

JAQUELINE MARTINS VASCONCELOS

PROPAGAÇÃO, TUBERIZAÇÃO *IN VITRO* E PRODUÇÃO DE 20-
HIDROXIECDISONA EM ACESSOS DE *Pfaffia glomerata* (SPRENG.)
PEDERSEN SOB CULTIVO EM FONTE DE CARBONO E
FITORREGULADORES

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa como parte das
exigências do Programa de Pós-
graduação em Botânica, para a
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012

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

T

V331p
2012

Vasconcelos, Jaqueline Martins, 1988-

Propagação, tuberização *in vitro* e produção de
20-hidroxicedisona em acessos de *Pfaffia glomerata*
(Spreng.) Pedersen sob cultivo em fonte de carbono e
fitorreguladores / Jaqueline Martins Vasconcelos.

– Viçosa, MG, 2012.

x, 88f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Wagner Campos Otoni.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Pfaffia glomerata*. 2. Propagação *in vitro*. 3. Plantas
medicinais. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 583.53

JAQUELINE MARTINS VASCONCELOS

PROPAGAÇÃO, TUBERIZAÇÃO *IN VITRO* E PRODUÇÃO DE 20-
HIDROXIECDISONA EM ACESSOS DE *Pfaffia glomerata* (SPRENG.)
PEDERSEN SOB CULTIVO EM FONTE DE CARBONO E
FITORREGULADORES

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa como parte das
exigências do Programa de Pós-
graduação em Botânica, para a
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 8 de março de 2012.



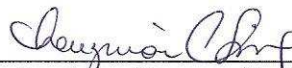
Andréa Dias Koehler



Cléber Witt Saldanha



Leonardo Lucas Carnevalli Dias
(Coorientador)



Luzimar Campos da Silva
(Coorientadora)



Wagner Campos Otoni
(Orientador)

*A meus pais,
Sebastião Carvalho Vasconcelos e Onilda Martins Vasconcelos.*

*Ao meu querido irmão,
Sebastião Carvalho Vasconcelos Filho.*

*Ao meu noivo,
Rodrigo de Castro Sousa.*

*Ao professor e amigo,
Wagner Campos Otoni*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmão por todo amor, compreensão e apoio na conquista de mais um sonho.

Ao meu noivo e toda sua família por todo o incentivo e apoio aos meus estudos.

A Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós Graduação em Botânica pela grande oportunidade de aprendizado, amadurecimento e realização do curso.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Vegetal.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro.

A família do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetal II e alunos vinculados, Leo, Marcos, Elyabe, Lorena, João Paulo, Marcela, Crislene, Cleber, Joseila, Diego, Bruno, Denise, Lili e todos que por ali passaram durante esses dois anos de convivência e me ajudaram na condução dos meus trabalhos.

Aos amigos do Laboratório de Anatomia Vegetal, Larisse, Wellington (Pé), Tiago (Tica), Dia, Naiara e Nívea.

A minha família Viçosa, Talita, Pollyanna, Larisse, Pé, Nívea, pela amizade, sessões de cinema, noites de estudo, almoços na pensão, risadas, conforto nos momentos de saudade de casa, que tonaram Viçosa meu segundo lar e juntos me ajudaram a realizar esse sonho.

Aos meus professores, Aristéa, Renata, João Augusto, Edgar, Marco Aurélio, João Marcos, Adriano, Rita, Ana Paula, Flávia, por todo auxílio e aprendizado.

Aos meus co-orientadores, professora Luzimar e Dr. Leonardo Dias (Leo), pela ajuda e apoio.

À Dra. Andréa Koehler e ao professor Mailson Rêgo, por toda ajuda e compreensão.

Em especial, ao professor orientador Wagner Otoni, por toda paciência, apoio, amizade, confiança e incentivo.

A Deus, por todas as bênçãos e por todas as pessoas maravilhosas que passaram por minha vida,

MUITO OBRIGADA!!!

BIOGRAFIA

JAQUELINE MARTINS VASCONCELOS, filha de Onilda Martins Vasconcelos e Sebastião Carvalho Vasconcelos, nasceu em 15 de fevereiro de 1988, na cidade de Rio Verde, no estado de Goiás.

Em 2006, graduou-se em Ciências Biológicas pela Universidade de Rio Verde. Iniciou o mestrado em Botânica na Universidade Federal de Viçosa em fevereiro de 2010, tendo defendido sua dissertação em 8 de março de 2012.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----|
| RESUMO | vii |
| ABSTRACT | ix |
| CAPITULO 1: INTRODUÇÃO GERAL..... | 1 |
| INTRODUÇÃO GERAL..... | 2 |
| REFERÊNCIAS..... | 9 |
| CAPÍTULO 2: MICROPROPAGAÇÃO DE <i>Pfaffia glomerata</i> (SPRENG.) PEDERSEN SOB CULTIVO EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO..... | 15 |
| RESUMO..... | 16 |
| ABSTRACT..... | 17 |
| INTRODUÇÃO..... | 18 |
| MATERIAL E MÉTODOS..... | 20 |
| Material vegetal..... | 20 |
| Influência de diferentes concentrações de glicose e sacarose sobre multibrotações <i>in vitro</i> de dois acessos de <i>Pfaffia glomerata</i> | 20 |
| Análise estatística..... | 21 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 22 |
| Influência de diferentes concentrações de glicose e sacarose sobre a multiplicação <i>in vitro</i> de dois genótipos de <i>Pfaffia glomerata</i> | 22 |
| CONCLUSÕES..... | 28 |
| REFERÊNCIAS..... | 29 |
| CAPÍTULO 3: PRODUÇÃO DE 20-HIDROXIECDISONA EM <i>Pfaffia glomerata</i> (SPRENG.) PEDERSEN SOB CULTIVO EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO..... | 33 |
| RESUMO..... | 34 |
| ABSTRACT..... | 35 |
| INTRODUÇÃO..... | 36 |
| MATERIAL E MÉTODOS..... | 39 |
| Material vegetal..... | 39 |
| Influência do genótipo e de diferentes concentrações de glicose e | |

| | |
|---|----|
| sacarose na produção de 20-hidroxicadisona (20-E) <i>in vitro</i> | 39 |
| Determinação do teor de β -ecdisona (20-E)..... | 40 |
| Análise micromorfológica de folhas de <i>Pfaffia glomerata</i> cultivadas <i>in vitro</i> em meio MS com diferentes fontes e concentrações de glicose e sacarose..... | 41 |
| Análise estatística..... | 42 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 43 |
| Influência do genótipo e de diferentes concentrações de glicose e sacarose na produção de 20-Hidroxicadisona (20-E) <i>in vitro</i> | 43 |
| Análise micromorfológica de folhas de <i>Pfaffia glomerata</i> cultivadas em meio MS com diferentes fontes de carbono..... | 50 |
| CONCLUSÕES..... | 65 |
| REFERÊNCIAS..... | 66 |
| CAPÍTULO 4: ESTUDOS PRELIMINARES NA INDUÇÃO DA TUBERIZAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE RAÍZES DE <i>Pfaffia glomerata</i> (SPRENG.) PEDERSEN..... | |
| RESUMO..... | 72 |
| ABSTRACT..... | 73 |
| INTRODUÇÃO..... | 74 |
| MATERIAL E MÉTODOS..... | 75 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 78 |
| CONCLUSÃO..... | 80 |
| REFERÊNCIAS..... | 83 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 84 |
| | 88 |

RESUMO

VASCONCELOS, Jaqueline Martins, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2012. **Propagação, tuberização *in vitro* e produção de 20-hidroxiecdisona em acessos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen sob cultivo em fonte de carbono e fitoreguladores.** Orientador: Wagner Campos Otoni. Coorientadores: Luzimar Campos da Silva e Leonardo Lucas Carnevalli Dias.

Plantas do gênero *Pfaffia* estão entre as principais espécies medicinais comercializadas no Brasil, sendo suas propriedades medicinais atribuídas a substâncias presentes nas raízes. É grande a necessidade o desenvolvimento de protocolos que viabilizem a propagação em larga escala dessa espécie para garantia de suprimento de material propagativo, em qualidade e quantidade. Sendo assim, esse trabalho objetivou o desenvolvimento de protocolos para a produção rápida e em larga escala da espécie e promover a tuberização das raízes de plantas cultivadas *in vitro*, uma vez que esse é o principal órgão comercializado. Para a promoção de multibrotações axilares *in vitro*, segmentos nodais dos acessos 04 e 13 foram inoculados em frascos com meio MS acrescido com 0,5 mg L⁻¹ de BA + ANA, em diferentes fontes de carbono (0,1M, 0,2 M ou 0,3 M de glicose ou sacarose), por 30 dias de cultivo. Foi avaliado o número de brotos produzidos, sendo observado a formação e coloração dos calos. Para viabilização da produção *in vitro* de 20-E, segmentos nodais dos acessos 4 e 13 foram inoculados em recipientes tipo Magentas[®] contendo meio MS com diferentes fontes de carbono (glicose a 0,1 M e 0,2 M; sacarose a 0,1 M ou 0,2 M; a combinação de sacarose + glicose 0,1 M ou 0,2 M) e sem fonte de carbono (controle), e ensacados em saco plástico com filtro bacteriológico, por 30 dias de cultivo. Foram avaliados o comprimento médio das plantas, a massa seca da parte aérea e raízes, verificando-se a porcentagem de 20-E na massa seca de folhas e raízes nos diferentes tratamentos e realizou-se análise micromorfométrica das folhas. Para promoção da tuberização *in vitro*, segmentos nodais dos acessos 22 e 43 foram inoculados em frascos de vidro contendo meio MS acrescido com diferentes combinação de regulador de crescimento (0,5 mg.L⁻¹ de BA; 0,5 BA + AIB; 0,5 BA + 1,0 DE AIB; 0,5 AIB) e sem regulador de crescimento (controle) por 10 dias. Após, os explantes foram transferidos para frascos contendo 0,2 M de sacarose por 30 dias de cultivo. Foram avaliados a porcentagem de cobertura do fundo do frasco por raízes, massa seca da parte aérea e raízes. No experimento de multibrotações, foi observada a formação de calos na base dos

explantes em todos os tratamentos, sendo a coloração dos calos do acesso 13 variando de branco a verde claro e dos brotos de verde claro a róseo. No acesso 4, a coloração dos calos variou de branco a verde escuro arroxeado. A característica de formação de multibrotações se mostrou genótipo-dependente, sendo o acesso 04 superior ao acesso 13 quando cultivado em glicose ou sacarose a 0,1 M (35 e 43 brotos/explantes). Para o teor de 20-E também foram observados efeitos significativos entre os acessos e as fontes de carbono, sendo do acesso 13 as maiores médias tanto para raízes quanto folhas (1,02 e 1,07%). As maiores médias para o comprimento da planta, massa seca das raízes e parte aérea foi observada para o acesso 13. Na análise micromorfológica das folhas em ambas as faces, o número de células epidérmicas, estômatos, e densidade estomática foram superiores no acesso 13 em relação ao acesso 04. O protocolo proposto para indução de raízes tuberiformes foi ineficaz, entretanto, plantas do acesso 43 apresentaram maior massa seca da parte aérea em relação ao acesso 22 e sendo dos tratamentos com 0,5 mg.L⁻¹ de BA as maiores médias para massa seca da parte aérea e raízes. Não houve efeito significativo nos acessos e reguladores de crescimento para porcentagem de enraizamento e dos acessos para massa seca das raízes. Em conformidade com os resultados, esses servirão para auxílio de pesquisas futuras sobre *Pfaffia glomerata*.

ABSTRACT

VASCONCELOS, Jaqueline Martins, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2012. **Propagation and *in vitro* tuberization and production of 20-hydroxyecdysone in *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen accessions under cultivation on carbon source and growth regulators.** Adviser: Wagner Campos Otoni. Co-advisers: Luzimar Campos da Silva and Leonardo Lucas Carnevalli Dias.

Plants of the genus *Pfaffia* are among the most traded medicinal species in Brazil whose medicinal properties are attributed to substances present in the roots. There is a great need for developing protocols to enable the large-scale propagation of this species and assure supply of large amounts of high quality propagation material. Thus, this study aimed to develop protocols for the rapid and large scale production of *Pfaffia* species and promote root tuberization of plants grown *in vitro*, since this is the main traded part. For *in vitro* axillary bud proliferation, nodal segments of the accessions 4 and 13 were inoculated in Magenta[®] boxes containing MS medium supplemented with 0.5 mg L⁻¹ BA + NAA, in different carbon sources (0.1 M, 0.2 M or 0.3 M of glucose or sucrose), for 30 days in culture. The number of shoots produced was recorded and the formation and color of calli were evaluated. To promote *in vitro* production of 20-E, nodal segments of accessions 4 and 13 were inoculated into Magenta[®] boxes containing MS medium with different carbon sources (0.1 M and 0.2 M glucose; 0.1 M or 0.2 M sucrose; and the combination of sucrose + 0.1 M or 0.2 M glucose) and a control without carbon source, and bagged in plastic bags with bacteriological filter, for 30 days of culture. The mean length of plants, dry mass of shoots and roots, the percentage of 20-E in the dry mass of leaves and roots of the different treatments were evaluated and the micro-morphometric analysis of leaves was performed. To promote the tuberization *in vitro* of roots, nodal segments of accessions 22 and 43 access were inoculated in glass jars containing MS medium supplemented with different combinations of growth regulators (0.5 mg l⁻¹ BA; 0.5 BA + AIB; 0.5 BA + 1.0 AIB; 0.5 AIB) and without growth regulators (control), for 10 days. The explants were then transferred to jars containing 0.2 M sucrose for 30 days of culture. The percentage of the bottom of the jar that was covered by roots, the dry mass of shoots and dry mass of roots were evaluated. In the experiment of axillary bud proliferation, there was formation of callus at the base of the explants in all treatments, and the color of the calli of accession 13 ranged from white to light green and the color of shoots from light green to pinkish. For accession

4, the color of the calli varied from white to dark green and purple. The characteristic axillary bud proliferation proved genotype-dependent: accession 4 was superior to accession 13 when grown on glucose or sucrose 0.1 M (35 and 43 shoots/explant). The content of E-20 also showed significant effects between the accessions and the carbon sources: accession 13 showed the highest means for both roots and leaves (1.02 and 1.07%). The highest means for plant height, dry mass of roots and shoots were recorded for accession 13. In the micromorphometric analysis of both sides of the leaves, the number of epidermal cells, stomata, and stomatal density were higher in the accession 13 compared with the accession 04. The protocol proposed for tuber induction was ineffective, however, plants of accession 43 had higher shoot dry mass in relation to accession 22. The treatments with 0.5 mg.L⁻¹ BA provided the highest means for dry mass of shoots and roots. There was neither significant effect of accession and growth regulator on percentage of rooting nor effect of accession on root dry mass. The results of this study will serve to guide future research on *Pfaffia glomerata*.

CAPITULO 1: INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

Na década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que mais da metade dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso à saúde (VEIGA JUNIOR et al., 2005). Entretanto, para serem consideradas medicinais, dentro da ciência moderna, estas tem que apresentar substâncias de ação farmacológica, que ajam direta ou indiretamente como medicamento. Mas, para ter esse reconhecimento é necessário que sua autenticidade, integridade e pureza sejam comprovadas (MACHADO, 2009).

O emprego correto de plantas para fins terapêuticos pela população em geral, requer o uso de plantas medicinais selecionadas por sua eficácia e segurança terapêutica, baseadas na tradição popular ou cientificamente validadas como medicinais (LORENZI & MATOS, 2002).

O uso de plantas medicinais faz parte da história humana e foram os primeiros recursos terapêuticos utilizados pelos povos (TOMAZZONI et al., 2006). O mercado mundial de fitoterápicos movimentava cerca de US\$ 22 bilhões por ano. Em 2000, o setor faturou US\$ 6,6 bilhões nos EUA e US\$ 8,5 bilhões na Europa. No Brasil, estima-se que o comércio de fitoterápicos seja da ordem de 5% do mercado total de medicamentos, sendo avaliado em mais de US\$ 400 milhões.

A demanda por plantas medicinais nativas do Brasil tende a aumentar com a descoberta de substâncias que não podem ser obtidas sinteticamente (SERRA et al., 2011). De acordo com os autores, no Brasil, a obtenção de plantas medicinais para uso popular tem ocorrido de forma extrativista e a coleta indiscriminada dessas plantas nativas pode causar sua extinção, a depredação do patrimônio genético e até mesmo engano na utilização das espécies.

Dentre as principais espécies medicinais comercializadas no Brasil, algumas espécies do gênero *Pfaffia* estão sendo estudadas por suas propriedades medicinais, atribuídas a substâncias presentes nas raízes (SERRA et al., 2011). As raízes de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, bem como de *P. paniculata* Kuntze, são de grande interesse comercial, na forma de fito-medicamento e suplementos alimentares, em razão do uso popular como antitumoral, antidiabetes e como tônico afrodisíaco (MAY et al., 2008), sendo esses efeitos provavelmente ocasionados pela ecdisterona (KAMADA., 2006; FENNER et al., 2008; FLORES et al., 2009a, FLORES et al., 2009b). Segundo Lorenzi & Matos (2002), as populações indígenas da Amazônia usam as raízes de *Pfaffia* sp. há mais de 300 anos para a cura de ampla variedade de males.

O gênero *Pfaffia* é nativo da América Tropical, mas possui ampla distribuição pelo mundo, estando presente em países como Guiana, Brasil, Paraguai, Argentina, Bolívia e Colômbia. No Brasil, foram descritas 27 espécies ocorrentes nos estados do Amazonas, Mato Grosso, Goiás, São Paulo e Paraná (KAMADA, 2006). É comum encontrá-la na beira de rios e nas orlas das matas de galerias, onde podem receber bastante luz, pois é uma espécie hidrófila e heliófita (ALVES et al., 2010). São no Brasil conhecidas popularmente como ginseng-brasileiro, para tudo, suma ou corango (SOUZA & LORENZI, 2005; OLIVEIRA, 1986).

P. glomerata (Figura 1) é uma espécie de ginseng brasileiro de maior importância medicinal e comercial. Caracteriza-se por ser uma erva perene relativamente alta, apresenta caules retos, delgados e ocos quando adultos, raiz fusiforme e inflorescência muito ramificada (Vigo et al., 2004). A espécie *P. glomerata* atinge cerca de 2 m de altura; possui caule ereto, nós engrossados, entrenós com cerca de 23 cm de comprimento, ramificações predominantemente

dicotômicas. Folhas com pecíolo muito curto; lâminas foliares linear-oblongas a longo-ovaladas, com 1 – 14 cm de comprimento e 0,3 – 4,5 cm de largura; ápice acuminado a mucronado, base decorrente, nervuras mais proeminentes na face dorsal, pubescência tênue ou densa, principalmente na face dorsal; coloração verde-clara ou azulada na face abaxial. Possui inflorescência capituliforme com pecíolo longo (ate 20 cm), branco-amareladas e capítulos com menos de 8 mm de diâmetro. Bráctea ovalada, uninervada e mucronada com 1 - 1,5 mm de comprimento. Flores hermafroditas com cerca de 3 – 4 mm, tépalas branco-amareladas, trinervadas. Tubo seminal de 0,5 – 1,0 mm. Ovário ovalado-globoso, geralmente menor do que o tubo estaminal na antese; estigma capitado, bilobado e papiloso (VASCONCELOS, 1986).



Figura 1. Características gerais de *Pfaffia glomerata*. **A:** Detalhes da inflorescência. **B:** Planta cultivada *in vitro*. **C:** Plantas cultivadas na Universidade Federal de Viçosa (Fonte: Iarema, 2008).

Os produtos provenientes da *Pfaffia* são indicados como regeneradores celulares, nos tratamentos contra o esgotamento físico, mental e falta de memória, como auxiliares no tratamento de irregularidades circulatória, estresse, anemias, diabetes, contra fadiga física, intelectual e de indisposição em geral, além de contribuir como estimulante sexual (RATES & GOSMANN, 2002).

As saponinas e os compostos esteroidais representam um grupo de constituintes químicos importantes em espécies de *Pfaffia* e atuam como coadjuvantes químicos na absorção de outras substâncias ativas pelo organismo. Em *P. glomerata* foram descritas a β -ecdisona (20-hidroxiecdisona, 20-E), ácido glomérico, ácido pfamérico, oleanólico, rubrosterona, β -D-glucopiranosil oleanolato e seus glicosídeos (RATES & GOSMANN, 2002; KAMADA, 2006).

Festucci-Buselli et al. (2008) relataram que a biossíntese, a regulação e a função precisa do fitoecdisteroide 20-E em *P. glomerata* são desconhecidas. Três hipóteses sobre suas funções têm sido propostas: como compostos fitohormonais, compostos protetores contra insetos fitófagos não adaptados e como fonte de fitoesteroides polihidroxilados requeridos no crescimento e na proliferação celular. Segundo os autores, os órgãos que apresentam maiores teores de 20-E são flores, seguidas pelas raízes, folhas e caules, respectivamente.

Neste sentido, várias pesquisas vêm sendo realizadas no intuito de desenvolver planos de manejo e estratégias de cultivo para essa espécie (VIGO et al., 2004; CORRÊA JUNIOR et al., 2008; GUERREIRO et al., 2009; KAMADA et al., 2009; SCALON et al., 2009; SERRA et al., 2011).

O estabelecimento de métodos eficientes para a propagação clonal de acessos de *P. glomerata*, com elevada produção de 20E, em larga escala são fundamentais para o fornecimento de mudas de qualidade. A propagação de plantas homogêneas

de *P. glomerata* via estaquia, em condições de viveiro e hidroponia, embora sendo viável, produz um número de mudas pouco expressivo (NICOLOSO et al., 1999). A cultura de tecidos tem auxiliado na produção comercial de mudas homogêneas e de qualidade, na conservação do germoplasma, além de auxiliar na seleção e melhoramento de genótipos com potencial para serem utilizados pela indústria farmacêutica (FLORES et al., 2009c).

No que diz respeito a *Pfaffia*, os trabalhos de propagação *in vitro* ainda são em número restrito, considerando o impacto econômico e social uma demanda para conservação da espécie em bancos de germoplasma *in vitro*, bem como o estabelecimento de protocolos eficientes de propagação em larga escala da espécie.

A propagação *in vitro* de *P. glomerata* tem sido conduzida tradicionalmente pelo método convencional de micropropagação através da proliferação de gemas axilares de segmentos nodais (RUSSOWSKI & NICOLOSO, 2003; MALDANER et al., 2006; NICOLOSO et al., 2008; SKREBSKY et al., 2009; FLORES et al., 2009b; FLORES et al., 2009c; ALVES et al., 2010; FLORES et al., 2010). Recentemente, Iarema et al. (2012) verificaram que a *P. glomerata* possui potencial para ser cultivada *in vitro* em sistema fotoautotrófico.

Flores et al. (2009c, 2010) avaliaram o efeito de reguladores de crescimento na micropropagação de *P. glomerata* e *P. tuberosa* e verificaram que o cultivo de segmentos nodais em meio MS suplementado com 1 µM de Thidiazuron (TDZ), mostrou ser viável para micropropagação. Em *P. glomerata*, a concentração regular de macro e micronutrientes do meio MS e a ausência de carvão ativado favoreceram o desenvolvimento das plântulas (NICOLOSO et al., 2001).

Nicoloso et al. (2003) avaliaram o efeito de doses e fontes de carboidratos no crescimento de *P. glomerata*, e observaram que a melhor fonte de carbono para o

crescimento *in vitro* da *P. glomerata* foi a sacarose. Maldaner et al. (2007) avaliaram o efeito da sacarose e do nitrogênio (N) na multiplicação *in vitro* de *P. glomerata* e concluíram que a redução da concentração de N, para 50% do meio MS, associada ao incremento na dose de sacarose até 45 g L⁻¹, favoreceu o crescimento em altura, número de segmentos nodais e brotações, bem como a produção de biomassa.

Flores et al. (2010), estudando o teor de β -ecdisona nas raízes e parte aérea de dois genótipos de *P. glomerata* (BRA e JB-UFSM) e *P. tuberosa* propagadas *in vitro*, e em campo, constataram que o genótipo BRA apresentou maior taxa de proliferação e conteúdo de β -ecdisona. A cultura de segmentos nodais de *P. tuberosa* em meio MS com adição de TDZ demonstrou ser um método adequado para a micropropagação, devido à taxa de multiplicação elevada e bom desenvolvimento das plantas. Ambas as espécies apresentaram boa adaptação às condições *ex vitro*. O teor de β -ecdisona em *P. tuberosa* micropropagadas foi semelhante à encontrada em plantas crescidas no campo. Para ambas as espécies, a parte aérea apresentou maior conteúdo de β -ecdisona que as raízes.

Sabendo do elevado potencial de multiplicação da espécie, a cultura de tecidos se torna uma importante ferramenta para a conservação da espécie. Além disso, pode auxiliar diversos estudos fisiológicos, genéticos e possivelmente na produção *in vitro* de produtos do metabolismo secundário. No entanto, as plantas cultivadas *in vitro* crescem em condições diferentes das plantas cultivadas *ex vitro*, e frequentemente, exibem peculiaridades no seu desenvolvimento anatômico, morfológico e fisiológico (CALVETE et al., 2002; MAJADA et al., 2000; JAUSORO et al., 2010). Segundo Bouguet & Torregrossa (2003) e Machado & Biasi (2011) a organização histológica de plantas cultivadas *in vitro* é influenciada, podendo induzir adaptações morfológicas como a redução no tamanho dos órgãos.

A anatomia foliar é um fator de bastante importância, pois dela que depende, em grande parte, a adaptação das plantas ao seu ambiente. São as características químicas e/ou morfológicas da superfície foliar que condicionam, por exemplo, a quantidade de luz absorvida ou refletida, o grau de hidrofobia do órgão, a pressão do ar em contato com as folhas, a eficiência do órgão na defesa contra parasitas e patógenos, a quantidade de poluentes ou defensivos absorvida e, evidentemente, a magnitude da transpiração (SANTIAGO et al., 2001).

Festucci-Buselli et al. (2008b) caracterizaram o acúmulo temporal de 20E em órgãos de *P. glomerata* e destacaram a importância das raízes como um dos principais órgãos acumuladores de 20-E. Sendo assim, o estabelecimento de um sistema de indução de raízes tuberiformes *in vitro* de *Pfaffia* é de grande importância para que se avalie o acúmulo temporal de 20-E nesses órgãos.

Para várias espécies a indução de tuberização *in vitro* foi obtida, sendo útil em estudos fisiológicos ou como estratégias de propagação e de conservação *in vitro* (XU et al. 1998; VERAMENDI et al., 1999; SILVA et al., 2001; OMOKOLO et al., 2003; HEN et al., 2007; FOGAÇA et al., 2010).

Sendo assim, esse trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de fontes de carbono em diferentes concentrações na multiplicação, produção de 20-E e tuberização de raízes de *P. glomerta* cultivadas *in vitro*, bem como o efeito as variações das fontes de carbono na anatomia foliar.

REFERÊNCIAS

- ALVES, R.B.N.; BERTONI, B.W.; VIEIRA, R.F.; FRANÇA, S.C.; MING, L.C.; PEREIRA, AM.S. **Influência de diferentes meios de cultura sobre o crescimento de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen** (Amaranthaceae) para conservação *in vitro*. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, 2010. p.510-515.
- BOUQUET, A.; TORREGROSA, L. **Micropropagation of the grapevine (*Vitis* spp.)**. In: JAIN, S. M. (Ed.). Micropropagation of woody trees and fruits. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 319-352.
- CALVETE, E.O.; AZEVEDO, M.; BORDIGNON, M.H.; SUZIN, M. **Análises anatômicas e da biomassa em plantas de morangueiro cultivadas *in vitro* e *ex vitro***. Horticultura Brasileira, 2002. p. 649-653.
- CORRÊA JÚNIOR, C., MING, L.C.; CORTEZ, D.A.G. **Sazonalidade na produção de raízes e teor de β -ecdisona em acessos de *fáfia***. Horticultura Brasileira, 2008. p. 393-397.
- FENNER, R., ZIMMER, A.R., NEVES, G., KLIEMANN, M., GOSMANN, G., RATES, STELA. M.K. **Hypnotic effect of ecdysterone isolated from *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen**. Brazilian Journal of Pharmacognosy, 2008. p. 170-176,
- FESTUCCI-BUSELLI, R.A.; CONTIM, L.A.S.; BARBOSA, L.C.A.; STUART, J.J.; VIEIRA, R.F.; OTONI, W.C. **Level and distribution of 20-hydroxyecdysone during *Pfaffia glomerata* development**. Brazilian Journal of Plant Physiology, 2008. p. 305-311.
- FLORES, R.; BRONDANI, D.; CEZAROTTO, V.; GIACOMELLI, S.R.; NICOLOSO, F. T. **Micropropagation and β -ecdisona content of the Brazilian**

ginsengs *Pfaffia glomerata* and *Pfaffia tuberosa*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2010. p. 210-217.

FLORES, R.; CEZAROTTO, V.; BRONDANI, D.; GIACOMELLI, S.R.; NICOLOSO, F.T. **Análise de β -ecdisona em plantas *in vivo* e *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, através da cromatografia em camada delgada.** *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 2009a. p. 368-371.

FLORES, R.; NICOLOSO, F.T.; BRONDANI, D.; MALDANER, J.; CEZAROTTO, V.; GIACOMELLI, S.R. **Extração de ecdisterona em raízes de ginseng brasileiro.** *Ciência Rural*, 2009b. p. 1223-1226.

FLORES, R.; NICOLOSO, F.T.; MALDANER, J.; GARLET, T.M.B. **Benzilaminopurina (BA) e thidiazuron (TDZ) na propagação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen.** *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 2009c. p. 292-299.

FLÔRES, A.V. **Introdução *in vitro* de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Martius et Zuccarini).** Mestrado em Engenharia Florestal. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2007. 75p.

GUERREIRO, C.P.V.; MARQUES, M.O.M.; FERRACINI, V.L.; QUEIROZ, S.C.N.; MING, L.C. **Produção de β -ecdisona em *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen em função da adubação orgânica em 6 épocas de crescimento.** *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 2009. p. 392-398.

IAREMA, L.; CRUZ, A.C.F.; SALDANHA, C.W.; DIAS, L.L.C.; VIEIRA, R.F.; OLIVEIRA, E.J.; OTONI, W.C. **Photoautotrophic propagation of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen].** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2012.

- JAUSORO, V.; LLORENTE, B.E.; APÓSTOLO, N.M. **Structural differences between hyperhydric and normal *in vitro* shoots of *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC) Mattos (Bignoniaceae).** Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2010. p. 183–191.
- 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 em Genética e Melhoramento. Universidade Federal de Viçosa, viçosa, 160p.
- KAMADA, T.; PICOLI, E.A.E.; VIEIRA, R.F.; BARBOSA, L.C.A.; CRUZ, C.D.; OTONI, W.C. **Variação de caracteres morfológicos e fisiológicos de populações naturais de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e correlação com a produção de β -ecdisona.** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, 2009. p. 247-256.
- LORENZI, H., MATOS, F.J.A. 2002. **Plantas medicinais no Brasil – nativas e exóticas.** Nova Odessa: Instituto Plantarum.
- MACHADO, M.P., BIASI, L.A. **Morfoanatomia das folhas do porta-enxerto de videira ‘VR043-43’ (*Vitis vinifera* L. x *Vitis rotundifolia* Michx.) em diferentes condições de cultivo.** Revista Acadêmica de Ciências Agrárias e Ambientais, 2011. p. 73-78.
- MACHADO, L.H.B. **As representações entremeadas no comércio de plantas medicinais em Goiânia/GO: uma reflexão geográfica.** Sociedade & Natureza, 2009. p. 159-172.
- MAJADA, J.P., TADEO, F., FAL, M.A., SÁNCHEZ-TAMÉS, R. **Impact of culture vessel ventilation on the anatomy and morphology of micropropagated carnation.** Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2000. p. 207-214.

- MALDANER, J., NICOLOSO, F.T., SANTOS, E.S., FAGUNDES, C.K., FLÔRES, R., JUCOSCKI, G.O., SKREBSKY, E.C. **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*, 2007. p.133-140.
- MAY, A.; BOVI, O.A.; MAIA, N.B.; MORAES, A.R.; PINHEIRO, M.Q. **Growth analysis of Fafia in relation to the propagation method used.** *Horticultura Brasileira*, 2008. p. 375-378.
- NICOLOSO, F.T.; ERIG, A.C.; RUSSOWSKI, D.; MARTINS, C.F. **Efeito de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*.** *Ciência e Agrotecnologia*, 2003. p. 84-90.
- NICOLOSO, F.T., CASSOL, L.F., FORTUNATO, R.P. **Comprimento da estaca de ramo no enraizamento de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*).** *Ciência Rural*, 2001. p. 57-60.
- NICOLOSO, F.T.; FORTUNATO, R.P.; FOGAÇA, M.A.F. **Influência da posição da estaca no ramo sobre o enraizamento de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen em dois substratos.** *Ciência Rural*, 1999. p. 277-283.
- OLIVEIRA, F. *Pfaffia paniculata* (Martius) Kuntze – **O ginseng brasileiro.** *Revista brasileira de Farmacognosia*, 1986. p. 86-92.
- PINTO, C.A., SILVA, D.H.S., BOLZANI, US, LOPES, N.P. EPIFÂNIO, R.A. **Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas.** *Química Nova*, 2002. p. 45-61.

- RATES, M. K; GOSMANN. **Gênero *Pfaffia*: aspectos químicos, farmacológicos e implicações para o seu emprego terapêutico.** Revista Brasileira de Farmacognosia, 2002. p. 85-93.
- SANTIAGO, E.J.A., PINTO, J.E.B.P., CASTRO, E.M., LAMEIRA, O.A., CONCEIÇÃO, H.E.O., GAVILANES, M.L. Aspectos da anatomia foliar da pimenta-longa (*Piper hispidinervium* C.DC.) sob diferentes condições de luminosidade. **Ciências Agrotecnicas**, 2001. p. 1035-1042.
- SCALON, S.P.Q.; MUSSURY, R.M.; ROSA, G.T.S.; MORAES, K.C.; SCALON FILHO, H. Enraizamento e germinação na propagação de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (ginseng-brasileiro). **Ciência e Agrotecnologia**, 2009. p. 1249-1254.
- SERRA, A.P.; MARCHETTI, M.E.; VIEIRA, M.C.; SILVA, M.A.G.; ROSA JUNIOR, E.J.; NASCIMENTO, J.M.; GUEDES, E.M.S. **Produção de biomassa e absorção de N e P pela *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen em função de doses de N e P em condições de casa de vegetação.** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, 2011. p. 265-270.
- SOUZA, V.C., LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II.** Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. p. 220-223.
- TOMAZZONI MI, NEGRELLE RRB, CENTA ML. **Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica.** Texto & Contexto Enfermagem, 2006. p. 115-121.
- VASCONCELOS, J.M.O. **Amaranthaceae do Rio Grande do Sul, V- gêneros de *Pfaffia* Mart e *Gomophera* L.** Roessléria, 1986. p. 75 – 94.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M. A. M. **Plantas medicinais: cura segura?** Química Nova, 2005. p. 519-528,

VIGO, C.L.S.; NARITA, E.; MARQUES, L.C. **Influências da variação sazonal e tipos de secagem nas características da droga vegetal - raízes de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen** (Amaranthaceae). Revista Brasileira de Farmacognosia, 2004. p. 137-144.

**CAPÍTULO 2: MICROPROPAGAÇÃO DE *Pfaffia glomerata* (SPRENG.)
PEDERSEN SOB CULTIVO EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO**

RESUMO

Pfaffia glomerata (Amarathaceae) é uma espécie medicinal encontrada em praticamente todo o território nacional, possuindo várias aplicações nos tratamentos contra diversas enfermidades. Possui como um dos principais compostos a β -ecdisona (20-hidroxiecdisona, 20-E), encontrado em todos os órgãos e, em especial, nas raízes e inflorescências. Esse trabalho objetivou buscar novos protocolos de propagação *in vitro* de acessos de *P. glomerata*. Para tal, segmentos nodais de dois acessos de *P. glomerata* foram inoculados em meio MS acrescido com sacarose ou glicose (0,1, 0,2 e 0,3 M) e 0,5 mg L⁻¹ de BA e ANA em 5 repetições. Observou-se que o número médio de brotos/segmento nodal variou de acordo com o acesso e com o tratamento. Foi observada a formação de calos na base dos explantes em todos os tratamentos. Para o acesso 13 a cloração dos calos variou de branco a verde claro e os brotos variaram de verde claro a róseo, com entrenós longos. No acesso 4, a coloração dos calos variou de branco a verde escuro arroxeadado, e as brotações arroxeadas com entrenós curtos. A característica de formação de multibrotações se mostrou genótipo-dependente, sendo o acesso 04 superior ao acesso 13 quando cultivado em glicose ou sacarose a 0,1 M (35 e 43 brotos/explantes). Conclui-se que o acesso 04 características favoráveis para multiplicação em larga escala.

ABSTRACT

Pfaffia glomerata (Amarathaceae) is a medicinal species found in virtually all the Brazilian territory which has several applications in treatments for different diseases. *P. glomerata* has as one of its main compounds β -ecdysone (20-hydroxyecdysone, 20-E), which is found in all plant organs and in particular, roots and inflorescences. This study aimed to seek new protocols for the *in vitro* propagation of accessions of *P. glomerata*. Nodal segments of two accessions of *P. glomerata* were inoculated on MS medium supplemented with sucrose or glucose (0.1, 0.2 and 0.3 M) and 0.5 mg L⁻¹ of BA and NAA, in 5 replicates. It was found that the number of shoots/nodal segment varied with the accession and the treatment. There was formation of calli on the base of explants in all treatments. Color of calli from accession 13 varied from white to light green and the shoots from light green to pinkish, with long internodes. In the accession 4, the color of calli varied from white to dark green and purple, and shoots in purple, with short internodes. The characteristic axillary bud proliferation proved genotype-dependent: accession 4 was superior to accession 13 when grown on glucose or sucrose 0.1 M (35 and 43 shoots/explant). The results showed that the accession 4 is suitable for propagation on a large scale.

INTRODUÇÃO

Sistemas de produção e cultivo de plantas medicinais ainda são incipientes ou inexistentes para a maioria das espécies nativas e a prevalência do processo de coleta extrativista acelerada tem exposto as espécies aos processos de erosão genética, comprometendo a biodiversidade e extinguindo a cultura dos povos que o habitam (KAMADA, 2006). Neste contexto, estudos e metodologias que viabilizem a produção de plantas medicinais em escala comercial são certamente recursos que podem reduzir o impacto da devastação da flora nativa (SOUZA et al., 2011).

Várias espécies do gênero *Pfaffia* (Amaranthaceae) possuem ampla distribuição pelo mundo, sendo conhecidas popularmente no Brasil como ginseng-brasileiro, paratudo, suma ou corango (SOUZA & LORENZI, 2005; OLIVEIRA, 1986). A fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] possui grande valor econômico, sendo centenas de toneladas exportadas todos os anos para países como Japão. Como muitas outras plantas medicinais, *P. glomerata* está ameaçada pela coleta indiscriminada e pela diminuição das áreas de ocorrência natural (GUERREIRO et al., 2009), causando a diminuição do pool gênico. Dessa maneira, a sua propagação torna-se estratégica para a conservação de germoplasma e propagação em larga escala.

Tem sido crescente o interesse de estudos envolvendo a propagação *in vitro* de plantas medicinais (ARORA et al., 2010; SAVIO et al., 2012; SINGH & TIWARI, 2012; WAWROSCH, 2010; YUNUS et al., 2012). Todavia, o sucesso de um sistema de micropropagação depende do controle de grande número de variáveis, a exemplo: a época da coleta, tipo de explante, o método de desinfestação, o isolamento e o tamanho dos explantes, o estado fisiológico e fitossanitário da planta matriz no momento da coleta, as condições de incubação, a manipulação dos

materiais nas subculturas, entre outros (MURASHIGE, 1974; THORPE et al., 1991; XAVIER et al., 2007).

A propagação *in vitro* de *P. glomerata* é uma maneira eficiente para se propagar vegetativamente a espécie. Nicoloso et al. (2001), desenvolveram um protocolo para este tipo de propagação conseguindo mais de 15.000 plantas a partir de um único explante em um período de 6 meses, com sucesso de 95% no transplante para o campo. Este protocolo foi aperfeiçoado por Nicoloso et al. (2003), Russowski & Nicoloso (2003) e Skrebsky et al. (2004), onde testaram, respectivamente, as fontes de carboidratos e as doses, o efeito das concentrações de N e P no meio de cultura e o efeito da concentração de sacarose sobre o período de cultivo *in vitro*. Flores et al. (2009, 2010) avaliando o efeito de reguladores na micropropagação de *P. glomerata* e *P. tuberosa* verificaram que o cultivo de segmentos nodais em meio MS suplementado com 1 µM de thidiazuron (TDZ), mostrou ser viável para micropropagação. Em *P. glomerata*, a concentração regular de macro e micronutrientes do meio MS e a ausência de carvão ativado favoreceram o desenvolvimento das plântulas (NICOLOSO et al., 2001).

Estudos relacionados ao desenvolvimento e melhoria de protocolos para a propagação *in vitro* de *P. glomerata* podem contribuir para a produção massal de mudas com alta qualidade morfo-fisiológica. Sendo assim, esse trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações de sacarose e glicose na indução de brotações em segmentos nodais de *P. glomerata*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos II do Departamento de Biologia Vegetal (DBV-BIOAGRO), na Universidade Federal de Viçosa, visando a multibrotação *in vitro* via segmento nodal.

Para tanto, foram utilizados como explantes segmentos nodais com cerca de 0,5 cm dos acessos 4 e 13, de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) oriundos da coleção de germoplasma de plantas medicinais do Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia (Embrapa/Cenargen).

Para obtenção de material estoque, os indivíduos foram multiplicados vegetativamente *in vitro*, via segmento nodal. Os acessos foram cultivados em meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 8 g L⁻¹ de ágar (Merck), e mantidos em sala de crescimento, à temperatura de 25 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 16 horas com irradiância de 60 μmol m⁻² s⁻¹, por 30 dias. Foram utilizados como explantes segmentos nodais provenientes do material estoque multiplicado *in vitro*.

Influência de diferentes concentrações de glicose e sacarose sobre multibrotações *in vitro* de dois acessos de *Pfaffia glomerata*.

Segmentos nodais com 0,5 cm de *P. glomerata* (acessos 04 e 13) foram cultivados em meio MS semi-sólido acrescido com sacarose ou glicose (0,1; 0,2 e 0,3 M), 0,5 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BA), 0,5 mg L⁻¹ de BA + 0,5 mg L⁻¹ de ácido α-naftalenoacético (ANA), 0,5 mg L⁻¹ BA + 1,0 mg L⁻¹ de ANA e o controle (sem regulador de crescimento).

Os explantes foram inoculados em frascos contendo 50 mL de meio de cultivo e vedados com filme plástico Rolopac[®], mantidos em sala de crescimento, à

temperatura de 25 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 16 horas com irradiância de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, por 30 dias.

Após 30 dias de cultivo foram avaliados as seguintes características: número médio de brotos, a formação de calo e suas respectivas colorações.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso em esquema fatorial triplo, 2 (acessos 13 e 04) x 6 (sacarose e glicose x 3 doses) x 4 (concentrações de reguladores de crescimento), sendo 5 repetições por tratamento. Cada repetição consistiu de um frasco com 5 explantes. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Análise estatística.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), empregando-se o programa ASSISTAT Versão 7.6 beta (2011) da Universidade Federal de Campina Grande (SILVA & AZEVEDO, 2009), e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Influência de diferentes concentrações de glicose e sacarose sobre a multiplicação *in vitro* de dois genótipos de *Pfaffia glomerata*.

Não houve interação significativa entre os tipos e doses de reguladores de crescimento. Assim, optou-se por tratar o experimento como um fatorial duplo, a saber: 2 (acessos) x 6 (fontes de carbono), perfazendo 12 tratamentos, com 5 repetições, conforme o quadro de Anova (Tabela 1).

Tabela 1. Resumo da análise de variância do número de brotos de acessos de *Pfaffia glomerata* em função dos acessos, fontes de carbono interação entre fatores.

| Fatores | GL | Quadrado Médio |
|-----------------------|----|----------------|
| | | Nº Brotos |
| Acessos (A) | 1 | 3575,81667** |
| Fonte de Carbono (FC) | 5 | 594,17** |
| AxFC | 5 | 660,81** |
| Resíduo | | 4859,92 |

GL. Graus de Liberdade.

** significativo a 1% de probabilidade ($p < 0,01$).

Para o número de brotos foi observado efeito significativo dos acessos ($p < 0,01$), sendo que a maior média foi observada para o acesso 04 (19,50), e das fontes de carbono ($p < 0,01$), sendo a sacarose e glicose a 0,1 M as melhores respostas para essa variável. Portanto, as fontes de carbono, apresentaram efeitos similares na indução do número de brotos.

Tabela 2 - Valores médios para números de brotos de *Pfaffia glomerata* em função dos tratamentos em diferentes fontes de carbono.

| Variável | Tratamentos | | | | | | | | CV (%) |
|-----------|-------------|-------|-------------------|-----------|-----------|----------|----------|----------|--------|
| | Acessos (A) | | Fontes de Carbono | | | | | | |
| | A4 | A13 | Glic 0,1M | Glic 0,2M | Glic 0,3M | Sac 0,1M | Sac 0,2M | Sac 0,3M | |
| Nº Brotos | 19,50a | 4,06b | 19,0ab | 6,70c | 4,20c | 22,90a | 10,50bc | 6,70c | 65,7 |

Glic = Glicose; Sac = Sacarose.

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Foi observada interação significativa ($p < 0,01$) entre os acessos e as fontes de carbono em relação ao número de brotos. Não houve diferença estatística entre as fontes de carbono para o acesso 13, entretanto para o acesso 04 as maiores médias foram observadas quando os explantes foram cultivados em meio MS suplementado com glicose 0,1 M (35) e sacarose 0,1 M (43). Com relação as fonte de carbono, as concentrações de 0,1 M de glicose ou sacarose a 0,2 M, contribuíram para melhorar a desempenho do acesso 4, o qual apresentou médias superiores, quando comparadas àquelas observadas no acesso 13, as demais não diferem estatisticamente entre si (Tabela 3).

Tabela 3- Valores médios para número de brotos de *Pfaffia glomerata* em função dos tratamentos em diferentes fontes de carbono.

| VARIÁVEL | | | | | | |
|--------------------|-----------|-----------------------|-----------|----------|----------|----------|
| NÚMERO DE BROTOS** | | | | | | |
| TRATAMENTOS | | Fonte de carbono (FC) | | | | |
| Acesso (A) | Glic 0,1M | Glic 0,2M | Glic 0,3M | Sac 0,1M | Sac 0,2M | Sac 0,3M |
| A 13 | 4,40 bA | 6,00 aA | 2,40 aA | 2,80 bA | 4,00 bA | 4,80 aA |
| A 4 | 35,00 aA | 7,40 aB | 6,00 aB | 43,00 aA | 17,00 aB | 8,60 aB |

Glic = Glicose; Sac = Sacarose

** significativo a 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, letras minúsculas para coluna e letras maiúsculas para linha.

Foi observada a formação de calos na base dos explantes em todos os tratamentos. Para o acesso 13 a coloração dos calos variou de branco (sacarose 0,3 M) a verde claro (glicose em todas as concentrações e sacarose 0,2 e 0,3M), e os

brotos variaram de verde claro a róseo (Figura 2). No acesso 4, a coloração dos calos variou de branco (sacarose a 0,1 M e sacarose+glicose 0,3M) a verde escuro arroxeado (glicose 0,1 e 0,2M e sacarose 0,2M) (Figura 1). A diferença na pigmentação entre os acessos pode ser explicada, uma vez que em campo, plantas do acesso 04 apresentam caule bastante pigmentado, enquanto no acesso 13 predomina a cor verde (KAMADA, 2006).

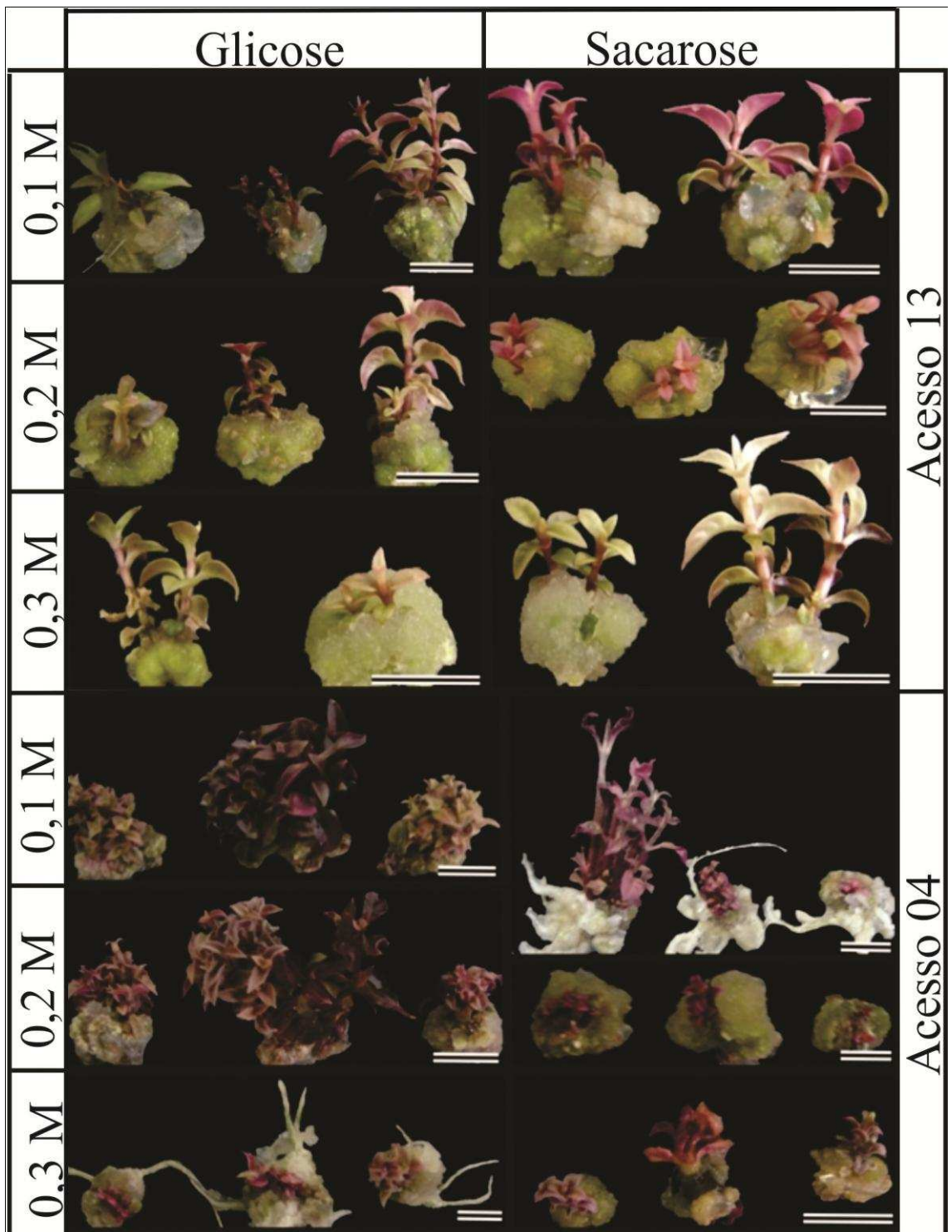


Figura 1: Detalhes das brotações em segmento nodal dos *Pfaffia glomerata* acessos 13 e 04 submetidas a diferentes fontes de carbono. Barra 1 cm.

No geral, o número total de brotos produzidos por explante, o acesso 04 de *P. glomerata* mostrou-se superior ao acesso 13, uma vez que foi observada média de 43 brotações para o acesso 4 e apenas 6 brotos para o acesso 13 (Tabela 3). As brotações no acesso 4 apresentaram padrão de proliferação de ramos axilares em tufos, apresentando brotações com entrenós mais curtos; já o acesso 13, as brotações se apresentaram mais alongadas (Figura 1).

Os brotos obtidos no presente trabalho se mostraram viáveis, uma vez que os mesmos foram transferidos para frascos contendo meio MS e cultivados em sala de crescimento por 30 dias. Todos apresentaram crescimento uniforme e rápido independente do tratamento de origem (dados não mostrados).

Flores et al. (2010) também desenvolveram um protocolo de micropropagação de *P. glomerata* via segmentos nodais. Observaram após 30 dias de cultivo, o número médio de 10 brotos/explante. Martins & Nicoloso (2004) também propuseram uma metodologia de propagação de *P. glomerata* via segmentos nodais, porém obtiveram apenas 1,6 brotos por explante. O número de brotos obtidos nos trabalhos citados anteriormente foram inferiores aos encontrados no presente trabalho.

A diferença na quantidade de brotos produzidas pelos acessos (A13 - 6 brotos por explante com entrenós longos e A04 - 43 brotos por explantes com entrenós curtos), pode ser atribuída a genótipo-especificidade, em que o acesso 4 apresenta propensão superior de proliferação de brotações axilares. Entretanto, segundo Kamada (2006), os indivíduos dos acessos 04 e 13 de *P. glomerata* em campo apresentam crescimento inicial do caule eretos, sem ramificações.

Diferenças significativas na indução *in vitro* de brotos múltiplos foram observadas em segmentos nodais de *Annona bahiensis*, *A. cauliflora*, *A. coriacea*,

A. glabrae *R. silvatica* quando se utiliza diferentes fontes de carbono (glicose, sacarose, frutose, galactose e maltose) (SANTANA et al., 2011). Segundo os autores, também foi observado que essa variável é genótipo-dependente, assim como observado nesse trabalho em *P. glomerata*, uma vez que a maior média de brotações observada para o acesso 4, foi no meio de cultivo com sacarose ou glicose a 0,1M. Entretanto, para o acesso 13 não houve diferença significativa entre as fonte de carbono, porém o maior número de brotos foi observado para a glicose a 0,2 M.

Resultados semelhantes quanto as concentrações da fonte de carbono foram observados por Nicoloso et al. (2003) quando compararam quatro diferentes concentrações de cinco fontes de carbono para determinar as melhores combinações na multiplicação de *P. glomerata*, e verificando que a sacarose apresenta os melhores resultados nas concentrações de 87,64; 131,46 e 175,28 mM. Mohamed & Alsdon (2010) também constaram que sacarose a 87,64 mM proporcionou os melhores resultados na multiplicação de batata. Romano et al. (1995) observaram que a sacarose (87,64 mM) e glicose (222,01 mM) foram as melhores fontes de carbono durante a fase de proliferação de *Quercus suber*. Pati et al. (2006) relataram que, enquanto a sacarose era a fonte de carbono mais utilizada na micropropagação de rosas, a glicose também apresentou resultados satisfatórios na micropropagação dessa espécie.

A sacarose geralmente é a fonte de carbono mais empregada em trabalhos de micropropagação, porém, outras fontes como glicose, maltose, rafinose, frutose, manose e lactose também são empregadas na suplementação de meios de cultura no cultivo *in vitro*, sendo sua eficácia variável de acordo com a espécie estudada (GEORGE, 1993).

CONCLUSÕES

Conclui - se que

- Na multiplicação *in vitro* de *P.glomerata*, os acesso respondem de forma distinta, sendo do acesso 04 as maiores respostas a indução de brotações em relação ao acesso 13, da concentração glicose a 0,1 M em relação as demais concentrações.
- Apesar dos brotos se mostrarem viáveis em análises preliminares de cultivo, há necessidade de mais estudos quando sua viabilidade e taxa de sobrevivência a aclimatização.

REFERÊNCIAS

- ARORA, R.; MATHUR, A.; MATHUR, A.K. **Emerging trends in medicinal plant biotechnology**. In.: ARORA, R. (Ed.) *Medicinal Plant Biotechnology*. CABI International: London, 2010. p. 1-12.
- FLORES, R.; BRONDANI JR, D.; CEZAROTTO JR, V.; GIACOMELLI, S.R.; NICOLOSO, F. T. **Micropropagation and β -ecdisonone content f the Brazilian ginsengs *Pfaffia glomerata* and *Pfaffia tuberosa***. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2010. p. 210-217.
- FLORES, R.; NICOLOSO, F.T.; MALDANER, J.; GARLET, T.M.B. **Benzilaminopurina (BA) e thidiazuron (TDZ) na propagação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen**. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 2009, p. 292-299.
- GEORGE, E.F., 1993. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Part 1. The Technology, 2nd ed. Exegetics Ltd., Edington.
- GUERREIRO C.P.V.; MARQUES M.O.M.; FERRACINI V.L.; QUEIROZ S.C.N.; MING L.C. **Produção de β -ecdisona em *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen em função da adubação orgânica em 6 épocas de crescimento**. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 2009. p. 392-398.
- 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 em Genética e Melhoramento. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 160p.
- MALDANER, J.; NICOLOSO, F.T.; SANTOS, E.S.; FAGUNDES, C.K.; FLORES, R.; JUCOSKI, G.O.; SKREBSKY, E.C. **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, 2007. p. 133-140.

MARTINS, C.F.; NICOLOSO, F.T. **Micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken.** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, 2004. p. 53-61.

MOHAMED, M.A.H.; ALSADON, A.A. **Influence of ventilation and sucrose on growth and leaf anatomy of micropropagated potato plantlets.** Scientia Horticulturae, Amsterdam, 2010, p. 295-300.

MURASHIGE, T. **Plant propagation through tissue culture.** Annual Review of Plant Physiology, 1974, p. 135-166.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. **A revised medium for growth and bioassays with tobacco tissue cultures.** Physiologia Plantarum, 1962. p. 473-497.

NICOLOSO, F.T., CASSOL, L.F., FORTUNATO, R.P. **Comprimento da estaca de ramo no enraizamento de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*).** Ciência Rural, 2001, p.57-60.

NICOLOSO, F.T.; ERIG, A.C.; RUSSOWSKI, D.; MARTINS, C.F. **Efeito de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*.** Ciência e Agrotecnologia, 2003., p. 84-90.

OLIVEIRA, F. ***Pfaffia paniculata* (Martius) Kuntze – O ginseng brasileiro.** Revista brasileira de Farmacognosia, 1986. p. 86-92.

PATI, P.K.; RATH, S.P.; SHARMA, M. ***In vitro* propagation of rose: a review.** Biotechnology Advances, Ottawa, 2006. p. 94-114.

ROMANO, A.; NORONHA, C.; MARTINSLOUCAO, M. A. **Role of carbohydrates in micropropagation of cork oak.** Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Hague, 1995., p. 159-167.

- SANTANA, J.R.F.; PAIVA, R.; REZENDE, R.K.S.; CASTRO, E.M.; PEREIRA, F.D.; OLIVEIRA, L.M. **Estímulo do comportamento fotoautotrófico durante o enraizamento *in vitro* de *Annona glabra* L.: II., aspectos da anatomia da folha antes da aclimatização.** Ciência e Agrotecnologia, 2008. p. 640-644.
- SANTANA, J.R.F.; PAIVA, R.; SOUZA, A.V.; OLIVEIRA, 1 L.M. **Effect of different carbon sources on the *in vitro* multiplication of *Annona* sp.** Ciência e Agrotecnologia. 2011, p. 487-493.
- SAVIO, L.E.B.; ASTARITA, L.V.; SANTARÉM, E.R. **Secondary metabolism in micropropagated *Hypericum perforatum* L. grown in non-aerated liquid medium.** Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2012, p. 465-472.
- SILVA, F. DE A. S. E. & AZEVEDO, C. A. V. DE. **Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance.** In:WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers. 2009.
- SINGH, J., TIWARI, K.N. ***In vitro* plant regeneration from decapitated embryonic axes of *Clitoria ternatea* L.— An important medicinal plant.** Industrial Crops and Products, 2012, p. 224– 229.
- SKREBSKY, E.C.; NICOLOSO, F.T.; FERRÃO, G.E. **Sacarose e período de cultivo *in vitro* na aclimatização *ex vitro* de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen).** Ciência Rural, 2004., p.1471-1477.
- SOUZA, A.V.; BERTONI, B.W.; FRANCA, S.C., PEREIRA, A.M.S. **Conservação e enraizamento *in vitro* de infalível (*Mandevilla velutina* K. Schum.), uma planta medicinal do Cerrado.** Revista Brasileira de Plantas Medicinai. 2011. , p. 319-327.

SOUZA, V.C., LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. p. 220-223.

THORPE, T.E.; HARRY, I.S.; KUMAR, P.P. **Application of micropropagation to forestry**. In: DEBERGH, P.C. & ZIMMERMAN, R.H. (Eds.). *Micropropagation: technology and application*. Dordrecht: Kluwer Academic Press, 1991. p. 311-336.

WAWROSCH, C. ***In vitro* propagation of medicinal plants for conservation and quality assurance**. In: ARORA, R. (Ed.) *Medicinal Plant Biotechnology*. CABI International: London. 2010. p. 93-97.

XAVIER, A.; OTONI, W.C.; PENCHEL, R.M. **Micropropagação e enxertia *in vitro* de espécies florestais**. In: BORÉM, A. (Ed.). *Biotecnologia Florestal*. Suprema Gráfica e Editora: Viçosa, 2007. p. 53-74.

YUNUS, M.F., AZIZ, M.A., KADIR, M.A., RASHID, A.A. ***In vitro* propagation of *Etilingera elatior* (Jack) (torch ginger)**. *Scientia Horticulturae*, 2012. p. 145–150

**CAPÍTULO 3: PRODUÇÃO DE 20-HIDROXIECDISONA EM *Pfaffia*
glomerata (SPRENG.) PEDERSEN SOB CULTIVO EM DIFERENTES
FONTES DE CARBONO**

RESUMO

Pfaffia glomerata (Amarathaceae) é uma espécie medicinal encontrada em praticamente todo o território nacional, possuindo várias aplicações nos tratamentos contra diversas enfermidades. Possui como um dos principais compostos a β -ecdisona (20-hidroxiecdisona, 20-E), encontrado em todos os órgãos e, em especial, nas raízes e inflorescências. Esse trabalho objetivou avaliar o cultivo de *P. glomerata* sob o efeito de diferentes fontes de carbono na produção de 20-E em folhas e raízes. Para tal, segmentos nodais de *P. glomerata* foram inoculados em recipientes Magenta[®] contendo meio MS acrescido com diferentes fontes de carbono (sacarose e glicose) a 0,1 e 0,2 M e suas respectivas combinações. Os recipientes foram ensacados em embalagem plástica com membrana tipo filtro, em 5 repetições por tratamento. Após 30 dias de cultivo raízes e folhas foram secas e processadas para a extração de 20-E e foi realizada a análise micromorfológica de folhas. O acesso 13 apresentou as maiores médias tanto para raízes quanto folhas (1,02 e 1,07%) e entre as fontes de carbono glicose em ambas as concentrações apresentaram as maiores médias em raízes (1,04 e 1,03) e em folhas as maiores médias foram observadas em glicose a 0,1 M (1,08), sacarose a 0,1 M (1,08) e sacarose + glicose a 0,1 M (1,08). As maiores médias para o comprimento da planta, massa seca das raízes e parte aérea foi observada para o acesso 13, entre as fontes de carbono, as maiores médias foram observadas em sacarose 0,1M e 0,2 M, sacarose+glicose 0,1M para todas as variáveis, e glicose 0,1M para comprimento médio das plantas e massa seca da parte aérea, controle comprimento da parte aérea e sacarose+glicose 0,2M para massa seca da parte aérea. Na análise micromorfológica das folhas em ambas as faces, o número de células epidérmicas, estômatos, e densidade estomática foram superiores no acesso 13 em relação ao acesso 04, já as fontes de carbono para a face abaxial, a maior média do número de células epidérmicas e estômatos e densidade estomática foi observado em plantas cultivadas em sacarose+glicose 0,2M (166,90; 31,90; 292,31), para o índice estomático, não houve interação entre os acessos, porém, entre as fontes de carbono, as maiores médias foram observadas nos tratamento controle (17,12), glicose 0,1M (15,92) sacarose 0,2M (15,77) e sacarose+glicose 0,2M (15,28). Na face adaxial a maior média para o número de estômatos foi em glicose+sacarose a 0,2M e as demais variáveis em glicose+sacarose 0,2M. Concluiu-se que para a produção de 20-E o acesso 13 se mostrou mais promissor.

ABSTRACT

Pfaffia glomerata (Amaranthaceae) is a medicinal species found in virtually all the Brazilian territory which has several applications in treatments for different diseases. *P. glomerata* has as one of its main compounds β -ecdysone (20-hydroxyecdysone, 20-E), which is found in all plant organs and, in particular, roots and inflorescences. This study aimed to evaluate the growth of *P. glomerata* under the influence of different carbon sources on the production of 20-E in leaves and roots. Nodal segments of *P. glomerata* were inoculated in Magenta[®] boxes containing MS medium supplemented with different carbon sources (glucose and sucrose) at 0.2 to 0.1 M and their combinations. The boxes were bagged in plastic bags with membrane filter (pore size 0.45 μ m) with 5 replicates per treatment. After 30 days of culture, roots and leaves were dried and processed for 20-E extraction and micromorphometric analysis. Significant effect was found among accessions and carbon sources on the 20-E content: the accession 13 showed the highest means for both roots and leaves (1.02 and 1.07%) and between the carbon sources, glucose in both concentrations had the highest means for the roots (1.04 and 1.03); and for the leaves, the highest means were found for 0.1 M glucose (1.08), 0.1 M sucrose (1.08) and sucrose + glucose at 0.1 M (1.08). The highest means for plant height, dry mass of roots and shoots were observed for the accession 13: between the carbon sources, the highest means were found for 0.1 M and 0.2 M sucrose, sucrose + glucose 0.1M for all variables, and glucose 0.1 M for plant mean height and dry mass of shoots, control, shoot height and sucrose + glucose 0.2 M for shoot dry mass. In the micromorphometric analysis on both surfaces of the leaves, the number of epidermal cells, stomata, and stomatal density were higher for the accession 13 than for the accession 4; however, the carbon sources for the abaxial side, the higher mean number of epidermal cells, stomata and stomatal density was found in plants grown in sucrose + glucose 0.2 M (166.90; 31.90; 292.31). For the stomatal index, there was no interaction between the accessions, however, between the carbon sources, the highest means were found in the control (17.12); 0.1 M glucose (15.92); 0.2 M sucrose (15.77); and 0.2 M sucrose + glucose (15,28). On the adaxial surface, the highest mean for number of stomata was found for glucose + sucrose at 0.2 M and the other variables in glucose + sucrose at 0.2 M. The results showed that the accession 13 proved the most promising for production of 20-E.

INTRODUÇÃO

Sistemas de produção e cultivo de plantas medicinais ainda são incipientes ou inexistentes para a maioria das espécies nativas e a prevalência do processo de coleta extrativista acelerada tem exposto as espécies aos processos de erosão genética, comprometendo a biodiversidade e extinguindo a cultura dos povos que o habitam (KAMADA, 2006). Neste contexto, estudos e metodologias que viabilizem a produção de plantas medicinais em escala comercial são certamente recursos que podem reduzir o impacto da devastação da flora nativa (SOUZA et al., 2011).

Várias espécies do gênero *Pfaffia* (Amaranthaceae) possuem ampla distribuição pelo mundo, compreendendo cerca de 170 gêneros e 2.000 espécies, sendo mais de 20 ocorrentes no Brasil e conhecidas popularmente como ginseng-brasileiro, paratudo, suma ou corango (SOUZA & LORENZI, 2005; OLIVEIRA, 1986). A fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] possui grande valor econômico, sendo centenas de toneladas exportadas todos os anos para países como Japão. Como muitas outras plantas medicinais, *P. glomerata* está ameaçada pela coleta indiscriminada e pela diminuição das áreas de ocorrência natural (GUERREIRO et al., 2009). Desse modo, é de grande importância que sejam estudadas cientificamente as espécies medicinais promissoras, que são utilizadas há muitas gerações pela população.

Os produtos provenientes de *Pfaffia* são indicados como regeneradores celulares, nos tratamentos contra o esgotamento físico, mental e falta de memória, como auxiliares no tratamento de irregularidades circulatória, estresse, anemias, diabetes, contra fadiga física, intelectual e de indisposição em geral, além de contribuir como estimulante sexual (RATES & GOSMANN, 2002).

As saponinas e os compostos esteroidais representam um grupo de constituintes químicos importantes em espécies de *Pfaffia* e atuam como coadjuvantes químicos na absorção de outras substâncias ativas pelo organismo. Em *Pfaffia glomerata* foram descritas a β -ecdisona (20-hidroxiecdisona, 20-E), ácido glomérico, ácido pfamérico, oleanólico, rubrosterona, β -D-glucopiranosil oleanolato e seus glicosídeos (RATES & GOSMANN, 2002; KAMADA, 2006).

Festucci-Buselli et al. (2008) relatam que a biossíntese, a regulação e a função precisa do fitoecdisteroide 20-E são desconhecidas. Três hipóteses sobre suas funções têm sido propostas: como compostos fitohormonais, compostos protetores contra insetos fitófagos não adaptados e como fonte de fitoesteroides polihidroxilados requeridos no crescimento e na proliferação celular. Segundo os autores, os órgãos que apresentam maiores teores de 20-E são flores, seguidas pelas raízes, folhas e caules, respectivamente.

A anatomia foliar é um fator de bastante importância, pois dela que depende, em grande parte, a adaptação das plantas ao seu ambiente. São as características químicas e/ou morfológicas da superfície foliar que condicionam, por exemplo, a quantidade de luz absorvida ou refletida, o grau de hidrofobia do órgão, a pressão do ar em contato com as folhas, a eficiência do órgão na defesa contra parasitas e patógenos, a quantidade de poluentes ou defensivos absorvida e, evidentemente, a magnitude da transpiração (SANTIAGO et al., 2001).

O cultivo *in vitro* pode promover alterações anatômicas, morfológicas e fisiológicas nas plantas (DONELLY et al., 1985; JAUSORO et al., 2010). Diversas alterações na estrutura da folha de plantas mantidas *in vitro* têm sido reportadas, como o aumento no tamanho e na densidade dos estômatos e a redução no controle estomático, na quantidade de cera epicuticular e na espessura do mesofilo, com alta

proporção de espaços intercelulares (KHAN et al., 2003; HAZARIKA, 2006). Entretanto, a intensidade dessas alterações é bastante variável em função de características próprias de cada espécie e sua quantificação poderá auxiliar na melhoria das condições de cultivo para cada grupo de plantas (SANTANA et al., 2008) e segundo Grisi (2010), a área foliar, a espessura da lâmina foliar, o conteúdo de água e a densidade estomática, são alguns parâmetros utilizados para avaliar o grau de adaptação da planta.

Sendo assim, esse trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações de sacarose e glicose na produção de β -ecdisona e na estrutura anatômica da folha.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos II do Departamento de Biologia Vegetal (DBV-BIOAGRO), na Universidade Federal de Viçosa, visando a multibrotação *in vitro* via segmento nodal.

Para tanto, foram utilizados como explantes segmentos nodais com cerca de 0,5 cm dos acessos 4 e 13, de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) oriundos da coleção de germoplasma de plantas medicinais do Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia (Embrapa/Cenargen).

Para obtenção de material estoque, os indivíduos foram multiplicados vegetativamente *in vitro*, via segmento nodal. Os acessos foram cultivados em meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 8 g L⁻¹ de ágar (Merck), e mantidos em sala de crescimento, à temperatura de 25 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 16 horas com irradiância de 60 μmol m⁻² s⁻¹, por 30 dias. Foram utilizados como explantes segmentos nodais provenientes do material estoque multiplicado *in vitro*.

Influência do genótipo e de diferentes concentrações de glicose e sacarose na produção de 20-hidroxiecdisona (20-E) *in vitro*.

Segmentos nodais de *P. glomerata* (acessos 04 e 13) foram cultivados em meio MS semi-sólido sem fonte de carbono e acrescido com sacarose ou glicose (0,1 e 0,2 M) e a combinação de sacarose + glicose (0,1 e 0,2 M), perfazendo um total de 5 tratamentos e o controle. Os meios foram dispensados em magentas de polietileno dentro de embalagens sanfonadas de polipropileno com filtro microbiológico (FAAL Embalagens, São Paulo), sendo 100 ml de meio de cultivo em cada magenta. Após

esse período, as plantas regeneradas a partir de segmentos nodais dos diferentes acessos de *P. glomerata* foram coletadas para determinação do teor de β -ecdisona.

Determinação do teor de β -ecdisona (20-E).

As raízes e parte aérea foram separadas, pesadas, cortadas e secas em estufa a 50 °C, durante uma semana (FIGUEIREDO et al., 2004). Após secos, com massa constante, foram triturados em moinho analítico (Modelo Q298A21 QUIMIB).

As amostras foram submetidas ao processo de extração, segundo Kamada (2006). Cerca de 100 mg de massa seca foram adicionadas a 10 mL de metanol foram armazenadas em temperatura ambiente por 8 dias sob agitação diária do extrato. Após, os extratos foram centrifugados e o sobrenadante foi coletado. O extrato metanólico foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para determinação do teor do fitoesteróide 20-hidroxiecdisona, utilizando-se o equipamento da Shimadzu (IC 10AD, Shimadzu, Kyoto, Japão), equipado com detector SPD 10AV, CBM 10^a, coluna Bomdesil C18 (5,0 μ m x 4,6 mm x 250 mm). O volume de amostra injetada foi de 20 μ L, com leitura em $\lambda = 245$ nm. A fase móvel foi composta por metanol-água 1:1 (v/v), com fluxo de 1,2 mL/min e com tempo de corrida cerca de 15 minutos. 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.

A curva de calibração foi obtida através de 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 em triplicatas, cerca de 20 μ L, nas diferentes condições da fase móvel.

Foi analisado o conteúdo de β -ecdisona em 100 mg de matéria seca de folhas e raízes e verificada a produção de matéria seca das raízes e da parte aérea de cada tratamento.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso em esquema fatorial duplo, 2 x 7 {2 acessos x 7 concentrações de fontes de carbono [0 (sem açúcar) ; 0,1 M ou 0,2 M de sacarose ou glicose ou a combinação de sacarose + glicose (0,5 M de cada fonte)]} x 5 repetições]. Os dados após serem transformados ($\sqrt{x+1}$), foram submetidos a análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Análise micromorfométrica de folhas de *Pfaffia glomerata* cultivadas *in vitro* em meio MS com diferentes fontes e concentrações de glicose e sacarose.

Folhas de *P. glomerata* obtidos a partir do experimento citado anteriormente foram coletadas para realização de análise micromorfométrica no laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa. Para isto, amostras de folhas do segundo nó de todos os tratamentos de ambos os acessos, foram fixadas em Karnovsky por 24 horas, sob vácuo, e estocadas em etanol 70%. Posteriormente foram desidratadas em série etílica crescente e incluídas em metacrilato (Historesin[®], Leica, Alemanha).

Foram realizados cortes transversais em micrótomo rotativo (American Optical), utilizando-se navalhas de aço. Os cortes foram obtidos com espessura de 7 μ m, e corados com Azul de Toluidina, pH 4,0 (O'BRIEN & McCULLY, 1981). As lâminas permanentes foram montadas em Bálsamo-do-Canadá.

Para análise da superfície foliar, amostras das folhas foram diafanizadas (ARNOTT, 1959). Para isto, as amostras foram imersas em hidróxido de sódio a 5% por 48 horas sendo posteriormente enxaguadas em água destilada e mergulhadas em

hipoclorito de sódio comercial, por 24 horas, até clarear. Em seguida, foram realizados três enxágues em água destilada, onde permaneceram por uma noite. Posteriormente, permaneceram por 24 horas em etanol 70 %, sendo coradas com Safranina 1% por 48 horas. Após a coloração, foram mantidas em etanol 50% por uma semana e desidratadas em série etanólica crescente e pós-desidratadas em xileno por 15 minutos. As lâminas foram montadas em Bálsamo-do-Canadá.

Todas as lâminas foram examinadas e fotografadas em fotomicroscópio (AX70TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão).

As análises micromorfométricas tiveram delineamento inteiramente casualizado, sendo 5 repetições por tratamento, sendo que para cada repetição foram fotografados dez campos. As análises das imagens foram realizadas através do programa Anati Quant 2[®] (AGUIAR et al., 2007). Foram analisadas a espessura da folha, do mesofilo foliar, dos parênquimas paliçádico e lacunoso, da epiderme da face adaxial e abaxial da folha, a densidade e o índice estomático.

Análise estatística.

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), empregando-se o programa ASSISTAT Versão 7.6 beta (2011) da Universidade Federal de Campina Grande (SILVA & AZEVEDO, 2009), e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Influência do genótipo e de diferentes concentrações de glicose e sacarose na produção de 20-Hidroxicidisona (20-E) *in vitro*.

Foi observado efeito significativo dos acessos ($p < 0.01$) no teor de 20-E produzidos pelas raízes, sendo a maior media observada nas raízes das plantas do acesso 13 (1,02%), também foi observado efeito significativo das concentrações das fontes de carbono ($p < 0.01$) no teor de 20-E produzidos pelas raízes. Houve também diferenças significativas do teor de 20-E dos acessos tanto nas raízes ($p < 0.01$) quanto nas folhas ($p < 0.05$), sendo que as maiores médias foram observadas para o acesso 13, em raízes (1,02) e folhas (1,07), respectivamente. Também foi verificado significância nas médias de fonte de carbono sendo glicose a melhor fonte de carbono em ambas as concentrações para a variável raiz ($p < 0.01$), para a folha ($p < 0.01$) as fontes glicose 0,1M, sacarose 0,1 M e a combinação de sacarose + glicose a 0,1M apresentaram as maiores médias para o teor de 20-E (Tabela 1).

Tabela 1 - Valores médios para teores de 20-hidroxicidisona (20-E) em folhas e raízes de dois acessos de *Pfaffia glomerata* em função dos tratamentos.

| Tratamentos | Variáveis | |
|-------------------|-------------------|--------------------|
| | Raiz ¹ | Folha ¹ |
| Acessos | 13 | 1.07a |
| | 04 | 1.06b |
| Fontes de Carbono | Controle (0) | 1.05b |
| | Glic 0,1 M | 1.08a |
| | Glic 0,2M | 1.06b |
| | Sac 0,1 M | 1.08a |
| | Sac 0,2 M | 1.06b |
| | G+S 0,1 M | 1.08a |
| | G+S 0,2 M | 1.05b |
| CV (%) | 0.17 | 0.66 |

Glic (G) = Glicose; Sac (S) = sacarose; 0 = controle (sem fonte de carbono). ¹Valores transformados por $\sqrt{x+1}$.

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Foi observada interação significativa ($p < 0.01$) entre os entre acessos e as fontes de carbono para o teor de 20-E em ambas as variáveis. Na raiz, plantas

cultivadas com glicose a 0,2M apresentaram as maiores médias do teor de 20-E para o acesso 13, já para folhas do acesso 13, as maiores medias foram observadas em sacarose a 0,1M e glicose + sacarose a 0,1M. Plantas cultivadas em meio contendo glicose a 0,2 M, ou a combinação de sacarose+glicose em ambas as concentrações para o acesso 13 apresentaram as maiores médias do teor de 20-E em raiz em relação ai acesso 04, entretanto, sacarose a 0,1 M e glicose a 0,1 M obteve maior média para o acesso 4 em relação ao acesso 13 (Tabela 2).

Tabela 2 - Valores médios para teores de 20-hidroxicdisona (20-E) em folhas e raízes de dois acessos de *Pfaffia glomerata* em função dos acessos em diferentes fontes de carbono.

| VARIÁVEIS | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------|------|------------------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|----------------------|---------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| ¹ RAIZ** | | | | | | | | ¹ FOLHA** | | | | | | |
| TRATAMENTOS | | Fontes de carbono (FC) | | | | | | | | | | | | |
| Acessos (A) | 0 | Glic 0,1 M | Glic 0,2 M | Sac 0,1 M | Sac 0,2 M | G+S 0,1 M | G+S 0,2 M | 0 | Glic 0,1 M | Glic 0,2 M | Sac 0,1 M | Sac 0,2 M | G+S 0,1 M | G+S 0,2 M |
| A 13 | 1.00 | 1.03 | 1.05 | 1.02 | 1.0 | 1.00 | 1.00 | 1.04 | 1.07 | 1.07 | 1.10 | 1.06 | 1.09 | 1.06 |
| | aF | bB | aA | bC | aE | aD | aF | aD | bBC | aC | aA | aCD | aAB | aCD |
| A 4 | 1.00 | 1.04 | 1.02 | 1.03 | 1.01 | 1.01 | 1.00 | 1.06 | 1.10 | 1.06 | 1.06 | 1.05 | 1.07 | 1.05 |
| | aE | aA | bC | aB | aD | bD | aF | aBC | aA | aBC | bBC | aC | bB | aC |

G= Glicose; S= Sacarose; 0 = controle (sem fonte de carbono). ¹Valores transformados por $\sqrt{x+1}$.

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$).

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, letras minúsculas para coluna e letras maiúsculas para linha.

Em folhas, as maiores médias do teor de 20-E foram observadas em meio com sacarose a 0,2 M e na combinação de sacarose e glicose a 0,1 M para o acesso 13, enquanto, para o acesso 4, a maior media observada foi em glicose a 0,1 M. Entre os acessos, plantas cultivadas em sacarose a 0,1M apresentaram maiores médias de teor de 20-E no acesso 13 em relação ao acesso 04, entretanto, glicose a 0,1 M obteve maior media no acesso 04 em relação ao acesso 13, já a combinação de sacarose com glicose a 0,2 M, o controle (sem açúcar) e glicose a 0,2M não diferiram estatisticamente entre os acessos (Tabela 2).

Nas análises de comprimento, massa seca de parte aérea e de raízes das plantas de ambos os acessos, cultivadas em diferentes fontes de carbono, apresentaram diferenças significativas ($p < 0.01$) para todas as variáveis, sendo as maiores médias observadas no acesso 13. Para o comprimento da planta, as fontes de carbono glicose 0,1M, sacarose 0,1M, sacarose 0,2M e glicose + sacarose 0,1M apresentaram as maiores médias, mas não foram diferentes significativamente do controle. As plantas cultivadas em sacarose a 0,1M e 0,2M e glicose + sacarose 0,1M, apresentaram as maiores médias para massa seca de parte aérea. Por outro lado, as plantas cultivadas em meio contendo glicose 0,2 M e sem fonte de carbono apresentaram as menores médias para massa seca da raiz, quando comparadas às outras fontes de carbono que foram estatisticamente iguais (Tabela 3).

Tabela 3 - Valores médios para comprimento de planta, massa seca da parte aérea e raízes de dois acessos de *Pfaffia glomerata* em função dos acessos em diferentes fontes de carbono.

| Tratamentos | Variáveis | | |
|-------------------|------------------|-----------------|---------------------|
| | Comprimento (cm) | Massa Seca (PA) | Massa Seca (Raízes) |
| Acessos | 13 | 8.8a | 0.4a |
| | 04 | 5.08b | 0.26b |
| Fontes de Carbono | Controle (0) | 8.65a | 0.14d |
| | Glic 0,1 M | 6.47ab | 0.29bcd |
| | Glic 0,2M | 2.65c | 0.18d |
| | Sac 0,1 M | 9.26a | 0.58a |
| | Sac 0,2 M | 7.41ab | 0.45abc |
| | G+S 0,1 M | 9.30a | 0.56ab |
| | G+S 0,2 M | 4.97bc | 0.28cd |
| | CV (%) | 30.97 | 54.17 |

Glic (G) = Glicose; Sac (S) = Sacarose; 0 = Controle; MS = Massa Seca; PA = Parte Aérea. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

A interação entre os acessos e as fontes de carbono foi significativa ($p < 0.01$) para o comprimento das plantas. O comprimento das plantas do controle (plantas cultivadas sem fonte de açúcar) do acesso 13 foi estatisticamente igual às plantas cultivadas nas fontes de carbono glicose 0,1M, sacarose 0,1M e 0,2M, na combinação de glicose + sacarose a 0,1M e superior ao comprimento das plantas cultivadas em glicose 0,2M e glicose + sacarose 0,2M. Para o acesso 4 a maior média foi para plantas cultivadas em meio contendo a combinação de sacarose + glicose a 0,1M, entretanto esse tratamento não diferiu do controle. Entre os acessos, apenas os tratamentos glicose 0,2M e glicose + sacarose 0,2M não apresentaram diferenças estatísticas, porém nos tratamentos com diferença estatística as plantas do acesso 13, apresentaram médias superiores as do acesso 4. Não houve interação significativa entre os acessos e as fontes de carbono para o acúmulo de massa seca das raízes (Tabela 4).

Houve interação estatística significativa ($p < 0.05$) entre os acessos e as fontes de carbono para o acúmulo de massa seca da parte aérea. Plantas cultivadas em meio contendo sacarose 0,1M e 0,2M, sacarose + glicose 0,1M, apresentaram

médias superiores as demais fontes de carbono, para o acesso 13, entretanto, para o acesso 4 todos os tratamentos com fonte de carbono foram superiores ao controle, mas não diferiram entre si. Entre os acessos, plantas do acesso 13 cultivadas em meio contendo glicose + sacarose a 0,1M e sacarose a 0,2M apresentaram média superiores as plantas do acesso 4, cultivadas no mesmo meio, entretanto, nas demais fontes de carbono os acessos não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 4).

Maldaner et al. (2007), avaliaram o efeito da sacarose e do nitrogênio na multiplicação *in vitro* de *P. glomerata* e concluíram que a redução da concentração de N para 50% do meio MS, associada a um incremento na dose de sacarose até 45 g L⁻¹, favoreceu o crescimento em altura, número de segmentos nodais e brotações, bem como a produção de biomassa, corroborando com os resultados encontrados nesse trabalho, onde pode-se observar uma relação positiva ao aumento da fonte de carbono com o acúmulo de massa seca, principalmente para parte aérea.

Flores et al. (2010), estudando o teor de massa e de 20-E em raízes e parte aérea de dois genótipos de *Pfaffia glomerata* (BRA e JB-UFSM) e *Pfaffia tuberosa* propagadas *in vitro*, e em campo, constataram que o genótipo BRA apresentou maior taxa de proliferação e conteúdo de 20-E; a cultura de segmentos nodais de *P. tuberosa*, em meio MS sem a adição de TDZ, demonstrou ser um método adequado para a micropropagação, devido à taxa de multiplicação elevada e bom desenvolvimento das plantas. Para ambas as espécies, a parte aérea apresentou maior conteúdo de 20-E comparativamente às raízes.

Assim, como relatado por Flores et al. (2010), também foi possível observar nesse trabalho o maior acúmulo de 20-E em folhas em relação às raízes, sendo que a produção de 20-E e a proporção de acúmulo do composto entre os diferentes órgãos é variável de acordo com cada genótipo estudado.

Tabela 4: Valores médios para comprimento de planta, massa seca das raízes e parte aérea de dois acessos de *Pfaffia glomerata* em função dos acessos em diferentes fontes de carbono.

| VARIÁVEL | | | | | | | |
|------------------------------|---------|--------------|---------------|--------------|-------------|--------------|-------------|
| Comprimento da planta (cm)** | | | | | | | |
| TRATAMENTOS | 0 | Glic 0,1M | Glic 0,2 M | Sac 0,1 M | Sac 0,2M | G+S 0,1 M | G+S 0,2M |
| Acessos(A) | | | | | | | |
| A 13 | 11.59aA | 8.31aAB | 2.33aC | 12.34aA | 11.02aA | 11.38aA | 4.87aBC |
| A 4 | 5.71bAB | 4.63bAB | 2.97aB | 6.18bAB | 3.81bAB | 7.22bA | 5.08aAB |
| Massa Seca (Raiz) | | | | | | | |
| TRATAMENTOS | 0 | Glic 0,1M | Glic 0,2 M | Sac 0,1 M | Sac 0,2M | G+S 0,1 M | G+S 0,2M |
| Acessos (A) | | | | | | | |
| A 13 | 0.01aA | 0.15 aA | 0.01 aA | 0.09 aA | 0.19 aA | 0.22 aA | 0.11 aA |
| A 4 | 0.03 aA | 0.06 aA | 0.02 aA | 0.02 aA | 0.16 aA | 0.03 aA | 0.06 aA |
| Massa Seca (PA)* | | | | | | | |
| TRATAMENTOS | 0 | Glic 0,1M | Glic 0,2 M | Sac 0,1 M | Sac 0,2M | G+S 0,1 M | G+S 0,2M |
| Acessos (A) | | | | | | | |
| A 13 | 0.23aCD | 0.42aBCD | 0.08aD | 0.69aAB | 0.58aABC | 0.80aA | 0.38aBCD |
| A 4 | 0.06 aB | 0.17aAB | 0.28aAB | 0.47aA | 0.32bAB | 0.32bAB | 0.19aAB |

Glic (G) = Glicose; Sac (S) = Sacarose; 0 = Controle; PA = Parte Aérea.

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$).

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 \leq p < 0.05$).

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, letras minúsculas para coluna e letras maiúsculas para linha.

Análise micromorfométrica de folhas de *Pfaffia glomerata* cultivadas em meio MS com diferentes fontes de carbono.

Todas as plantas cultivadas, independente do tratamento e em ambos os acessos, apresentaram epiderme uniseriada em ambas as faces da folha. O mesofilo com parênquima paliçádico variou de 1 a 3 camadas de células bem definidas, e parênquima lacunoso com 3 a 4 camadas de células (Figuras 2 e 3). Células epidérmicas apresentaram paredes sinuosas e estômatos anomocíticos em ambas as faces da folha (Figura 4).

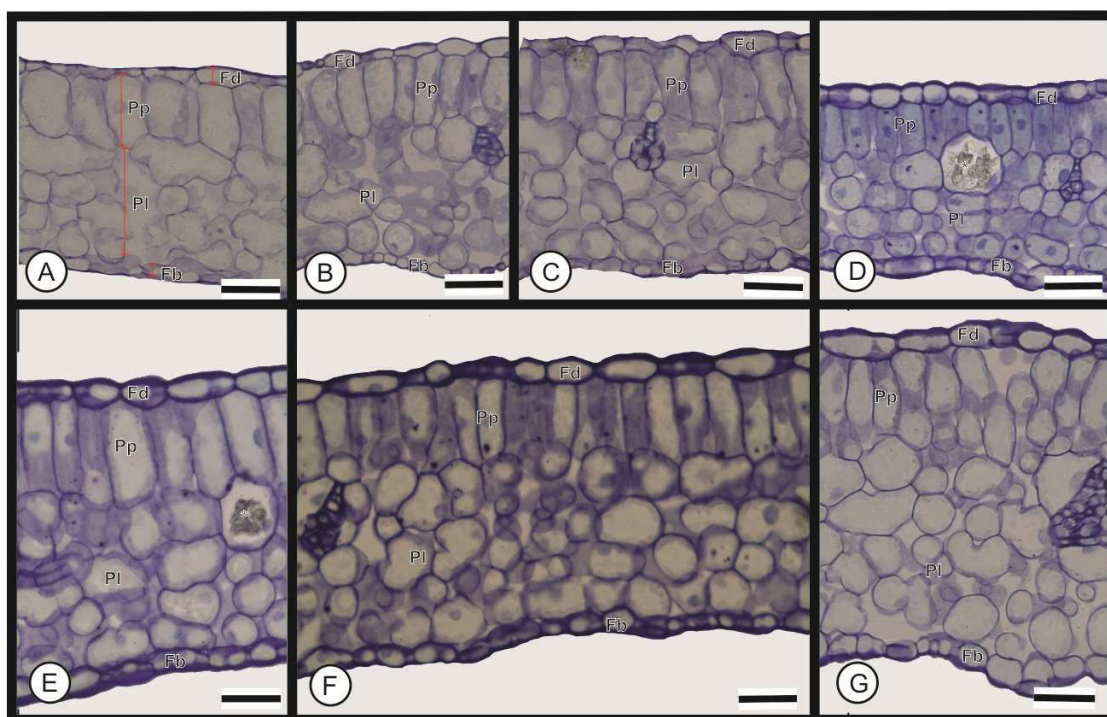


Figura 2. Folhas de *Pfaffia glomerata* (acesso 13) cultivadas *in vitro* com diferentes fontes de carbono (cortes transversais). **A:** Sem fonte de carbono. **B:** 0,1 M de glicose. **C:** 0,1 M de sacarose, **D:** 0,1 M de glicose+sacarose. **E:** 0,2 M de glicose. **F:** 0,2 M de sacarose. **G:** 0,2 M de glicose + sacarose. **Eb.** Epiderme abaxial, **Pp** parênquima paliçádico, **Pl:** parênquima lacunoso, Ed: epiderme adaxial, * cristal. **Barra:** 50 μm .

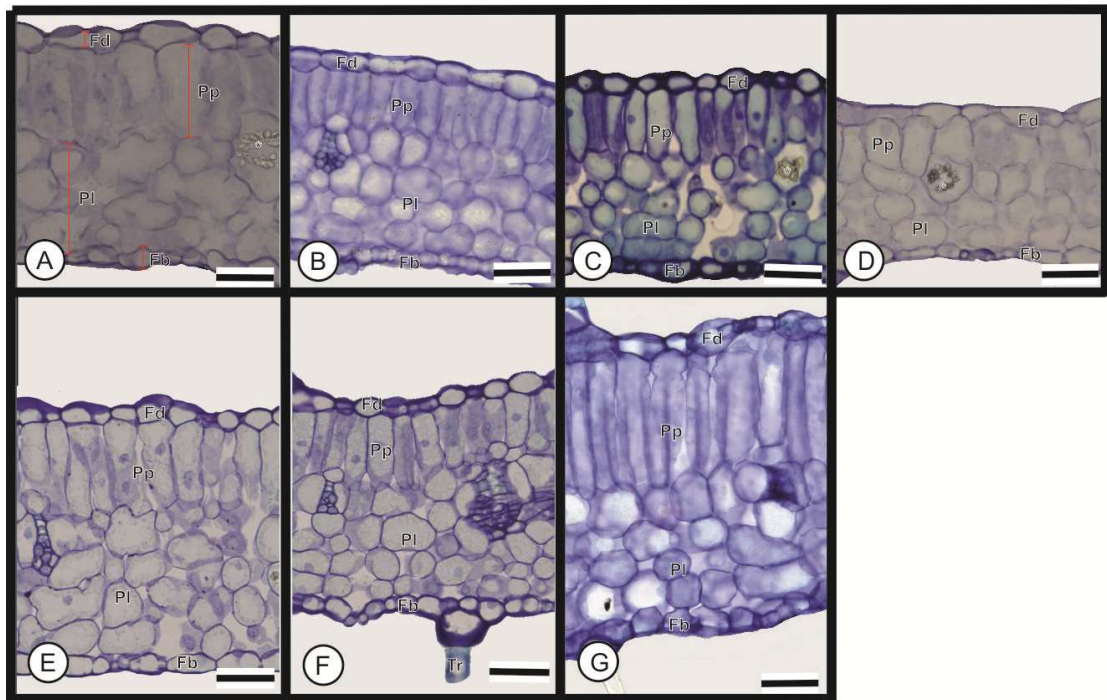


Figura 3. Folhas de *Pfaffia glomerata* (acesso 04) cultivadas *in vitro* com diferentes fontes de carbono (cortes transversais). **A:** Sem fonte de carbono. **B:** 0,1 M de glicose. **C:** 0,1 M de sacarose, **D:** 0,1 M de glicose+sacarose. **E:** 0,2 M de glicose. **F:** 0,2 M de sacarose. **G:** 0,2 M de glicose + sacarose. **Eb.** Epiderme abaxial, **Pp** parênquima paliçádico, **Pl:** parênquima lacunoso, Ed: epiderme adaxial, * cristal. **Barra:** 50 μm .

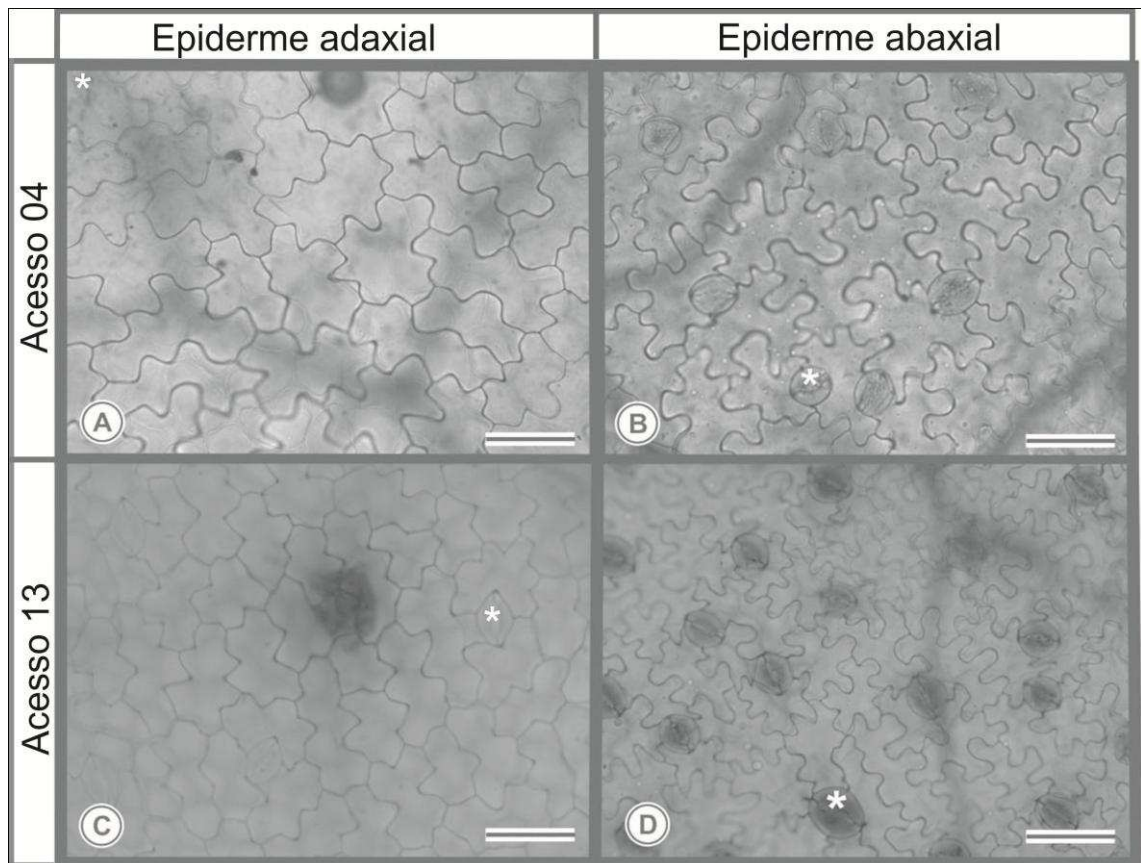


Figura 4. Folhas de *Pfaffia glomerata* diafanizadas. **A-B.** Acesso 04. **C-D** Acesso 13. **A-C.** Face adaxial. **B-D.** Face abaxial. * Estômato. **Barra:** 100 μm .

Plantas cultivadas com 0,1M de glicose apresentaram poucos espaços intracelulares no parênquima lacunoso em relação às plantas cultivadas com 0,2 M de glicose, entretanto, ambos os tratamentos apresentaram cristais tipo drusas em células do parênquima lacunoso (Figuras 2 e 3 B e E). Plantas cultivadas com 0,1 M de sacarose e com a combinação de sacarose e glicose a 0,1 M apresentam grandes espaços intracelulares no parênquima lacunoso e cristais tipo drusa (Figuras 2 e 3 B e C). Já, o tratamento com 0,2 M de sacarose e a combinação das fontes de carbono a 0,2 M apresentaram parênquima lacunoso com células bastante unidas, com poucos espaços entre as células (Figuras 2 e 3 F e G).

Na análise micromorfométrica das folhas, foi observado efeito significativo dos acessos ($p < 0.01$) para todas as variáveis em todos dos tratamentos, exceto para

parênquima lacunoso nos acessos. Na epiderme adaxial, a maior média observada foi para o acesso 4, já entre as fontes de carbono a maior média encontrada foi para o controle (sem açúcar). Para o parênquima paliçádico, o acesso 4 apresentou a maior média e para fonte de carbono a maior média para essa variável foi em folhas de plantas cultivadas em meio sem açúcar (controle). No parênquima lacunoso não houve diferença significativa entre os acessos, entretanto, para as fontes de carbono as maiores médias observadas foram em todas as fontes de carbono exceto para combinação de glicose + sacarose a 0,1M. Para epiderme abaxial, assim como nas demais variáveis, as maiores médias foram observadas no acesso 04, para a fonte de carbono foi observado as maiores em todas as fontes de carbono exceto na combinação de glicose + sacarose a 0,1M (Tabela 5).

Não houve interação significativa entre os acessos e as fontes de carbono para todas as variáveis (Tabela 6).

Tabela 5 - Valores médios da análise micromorfométrica de folhas de dois acessos de *Pfaffia glomerata* em função dos tratamentos.

| Tratamentos | Variáveis | | | | |
|-------------------|------------------|-----------------------|---------------------|------------------|----------|
| | Epiderme Adaxial | Parênquima Paliçádico | Parênquima Lacunoso | Epiderme Adaxial | |
| Acessos | 13 | 14.94b | 47.81b | 88.55 | 13.62 b |
| | 04 | 18.12a | 56.72a | 94.70 | 16.68a |
| Fontes de Carbono | Controle (0) | 18.35a | 65.56a | 99.29a | 17.17a |
| | Glic 0,1 M | 16.39 abc | 44.38de | 88.18a | 14.94a |
| | Glic 0,2M | 15.39 bc | 48.25cd | 91.53a | 14.47ab |
| | Sac 0,1 M | 16.79ab | 53.71bcd | 94.05a | 15.04a |
| | Sac 0,2 M | 17.92ab | 60.21ab | 107.58a | 17.12a |
| | G+S 0,1 M | 13.92 c | 36.98e | 64.96b | 12.03b |
| | G+S 0,2 M | 16.95ab | 56.81abc | 95.78a | 56.81abc |
| | CV (%) | 17.71 | 21.78 | 24.70 | 21.7 |

G = Glicose; S = Sacarose

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 6 - Valores médios da análise micromorfométrica de folhas de dois acessos de *Pfaffia glomerata* em função dos acessos em diferentes doses de fonte de carbono.

| | | VARIÁVEIS | | | | | | | | | | | | | |
|-------------|---------|-----------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------------------|---------|---------|----------|---------|----------|--|
| | | PARÊNQUIMA PALIÇÁDICO | | | | | | | PARÊNQUIMA LACUNOSO | | | | | | |
| TRATAMENTOS | | Fonte de Carbono | | | | | | | | | | | | | |
| Acessos (A) | 0 | G | G | S | S | G+S | G+S | 0 | G | G | S | S | G+S 0,1 | G+S | |
| | | 0,1 M | 0,2 M | 0,1M | 0,2 M | 0,1 M | 0,2M | | 0,1 M | 0,2 M | 0,1M | 0,2 M | M | 0,2M | |
| A 13 | 59.06aA | 44.19aA | 45.33aA | 47.20aA | 53.17aA | 36.29aA | 49.46aA | 98.96aA | 92.4aA | 84.20aA | 89.73aA | 100.09aA | 71.13aA | 83.35aA | |
| A 4 | 72.06aA | 44.57aA | 51.17aA | 60.21aA | 67.24aA | 37.67aA | 64.15aA | 99.62aA | 83.95aA | 98.86aA | 98.36aA | 115.07aA | 58.80aA | 108.21aA | |

G = Glicose; S = Sacarose

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, letras minúsculas para coluna e letras maiúsculas para linha.

Nas análises micromorfométricas para a superfície foliar da face abaxial foi observado efeito significativo para acessos ($p < 0.01$) todas as variáveis exceto para índice estomático, sendo as maiores médias observadas no acesso 13 (Tabela 7). Para as variáveis células epidérmicas, número de estômatos e densidade estomática houve efeito significativo, sendo a fonte de carbono glicose + sacarose a 0,2M que apresentou as maiores medias. Para o índice estomático a glicose 0,2M, sacarose 0,2M e glicose + sacarose 0,1M apresentaram as menores médias quando comparadas aos outros tratamentos que não diferiram do controle (sem açúcar) (Tabela 6).

Tabela 7 - Valores médios da análise micromorfométrica da face abaxial de folhas de dois acessos de *Pfaffia glomerata* em função dos tratamentos.

| FACE ABAXIAL | | | | | |
|-------------------|------------|---------------------|---------------------|-----------------------|---|
| VARIÁVEIS | | | | | |
| Tratamentos | | Células Epidérmicas | Número de Estômatos | Índice Estomático (%) | Densidade Estomática (mm ²) |
| Acessos | 13 | 135.94 a | 23.14 a | 14.17a | 212.06 a |
| | 04 | 88.14 b | 12.97 b | 13.37a | 120.43 b |
| | 0 | 57.60 e | 12.30 c | 17.12 a | 112.71 c |
| Fontes de Carbono | Glic 0,1 M | 114.50 c | 22.30 b | 15.92 a | 204.34 b |
| | Glic 0,2M | 144.20 b | 22.50 b | 12.81 b | 206.17 b |
| | Sac 0,1 M | 85.20 d | 16.30 c | 15.77 a | 149.36 c |
| | Sac 0,2 M | 136.80 b | 14.80 c | 9.98 c | 141.11 c |
| | G+S 0,1 M | 79.10d | 6.30 d | 9.54 c | 57.72 d |
| | G+S 0,2 M | 166.90a | 31.90 a | 15.28 ab | 292.31 a |
| CV (%) | | 12.53 | 21.22 | 13.91 | 20.88 |

Glic (G) = Glicose; Sac (S) = Sacarose; 0 = controle (sem fonte de carbono).

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Houve interação significativa ($p < 0.01$) entre os acessos e as fontes de carbono para o número de células epidérmicas na face abaxial da folha. Para o acesso 13, a maior média foi observada em plantas cultivadas em meio contendo a combinação de sacarose + glicose a 0,2M, já para o acesso 04, a maior média observada foi em plantas cultivadas com sacarose a 0,2 M. Não houve diferenças estatísticas entre os acessos em plantas cultivadas em meio sem açúcar e em sacarose

0,2 M, entretanto, nas demais fontes e concentrações de carbono plantas do acesso 13 apresentaram medias superiores as plantas do acesso 4 (Tabela 8).

Tabela 8- Valores médios da análise micromorfométrica da face abaxial de folhas de dois acessos de *Pfaffia glomerata* em função dos acessos em diferentes fontes de carbono.

| FACE ABAXIAL | | | | | | | |
|-----------------------|---------|--------------|---------------|--------------|-------------|--------------|-------------|
| CELULAS EPIDÉRMICAS** | | | | | | | |
| TRATAMENTOS | 0 | Glic 0,1M | Glic 0,2 M | Sac 0,1 M | Sac 0,2M | G+S 0,1 M | G+S 0,2M |
| Acessos (A) | | | | | | | |
| A 13 | 64.80aE | 133.80aC | 177.40aB | 102.60aD | 130.60aC | 113.40aCD | 229.00aA |
| A 4 | 50.40aC | 95.20bB | 111.00bB | 67.80bC | 143.00aA | 44.80bC | 104.80bB |

Glic (G) = Glicose; Sac (S) = Sacarose; 0 = controle (sem fonte de carbono).

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$).

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, letras minúsculas para coluna e letras maiúsculas para linha.

A interação entre os acessos e as fontes de carbono para número de estômatos e densidade estomática da face abaxial da folha foi significativa ($p < 0.01$), e os melhores resultados foram observados na combinação do acesso 13 e glicose+sacarose a 0,2M. Para o número de estômatos, do acesso 4 o tratamento controle e glicose + sacarose 0,1M apresentaram as menores médias quando comparados aos outros tratamentos. Para a densidade estomática do acesso 4 as plantas cultivadas em controle, sacarose 0,1M e glicose + sacarose 0,1M apresentaram as menores médias comparadas aos outros tratamentos (Tabela 9).

Tabela 9 - Valores médios no número de estômatos e densidade estomática da face abaxial de folhas de dois acessos de *Pfaffia glomerata* em função dos acessos em diferentes fontes de carbono.

| FACE ABAXIAL | | | | | | | |
|------------------------|-----------|------------|-------------|------------|-----------|-----------|-----------|
| VARIÁVEL | | | | | | | |
| NÚMERO DE ESTÔMATOS** | | | | | | | |
| TRATAMENTOS | 0 | Glic 0,1M | Glic 0,2 M | Sac 0,1 M | Sac 0,2M | G+S 0,1 M | G+S 0,2M |
| Acessos (A) | | | | | | | |
| A 13 | 16.20aCD | 29.00 aB | 31.80aB | 21.00aC | 11.80bDE | 4.60aE | 47.60 aA |
| A 4 | 8.40bBC | 15.60bAB | 13.20bABC | 11.60bABC | 17.80aA | 8.00aC | 16.20 bA |
| DENSIDADE ESTOMÁTICA** | | | | | | | |
| TRATAMENTOS | 0 | Glic 0,1M | Glic 0,2 M | Sac 0,1 M | Sac 0,2M | G+S 0,1 M | G+S 0,2M |
| Acessos (A) | | | | | | | |
| A 13 | 148.44aCD | 265.74aB | 291.39aB | 192.43aC | 108.12bDE | 42.15aE | 436.18aA |
| A 4 | 76.97bCD | 142.95bABC | 120.95bABCD | 106.29bBCD | 174.10aA | 73.30aD | 148.44bAB |

Glic (G) = Glicose; Sac (S) = Sacarose; 0 = controle (sem fonte de carbono)

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$)

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, letras minúsculas para coluna e letras maiúsculas para linha.

Houve interação significativa ($p < 0.01$) entre os acessos e as fontes de carbono para o índice estomático da face abaxial das folhas. A maior média observada para o acesso 13 foi em plantas cultivadas em meio sem açúcar, entretanto esse tratamento não se diferenciou estatisticamente dos tratamentos com glicose 0,1 M, sacarose 0,1 M e a combinação de sacarose a 0,2 M. Para o acesso 04, plantas cultivadas em glicose 0,2 M apresentaram a menor média para essa variável. Entre os acessos, as plantas do acesso 13 cultivadas glicose em ambas as concentrações, sacarose a 0,1 M, glicose+sacarose a 0,1M e em meio sem açúcar apresentaram médias superiores as plantas do acesso 04 cultivadas nas mesmas condições, entretanto, plantas do acesso 04 apresentaram medias superiores para a variável em relação ao acesso 13 quando cultivadas em sacarose 0,2 M e sacarose + glicose a 0,2 M (Tabela 10).

Tabela 10 - Valores médios do índice estomático da face abaxial de folhas de dois acessos de *Pfaffia glomerata* em função dos acessos em diferentes fontes de carbono.

| FACE ABAXIAL | | | | | | | |
|---------------------|-------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| VARIÁVEL | | | | | | | |
| ÍNDICE ESTOMÁTICO** | | | | | | | |
| TRATAMENTOS | 0 | Glic 0,1M | Glic 0,2 M | Sac 0,1 M | Sac 0,2M | G+S 0,1 M | G+S 0,2M |
| Acessos (A) | | | | | | | |
| A 13 | 20.02 aA | 17.71 aAB | 15.14 aB | 17.01 aAB | 8.25 bC | 3.89 bD | 17.20 aAB |
| A 4 | 14.22 bA | 14.12 bAB | 10.48 bB | 14.53 bA | 11.72 aAB | 15.19 aA | 13.36 bAB |

Glic (G) = Glicose; Sac (S) = Sacarose; 0 = controle (sem fonte de carbono).

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$).

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, letras minúsculas para coluna e letras maiúsculas para linha.

Nas análises micromorfométricas para a superfície foliar da face adaxial foi observado efeito significativo dos acessos e das fontes de carbono ($p < 0.01$) para todas as variáveis, as maiores médias foram observadas nas plantas do acesso 13. Para fontes de carbono, a maior média foi observada na combinação de sacarose + glicose 0,2 M para o número de células epidérmicas, e sacarose + glicose 0,1 M para as demais variáveis (Tabela 11).

Houve interação significativa ($p < 0.01$) entre os acessos e as fontes de carbono para o número de células epidérmicas da face adaxial das folhas. Plantas do acesso 13 cultivadas meio sem açúcar apresentaram médias superiores, porém não diferiram entre as médias das plantas cultivadas em glicose 0,2M e glicose + sacarose 0,2M. Já para o acesso 4, plantas cultivadas em meio com glicose + sacarose 0,1M e 0,2M apresentaram as maiores médias para a variável. Entre os acessos, foi observado médias superiores do acesso 13 em relação ao acesso 4 nos tratamentos controle e glicose 0,2M. Não houve interação significativa entre os acessos e as fontes de carbono para o número de estômatos e densidade estomática da face adaxial das folhas de ambos os acessos (Tabelas 12 e 13).

Tabela 11 - Valores médios da análise micromorfométrica da face adaxial de folhas de dois acessos de *Pfaffia glomerata* em função dos tratamentos.

| FACE ADAXIAL | | | | | |
|----------------------|------------|------------------------|------------------------|-----------------------------|---|
| VARIÁVEIS | | | | | |
| Tratamentos | | Células Epidérmicas | Número de Estômatos | Índice Estomático (%) | Densidade Estomática (mm ²) |
| Acessos | 13 | 132.82 a | 7.88 a | 5.41 a | 72.26 a |
| | 04 | 97.82 b | 6.17 b | 4.36 b | 56.55 b |
| | 0 | 115.90 bc | 2.00 c | 1.73 d | 18.32 c |
| Fontes de Carbono | Glic 0,1 M | 77.20 d | 1.60 c | 2.23 cd | 14.66 c |
| | Glic 0,2M | 117.80 bc | 2.90 c | 2.25 bcd | 26.57 c |
| | Sac 0,1 M | 89.00 cd | 3.40 c | 3.70 bc | 31.15 c |
| | Sac 0,2 M | 108.80 bcd | 2.10 c | 1.74 d | 19.24 c |
| | G+S 0,1 M | 132.40 ab | 29.80 a | 18.40 a | 273.07 a |
| | G+S 0,2 M | 166.20 a | 7.40 b | 4.12 b | 67.80 b |
| CV (%) | | 23.10 | 30.72 | 28.13 | 30.72 |

Glic (G) = Glicose; Sac (S) = Sacarose; 0 = controle (sem fonte de carbono).

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade nas colunas.

Tabela 12 - Valores médios do número de células epidérmicas e estômatos da face adaxial de folhas de dois acessos de *Pfaffia glomerata* em função dos acessos em diferentes fontes de carbono.

| FACE ADAXIAL | | | | | | | |
|-----------------------|----------|--------------|---------------|--------------|-------------|--------------|-------------|
| VARIÁVEL | | | | | | | |
| CELULAS EPIDÉRMICAS** | | | | | | | |
| TRATAMENTOS | 0 | Glic 0,1M | Glic 0,2 M | Sac 0,1 M | Sac 0,2M | G+S 0,1 M | G+S 0,2M |
| Acessos (A) | | | | | | | |
| A 13 | 189.80aA | 67.60aD | 143.20aABC | 105.80aCD | 124.80aBC | 132.40aBC | 166.20 aAB |
| A 4 | 42.00bC | 86.80aBC | 92.40bBC | 72.20aC | 92.80aBC | 132.40aAB | 166.20 aA |

| NÚMERO DE ESTÔMATOS | | | | | | | |
|---------------------|---------|--------------|---------------|--------------|-------------|--------------|-------------|
| TRATAMENTOS | 0 | Glic 0,1M | Glic 0,2 M | Sac 0,1 M | Sac 0,2M | G+S 0,1 M | G+S 0,2M |
| Acessos (A) | | | | | | | |
| A 13 | 3.40aA | 2.80 aA | 4.20 aA | 3.80 aA | 3.80 aA | 29.80 aA | 7.40 aA |
| A 4 | 0.60 aA | 0.40 aA | 1.60 aA | 3.00 aA | 0.40 aA | 29.80 aA | 7.40 aA |

Glic (G) = Glicose; Sac (S) = Sacarose; 0 = controle (sem fonte de carbono).

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$).

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 13 - Valores médios da densidade estomática da face adaxial de folhas de dois acessos de *Pfaffia glomerata* em função dos acessos em diferentes fontes de carbono.

| FACE ADAXIAL | | | | | | | |
|----------------------|---------|-------------|-------------|-------------|----------|--------------|-------------|
| VARIÁVEL | | | | | | | |
| DENSIDADE ESTOMÁTICA | | | | | | | |
| TRATAMENTOS | 0 | Glic 0,1M | Glic 0,2 M | Sac 0,1 M | Sac 0,2M | G+S 0,1 M | G+S 0,2M |
| Acessos (A) | | | | | | | |
| A 13 | 31.15aA | 25.65 aA | 38.48 aA | 34.82 aA | 34.82aA | 273.07 aA | 67.80 aA |
| A 4 | 5.49 aA | 3.66 aA | 14.66 aA | 27.49 aA | 3.66 aA | 273.07 aA | 67.80 aA |

Glic (G) = Glicose; Sac (S) = Sacarose; 0 = controle (sem fonte de carbono).

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Houve interação estatística significativa ($p < 0.05$) entre os acessos e as fontes de carbono para o índice estomático da face adaxial das folhas. Plantas cultivadas em meio contendo sacarose + glicose 0,1M apresentaram medias superiores as demais fontes de carbono, para ambos os acessos. Entre os acessos, plantas do acesso 13 cultivadas em meio contendo glicose a 0,1M e sacarose a 0,2M, apresentaram medias superiores as plantas do acesso 4 cultivadas no mesmo meio, entretanto, nas demais fonte de carbono os acessos não diferenciaram entre si (Tabela 14).

Tabela 14 - Valores médios do índice estomático da face adaxial de folhas de dois acessos de *Pfaffia glomerata* em função dos acessos em diferentes fontes de carbono.

| FACE ADAXIAL | | | | | | | |
|--------------------|---------|--------------|---------------|--------------|-------------|--------------|-------------|
| VARIÁVEL | | | | | | | |
| ÍNDICE ESTOMÁTICO* | | | | | | | |
| TRATAMENTOS | 0 | Glic 0,1M | Glic 0,2 M | Sac 0,1 M | Sac 0,2M | G+S 0,1 M | G+S 0,2M |
| A 13 | 2.01 aB | 3.97aB | 2.84aB | 3.42 aB | 3.09aB | 18.40aA | 4.12 aB |
| A 4 | 1.45aCD | 0.50bD | 1.66aBCD | 3.98aBC | 0.39bD | 18.40aA | 4.12 aB |

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 \leq p < 0.05$)

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, letras minúsculas para coluna e letras maiúsculas para linha.

A anatomia vegetal tem sido uma ferramenta de valiosa importância no sucesso das técnicas de micropropagação, uma vez que o emprego destas depende das estruturas escolhidas e da competência dos tecidos vegetais (SILVA et al., 2005). Diversos estudos têm caracterizado histologicamente os processos de micropropagação (APPEZZATO-DA-GLÓRIA et al., 1999; RODRIGUES et al., 2004), e segundo Lombardi et al. (2007), para o completo uso da ferramenta de micropropagação, faz-se necessário a compreensão dos aspectos histológicos e morfológicos.

Aspectos anatômicos das folhas de *P. glomerata* realizados por Iarema (2008) e Iarema et al. (2012), corroboram com os resultados observados nesse trabalho, uma vez que, as folhas de *P. glomerata* apresentam as mesmas características já descritas pela autora em ambos os acessos.

Calvete et al. (2002) estudaram o efeito de diferentes concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de morangueiro, verificaram que concentrações de 30 a 45 g.L⁻¹ otimizaram o desenvolvimento *in vitro*, no entanto as folhas apresentaram a

mesma morfologia nas quatro concentrações de sacarose estudadas. Segundo os autores, grandes diferenças anatômicas nas folhas podem ser observadas quando comparados folhas de plantas cultivadas *in vitro* e em casa de vegetação, uma vez que, caracteres morfológicos e anatômicos, tanto vegetativos quanto reprodutivos, estão relacionados com determinadas condições ambientais, embora a relação entre esses caracteres adaptativos e condições ambientais, em muitos casos, seja difícil de estabelecer (BARBOZA et al., 2006) .

Plantas cultivadas em meio contendo glicose, como fonte de carbono, independente do acesso apresentaram os tecidos foliares com células bem definidas. Essa melhor delimitação celular pode ser explicada pelo fato de ocorrer uma possível interferência na síntese da parede celular influenciada pela presença de glicose como principal fonte de carbono no meio, já que a parede celular primária é basicamente composta de microfibrilas de celulose embebidas em uma matriz de polissacarídeos, sendo a celulose uma microfibrila composta de cadeias lineares de D-glicose (TAIZ & ZEIGER, 2009). Alguns autores relataram a influência do meio de cultura na formação e composição da parede celular (PASQUAL et al., 2011; CAMARGO et al, 2007), entretanto, ainda é escassa a literatura sobre o assunto.

Segundo Baroja-Fernández et al. (2012), a atividade da sacarose sintase em *Arabidopsis* é expressa por 4 genes, e essa característica pode variar entre genótipos, o que explicaria a afinidade dos acessos por fontes de carbono diferentes, uma vez que, na inatividade de alguns dos genes que expressam a sacarose sintase, a presença de glicose no meio dispensaria a atividade dessa enzima na quebra de sacarose em glicose e frutose, além da disponibilidade de $MgCl_2$ no meio e o pH correto que também influenciam na absorção de sacarose. Qazi et al. (2012) também verificaram o acúmulo de açúcar em dois genótipos de sorgo, e também verificaram essa

característica de genótipo dependência, quanto afinidade pela fonte de carbono, como observado no presente estudo.

A anatomia foliar é um fator de bastante importância, pois influencia em grande parte a adaptação das plantas ao seu ambiente, sendo as características químicas e/ou morfológicas da superfície foliar que condicionam, por exemplo, a quantidade de luz absorvida ou refletida, o grau de hidrofobia do órgão, a eficiência do órgão em defender-se de parasitas e patógenos e a magnitude da transpiração (SANTIAGO et al, 2001).

CONCLUSÕES

Conclui - se que

- Na produção de 20-E, o acesso 13 se mostrou superior ao acesso 04 tanto em folhas quanto raízes, sendo a glicose em ambas as concentrações a melhor fonte de carbono, podendo o acesso 13 apresentar melhores resultados em trabalhos futuros de aclimatização, uma vez que apresentou espessamento epidérmico mais espesso.
- Não houve diferença anatômica das plantas com a descrição já existente na literatura, entretanto, plantas cultivada em glicose + sacarose 0,2 M apresentaram tecidos mais bem formados.
- Apesar de no ganho de massa seca, o controle não diferir de alguns tratamentos com fonte de carbono, verificou-se que glicose seria a melhor fonte de carbono para o cultivo de fáfia, uma vez plantas cultivadas em meio contendo glicose apresentaram as maiores medias de brotações e teor de 20-E.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, T.V.; SANT'ANNA-SANTOS, B.F.; AZEVEDO, A.A., FERREIRA, R.S. **ANATI QUANTI: software de análises quantitativas para estudos em anatomia vegetal**. Planta Daninha, v. 25, 2007, p. 649-659.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; VIEIRA, M. L. C.; DORNELAS, M. C. **Anatomical studies of *in vitro* organogenesis induced in leaf-derived explants of passion fruit**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 34, 1999, p. 2007-2013.
- ARNOTT, H.J. **Leaf clearing**. Turtox News, v. 37, 1959, p. 192-194.
- BARBOZA, S.B.S.C., GRACIANO-RIBEIRO, D., TEIXEIRA, J.B., PORTES, T.A., SOUZA, L.A.C. **Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 41, 2006.p. 185-194.
- BAROJA-FERNÁNDEZ, E., MUÑOZ, F.J., LI, J., BAHAJI, A., ALMAGRO, G., MONTERO, M., ETXEBERRIA, E., HIDALGO, M., SESMA, M.T., POZUETA-ROMERO, J. **Sucrose synthase activity in the *sus1/sus2/sus3/sus4* Arabidopsis mutant is sufficient to support normal cellulose and starch production**. Plant Biology, v.109, 2012. p.121-126.
- CALVETE, E.O.; AZEVEDO, M.; BORDIGNON, M.1 H.; SUZIN, M. **Análises anatômicas e da biomassa em plantas de morangueiro cultivadas *in vitro* e *ex vitro***. Horticultura Brasileira, v. 20, 2002. p. 649-653.
- CAMARGO, M.S; KORNDÖRFER, G.H; PEREIRA, H.S. **Solubilidade do silício em solos: influência do calcário e ácido silícico aplicados**. Bragantia, v. 66, 2007.p. 637-647.
- DONNELLY D.J.; VIDAVER, W.E.; LEE, K.Y. **The anatomy of tissue cultured red raspberry prior to and after transfer to soil**. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 4, 1985. p. 43-50.

FESTUCCI-BUSELLI, R.A.; CONTIM, L.A.S.; BARBOSA, L.C.A.; STUART, J.J.; OTONI, W.C. **Biosynthesis and potential functions of the ecdysteroid 20-hydroxyecdysone**. Review Botany, v. 86, 2008. p. 978-987.

FIGUEIREDO, L.S.; TEIXEIRA, S.L.; FREITAS, S.P.; VIEIRA, I.J.C.; MARTINS, E.R. **Comportamento de acessos de *P. glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae) nas condições de Campos dos Goytacazes – Rio de Janeiro**. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 7. 2004. p. 67 – 72.

FLORES, R.; BRONDANI JR, D.; CEZAROTTO JR, V.; GIACOMELLI, S.R.; NICOLOSO, F. T. **Micropropagation and β -ecdysone content f the Brazilian ginsengs *Pfaffia glomerata* and *Pfaffia tuberosa***. In *Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, v. 46. 2010. p. 210-217.

FLORES, R.; NICOLOSO, F.T.; MALDANER, J.; GARLET, T.M.B. **Benzilaminopurina (BA) e thidiazuron (TDZ) na propagação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen**. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 11, 2009. p. 292-299.

GRISI, F.A. **Aspectos fisiológico de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi), sob níveis distintos de saturação hídrica em ambientes protegidos, e área em processo de recuperação**. Doutorado em Engenharia Florestal. Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2010.126p.

GUERREIRO C.P.V.; MARQUES M.O.M.; FERRACINI V.L.; QUEIROZ S.C.N.; MING L.C. **Produção de β -ecdisona em *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen em função da adubação orgânica em 6 épocas de crescimento**. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 11, 2009. p. 392-398.

HAZARIKA, B. N. **Morpho-physiological disorders *in vitro* culture of plants**. Scientia Horticulturae, v. 108, 2006. p. 105-120.

- IAREMA, L. **Enxertia e propagação *in vitro* de fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]**. Doutorado em Botânica. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2008.189p.
- JAUSORO, V.; LLORENTE, B.E.; APÓSTOLO, N.M. **Structural differences between hyperhydric and normal *in vitro* shoots of *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC) Mattos (Bignoniaceae)**. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2010. p.183–191.
- JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York, McGraw-Hill Book Co. Incl. 1940.
- KAMADA, T. **Avaliação da diversidade genética de populações de fáfia (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) por RAPD, caracteres morfológicos e teor de β -ecdisona**. Doutorado em Genética e Melhoramento. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2006.160p.
- KHAWAR, K.M., SANCAK, C., URANBEY, S., ZCAN, S. **Effect of thidiazuron on shoot regeneration from different explants of lentil (*Lens culinaris* Medik.) via organogenesis**. *Turkish Journal of Botany*, v. 28, 2004. p. 421-426.
- KRAUS, J. E. & ARDUIN, A. 1997. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro, Seropédica.
- MALDANER, J.; NICOLOSO, F.T.; SANTOS, E.S.; FAGUNDES, C.K.; FLORES, R.; JUCOSKI, G.O.; SKREBSKY, E.C. **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*, v. 37, 2007. p. 133-140.
- MARTINS, C.F.; NICOLOSO, F.T. **Micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken**. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 6, 2004.p. 53-61.

- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. **A revised medium for growth and bioassays with tobacco tissue cultures.** *Physiologia Plantarum*, v. 15. 1962. p. 473-497.
- NICOLOSO, F.T., CASSOL, L.F., FORTUNATO, R.P. **Comprimento da estaca de ramo no enraizamento de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*).** *Ciência Rural*, v. 31, 2001. p.57-60.
- NICOLOSO, F.T.; ERIG, A.C.; RUSSOWSKI, D.; MARTINS, C.F. **Efeito de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*.** *Ciência e Agrotecnologia*, v. 27, 2003. p. 84-90.
- O'BRIEN, T. P. & McCULLY, M. E. **The study of plant structure principles and selected methods.** Melbourne, Termarcarphi Pty Ltd., 1981. 280p.
- OLIVEIRA, F. *Pfaffia paniculata* (Martius) Kuntze – **O ginseng brasileiro.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 1, 1986.p. 86-92.
- PAIVA NETO, V.B.; OTONI, W.C. **Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture: does it matter?** *Scientia Horticulturae*, v. 97, 2003. p. 193–202.
- PASQUAL, M; SOARES, J.D.R; RODRIGUES, F.A; ARAUJO, A.G; SANTOS, R.R. **Influência da qualidade de luz e silício no crescimento *in vitro* de orquídeas nativas e híbridas.** *Horticultura Brasileira*, v. 29, 2011. p. 324-329.
- QAZI, H.A., PARANJPE, S., BHARGAVA, S. **Stem sugar accumulation in sweet sorghum – Activity and expression of sucrose metabolizing enzymes and sucrose transporters.** *Journal of Plant Physiology*, v.169, 2012. p.605-613.
- RATES. M. K; GOSMANN. **Gênero *Pfaffia*: aspectos químicos, farmacológicos e implicações para o seu emprego terapêutico.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2002. p. 85-93.

- RODRIGUES, L. R., OLIVEIRA, J.M.S., MARIATH, J.E.A. **Anatomia vegetal aplicada aos estudos androgênicos *in vitro***. Revista Brasileira de Biociências, 2004. p. 159-167.
- SANTANA, J.R.F.; PAIVA, R.; REZENDE, R.K.S.; CASTRO, E.M.; PEREIRA, F.D.; OLIVEIRA, L.M. **Estímulo do comportamento fotoautotrófico durante o enraizamento *in vitro* de *Annona glabra* L.: II., aspectos da anatomia da folha antes da aclimatização**. Ciência e Agrotecnologia, v. 32, 2008. p. 640-644.
- SANTANA, J.R.F.; PAIVA, R.; SOUZA, A.V.; OLIVEIRA, L.M. **Effect of different carbon sources on the *in vitro* multiplication of *Annona* sp.** Ciência e Agrotecnologia. v. 35, 2011. p. 487-493.
- SANTANA, J.R.F.DE., OLIVEIRA, L.M.DE., PAIVA, R., RESENDE, R.K.S., CASTRO, E.M., PEREIRA, F.D. **Anatomia foliar de seis espécies de anonáceas cultivadas *in vitro* e em casa de vegetação**. Ciência Rural, v. 38, 2001. p. 2362-2365.
- SANTIAGO, E.J.A.; PINTO, J.E.B.P.; CASTRO, E.M.; LAMEIRA, O.A.; CONCEIÇÃO, H.E.O. **Aspectos da anatomia foliar da pimenta-longa (*Piper hispidinervium* C. DC.) sob diferentes condições de luminosidade**. Ciência e Agrotecnologia, v. 25, 2001. p. 1035- 1042.
- SILVA, F. DE A. S. E. & AZEVEDO, C. A. V. DE. **Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance**. In:WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers. 2009.
- SILVA, L. M.; ALQUINI, Y.; CAVALLET, V. J. **Inter-relações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal**. Acta Botanica Brasílica, v. 19, 2005. p. 183-194.

SKREBSKY, E.C.; NICOLOSO, F.T.; FERRÃO, G.E. **Sacarose e período de cultivo *in vitro* na aclimatização *ex vitro* de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen).** *Ciência Rural*, v. 34, 2004. p.1471-1477.

SOUZA, A.V.; BERTONI, B.W.; FRANCA, S.C., PEREIRA, A.M.S. **Conservação e enraizamento *in vitro* de infalível (*Mandevilla velutina* K. Schum.), uma planta medicinal do Cerrado.** *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. v. 13, 2011. p. 319-327.

SOUZA, V.C., LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II.** Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. p. 220-223.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Paredes Celulares, Biogênese e Expansão.** *Fisiologia vegetal*. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. p. 407-430.

**CAPÍTULO 4: ESTUDOS PRELIMINARES NA INDUÇÃO DA
TUBERIZAÇÃO *IN VITRO* DE RAÍZES DE *Pfaffia glomerata* (SPRENG.)
PEDERSEN**

RESUMO

Pfaffia glomerata (Amaranthaceae) também conhecida como fáfia e ginseng brasileiro é amplamente utilizada na medicina popular. O principal órgão utilizado pela população como medicamento são as raízes, a qual é o segundo órgão que mais acumula o principal fitoquímico produzido pela planta (20 hidroxiecdisona, 20-E). Sabendo da importância da espécie na medicina popular, é de grande importância o desenvolvimento de protocolos que viabilizem sua propagação em larga escala, sendo assim, esse trabalho objetivou a produção de raízes tuberosas de *P. glomerata in vitro*. Dois acessos de *P. glomerata* foram inoculados em frascos de vidro contendo meio MS acrescido com diferentes concentrações de reguladores de crescimento (0,5 e 0,1 M de BA e AIB em suas respectivas combinações) e sem regulador de crescimento (controle), por 10 dias. Após, foram transferidos para frascos contendo meio MS acrescido com sacarose a 0,2M por 30 dias, sendo 5 repetições por tratamento. Foram utilizados como explantes segmentos nodais de plantas matrizes já estabelecidas *in vitro*. A avaliação ocorreu após 30 dias de cultivo. O protocolo proposto para indução de raízes tuberiformes foi ineficaz. Entretanto, as plantas do acesso 43 apresentaram maior massa seca da parte aérea em relação ao acesso 22. As plantas do tratamento com 0,5 mg.L⁻¹ de BA apresentaram as maiores médias para massa seca da parte aérea e das raízes. Não houve efeito significativo nos acessos e reguladores de crescimento para porcentagem de enraizamento e dos acessos para massa seca das raízes.

ABSTRACT

Pfaffia glomerata (Amaranthaceae), also known as Brazilian ginseng, is widely used in folk medicine. The roots are the main organ used as medicine and the second that accumulates the main phytochemical produced by the plant (20 hydroxyecdysone, 20-E). Due to the medicinal value of the species, it is of great importance to develop protocols to enable its propagation on a large scale. Therefore, this study aimed to produce tuber roots of *P. glomerata in vitro*. Two accessions of *P. glomerata* were inoculated in glass jars containing MS medium supplemented with different concentrations of growth regulators (0.5 and 0.1 M of BA and IBA and their combinations) and a control without growth regulators, for 10 days. Then, the explants were transferred to jars containing MS medium supplemented with 0.2 M sucrose, for 30 days, with five replicates per treatment. Nodal segments from donor plants already established *in vitro* were used as explants. The evaluation took place after 30 days of culture. The protocol proposed for induction of tuber roots was ineffective; however, plants of accession 43 showed higher dry mass of shoots than accession 22. Plants of the treatment with 0.5 mg.L⁻¹ BA had the highest mean dry mass of shoots and roots. There was neither significant effect of accession and growth regulator on percentage of rooting nor effect of accession on root dry mass.

INTRODUÇÃO

As plantas medicinais vêm sendo utilizadas ao longo dos tempos para fins de tratamento, prevenção e cura de doenças. Na década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que mais da metade dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso à saúde (VEIGA et al., 2005).

Dentre as espécies com interesse fitoterápico e fitofármaco pode-se citar a *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, de ocorrência natural no Brasil (POTT & POTT, 1994; SOUZA & LORENZI, 2005), e conhecida popularmente como fáfia, suma, corango, ginseng do pantanal ou ginseng brasileiro (NASCIMENTO et al., 2007).

P. glomerata é de grande interesse para a indústria farmacêutica devido à produção do metabólito β -ecdisona (20E) (FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008a). Várias propriedades têm sido atribuídas a *Pfaffia* sp., como anabolizante, analgésica, antiinflamatória, antimutagênica, afrodisíaca, sedativa, antidiabética e de tônico muscular (RATES & GOSMAN, 2002; FERNANDES et al., 2005; CORRÊA JÚNIOR et al., 2008; FESTUCCI-BUSELLI et al., 2008a, b).

Devido a sua ampla utilização na medicina popular, estudos químicos e farmacológicos, visando à determinação dos seus princípios ativos e a validação científica de suas propriedades terapêuticas, foram desenvolvidos por vários pesquisadores (MONTANARI JÚNIOR, 2005). Segundo Corrêa Junior et al. (2008), os principais compostos responsáveis pela atividade biológica da espécie *P. glomerata* são os ecdisteróides, sendo a ecdisterona e/ou β -ecdisona o esteróide mais importante empregado nas formulações cosméticas e na farmacêutica. Festucci-Buselli et al. (2008a) relataram que a biossíntese, a regulação e a função precisa do

fitoecdisteroide 20-E são desconhecidas. Segundo os autores, os órgãos que apresentam maiores teores de 20-E são flores, seguidas pelas raízes, folhas e caules, respectivamente.

As atividades biológicas das raízes também têm merecido a atenção de pesquisadores. Fenner et al. (2008) avaliaram o efeito hipnótico de ecdisterona isolada de *Pfaffia glomerata* em roedores. Vigo et al. (2003) avaliaram os efeitos das raízes de *Pfaffia glomerata* sobre o tempo de sono e crescimento bacteriano em camundongos. Marques et al., (2002) avaliaram os efeitos tônicos em atividade física atribuídos às raízes de *Pfaffia glomerata*.

Festucci-Buselli et al. (2008b) caracterizaram o acúmulo temporal de 20E em órgãos de *Pfaffia glomerata* e destacaram a importância das raízes como um dos principais órgãos acumuladores de 20-E. Sendo assim, o estabelecimento de um sistema de indução de raízes tuberiformes *in vitro* de *Pfaffia* é de grande importância para que se avalie o acúmulo temporal de 20-E nesses órgãos.

Indução de tuberização *in vitro* foi obtida em várias espécies, sendo útil em estudos fisiológicos ou como estratégias de propagação e de conservação *in vitro* (XU et al. 1998; VERAMENDI et al., 1999; SILVA et al., 2001; OMOKOLO et al., 2003; HEN et al., 2007; FOGAÇA et al., 2010).

A tuberização *in vitro* é um processo fisiológico em que seções de caules ou raízes, sob cultivo com reguladores de crescimento, níveis de açúcares no meio de cultura e fotoperíodo, passam por alterações morfo-anatômicas, hormonais e bioquímicas, provocando, assim, o padrão tuberiforme do órgão (MEDINA et al., 2009; FOGAÇA et al., 2010). Diferentes concentrações de sacarose foram avaliadas na minituberização de *Solanum tuberosum* (XU et al., 1998; OMOKOLO et al. 2003; KANWAL et al., 2006; ALTINDAL & KARADOAN, 2010; HASSAN et al., 2011),

Manihot esculenta (FOGAÇA et al., 2010) e *Helianthus tuberosus* (GUTIERREZ et al., 2011).

Sabendo que o segundo órgão de maior acúmulo de 20-E em *P. glomerata* são as raízes, esse trabalho objetivou o desenvolvimento de um protocolo que viabilize a produção de raízes tuberosas *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos do II (DBV-BIOAGRO), na Universidade Federal de Viçosa. Foram utilizados dois acessos de *Pfaffia glomerata* (acessos 22 e 43) oriundas da coleção de germoplasma de plantas medicinais do Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia (Embrapa/Cenargen).

Para obtenção de material estoque, os indivíduos foram multiplicados vegetativamente *in vitro*, via segmento nodal. Os acessos foram cultivados em tubo de ensaio com meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 8 g L⁻¹ de ágar (Merck), 0,1 g L⁻¹ de inositol, e mantidos em sala de crescimento, à temperatura de 25 ± 2°C, sob fotoperíodo de 16 horas com irradiância de 60 μmol m⁻² s⁻¹, por 30 dias.

Após 30 dias de cultivo, segmentos nodais oriundos do material estoque foram inoculados em meio MS semi-sólido, acrescido, 8 g L⁻¹ de ágar (Merck), 0,1 g L⁻¹ de inositol, acrescido 0,5 mg L⁻¹ de 6-benziladenina (BA); 0,5 mg/l de BA+ 0,5 mg L⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB), 0,5 mg L⁻¹ de BA+ 1,0 mg L⁻¹ de AIB; 0,5 mg L⁻¹ de AIB e sem regulador de crescimento (controle), em frascos de vidro contendo 50 ml de meio de cultura, tampados com filme plástico Rolopac[®] e mantidos em sala de crescimento, por 10 dias.

Após 10 dias de cultivo, os explantes foram transferidos para frascos contendo 50 ml de meio MS acrescido de, 8 g L⁻¹ de ágar (Merck), 0,1 g L⁻¹ de mio- ositol, sacarose a 0,2 M sem regulador de crescimento, tampados com filme plástico Rolopac[®], sendo mantidos em sala de crescimento por 30 dias.

O delineamento foi inteiramente ao acaso em esquema fatorial, sendo: 2 x 5 {2 acessos x 5 concentração de reguladores de crescimento [0 (controle); 0,5 AIB;

0,5 BA; 0,5 de BA + 0,5 AIB e 0,5 de BA + 1 AIB mg L⁻¹]]. Foram avaliados 5 repetições por tratamento.

A avaliação ocorreu após 30 dias de cultivo, observando a porcentagem de cobertura de raízes no fundo do pote e matéria seca para parte aérea e raízes. Para avaliação da porcentagem de raízes foi utilizado o seguinte índice de enraizamento: 0 - 2 = 0 a 25 %; 2,1 - 3 = 25 a 50%; 3,1 - 4 = 51 a 75%; acima de 4 = 75 a 100%.

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), empregando-se o programa ASSISTAT Versão 7.6 beta (2011) da Universidade Federal de Campina Grande (SILVA & AZEVEDO, 2009), e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foi observado efeito significativo dos acessos e dos reguladores de crescimento para a porcentagem de raiz. Para a massa seca da parte aérea foi observado efeito significativo dos acessos e dos reguladores de crescimento ($p < 0,01$), sendo as maiores médias observadas para o acesso 43 e o regulador de crescimento 0,5 BA mg.l^{-1} . Para massa seca das raízes houve efeito significativo do regulador de crescimento ($p < 0,01$), sendo a maior média observada em 0,5 mg.l^{-1} BA (Tabela 1).

Não houve interação entre os acessos e os reguladores de crescimento para a porcentagem de raiz, entretanto essa interação foi significativa para massa seca da parte aérea ($p < 0,01$), e massa seca das raízes ($p < 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 1- Valores médios da porcentagem de enraizamentos, massa seca de parte aérea e raízes de dois acessos de *Pfaffia glomerata* em função dos tratamentos.

| Tratamentos | VARIÁVEIS | | | |
|----------------------------|---|-----------------|-------------------|---------|
| | Raiz (%) | Massa Seca (PA) | Massa Seca (Raiz) | |
| Acessos | 22 | 2,56 a | 0,18 b | 0,22 a |
| | 43 | 3,00 a | 0,41 a | 0,21 a |
| | 0 | 3,10 a | 0,24 b | 0,04 d |
| Reguladores de crescimento | 0,5 BA (MG.l^{-1}) | 2,70 a | 0,51 a | 0,47 a |
| | 0,5 BA + 0,5 AIB (mg.l^{-1}) | 2,70 a | 0,25 b | 0,16 c |
| | 0,5 BA + 1,0 AIB (mg.l^{-1}) | 2,60 a | 0,26 b | 0,32 b |
| | 0,5 AIB (mg.l^{-1}) | 2,80 a | 0,23 b | 0,07 cd |
| CV (%) | 30,94 | 22,93 | 41,04 | |

PA = Parte aérea.

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si na coluna pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Para massa seca da parte aérea, verificou-se que para o acesso 22, plantas cultivadas sem regulador de crescimento apresentaram a maior média, já para o acesso 43, a maior média foi observada em plantas cultivadas em meio contendo 0,5 mg.L^{-1} de BA. Entre os acessos, plantas cultivadas em 0,5 mg.L^{-1} de BA, 0,5 mg.L^{-1} de BA+AIB e 0,5 BA+1,0 de AIB, o acesso 43 apresentou médias superiores as

plantas do acesso 22 cultivadas nas mesmas condições, os demais tratamentos não diferem entre si estatisticamente (Tabela 2).

Para massa seca da raiz ocorreu interação significativa ($p < 0,05$) entre os acessos e os reguladores de crescimento. Neste caso, o acesso 22, apresentou melhor performance na maioria dos meios, exceto para meio MS suplementado com 0.5 de BA, onde a resposta foi similar nos dois acessos, 22 e 43 (Tabela 2).

Corrêa et al. (2003) também não obtiveram estruturas semelhantes a raízes tuberosas em batata doce. O insucesso foi justificado pela presença de carvão ativado no meio de cultura. Todavia, na presença de filtro amarelo e reguladores de crescimento nas combinações de BA (2 mg L^{-1}) + ácido naftaleno acético (ANA) ($0,3 \text{ mg L}^{-1}$) e cinetina (6 mg L^{-1}) + ANA ($0,3 \text{ mg L}^{-1}$), houve formação de estruturas semelhantes a raízes tuberosas e a presença de reguladores de crescimento promoveu maiores incrementos de massa seca da parte aérea. Entretanto, em diversos trabalhos utilizando altas dosagens de sacarose, combinadas aos reguladores de crescimento, relatou-se sucesso na formação de microtubérculos *in vitro*. Raízes tuberosas de *Rehmannia glutinosa* foram induzidas *in vitro* com sucesso utilizando alto teor de sacarose e BA (SUN et al., 2010), em *Dioscorea nipponica* Makino (CHEN et al., 2007) e em diferentes cultivares de mandioca (FOGAÇA et al., 2010). Medina et al., (2009) também avaliaram o efeito de diferentes concentrações de reguladores de crescimento e sacarose em meio MS na indução de tubérculos em *Habenaria bractescens* Lindl.

Tabela 2- Valores médios da porcentagem de enraizamentos, massa seca de parte aérea e raízes de dois acessos de *Pfaffia glomerata* em função dos acessos em diferentes concentrações de reguladores de crescimento.

| TRATAMENTOS | | VARIÁVEIS | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------|------------|-------------------------------|------------------|------------------|------------|------------|---------------------|------------------|------------------|-------------|------------|----------------------|------------------|------------------|-------------|--|
| | | RAIZ (%) | | | | | MATÉRIA SECA (PA)** | | | | | MATÉRIA SECA (RAIZ)* | | | | |
| | | Regulador de crescimento (RC) | | | | | | | | | | | | | | |
| Acessos (A) | 0 | 0,5 BA | 0,5 BA + 0,5 AIB | 0,5 BA + 1,0 AIB | 0,5 AIB | 0 | 0,5 BA | 0,5 BA + 0,5 AIB | 0,5 BA + 1,0 AIB | 0,5 AIB | 0 | 0,5 BA | 0,5 BA + 0,5 AIB | 0,5 BA + 1,0 AIB | 0,5 AIB | |
| A 22 | 3,20 aA | 2,20 aA | 2,20 aA | 2,40 aA | 2,80 aA | 0,27 aA | 0,17 bAB | 0,16 bAB | 0,10 bB | 0,19 aAB | 0,07 aB | 0,46 aA | 0,10 bB | 0,39 aA | 0,06 aB | |
| A 43 | 3,00 aA | 3,20 aA | 3,20 aA | 2,80 aA | 2,80 aA | 0,21 aC | 0,85 aA | 0,33 aBC | 0,41 aB | 0,27 aC | 0,01 aC | 0,48 aA | 0,23 aB | 0,25 bB | 0,08 aBC | |

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$).

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$).

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, letras minúsculas para coluna e letras maiúsculas para linha.

CONCLUSÃO

As condições testadas para indução de raízes tuberiformes não foi eficiente. Entretanto, as plantas do acesso 43 apresentaram maior massa seca da parte aérea em relação ao acesso 22, sendo que o tratamento com $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BA apresentou a maior média para massa seca da parte aérea e das raízes. Não houve efeito significativo nos acessos e reguladores de crescimento para porcentagem de enraizamento e dos acessos para massa seca das raízes.

REFERÊNCIAS

- ALTINDAL, D., KARADOAN, T. **The effect of carbon sources on *in vitro* microtuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.).** Turkish Journal of Field Crops, v. 15, 2010. p. 7-11.
- CHEN, F.Q.; FU, Y.; WANG, D.L.; GAO, X. & WANG, L. **The effect of plant growth regulators and sucrose on the micropropagation and microtuberization of *Dioscorea nipponica* Makino.** Journal of Plant Growth Regulation, v. 26, 2007. p. 38-45.
- CORRÊA JÚNIOR, C.; MING, L.C.; CORTEZ, D.A.G. **Sazonalidade na produção de raízes e teor de β -ecdisona em acessos de *Puffia*.** Horticultura Brasileira, v.26, 2008. p. 393-397.
- CORRÊA, R.M.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; REIS, E.S.; SOUZA, A.V. **Potencial do carvão ativado, filtro amarelo e interação fotoperíodo/temperatura na formação de raízes tuberosas de batata-doce *in vitro*.** Ciência Rural, v. 33, 2003. p. 423-430.
- FENNER, R., ZIMMER, A.R., NEVES, G., KLIEMANN, M., GOSMANN, G., RATES, STELA. M.K. **Hypnotic effect of ecdysterone isolated from *Puffia glomerata* (Spreng.) Pedersen.** Brazilian Journal of Pharmacognosy, v.18, 2008. p.170-176.
- FESTUCCI-BUSELLI, R.A.; CONTIM, L.A.S.; BARBOSA, L.C.A.; STUART, J.J.; OTONI, W.C. **Biosynthesis and potential functions of the ecdysteroid 20-hydroxyecdysone.** Review Botany, v. 86, 2008a. p. 978-987.
- FESTUCCI-BUSELLI, R.A.; CONTIM, L.A.S.; BARBOSA, L.C.A.; STUART, J.J.; VIEIRA, R.F.; OTONI, W.C. **Level and distribution of 20-hydroxyecdysone**

during *Pfaffia glomerata* development. Brazilian Journal of Plant Physiology, v. 20, 2008b. p. 305-311.

FOGAÇA, C.M.; SANT'ANNA-SANTOS, B.F.; CORDEIRO, D.C.; CORREIA, T.D.; FINGER, F.L.; OTONI, W.C.; CARGNIN, A. **Microtuberização *in vitro* de cultivares de Mandioca: aspectos morfológicos e anatômicos.** Acta Botânica Brasilica, v. 24, 2010. p. 634-630.

GUTIERREZ, P.P.; BIZZARRI, M.; RUGINI, E.; DE PACE, C. ***In vitro* microtuberization for simulating the developmental physiology of underground storage organ in *Heliantus tuberosus*.** Proceedings of the Joint Meeting AGI-SIBV-SIGA, v. 19, 2011. p. 19 - 22.

HASSAN, M.L.; BEHROOZ, E.; ESMAIEL, C. **Hinokitiol and activated charcoal influence the microtuberization and growth of potato (*Solanum tuberosum* cv. Agria) plantlets *in vitro*.** Australian Journal of Crop Science, v. 5, 2011. p. 1481-1485.

KANWAL, A., ALI, A., SHOAIB, K. ***In vitro* microtuberization of Potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Kuroda - a new variety in Pakistan.** International Journal of Agriculture & Biology. v. 8, 2006. p. 37-340.

MARQUES, L.C.; DANUCALOV, M.Á.; TORRES, F.; GALDURÓZ, J.C.F.; CARLINI, E.L.A.; SILVA, A.C. **Estudo clínico duplo-cego de extrato padronizado (BNT-08) das raízes de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen: avaliação do efeito tônico em atividade física.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 12, 2002. p. 44-47.

MEDINA, R.D.; FLACHSLAND, E.A.; GONZALEZ, A.M.; ERADA, G.T.; FALOCI, M.M.; MROGINSKI, L.A. ***In vitro* tuberization and plant regeneration from multimodal segment culture of *Habenaria bractescens* Lindl., an**

Argentinean wetland orchid. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 97, 2009. p. 91–101.

MONTANARI JÚNIOR, I. **Avaliação de genótipos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen visando seu cultivo comercial.** Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical. Instituto Agronômico, Campinas, SP. 2005. 65p.

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

NASCIMENTO, E.X.; MOTA, J.H.; VIEIRA, M.C.; ZÁRATE, N.A.H. **Produção de biomassa de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Plantago major* L. em cultivo solteiro e consorciado.** Ciência e Agrotecnologia, v. 31, 2007. p. 724-730.

OLIVEIRA, F. ***Pfaffia paniculata* (Martius) Kuntze – O ginseng brasileiro.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 1, 1986. p. 86-92.

OMOKOLO, N.D.; BOUDJEKO, T.; TSAFACK TAKADONG, J.J. ***In vitro* tuberization of *Xanthosoma sagittifolium* L. Shott: effects of phytohormones, sucrose, nitrogen and photoperiod.** Scientia Horticulturae, v. 98, 2003. p. 337-345.

POTT, A.; POTT, V. S. **Plantas do pantanal.** Corumbá: Embrapa-SPI. 1994. 320 p.

RATES, M. K.; GOSMAN, N. **Gênero *Pfaffia*: aspectos químicos, farmacológicos e implicações para o seu emprego terapêutico.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 12, 2002. p. 85-93.

RODRIGUES-OTUBO, B.M.; USBERTI FILHO, J.A.; SIQUEIRA, W.J.; DOMINGUES, E.T.; GRANJA, N.P.; MIRANDA FILHO, H.S. **Respostas de diferentes genótipos de batata à tuberização *in vitro*.** Bragantia, v. 58, 1999. p. 227-233.

- SILVA, F. DE A. S. E. & AZEVEDO, C. A. V. DE. **Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance.** In:WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers. 2009.
- SILVA, J.A.B.; OTONI, W.C.; MARTINEZ, C.A.; DIAS, L.M. & SILVA, M.A.P. **Microtuberization of Andean potato species (*Solanum* spp.) as effected by salinity.** Scientia Horticulturae, v. 89, 2001. p. 91-101
- SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II.** Nova Odessa. Instituto Plantarum. 2005. 704p.
- SUN, P.; YUHAI, G.; JIANJUN, Q.; LILI, Z.; XIANEN L. **Isolation and expression analysis of tuberous root development related genes in *Rehmannia glutinosa*.** Molecular Biology Reports, v. 37, 2010. p.1069–1079.
- VEIGA JR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M. A. M. **Plantas medicinais: cura segura?** Química Nova, v. 28, 2005. p. 519-528.
- VERAMENDI, J.; WILLMITZER, L.; TRETHERWEY, R.N. ***In vitro* grown potato microtubers are a suitable system for the study o primary carbohydrate metabolism.** Plant Physiology & Biochemistry, 1999. p. 693-697.
- VIGO, C.L.S.; NARITA, E.; NAKAMURA, C.V.; MARQUES, L.C. **Avaliação dos efeitos das raízes de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen sobre o tempo de sono e crescimento bacteriano.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 13, 2003. p. 14-17.
- XU, X.; VAN LAMMEREN, A.M.; VERMEER, E. & VREUGDENHIL, D. **The role of gibberellin, abscisic acid, and sucrose in the regulation of potato tuber formation *in vitro*.** Plant Physiology, v. 117, 1998.p. 575-584.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A característica de multibrototagens se mostrou genótipo dependente, sendo que nesse trabalho, o acesso 04 foi superior ao acesso 13 e a melhor fonte de carbono para o cultivo de fáfia, visando tanto multibrototagens como produção *in vitro* de 20-E, foi glicose a 0,2 M.

Contrariando o que já existe na literatura, neste trabalho, *in vitro*, folhas apresentaram maior teor de 20-E que raízes, sendo a produção de 20-E variável entre os acessos.

Para a produção de 20-E, o acesso 13 se mostrou mais promissor, podendo esse apresentar melhores resultados em trabalhos futuros de aclimação, uma vez que apresentou espessamento epidérmico mais espesso.

Os tratamentos visando a tuberização *in vitro* de raízes de fáfia se mostraram ineficazes. Entretanto, sabendo-se que plantas cultivadas *in vitro* apresentam maior teor de 20-E em folhas e não em raízes, se torna necessário avaliar em experimentos futuros se essa característica foi devido ao fato das plantas cultivadas *in vitro* apresentarem raízes finas.