzido suporte mecânico e paredes celulares delgadas (Donnelly & Tisdall, 1993), podendo ser baseado na composição nutricional do meio ou no ambiente de cultivo os quais inibem a deposição de parede celular e a formação de colênquima e esclerênquima (Donnelly et al., 1985), e restringem o desenvolvimento do sistema vascular (Donnelly & Tisdall, 1993). Tais características foram observadas em *P. glomerata* nos tratamentos que apresentaram menor produção de biomassa.

As características estruturais observadas em *P. glomerata* nas condições heterotrófica e fotomixotrófica foram semelhantes aos resultados obtidos em couve-flor e tabaco, em plantas submetidas à ventilação forçada na presença de sacarose, sendo constatada nestas plantas maior funcionalidade dos estômatos e arranjo mais compacto nas células do mesofilo (Zobayed et al., 2001). Em condição fotomixotrófica, as plantas aparentemente alternam entre o uso de carboidrato e a fixação de CO₂ (Donnelly & Tisdall, 1993), o que não ocorre na condição fotoautotrófica. Dessa forma, a distribuição da energia produzida nesta condição é destinada de forma diferenciada entre as plantas, justificando as alterações estruturais observadas nestas condições em *P. glomerata*.

As diferenças anatômicas observadas na condição fotoautotrófica podem ser minimizadas com a utilização de combinações de diferentes concentrações de CO₂ obtidas com o enriquecimento, bem como, com as modificações nos padrões de irradiâncias. Estudos posteriores devem ser conduzidos objetivando melhorar a propagação fotoautotrófica de *P. glomerata*, por ser uma importante espécie medicinal e apresentar grande potencial para propagação sob tais condições com reduzidos custos e perspectivas para produção em escala comercial.

Referências Bibliográficas

- AFREEN, F.; ZOBAYED, S.M.A.; KOZAI, T. 2002. Photoautotrophic culture of *Coffea arabusta* somatic embryos: photosynthetic ability and growth of different stages of embryos. **Annals of Botany**, 90:11-19.
- AITKEN-CHRISTIE, J.; KOZAI, T.; SMITH, M.A.L. 1995. **Automation and environmental control in plant tissue culture**. Dordrecht, Kluwer Academic, 574p. Disponível: <http://books.google.com.br>. Acesso em: 15/04/2008.
- ARIGITA, L. GONZÁLEZ, A.; TAMÉS, R.S. 2002. Influence of CO₂ and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinidia deliciosa* explants cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, 115:166-173, 2002.
- BALACHANDRAN, S.; HURRY, V.M.; KELLEY, S.E.; OSMOND, C.B.; ROBINSON, S.A.; ROHOZINSKI, J.; SEATON, G.G.R.; SIMS, D.A. 1997. Concepts of plant biotic stress. Some insights into the stress physiology of virus-infected plants, from the perspective of photosynthesis. **Physiologia Plantarum**, 100:203- 213.
- BJÖRKMANN, O.; DEMMIG, B. 1987. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77K among vascular plants of diverse origins. **Planta**, 170:489-504.
- BOLWELL, G.P.; ROBERSTON, D. 1999. Differentiation of vascular elements in tissue culture. In: SOH, W.Y.; BHOJWANI, S.S. (Eds.). **Morphogenesis in plant tissue culture**. Kluwer: Dordrecht, pp. 3-35.
- BOWES, G. 1993. Facing the inevitable: plants and increasing atmospheric carbon dioxide. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 44:309-332, 1993.
- BRAINED, K. E.; FUCHIGAMI, L. H. 1981. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 106:515-518.
- BUDDENDORF-JOOSTEN, J.M.C.; WOLTERING, E.J. 1994. Components of the gaseous environment and their effects on plant growth and development *in vitro*. **Plant Growth Regulation**, 15: 1-16.
- CAPELLADES, M.; LEMEURE, R.; DEBERGH, P. 1991. Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in *Rosa* cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 25:21-26.
- CASSELS, A.C.; WALSH, C. 1994. The influence of the gas permeability of the culture lid on calcium uptake and stomatal function in *Dianthus* microplants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 37:171-178.
- CHEN, C. 2004. Humidity in plant tissue culture vessels. **Biosystems Engineering**, 88:231-241.
- CORRÊA JR., C.; CORTEZ, D.A.G.; MING, L. C.; SOARES, W. 2006. **Fáfia – O ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Sprengel) Pedersen): Aspectos Agronômicos e Fitoquímicos**. Curitiba: Clichetec, 22p.
- CRITCHLEY, C. 1998. Photoinhibition. In: RAGAVENDRA, A.S. (Ed.). **Photosynthesis: A Comprehensive Treatise**. Cambridge University Press, Cambridge. p. 264-272.
- CRUZ, C.D. 2006. **Programa GENES. Versão Windows**. Editora UFV, Minas Gerais. 642p. (Versão 2006.4.1).
- DAMI, I.; HUGLES, H. 1995. Leaf anatomy and water loss of *in vitro* PEG-treated 'Valiant' grape. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 42(2):179-184.
- DANTAS, A.K.; MAJADA, J.P.; FERNÁNDEZ, B.; CAÑAL, M.J. 2001. Mineral nutrition in carnation tissue cultures under different ventilation conditions. **Plant Growth Regulation**, 33:237-243.

- DENG, R.; DONNELLY, D.J. 1993. *In vitro* hardening of red raspberry through CO₂ enrichment and relative humidity reduction on sugar-free medium. **Canadian Journal of Plant Science**, 73:1105-1113.
- DESJARDINS, Y.; GOSSELIN, A.; YELLE, S. 1987. Acclimatization of *ex vitro* strawberry plantlets in CO₂ enriched environments and supplementary lighting. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 112: 846-851.
- DONNELLY, D.J.; VIDAVER, W.E. LEE, K.Y. 1985. The anatomy of tissue cultured red raspberry prior to and after transfer to soil. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 4:43-50.
- DONNELLY, D.J.; TISDALL, L. 1993. Acclimatization strategies for micropropagated plants. In: AHUJA, M. R. (Ed.). **Micropropagation of wood plants**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p.153-166.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. 1999. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília, Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 370p.
- FERNANDES FILHO, E.I.; VIANA, J.H.M. 2001. QUANTIPORO: um novo programa para tratamento e quantificação de imagens digitais para aplicações em ciência do solo. In: **Congresso Brasileiro de Ciência do Solo**, 28. Londrina, 2001. Resumos. Londrina, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. p.224.
- FIGUEIREDO, L.S.; TEIXEIRA, S.L.; FREITAS, S.P.; VIEIRA, I.J.C.; MARTINS, E.R. 2004. Comportamento de acessos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae) nas condições de Campos dos Goytacazes – RJ. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 7:67-72.
- FLORES, R. 2006. **Cultura de tecidos e produção de β-ecdisona em *Pfaffia glomerata* e *Pfaffia tuberosa* (Amaranthaceae)**. Doutorado (Agronomia), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 168p.
- FUENTES, G.; TALAVERA, C.; DESJARDINS, Y.; SANTAMARIA, J.M. 2005. High irradiance can minimize the negative effect of exogenous sucrose on the photosynthetic capacity of *in vitro* grown coconut plantlets. **Biologia Plantarum**, 49:7-15.
- GEORGE, E. F. 1993. **Plant propagation by tissue culture – The technology**. 2^a ed. Basingstoke, Exegetics Limited, 574 p.
- GÓMEZ-GALERA, S.; PELACHO, A.M.; GENÉ, A.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P. 2007. The genetic manipulation of medicinal and aromatic plants. **Plant Cell Reports**, 26:1689-1715.
- GONÇALVES, L.A.; GERALDINE, R.M.; PICOLI, E.A.T.; VENDRAME, W.A.; CARVALHO, C.R.; OTONI, W.C. 2008. *In vitro* propagation of *Herreria salsaparilha* Martius (Herreriaceae) as affected by different sealing materials and gaseous exchanges. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 92:243-250.
- GRIBAUDO, I.; RESTAGNO, M.; NOVELLO, V. 2003. Vented vessels affect growth rate of *in vitro* *Vitis vinifera* cv. *Nebbiolo*. **Acta Horticulturae**, 616:129-133.
- HDIDER, C.; DESJARDINS, Y. 1994. Effects of sucrose on photosynthesis and phosphoenolpyruvate carboxylase activity of *in vitro* cultured strawberry plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 1:27-33.
- HEMPEL, M. 1993. From micropropagation to “microponics”. **Practical Hydroponics International**, November/December, p.21-23. Acesso em 10/04/2008. Disponível: <http://members.ozemail.com.au/~mhempel/publications/mponic1.htm>.
- JOHANSEN, D. A. 1940. **Plant microtechnique**. Mc Graw-Hill Book Co. Inc., New York. 523p.
- KAGIKI, F.O.; GONÇALVES, G.C.; OLIVEIRA, E.T.; CROCOMO, O.J.; GALLO, L.A. 2004. Indução de calos e produção de saponinas totais em *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 7:43-50.

- KADLECEK, P., TICHÁ, I., HAISEL, D., CAPKOVÁ, V.; SCHAFER, C. 2001. Importance of *in vitro* pretreatment for *ex vitro* acclimatization and growth. **Plant Science**, 161:695-701.
- KADLECEK, P., RANK, B.; TICHÁ, I. 2003. Photosynthesis and photoprotection in *Nicotiana tabacum* L. *in vitro*-grown plantlets. **Journal of Plant Physiology**, 160:1017-1024.
- KARNOVSKY, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, 27:137-138.
- KIRDMANEE, C.; KOZAI, T.; ADELBERG, J. 1997. Rapid acclimatization of *in vitro* eucalyptus plantlets by controlling relative humidity *ex vitro*. **Acta Horticulturae**, 440:616-620.
- KITAYA, Y.; OHMURA, Y.; KUBOTA, C.; KOZAI, T. 2005. Manipulation of the culture environment on *in vitro* air movement and its impact on plantlets photosynthesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 83:251-257.
- KOZAI, T.; HAYASHI, M.; HIROSAWA, Y. KODAMA.; WATANABE, I. 1987. Environmental control for acclimatization of *in vitro* cultured plantlets. Development of the acclimatization unit for accelerating the plantlet growth and the test cultivations. **Journal of Agricultural Meteorology**, 42: 349-358.
- KOZAI, T.; SEKIMOTO, K. 1988. Effect of the number of air exchanges per hour of the closed vessel and the photosynthetic photon flux on the carbon dioxide concentration inside the vessel and the growth of strawberry plantlets *in vitro*. **Environmental Control Biology**, 26:21-29.
- KOZAI, T. 1991. Micropropagation under photoautotrophic conditions. In: DEBERGH, P.C. & ZIMMERMAN, R.H. (Eds). **Micropropagation technology and application**. Amsterdam, Kluwer Academic Publishers. 447-469p.
- KOZAI, T.; KUBOTA, C. 2001. Developing a photoautotrophic micropropagation system for woody plants. **Journal of Plant Research**, 114: 525-537.
- KRAUSE, G.H.; WEIS, E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 42:313-349.
- KUBOTA, C.; KOZAI, T. 1992. Growth and net photosynthetic rate of *Solanum tuberosum in vitro* under forced and natural ventilation. **HortScience**, 27:1312-1314.
- LEIFERT, C. MURPHY, K.P.; LUMSDEN, P.J. 1995. Mineral and carbohydrate nutrition of plant cell and tissue cultures. **Critical Reviews in Plant Sciences**, 14:83-109.
- LU, Q.; WEN, X.; LU, C.; ZHANG, Q.; KUANG, T. 2003. Photoinhibition and photoprotection in senescent leaves of field-grown wheat plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, 41:749-754.
- MALDANER, J.; NICOLOSO, F.T.; SANTOS, E.S.; FLORES, R.; SKREBSKY, E.C. 2006. Sacarose e nitrogênio na multiplicação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Ciência Rural**, 36(4):1201-1206.
- MALDANER, J.; NICOLOSO, F.T.; SANTOS, E.S.; FAGUNDES, C.K.; FLORES, R.; JUCOSKI, G.O.; SKREBSKY, E.C. 2007. Crescimento de plântulas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen cultivadas *in vitro* sob dois níveis de nitrogênio e sacarose, durante seis subculturas sucessivas e aclimatização. **Ciência Rural**, 37:133-140.
- MARINO, G., G. BERARDI. 2004. Different sealing materials for petri dishes strongly affect shoot regeneration and development from leaf explants of Quince 'BA 29'. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, 40:384-388.
- MARSCHNER, M. 1995. **Mineral nutrition of higher plants**. 2nd edn. London: Academic Press. 889p.
- MITRA, A.; BHATTACHARYA, P.S.; DEY,S.; SAWARKAR, S.K.; BHATTACHARYYA, B.C. 1998. Photoautotrophic *in vitro*culture of *Chrysanthemum* under CO₂ enrichment. **Biotechnology Techniques**, 12(4): 335-337.

- MOSALEEYANON, K.; CHAN-UM, S.; KIRMANEE, C. 2004. Enhanced growth and photosynthesis of rain tree (*Samanea saman* Merr.) plantlets *in vitro* under a CO₂-enriched condition with decreased sucrose concentrations in the medium. **Scientia Horticulturae**, 103:51-63.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15:473-497.
- NEUMANN, K.H.; BENDER, L. 1987. Photosynthesis in cell and tissue culture systems. In: GREEN, C.E.; SOMERS, D.A.; HACKETT, W.P.; BIESBOER, D.D. (Eds.). **Plant Tissue and Cell Culture**. New York: Alan R. Liss, p. 151-165.
- NICOLOSO, F.T.; ERIG, A.C.; MARTINS, C.F.; RUSSOWSKI, D. 2001. Micropropagação do ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 3:11-18.
- NICOLOSO, F.T.; FERRÃO, G.E. 2001. Fontes e doses de ferro na micropropagação de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). **IV Encontro Latino Americano de Biotecnologia Vegetal**. Disponível em: www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001. Acesso em 25/07/2007.
- NICOLOSO, F.T.; ERIG, A.C.; RUSSOWSKI, D.; MARTINS, C.F. 2003. Efeito de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, 27:84-90.
- O'BRIEN, T. P.; McCULLY, M. E. 1981. **The study of plant structure principles and selected methods**. Termarcaphi Pty. Ltda, Melbourne – Austrália. 45p.
- OGASAWARA, N. 2003. Ventilation and light intensity during *in vitro* culture affect relative growth rate and photosynthate partitioning of *Caladium* plantlets after transplanting to *ex vitro*. **Acta Horticulturae**, 616:143-149.
- PODWYSZYNSKA, M.; OLSZEWSKI, T. 1995. Influence of gelling agents on shoot multiplication and the uptake of macroelements by *in vitro* culture of rose, cordyline and homalomena. **Scientia Horticulturae**, 64:77-84.
- POSPÍŠILOVÁ, J.; TICHÁ, I.; KADLECEK, P.; HAISEL, D.; PLZÁKOVÁ, Š. 1999. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. **Biologia Plantarum**, 42:481-497.
- RAMAGE, C. M. & WILLIAMS, R. R. 2002. Mineral nutrition and plant morphogenesis. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, 38:116-124.
- ROUT, G.R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. 2000. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. **Biotechnology Advances**, 18:91-120.
- RUSSOWSKI, D.; NICOLOSO, F.T. 2003. Nitrogênio e fósforo no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. **Ciência Rural**, 33:57-63.
- SANTAMARIA, J. M.; KERSTIENS, G. 1994. The lack of control of water loss in micropropagated plants is not related to poor cuticle development. **Physiologia Plantarum**, 91:191-195.
- SHIM, S-W.; HAHN, E-J.; PAEK, K-Y. 2003. *In vitro* and *ex vitro* growth of grapevine rootstock '5BB' as influenced by number of air exchanges and the presence or absence of sucrose in culture media. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 75:57-62.
- SCIUTTI, R.; MORINI, S. 1993. Effect of relative humidity in *in vitro* culture on some growth characteristics of a plum rootstock during shoot proliferation and rooting and on plantlet survival. **Advances in Horticultural Science**, 7:153-156.
- SKREBSKY, E.C.; NICOLOSO, F.T.; FERRÃO, G.E. 2004. Sacarose e período de cultivo *in vitro* na aclimatização *ex vitro* de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Ciência Rural**, 34:1471-1477.

- TSAY, H-S.; LEE, C-Y.; AGRAWAL, D.C.; BASKER, S. 2006. Influence of ventilation closure, gelling agent and explant type on shoot bud proliferation and hyperhydricity in *Scrophularia yoshimurae* – a medicinal plant. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, 42:445-449.
- TURCHETTO, A.C.; ZANANDREA, I.; NASSI, F.L.; BRAGA, E.J.B.; PETERS, J.A.; BACARIN, M.A. 2005. Cinética da emissão de fluorescência das clorofilas em plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) cultivadas *in vitro* sob estresse salino. In: **Anais do 10º Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal**, Recife, PE, CD-ROM.
- VIEIRA, R.F.; SILVA, S.R.; ALVES, R.B.N.; SILVA, D.B.; WETZEL, M.M.V.S.; DIAS, T.A.B.; UDRY, M.C.; MARTINS, R.C. 2002. Estratégias para conservação e manejo de recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas: **Resultados da 1ª Reunião Técnica. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Ibama, CNPq, Brasília. 184p.
- WELLBURN, A. R. 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, 144:307–313.
- WILLIAMS, R.R. 1993. Mineral nutrition in vitro – a mechanistic approach. **Australian Journal of Botany**, 41:237-251.
- WRIGHT, D.P.; BALDWIN, B.C.; SHEPHARD, M.C.; SCHOLLES, J.D. 1995. Source-sink relationships in wheat leaves infected with powdery mildew. II. Changes in the regulation of the Calvin cycle. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 47:255-267.
- XIAO, Y.; KOZAI, T. 2006. In vitro multiplication of statice plantlets using sugar-free media. **Scientia Horticulturae** 109:71–77.
- ZOBAYED, S.M.A. 2000. *In vitro* propagation of *Lagerstroemia* spp. from nodal explants and gaseous composition in the culture headspace. **Environment Control in Biology**, 38:1-11.
- ZOBAYED, S.M.A.; AFREEN, F.; KOZAI, T. 2001. Physiology of *Eucalyptus* plantlets grown photoautotrophically in a scaled-up vessel. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, 37:807-813.
- ZOBAYED, S.M.A. 2006. Aeration in plant tissue culture. In: DUTTA GUPTA, S.; IBARAKI, Y. (Eds.). **Plant Tissue Culture Engineering**. Netherlands: Springer, p. 313-327.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os índices de pegamento e de sobrevivência obtidos demonstraram que não houve dificuldades no processo de estabelecimento e aclimatização das plantas enxertadas. A enxertia não comprometeu o desenvolvimento das plantas em condição de campo, sendo obtido vigoroso crescimento. Podendo ser também utilizada como uma importante ferramenta para a seleção de acessos resistentes e susceptíveis aos nematóides.

Os sucessivos eventos estruturais ocorridos na formação da união das plantas enxertadas de *P. glomerata* evidenciam a enxertia funcional e compatível. Houve a diferenciação e reconexão dos elementos vasculares nas plantas enxertadas, a reconstituição do sistema dérmico finalizando o processo de cicatrização, assim como, o início do crescimento secundário na região da união característico na espécie.

Os acessos utilizados demonstraram compatibilidade fisiológica e estrutural, as plantas enxertadas demonstraram interação fisiológica constatada por alterações no início do período reprodutivo, na produção de massa seca de raiz e na concentração do princípio ativo. Demonstrando a viabilidade da técnica para o objetivo estabelecido.

As folhas e inflorescências de *P. glomerata* apresentaram os maiores teores de β -ecdisona, quando comparados com o sistema radicular. No entanto, a dificuldade de isolar o princípio ativo da parte aérea, assim como, a proporção de massa seca produzida tornam-se limitantes para a utilização em escala comercial destes órgãos. Sendo assim, o sistema radicular continua sendo o principal órgão de interesse da espécie.

A enxertia *in vitro* resultou em menor produtividade por planta, entretanto, houve maior concentração de β -ecdisona, essa característica é relevante para a indústria, pois o seu maior interesse é a obtenção de produtos de qualidade com altos índices na obtenção do princípio ativo. Sendo uma técnica eficiente na propagação vegetativa de *P. glomerata*, com o objetivo de explorar a diversidade genética existente entre suas populações, estabelecendo diferentes combinações de acessos para agregar valor comercial a esta importante espécie medicinal.

A concentração de sacarose influencia o desenvolvimento estrutural de *P. glomerata*, afetando diretamente a formação de paredes celulares e de tecidos de sustentação, bem como a diferenciação de tecidos vasculares.

Esta fonte de carboidrato também influenciou os padrões fisiológicos, sendo obtido maior teor de pigmentos cloroplastídicos e maior massa seca na presença deste carboidrato, enquanto que, a taxa fotossintética foi maior na ausência de sacarose. A ausência de sacarose e de membranas comprometeu o desenvolvimento das plantas.

O cultivo heterotrófico de *P. glomerata* não interfere nos padrões de crescimento da espécie, e nesta condição a organização estrutural da folha é definida, inclusive apresentando justaposição das células e estômatos funcionais.

A condição fotomixotrófica permite uma maior proximidade às condições ambientais *ex vitro*, e a interação, entre a concentração de sacarose e os tipos de vedações permeáveis às trocas gasosas, trouxe efeitos favoráveis nos parâmetros fisiológicos e estruturais.

As plantas de *P. glomerata* desenvolvidas em sistema permeável a trocas gasosas, na ausência de sacarose, apresentaram crescimento vigoroso; no entanto, a organização estrutural da folha foi estabelecida apenas com a utilização de duas membranas. Portanto, o tipo de vedação usado está associado à indução da nutrição fotoautotrófica nas plantas de *P. glomerata* cultivadas *in vitro*, demonstrando que a espécie apresenta potencial para propagação sob tal condição.