

ITAINA GONÇALVES ANDRADE BUENO

**MICROENXERTIA E EFEITO DE PACLOBUTRAZOL E SACAROSE NO  
DESENVOLVIMENTO IN VITRO DE ACESSOS DE *Pfaffia*  
*glomerata* (SPRENG.) PEDERSEN**

Tese apresentada a Universidade Federal de  
Viçosa como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em Botânica,  
para obtenção do título de Doctor Scientiae.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2018

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

B928m  
2018

Bueno, Itaina Gonçalves Andrade, 1987-  
Microenxertia e efeito de paclobutrazol e sacarose no desenvolvimento *in vitro* de acessos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen / Itaina Gonçalves Andrade Bueno. – Viçosa, MG, 2018.  
ix, 80 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

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

1. Enxertia. 2. *Pfaffia glomerata*. 3. Poliploidia.  
4. Paclobutrazol (Fungicida). 5. Sacarose. 6. Hormônios vegetais. 7. Plantas - Crescimento. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa de Pós-Graduação em Botânica. II. Título.


CDD 22. ed. 631.541


ITAINA GONÇALVES ANDRADE BUENO

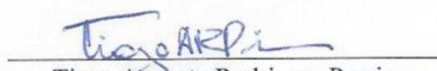
**MICROENXERTIA E EFEITO DE PACLOBUTRAZOL E SACAROSE NO  
DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE ACESSOS DE *Pfaffia*  
*glomerata* (SPRENG.) PEDERSEN**

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

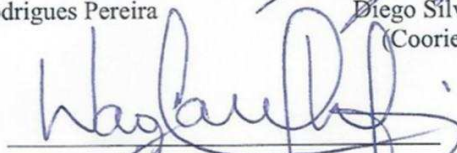
APROVADA: 28 de março de 2018

  
Lorena Melo Vieira

  
Larisse de Freitas Silva

  
Tiago Augusto Rodrigues Pereira

  
Diego Silva Batista  
(Coorientador)

  
Wagner Campos Otoni  
(Orientador)

## **DEDICO**

**A Deus e à minha família**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus pelo apoio e oportunidade de renovar minha fé todos os dias.

Ao Acampamento Manaaim, pelo cuidado e apoio espiritual.

À Universidade Federal de Viçosa e ao programa de pós-graduação em Botânica pela oportunidade e por toda a infraestrutura disponível para execução do trabalho, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsas de estudos.

Ao Prof W. C. Otoni por todo zelo, apoio, amizade, exemplo de profissional e orientador ao longo desses anos. Ao Laboratório de Cultura de Tecidos (LCT/Bioagro), seus funcionários (Elci e Lili) e estudantes em especial à Ludmila, Sérgio, Diego, Kristhiano, Priscila, Tatiane, Wellington, Anyela, Evandro pela companheirismo, incentivo e auxílio essenciais.

Ao meu esposo Rafael e minha filha Maria pelo presença, amor incondicional, apoio, incentivo, por tudo aquilo que não são explicados por meras palavras. Muito obrigada por serem minha família! Aos meus pais, minha irmã Inaê e seu esposo André por todo o amor, auxílio de muitas horas e apoio incondicional. Aos meus sogros e cunhados pelo apoio e incentivo, em especial a Marlene que veio cuidar da nossa preciosa Maria para que eu pudesse executar a parte prática desse trabalho.

A todos aos meus amigos, em especial a Amanda, Tânia e toda a família por terem acolhido e cuidado da Maria com tanto amor e alegria em vários momentos. À Ludmila, Lays e Luana pelo apoio, incentivo, amizade, dedicação ao longo de todos esses anos. À nossa família em Canaã constituída por Ivone, Zete, Gabriela e Mariana (in memoriam) que nos acolheu com amor e amizade. E não menos importantes à amizade de: Mateus, Thais, Ruth e Bia.

Agradeço a todos que de alguma forma me apoiaram ao longo desses anos.

Muito obrigada!

## **BIOGRAFIA**

ITAINA GONÇALVES ANDRADE BUENO, filha de Leopoldo Claret Andrade Souza e Ana Angélica Gonçalves Andrade, nasceu em 14 de março de 1987 na cidade de Belo Horizonte, estado de Minas Gerais. Casou-se com Perácio Rafael Bueno Ferreira e tiveram uma filha chamada Maria Andrade Perácio Bueno.

Graduou-se em Ciências Biológicas (Bacharelado) em janeiro de 2011 pela Universidade Estadual de Montes Claros. Obteve o título de mestre em Botânica em 2013, pela Universidade Federal de Viçosa. Na mesma Universidade iniciou o doutorado em Botânica em fevereiro de 2013, tendo defendido a tese em março de 2018.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ix</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>1</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>5</b>
<b>CAPÍTULO 1. Microenxertia em acessos de fáfia [Pfaffia glomerata (Spreng.) Pedersen]: morfoanatomia, expressão dos genes SPOOK e PHANTOM e conteúdo de 20-hidroxiecdisona</b> .....	<b>8</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>8</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>9</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>14</b>
Origem do material vegetal.....	<b>14</b>
Avaliação de crescimento.....	<b>15</b>
Análises anatômicas.....	<b>15</b>
Teor de 20E.....	<b>16</b>
Determinação do conteúdo de açúcares e teor de clorofilas.....	<b>17</b>
Determinação de conteúdo de amido.....	<b>17</b>
Extração de RNA, síntese de cDNA e análise de RT-qPCR.....	<b>18</b>
Análise de dados.....	<b>19</b>
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>20</b>
Aspectos de crescimento das plântulas.....	<b>20</b>
Análise anatômica das regiões de instalação da microenxertia.....	<b>22</b>

Variações no teor de clorofilas de plântulas microenxertadas.....	31
Análise dos teores de açúcar redutores e amido.....	32
Teor e expressão de genes envolvidos na rota da síntese de 20E.....	33
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>35</b>
A microenxertia e ploidia dos acessos incrementaram o crescimento...	35
Alterações anatômicas na microenxertia.....	37
A microenxertia influenciou na redução da relação Cla/Clb.....	38
Acúmulo de açúcares solúveis e amido.....	39
Incremento do teor de 20E.....	40
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>41</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>43</b>
<b>CAPÍTULO 2. Efeito do paclobutrazol e sacarose sob o teor de 20-hidroxiecdisona, expressão dos genes SPOOK e PHANTOM, sistema antioxidante e teor de açúcares de plântulas de Pfaffia glomerata .....</b>	<b>49</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>49</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>50</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>51</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>54</b>
Material vegetal.....	54
Avaliação de crescimento.....	55
Teor de 20E.....	55
Determinação de conteúdo de açúcares e teor de clorofilas.....	56

Determinação do conteúdo de amido .....	57
Enzimas do estresse oxidativo.....	58
Extração de RNA, síntese cDNA e análise de RT-qPCR.....	59
Análise de dados.....	61
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>61</b>
Aspectos morfológicos e de crescimento.....	61
Variações no teor de clorofilas.....	64
Análise de teores de açúcares e amido.....	65
Análise da atividade das enzimas do estresse oxidativo.....	66
Teor de 20E e expressão de genes relacionados com a rota de 20E.....	67
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>69</b>
Plantas de fáfia expostas à PBZxSacarose apresentaram redução no crescimento da parte aérea e radicular.....	69
Variações no teor de clorofilas.....	70
Análise de teores de açúcares e amido.....	71
Análise da atividade das enzimas do estresse oxidativo.....	72
Teor de 20E e expressão de genes relacionados com a rota de 20E.....	73
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>74</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>75</b>
<b>CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>80</b>

## RESUMO

BUENO, Itaina Gonçalves Andrade, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2018. **Microenxertia e efeito de paclobutrazol e sacarose no desenvolvimento in vitro de acessos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen.** Orientador: Wagner Campos Otoni. Coorientador: Diego Silva Batista.

À luz de que plantas de acessos poliploides de fáfia (*Pfaffia glomerata*) apresentaram aumento de 50% na produção de 20-hidroxicdisona (20E), em comparação ao acesso original diploide, o objetivo desse trabalho foi verificar a microenxertia de combinações de epibioto e hipobioto provindos de acessos de fáfia de diferentes ploidias (acesso diploide LCT22 e acesso poliploide LCT28), com o intuito de avaliar seu efeito sobre a síntese de 20E. Plantas autoenxertadas de LCT28 apresentaram aumento nos teores de açúcares e clorofilas, além de um estabelecimento precoce da microenxertia na consolidação dos tecidos. O mesmo tratamento apresentou elevado acúmulo de biomassa e conteúdo de 20E, comparativamente ao acesso poliploide LCT28 sem microenxertia. Outra estratégia explorada nesse trabalho foi a indução de tuberização in vitro. Objetivou-se nessa etapa do trabalho avaliar a tuberização in vitro em raízes de plantas de *P. glomerata* cultivada sob combinações de Paclobutrazol (PBZ) e sacarose. Para tal, monitorou-se alterações na síntese de 20E e na expressão dos genes SPOOK e PHANTOM, relacionados à síntese de 20E. Os tratamentos com paclobutrazol induziram redução no crescimento vegetal, acúmulo de biomassa na parte aérea e radicular. A concentração de 8% de sacarose atuou como agente protetivo do estresse oxidativo, culminando na redução da atividade enzimática. Paclobutrazol associado com sacarose reduziram o teor de 20E e apresentou menor/maior expressão dos genes SPOOK e PHANTOM na parte radicular, respectivamente.

## ABSTRACT

BUENO, Itaina Gonçalves Andrade, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2018. **Micrografting and effect of paclobutrazol and sucrose in vitro development of accesses of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen.** Adviser: Wagner Campos Otoni. Co-adviser: Diego Silva Batista.

In light that a polyploid accession of 'fáfia' (*Pfaffia glomerata*) showed a 50% increase in the production of 20-hydroxyecdysone (20E), compared to the original diploid access, the objective of this work was to verify the micrografting of epibioto and hipobioto (diploid access LCT22 and polyploid LCT28 access), with aim to evaluate its effect on the synthesis of 20E. Selfgrafted plants of LCT28 showed an increase in sugar and chlorophyll content, as well as an early establishment of micrografting in tissue consolidation. The same treatment presented high accumulation of biomass and content of 20E, compared to the polyploid access LCT28 without micrografting. Another strategy explored in this work was the induction of in vitro tuberization. The aim of this work was to evaluate the in vitro tuberization of roots of *P. glomerata* plants grown under combinations of paclobutrazol (PBZ) and sucrose. For this, changes in 20E synthesis and SPOOK and PHANTOM genes expression related to 20E synthesis were monitored. Treatments with paclobutrazol induced reduction in plant growth, accumulation of biomass in shoot and root. The concentration of 8% sucrose served as a protective agent of oxidative stress, culminating in the reduction of enzymatic activity. Paclobutrazol associated with sucrose reduced the content of 20E and presented lower/higher expression of the SPOOK and PHANTOM genes in the radicular part, respectively.

## INTRODUÇÃO GERAL

*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae) é uma espécie encontrada na América do Sul, sendo o Brasil o mais importante centro de coleta de espécies desse gênero para fins medicinais e alimentícios (Corrêa Júnior et al. 2006). Popularmente conhecida como fáfia, ginseng brasileiro, para-tudo, batata-do-mato, corango, corrente, sempre-viva e suma, nomes que correlacionam-se às propriedades medicinais relatadas para as raízes da espécie, tais como diabetes e reumatismo (Flores 2006).

As utilidades medicinais de fáfia são atribuídas à atividade da 20-hidroxiecdisona (20E), o fitoecdisteroide predominante no gênero (Bakrim et al. 2008). Além disso, o fitoecdisteroide apresenta utilidade agroquímica, biotecnológica e farmacêutica e está envolvido em processos bioquímicos e fisiológicos de plantas (Festucci-Buselli et al. 2008). No entanto, sua via de biossíntese ainda não está totalmente elucidada.

Os ecdisteroides são esteróis com adição de grupos múltiplos de hidroxilas e estão presentes em plantas e em insetos (Dinan 2009). Em artrópodes, os ecdisteroides estão envolvidos em vários estágios do ciclo de vida, tais como a regulação da muda, metamorfose, desenvolvimento, e reprodução (Speranza 2010). As glândulas protorácicas dos insetos secretam a ecdisona, a qual é subsequentemente transformada em 20E (Buszczak e Seagraves 2000). As enzimas do citocromo P450 (CYP) codificadas pelos genes HALLOWEEN – Spook (spo), Phantom (phm), Disembodied (dib), Shadow (sad), e Shade (shd) – catalisam uma série de passos de hidroxilações, resultando no hormônio ativo de muda, a 20E (Zhou et al. 2016).

Em plantas, os ecdisteroides são metabólitos secundários que atuam na defesa contra insetos herbívoros (Dinan 2009), no crescimento vegetal e na atividade enzimática

(Golovatskaya 2004). A presença da biossíntese de ecdisteroides em insetos e plantas é uma analogia interessante para a busca do entendimento da regulação da rota desses compostos. (Lafont et al. 2005; Festucci-Busceli et al. 2008). Um dos trabalhos relacionados com enzimas CYP apresenta genes similares aos genes HALLOWEEN envolvidos em biossíntese de fitoecdisteroides, afetando o C20-hidroxilase (Canals et al. 2005). Isso indica que as plantas por evolução convergente desenvolveram a biossíntese de 20E como mecanismo de defesa contra insetos herbívoros (Bakrim et al. 2008). O mais recente estudo relacionando aos genes HALLOWEEN foi a infecção de plântulas de *P. glomerata* por nematoides, onde constatou-se alto teor de 20E e modulação de sua rota pelos genes SPOOK e PHANTOM (Ferreira 2017).

Um aspecto com grande potencial para investigação da rota da biossíntese de 20E é a microenxertia. Esta técnica permite a enxertia de combinações de variedades da mesma espécie ou de espécies distintas, aumentando a possibilidade da obtenção de plantas mais produtivas (Warschefsky et al. 2016). Em se tratando da espécie *Pfaffia glomerata*, existe um banco de acessos no Laboratório de Cultura de Tecidos (LCTII-UFV), com clones apresentando distintas características em relação à produtividade e local de acúmulo da 20E. Por meio da indução da poliploidização do acesso diploide LCT22 obteve-se o acesso poliploide LCT28, com grande potencial de síntese de 20-hidroxiecdisona (Gomes et al. 2014). A poliploidização é um evento que ocorre a duplicação do genoma de um organismo, resultando em um poliploide mais vigoroso e produtivo (Noori et al. 2017).

Como técnica alternativa à elevação da produção de metabólitos primários e secundários, têm-se a tuberização *in vitro*. É uma via promissora para otimizar a produtividade de espécies medicinais, e atender a demanda da indústria farmacêutica (Ashraf et al. 2013). Os estudos relacionados com tuberização foram realizados com

diversas espécies como *Solanum tuberosum*, *Plectranthus esculentus*, *Chlorophytum Borivilianum*, *Dioscorea alata* (Bazabakana et al. 2003; Allemann e Hammes 2006; Fogaça et al. 2010; Ashraf et al. 2013).

Vários fatores controlam a tuberização, como sacarose (Teixeira e Pinto 1991), reguladores de crescimento (Teixeira e Pinto 1991; Harvey et al. 1991; Pelacho e Mingo-Castel 1991; Leclerc et al. 1994), fotoperíodo (Ortiz-Montiel e Lozoya-Saldana 1987; Pelacho e Mingo-Castel 1991; Seabrook et al. 1993), dentre outros. Neste trabalho utilizou-se os seguintes fatores: a sacarose e o paclobutrazol (PBZ).

A sacarose atua como fonte de carbono e agente osmótico, e em altas concentrações como um sinal inicial da tuberização (Perl et al. 1991; Liu et al. 2018). O regulador de crescimento paclobutrazol impede a síntese de giberelinas, dessa forma estimula o processo de tuberização (Jackson e Prat 1996). Esse agente anti-giberelina induz a aceleração do início da tuberização (Simko 1994). Para plantas medicinais esse acréscimo de massa é interessante pois pode acarretar no incremento dos princípios ativos de interesse (Jones et al. 2005).

As hipóteses deste trabalho baseiam-se nas seguintes questões:

1. Capítulo 1: Quais são as alterações na histologia, no perfil dos açúcares, na biossíntese de 20E e na modulação dos genes SPOOK e PHANTOM em plantas microenxertadas originadas de diferentes combinações de acessos de fáfia?
2. Capítulo 2: Quais são as características da histologia, do perfil de açúcares, do sistema antioxidante, da expressão de genes SPOOK e PHANTOM na biossíntese de 20E de plantas de fáfia cultivadas em meio de cultura com agentes indutores de tuberização *in vitro*?

Dada a importância de *P. glomerata*, da 20E e a falta de conhecimento sobre a rota de biossíntese, esse estudo pretende:

1. Capítulo 1: analisar a eficiência da microenxertia de dois acessos de fáfia, utilizados na combinação de epibioto e hipobioto, na produção do princípio ativo 20E e na modulação dos genes SPOOK e PHANTOM.
2. Capítulo 2: verificar se as concentrações de paclobutrazol e sacarose adicionadas ao meio de cultivo de plantas de fáfia alteram a produção de 20E e o comportamento da expressão dos genes SPOOK e PHANTOM.

## REFERÊNCIAS

- Allemann J, Hammes PS (2006) Effect of photoperiod on tuberization in the Livingstone potato (*Plectranthus esculentus* N.E.Br. Lamiaceae). **Field Crop Res**, 98:76–81.
- Ashraf MF, Aziz MA, Kadir MA, Stanslas J, Farokhian E (2013) In vitro tuberization of *Chlorophytum borivilianum* Sant & Fern (Safed Musli) as influenced by sucrose, CCC and culture systems. **Plant Cell Physiol**, 54(8):1356–1364.
- Bakrim A, Maria A, Sayah F, Lafont R, Takvorian N (2008) Biosynthesis and regulation of phytoecdysteroids in spinach (*Spinacia oleracea* L.). **Plant Physiol Biochem**, 46: 844-854.
- Bazabakana R, Wattiez R, Baucher M, Diallo B, Jaziri M (2003) Effect of jasmonic acid on developmental morphology during in vitro tuberization of *Dioscorea alata* (L.). **Plant Growth Regul**, 40: 229–237.
- Buszczak M, Segraves WA (2000). Insect metamorphosis: out with the old, in with the new. **Curr Biol**, 10:830-833.
- Canals D, Irurre-Santilari J, Casas J (2005) The first cytochrome P450 in ferns. Evidence for its involvement in phytoecdysteroid biosynthesis in *Polypodium vulgare*. **FEBS J**, 272: 4817-4825.
- Corrêa Júnior C (2006) **Fáfia - O ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Sprengel) Pedersen)**: aspectos agronômicos e fitoquímicos. Curitiba: Clichetec, 22p.
- Dinan L (2009) Phytoecdysteroids: what use are they? **Arch Insect Biochem**, 72:126-41.
- Ferreira PRB (2017) **Metabolic profile, ultrastructure and gene expression of brazilian-ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] under photoautotrophic growth and interaction with nematodes**. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais.
- Festucci-Buselli RA (2008) Biosynthesis and potential functions of the ecdysteroid 20-hydroxyecdysone - a review. **Botany**, 86:978-87.
- Flores R (2006) **Cultura de tecidos e produção de ecdisona em *Pfaffia glomerata* e *Pfaffia tuberosa* (Amaranthaceae)**. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade Federal de Santa Maria. Rio Grande do Sul.
- Fogaça CM, Sant'Anna-Santos BF, Cordeiro DC, Correia TD, Finger FL, Otoni WC, Cargnin A (2010) Microtuberização in vitro de cultivares de Mandioca: aspectos morfológicos e anatômicos. **Acta Bot Bras**, 24(3):624-630.
- Golovatskaya IF (2004) Effect of ecdysterone on morphological and physiological processes in plants. **Russ J Plant Physiol**, 51(3):407–413.

Gomes SSL, Saldanha CW, Neves CS, Trevizani M, Raposo NRB, Notini MM, Santos MO, Campos JMS, Otoni WC, Viccini LF (2014) Karyotype, genome size, and in vitro chromosome doubling of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, 118:45–56.

Harvey BMR, Crothers SH, Evans NE, Selby C (1991) The use of growth retardants to improve microtuber formation by potato (*Solanum tuberosum*). **Plant Cell Tiss Organ Cult**, 27:59-64.

Jackson SD, Prat S (1996) Control of tuberization in potato by gibberellins and phytochrome B. **Physiol Plant**, 98:407–411.

Jones ML, Chaffin GS, Eason JR, Clark DG (2005) Ethylene-sensitivity regulates proteolytic activity and cysteine protease gene expression in *Petunia corollas*. **J Exp Bot**, 56: 2733–2744.

Lafont R, Dauphin-Villemant C, Warren JT, Rees H (2005) Ecdysteroid chemistry and biochemistry. In: Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS (Eds) **Comp Mol Insect Sci**, 125-195.

Leclerc Y, Donnelly DJ, Seabrook JEA (1994) Microtuberisation of layered shoots and nodal cuttings of potato: the influence of growth regulators and incubation periods. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, 37:113-120.

Liu YJ, Wang GL, Ma J, Xu ZS, Wang F, Xiong AS (2018) Transcript profiling of sucrose synthase genes involved in sucrose metabolism among four carrot (*Daucus carota* L.) cultivars reveals distinct patterns. **BMC Plant Biol**, 18:8.

Noori SAS, Norouzi M, Karimzadeh G, Shirkoool K, Niazi M (2017) Effect of colchicine-induced polyploidy on morphological characteristics and essential oil composition of ajowan (*Trachyspermum ammi* L.). **Plant Cell Tiss Organ Cult**, 130(3):543-551.

Ortiz-Montiel G, Lozoya-Saldana H (1987) Potato minitubers: Technology validation in Mexico. **Amer Potato J**, 64:535-544.

Pelacho AM, Mingo-Castel AM (1991) Effects of photoperiod on kinetin-induced tuberisation of isolated potato stolons cultured in vitro. **Amer Potato J**, 68:533-541.

Perl A, Aviv D, Willmitzer L, Galun E (1991) In vitro tuberization potatoes harboring  $\beta$ -glucuronidase linked to a patatin promoter: effects of sucrose levels and photoperiods. **Plant Sci**, 73:87-95.

Seabrook JEA, Shirlyn C, Levy D (1993) Effect of photoperiod on in vitro tuberisation of potato (*Solanum tuberosum* L.). **Plant Cell Tiss Organ Cult**, 34:43-51.

Simko I (1994) Effect of paclobutrazol on in vitro formation of potato microtubers and their sprouting after storage. **Biol Plant**, 36:15-20.

Speranza A (2010) Into the world of steroids: A biochemical “keep in touch” in plants and animals. **Plant SignBeh**, 5(8):940-943.

Teixeira DMC, Pinto JEBP (1991) Minituberização da batata em diferentes níveis de N, Sacarose e BAP. **Rev Bras Fisiol Veg**, 3(2):77-81.

Warschefsky EJ, Klein LL, Frank MH, Chitwood DH, Londo JP, vonWettberg EJ, Miller AJ (2016) Rootstocks: diversity, domestication, and impacts on shoot phenotypes. **Trends Plant Sci**, 21(5):418–437.

Zhou J, Li J, Wang R, Sheng X, Zong S, Weng Q, Luo Y (2016) Ecdysteroid titers and expression of Halloween genes and ecdysteroid receptor in relation to overwintering and the long larval phase in the seabuckthorn carpenterworm, *Holcocerus hippophaecolus*. **Entomol Experim Appl**, 160(2):1–14.

## CAPÍTULO 1

### **Microenxertia em acessos de fáfia [Pfaffia glomerata (Spreng.) Pedersen]: morfoanatomia, expressão dos genes SPOOK e PHANTOM e conteúdo de 20-hidroxiecdisona**

#### **RESUMO**

Microenxertia baseia-se na enxertia do epibioto com o hipobioto sob condições assépticas, o que permite a eliminação de vírus, rejuvenescimento de tecidos vegetais maduros, obtenção de plantas altamente produtivas, inclusive a enxertia de combinações de variedades da mesma espécie e até entre espécies distintas. Sabendo-se que plantas poliploides de fáfia apresentaram um aumento de 50% na produção de 20-hidroxiecdisona (20E), em comparação às plantas diploides, o objetivo desse trabalho foi verificar a eficiência da associação da técnica da microenxertia em acessos de *Pfaffia glomerata* de diferentes ploidias (acesso diploide LCT22 e acesso poliploide LCT28), com o intuito de aumentar a síntese de 20E. Plantas autoenxertadas do acesso poliploide LCT28 apresentaram aumento nos teores de açúcares solúveis, amido e clorofilas, visto que esses teores influenciaram no sucesso da microenxertia e na obtenção de plantas vigorosas e produtivas. A autoenxertia do acesso LCT28 apresentou conexão vascular prematura comparando-se com os outros tratamentos, resultando no estabelecimento precoce da microenxertia. Dessa forma, esse tratamento exibiu uma maior capacidade adaptativa a estresses bióticos e abióticos. O mesmo tratamento apresentou elevado acúmulo de biomassa e conteúdo de 20E, comparando-se com o acesso poliploide LCT28 sem microenxertia. Na autoenxertia com acesso LCT28, os genes HALLOWEEN mostraram menor expressão do gene SPOOK e maior expressão do gene PHANTOM. Por outro lado, o acesso LCT28 sem microenxertia apresentou o inverso, maior e menor expressão dos genes SPOOK e PHANTOM, respectivamente.

**Palavras-chave:** microenxertia, 20- hidroxiecdisona, poliploidia, açúcares

## ABSTRACT

Micrografting is based on the grafting of the epibioto with the hipobioto under aseptic conditions, which allows the elimination of virus, rejuvenation of mature plant tissues, obtaining highly productive plants, including the grafting of combinations of varieties of the same species and even between different species. 'Fáfia' polyploid plants showed increase 50% in the production of 20-hydroxyecdysone (20E), compared to diploid plants, this work aimed to verify the efficiency of the association of the micrografting technique in *Pfaffia glomerata* different ploidy accessions ( LCT22 diploid and polyploid LCT28 ), in order to increase the synthesis of 20E. Selfgrafted plants of the polyploid LCT28 showed an increase in soluble sugars, starch and chlorophyll content, since these contents influenced the success of micrografting and the production of vigorous and productive plants. The selfgrafting LCT28 access showed premature vascular connection compared to the other treatments, resulting in the early establishment of micrografting. Thus, this treatment exhibited a greater adaptive capacity to biotic and abiotic stresses. The same treatment presented high accumulation of biomass and content of 20E, comparing with the polyploid LCT28 access without micrografting. In the selfgrafting with LCT28 access, the HALLOWEEN genes showed lower expression of the SPOOK gene and greater expression of the PHANTOM gene. On the other hand, LCT28 access without micrografting showed the inverse, higher and lower expression of the SPOOK and PHANTOM genes, respectively.

**Key words:** micrografting, 20-hydroxyecdysone, polyploidy, sugars

## INTRODUÇÃO

A capacidade de regeneração das células vegetais é baseada na teoria da totipotência, em que células detêm a habilidade potencial em formar um órgão ou uma planta completa, quando expostas a um determinado ambiente (Sugimoto et al. 2010; Féher 2014). Além disso, essa habilidade lhes permite reparar danos causados por vários tipos de estresses bióticos e abióticos (Melnyk 2017). Essa característica das células vegetais, de aderir tecidos e reconectar após ferimentos (Lough e Lucas 2006), é constatada no processo da microenxertia.

Essa técnica consiste na enxertia, sob condições assépticas, de um meristema ou ápice caulinar (epibioto) sobre um porta-enxerto (hipobioto) estabelecido in vitro. A planta enxertada é produto do sucesso da adesão de tecidos e reconexão da vascularização da região onde se encontra em contato entre o epibioto e hipobioto utilizados no processo de microenxertia. Essas mudanças histológicas são estudadas por vários pesquisadores no intuito de conhecer e descrever os mecanismos e eventos que levam ao sucesso ou falha da enxertia, ou melhor, a compatibilidade e incompatibilidade entre as plantas envolvidas (Goldschmidt 2014; Melnyk 2017).

Alterações fisiológicas e moleculares provindas da enxertia também tem sido alvo de estudo no âmbito científico, tanto para embasar melhor o processo (Kumari et al. 2015), como ferramenta para o entendimento de princípios do desenvolvimento vegetal, como a hipótese de canalização da auxina formulada por Sachs (1969).

A microenxertia auxilia na eliminação de vírus, rejuvenescimento de tecidos maduros, obtenção de plântulas com combinações genótípicas para aumentar a produtividade e em estudos de compatibilidade (Richardson et al. 1996; Hartmann et al.

1997). Comparando-se a enxertia tradicional, a microenxertia apresenta vantagens, tais como rapidez do processo, requerimento de menor espaço, material vegetal livre de doenças e produção de plântulas geneticamente uniformes (Işıkalan et al. 2011). Outra vantagem dessa alternativa de propagação in vitro é a utilização em qualquer período do ano, o que não afeta o sucesso da enxertia e a velocidade na obtenção dos resultados (Araújo e Castro-Neto 2002).

Popularmente conhecida como fáfia, ginseng brasileiro, para-tudo, batata-do-mato, corango, corrente, sempre-viva e dentre outros (Flores 2006), *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae) é uma espécie encontrada na América do Sul, sendo o Brasil o mais importante centro de coleta de espécies desse gênero para fins medicinais e alimentícios (Corrêa Júnior et al. 2008). A atividade do fitoecdisteroide 20-hidroxiecdisona (20E) confere às raízes da fáfia propriedades medicinais para o tratamento de diabetes e reumatismo (Flores 2006; Bakrim et al. 2008). Além disso, apresenta utilidades agroquímica, biotecnológica e farmacêutica e está envolvido em processos bioquímicos e fisiológicos de plantas (Festucci-Buselli et al. 2008). No entanto, a via de biossíntese de 20E, ainda não está totalmente elucidada.

Em *P. glomerata*, uma população pode apresentar ampla variabilidade fenotípica, inclusive variabilidade expressa em distintos conteúdos de constituintes bioativos (Montanari Jr e Perecin 2006). Os acessos de fáfia apresentam diferenças na produção de 20E e na massa seca das raízes (Kamada 2006).

Outra variável interessante relacionada à variabilidade são as plantas poliploides, que por definição são plantas com o genoma duplicado (Noori et al. 2017). Estas apresentam aumento na tolerância à seca, na resistência à pesticidas, na biomassa e tamanho dos órgãos, dentre outros (Osborn et al. 2003). A poliploidização induz maior

incremento de biomassa das partes vegetativas (Dhooghe et al. 2011), promovendo maior acúmulo de metabólitos secundários em algumas espécies (Gao et al. 1996; Jesus-Gonzalez e Weathers, 2003; Kim et al. 2004; Kaensaksiri et al. 2011; He et al. 2012).

O Laboratório de Cultura de Tecidos (LCTII) da UFV detém em seu Banco de Germoplasma em colaboração com a EMBRAPA-Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN, Brasília, DF) alguns poliploides, incluindo o poliploide LCT28, provindo da poliploidização do acesso diploide LCT22 da espécie, utilizado no presente trabalho. O poliploide LCT28 é caracterizado por produzir 50% a mais de 20E do que o diploide LCT22 (Gomes et al. 2014). Portanto, a propagação vegetativa de acessos diploide e poliploide de *P. glomerata*, via microenxertia, pode ser uma alternativa para o aumento significativo na produção e no esclarecimento da rota do princípio ativo de interesse, o 20E.

A descrição anatômica de uma série de eventos desse processo é realizada baseando-se nas seguintes etapas: corte do tecido vegetal, aderência dos tecidos, expansão e divisão celular, formação de calo (Birnbaum e Sanchez Alvarado 2008; Ikeuchi et al. 2013), diferenciação dos tecidos adjacentes e calos em floema e xilema, e finalmente a conexão do epibioto e hipobioto por meio de cordões vasculares.

Recentemente, por meio de novas técnicas, vários trabalhos relacionados com enxertia de hipocótilos, meristemas, cotilédones e inflorescências da planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Turnbull et al. 2002), tem fornecido conhecimento acerca do entendimento da enxertia e regeneração vegetal e também reforçando a importância da realização de trabalhos relacionados com a descrição do processo por meio de análises anatômicas.

Os ecdisteroides estão envolvidos em vários estágios do ciclo de vida dos artrópodes, tais como a regulação da muda, metamorfose, desenvolvimento e reprodução.

Similarmente, a síntese de 20E está presente em várias plantas (Lafont et al. 2005; Canals et al. 2005), inclusive em fáfia. Em insetos, os genes HALLOWEEN – SPOOK e PHANTOM - estão envolvidos na biossíntese de 20E, e recentemente observou-se a expressão desses genes em fáfia (Batista et al., submetido). Sendo assim, várias lacunas do conhecimento, relativos a biossíntese de 20E, podem ser esclarecidas por meio de estudos referentes à modulação desses genes em plantas. A técnica de microenxertia é uma oportunidade em potencial para buscar esses esclarecimentos.

As hipóteses deste capítulo baseiam-se nas seguintes questões: Quais as diferenças histológicas durante o processo de microenxertia nas diferentes combinações de acessos de fáfia? Como o perfil de açúcares se comporta em plantas microenxertadas originadas de diferentes combinações de acessos de fáfia? Quais as alterações na biossíntese de 20-hidroxiecdisona em plantas microenxertadas originadas de diferentes combinações de acessos de fáfia? Como é a expressão dos genes SPOOK e PHANTOM na biossíntese de 20E de plantas microenxertadas?

Logo, o objetivo desse trabalho foi analisar a eficiência da microenxertia de dois acessos de fáfia com ploidias distintas, utilizados na combinação de epibioto e hipobioto, visando aumentar a produção do princípio ativo 20E. E, ainda, agregar conhecimento em relação ao desenvolvimento ontogenético, às mudanças morfofisiológicas e comportamento da expressão de genes SPOOK e PHANTOM da rota metabólica da síntese de 20E em plantas microenxertadas de *P. glomerata*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal

Ápices caulinares com aproximadamente 1 cm de comprimento e contendo um par de folhas foram utilizados como epibioto e segmentos internodais alongados da porção basal da planta com aproximadamente 1,5 cm de comprimento foram utilizados como hipobioto. Os acessos utilizados foram o diploide LCT22 e o poliploide LCT28. Os tratamentos foram: controles (diploide LCT22 e o poliploide LCT28 sem enxertia) e as diversas combinações de epibioto-hipobioto (22-22; 28-28; 22-28; e 28-22).

O preparo dos epibiotos para a microenxertia constituiu-se de uma excisão na porção proximal na forma de duplo bisel. Já o hipobioto, no segmento internodal realizou-se uma fenda na região distal, visando receber o enxerto.

Após o preparo do hipobioto e epibioto, sob lupa binocular e com auxílio de pinças, foi realizada a microenxertia, ou seja, união dessas duas partes conforme metodologia de Bandeira et al. (2006). Todos os procedimentos foram realizados sob condições assépticas, com utilização de papel filtro umedecido com água destilada.

As plantas enxertadas foram transferidas para tubos de ensaio contendo 10 mL de meio constituído pelos sais MS (Murashige e Skoog 1962), vitaminas MS (0,5 mg L<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 0,5 mg L<sup>-1</sup> de piridoxina, 0,1 mg L<sup>-1</sup> de tiamina e 2 mg L<sup>-1</sup> de glicina) 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose. O meio de cultura teve o pH ajustado para 5,7 e geleificado com 7 g L<sup>-1</sup> de ágar granulado (Merck®), sendo posteriormente esterilizado por autoclavagem a 121° C e 1,5 atm durante 15 min. As culturas foram mantidas a 25 ± 2° C sob irradiância de 150 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 h.

Os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado em arranjo bifatorial (6x2), composto por combinações de epibioto-hipobioto (22;28;22-22; 28-28; 22-28; e 28-22) x regiões da planta (parte aérea e radicular). A unidade experimental foi composta por uma plântula por tubo e o experimento foi composto por 50 repetições/tratamento.

Foram realizadas coletas de material vegetal de todos os tratamentos para análise anatômica nos seguintes tempos: 7; 14; 21; 35; e 45 dias. As amostras foram coletadas aos 45 dias para realizar teor de 20E, teor de açúcares, teor de amido, teor de clorofilas e expressão gênica.

#### Avaliação de crescimento

Após 45 dias de cultivo in vitro, as seguintes mensurações foram realizadas: número de plântulas enxertadas, número de plântulas mortas, número de nós, comprimento das parte aérea e radicular, massa fresca das parte aérea e radicular, massas seca das partes aérea e radicular e porcentagem de eficiência da microenxertia.

#### Análise Anatômica

Amostras da região de contato entre o epibioto e hipobioto de todos os tratamentos em todos os tempos de coleta, já descritos no item acima, foram coletadas e fixadas em solução de Karnovsky (1965). Posteriormente, foram desidratadas em série etílica crescente, incluídas em resina metacrilato (Historesina, Leica®) e emblocados em moldes plásticos. Os blocos foram cortados com auxílio de micrótomo rotativo de avanço automático (RM 2155 - Leica), os cortes de 5 µm de espessura foram aderidos em lâminas

histológicas e corados com azul de Toluidina (O'Brien e McCully 1981), com pH 4,0. Após a secagem as lâminas foram montadas em resina sintética Permout (Fisher Scientific, Fair Lawn, USA). As imagens foram obtidas em microscópio de luz (modelo AX-70 TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japan) acoplado a câmera fotográfica digital (modelo Zeiss AxioCam HRc, Göttinger, Germany) e microcomputador com o programa de captura de imagens AxioVision v 4.8.2 (Zeiss, Germany).

#### Teor de 20-hidroxicdisona

A determinação do teor de 20-hidroxicdisona foi quantificada pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), analisando-se amostras de massa seca das folhas, obtidas por extrato metanólico. Utilizou-se o método descrito por Kamada (2006), e o material processado foi acondicionado em freezer (-20 °C).

As amostras foram preparadas a partir de 100 mg de material vegetal para 10 mL de metanol, as quais ficaram armazenadas em temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C) durante oito dias, sob agitação diária do extrato. Após esse período, os extratos foram centrifugados (15 minutos/5.000 rpm) e o sobrenadante coletado. Depois de obtido o extrato metanólico, foi analisado por CLAE sob as seguintes condições: equipamento (Shimadzu) modelo LC-10AI, equipado com detector SPD-10AI, CBM-10<sup>a</sup>, coluna Bomdesil C 18 (5,0 µm x 4,6 mm x 250 mm). A fase móvel foi composta por metanol-água na proporção 50:50 (v/v) com fluxo esperado de 1,2 mL min<sup>-1</sup> e tempo de corrida da amostra de 15 minutos. Os dados foram integrados por meio do "software" Shimadzu LC10.

A curva de calibração foi obtida com padrão de 97% de pureza de 20-hidroxicdisona (Sigma Chem. Co., EUA), em concentrações de 5, 10, 20, 40, 80, 100 e

160 mg L<sup>-1</sup> metanol, os quais foram injetados 20 µL. Os valores obtidos nos cromatogramas, correspondentes às concentrações das amostras-padrão, foram plotados no gráfico e obtido a equação para cálculo do teor de 20-hidroxicodisona dos indivíduos.

#### Determinação do conteúdo de açúcares e teor de clorofilas

Amostras foliares foram submetidas à extração etanólica determinando-se, na fração solúvel, os teores de glicose, frutose e sacarose segundo metodologia descrita por Fernie et al. (2001). Inicialmente, em cada microplaca, foram adicionados a cada poço 160 µL do meio de reação (HEPES/KOH 100 mM com MgCl<sub>2</sub> 3 mM pH 7, ATP 118 mM, NADP<sup>+</sup> 48,4 mM, e 56 unidades de desidrogenase da glicose-6-fosfato - G6PDH (5 mg mL<sup>-1</sup>)), 30 µL do extrato e 20 µL de etanol 80%. Por meio de um leitor de microplacas (OptiMax Tunable Microplate Reader) foram realizadas leituras das absorvâncias à 340 nm com intervalos entre leituras de 1 min. Uma vez ocorrida a estabilização da densidade ótica (OD), adicionou-se 5 µL, sucessivamente, das seguintes enzimas: hexocinase (1,5 U por reação), fosfoglicose isomerase (0,7 U por reação) e invertase (5 U por reação), após intervalo aproximado de 25 min entre cada aplicação. Para estimar a concentração dos açúcares, resultados expressos em µmol g<sup>-1</sup>, utilizou-se equação baseada na lei de Lambert-Beer: µmol NADPH = ΔOD/ (2,85\*6,22).

Os pigmentos fotossintéticos foram determinados como descrito por Porra et al. (1989).

#### Determinação do conteúdo de amido

A concentração de amido foi determinada como descrito previamente por Fernie et al. (2001). Aos tubos contendo o precipitado resultante da extração etanólica e o NaOH 0,1

M, foram adicionados 70  $\mu\text{L}$  de ácido acético 1 M para neutralização do extrato. Uma alíquota de 40  $\mu\text{L}$  da suspensão foi retirada e colocada em uma microplaca, a qual continha 60  $\mu\text{L}$  do mix de hidrólise do amido, composto pelas enzimas amiloglicosidase (0,14 unidades  $\mu\text{L}^{-1}$ ) e  $\alpha$ -amilase (0,01 U  $\mu\text{L}^{-1}$ ) ressuspensas em acetato de sódio 0,5 M pH 4,9. A microplaca foi vedada com fita de alumínio (3M Modelo 425<sup>®</sup>) e incubada por 1 h a 55 °C, com leve agitação. Posteriormente, 25  $\mu\text{L}$  do extrato hidrolisado foram transferidos para uma microplaca nova, que continha 160  $\mu\text{L}$  do meio de reação composto por tampão HEPES/KOH 1M pH 7,0 MgCl<sub>2</sub> 3 mM, ATP 118 mM, NADP<sup>+</sup> 48,4 mM e 56 unidades de desidrogenase da glicose-6-fosfato– G6PDH (0,7 unidades  $\mu\text{L}^{-1}$ ), por poço. Por meio de um leitor de microplacas (OptiMax Tunable Microplate Reader) foram lidas as absorvâncias das respectivas amostras a 340 nm, com 1 min de intervalo entre leituras. Uma vez estabilizado a OD, foi adicionado aos poços 2  $\mu\text{L}$  de hexocinase (2 unidades por reação). O conteúdo de amido foi então calculado de acordo com a equação Lambert-Beer e os resultados expressos em  $\mu\text{mol}$  de glicose por  $\text{g}^{-1}$  de massa seca (MS).

#### Extração de RNA, síntese de cDNA e análise de RT-qPCR

O RNA total foi isolado a partir de amostras da parte aérea e radicular de plântulas com e sem microenxertia dos acessos diploide LCT22 e poliploide LCT28 de *P. glomerata* após 45 dias de cultivo in vitro usando TRI Reagent<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) e tratado com DNase I (Thermo Scientific NanoDrop Technology, Wilmington, Delaware, USA) para remover contaminação do DNA genômico.

O cDNA foi sintetizado a partir de 500 ng de RNA total usando a enzima MMLV Transcriptase reversa, (Ludwig Biotec<sup>®</sup>, Alvorada, Brazil). Níveis de expressão do ecdisteroide 25-hidroxilase (“Phantom” - Cyp306a1) e citocromo P450 família 307

subfamília A (“Spook” - Cyp307a1) foram acessadas pelo RT-qPCR com gene de primers específicos. O RT-qPCR foi conduzido em um CFX96 Touch™ (BIO-RAD). O gene glicerol-3-fosfato desidrogenase (PgGAPDH) de *P. glomerata* foi usado como gene de referência interno com primers específicos. Os primers foram obtidos a partir do transcriptoma de *P. glomerata* (Batista et al., submetido). Os primers utilizados foram: GAPDH gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, primer direto (5'-GCCAGCCCTCAATGGTAAGT-3'), primer reverso (5'-CGGTGTAACCAAATGCCC-3'), e *P. glomerata* CYP306A1, ecdisteroides 25-hidroxilase [Phantom], primer direto (5'-GTCCTGGTGATGTTGGCCT-3'), primer reverso (5'-TGGGCATGGAATAGCACGTA-3'), e citocromo P450, família 307, subfamília A [Spook], primer direto (5'-GCGGTACGATGAAGGTCGAT-3'), primer reverso (5'-TCAACCCTAGCCACGTTTCC-3').

Os programas de PCR foram os seguintes: 2 min a 50 °C e 10 min a 90 °C, seguido por 40 ciclos de 16 s a 95 °C e 1 min a 60°C, e 15 s a 95 °C, 1 min a 60 °C, 30 s a 95 °C, e 15 s a 60 °C. Os níveis de transcrito foram determinados usando o método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak e Schmittgen 2001) com três réplicas biológicas e pelo menos três réplicas técnicas (reações), estando cada réplica técnica composta por uma reação de PCR.

#### Análise dos dados

Os dados provindos da expressão gênica foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA), com as médias comparadas pelo teste de Dunnett, com nível de significância de 5%.

As análises de crescimento, fisiológicas e bioquímicas foram analisadas pelo teste de variância ANOVA a 5% probabilidade e separação de médias pelo teste Tukey a 5% de significância utilizando o programa estatístico GENES (Cruz 2013).

## RESULTADOS

Aspectos do crescimento das plântulas microenxertadas de *Pfaffia glomerata*

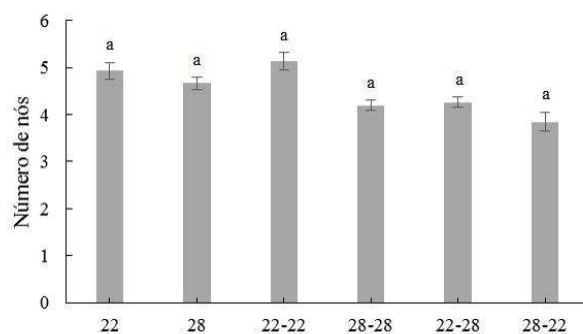
As microenxertias apresentaram diferenças na porcentagem de eficiência do estabelecimento da enxertia. Sendo que as autoenxertias dos acessos LCT22 e LCT28 apresentaram maior porcentagem de eficiência (Tabela 1).

**Tabela 1.** Eficiência do pegamento da microenxertia com combinações de acessos de *Pfaffia glomerata*

Tratamentos	Eficiência do pegamento (%)
22-22	90 a
28-28	90 a
28-22	64 a
22-28	48 a

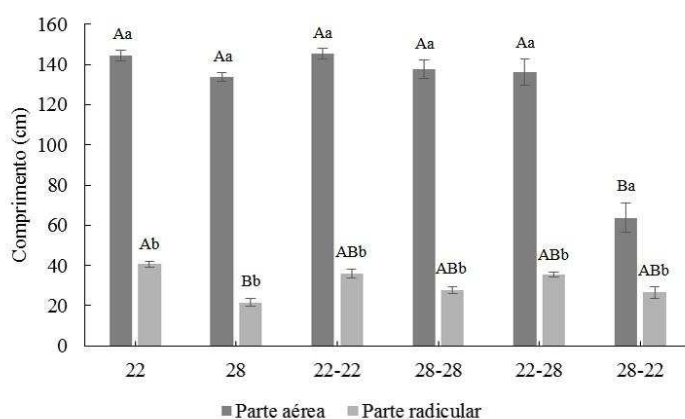
As médias seguidas de uma mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

O processo da microenxertia e a alteração das combinações do epibioto e hipobioto não influenciaram no número de nós das plântulas (Figura 1).



**Figura 1.** Número de nós dos acessos LCT22, LCT28 e das microenxertias (autoenxertias e recíprocas) de *Pfaffia glomerata* após 45 dias de cultivo in vitro. As médias seguidas de uma mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Por outro lado, quando o acesso poliploide LCT28 passou de hipobioto para epibioto, o comprimento da parte aérea diminuiu consideravelmente em comparação com os outros tratamentos (Figura 2).

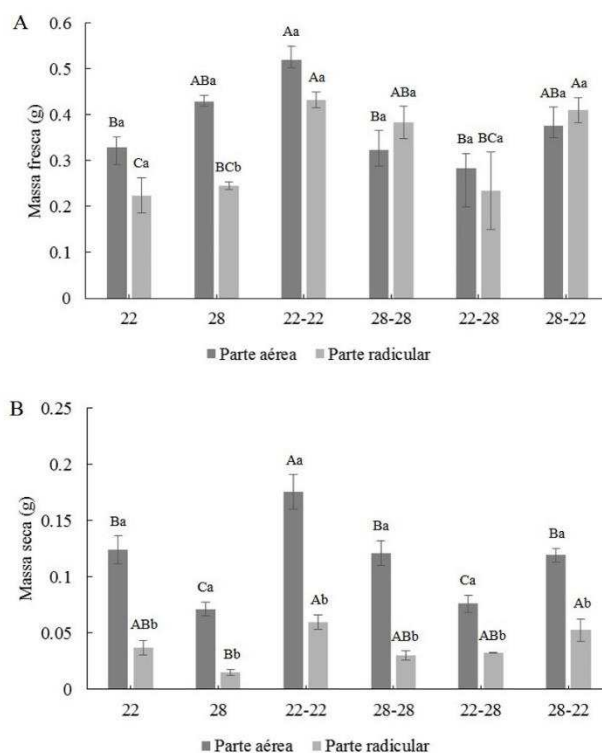


**Figura 2.** Comprimento das partes aérea e radicular dos acessos LCT22, LCT28 e das microenxertias (autoenxertias e recíprocas) de *Pfaffia glomerata* após 45 dias de cultivo in vitro. As médias seguidas de uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras minúsculas equivalem a diferenças entre as partes aérea e radicular e letras maiúsculas equivalem a diferenças entre os tratamentos.

A autoenxertia com o acesso LCT22 apresentou maior valor de massa fresca da parte aérea. Já em relação à massa fresca da parte radicular, as microenxertias com o acesso

LCT22 como hipobioto apresentaram maiores valores. Quando o acesso LCT28 foi usado como hipobioto observou-se diminuição da massa fresca da parte aérea (Figura 3A).

O maior valor de massa seca da parte aérea foi observado na autoenxertia do acesso LCT22. (Figura 3B).

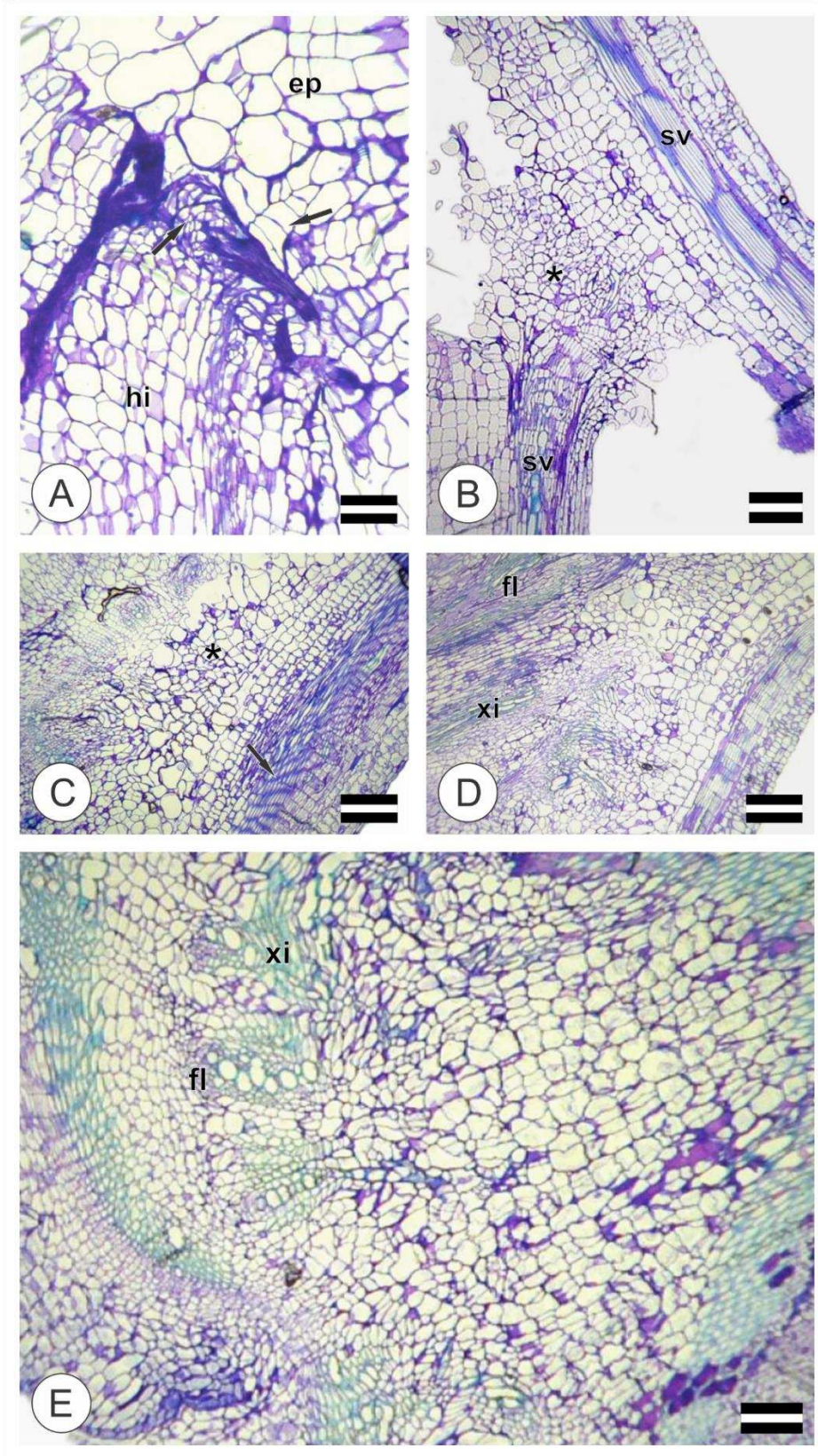


**Figura 3.** Massas fresca (A) e seca (B) das partes aérea e radicular dos acessos LCT22, LCT28 e das microenxertias (autoenxertias e recíprocas) de *Pfaffia glomerata* após 45 dias de cultivo in vitro. As médias seguidas de uma mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras minúsculas equivalem a diferenças entre as partes aérea e radicular e letras maiúsculas equivalem a diferenças entre os tratamentos.

#### Análise anatômica do desenvolvimento das regiões de instalação da microenxertia

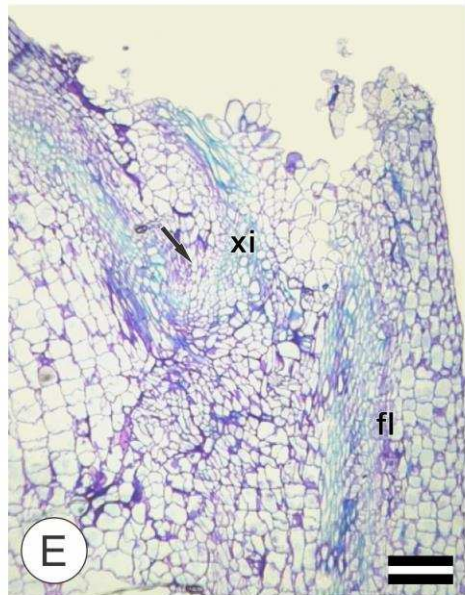
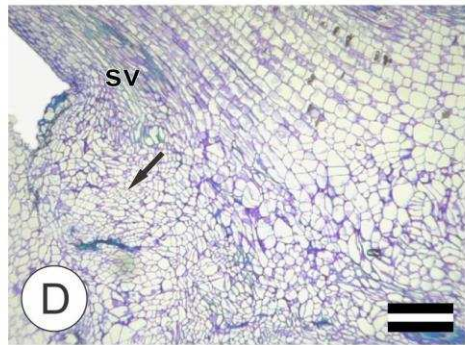
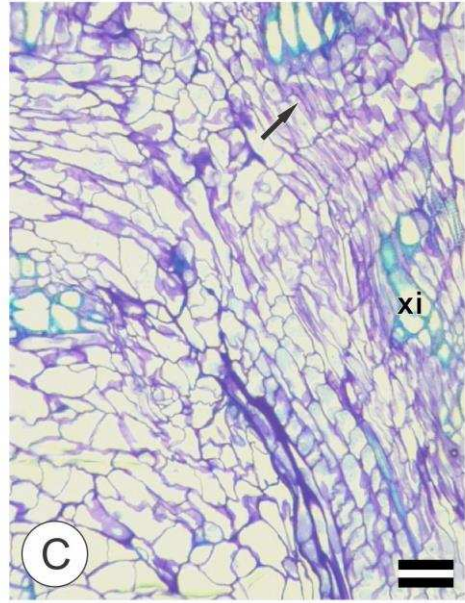
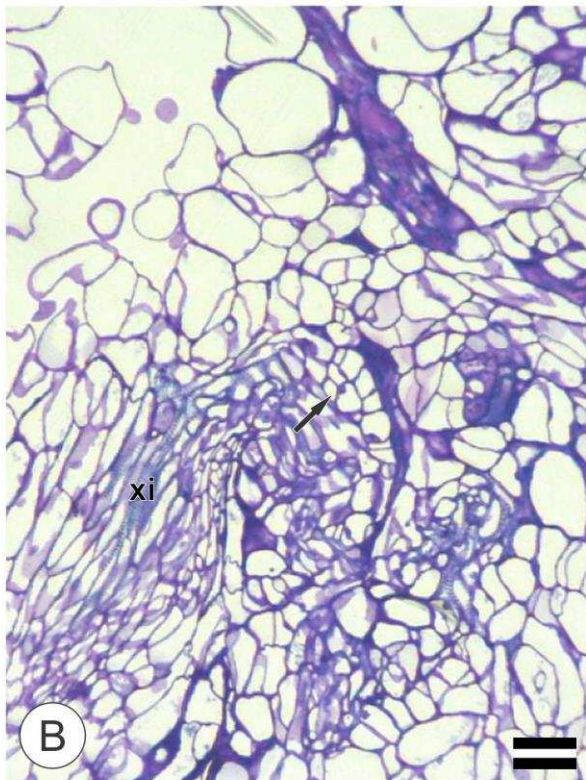
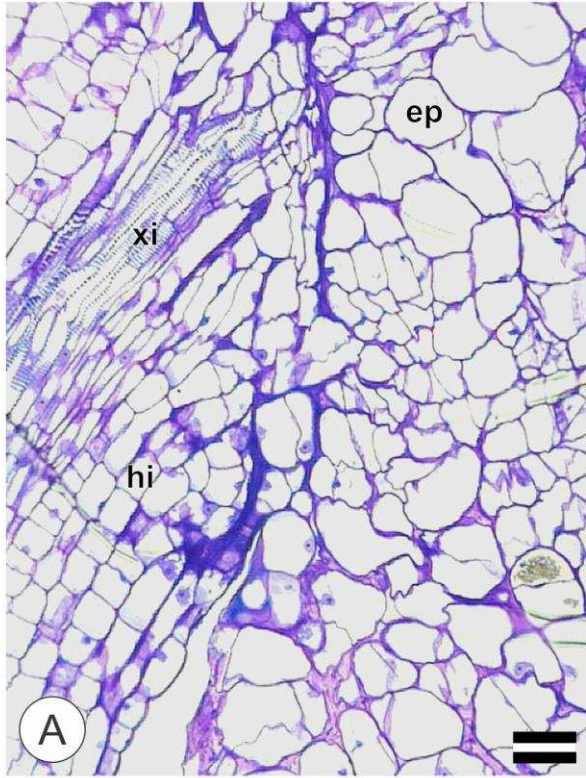
Após sete dias da realização da microenxertia na combinação 22-22, observou-se que o hipobioto estava conectado às bordas da incisão sendo notados alterações visíveis nos tecidos do epibioto e hipobioto (Figura 4A). Embora já estivessem conectados aos 14 dias, o contato entre o epibioto e o hipobioto não era uniforme, apresentando muitos

espaços vazios. Os resíduos das paredes celulares de células danificadas podiam ser vistos na superfície do epibioto, enquanto células arrançadas frouxamente foram observadas na superfície do hipobioto (Figura 4B). Aos 21 dias, a proliferação de células pode ser observada em algumas regiões do parênquima medular do epibioto, próximo a região da incisão (Figura 4C). Na mesma fase, na região de conexão observou-se inúmeras divisões celulares e a formação de células com formatos variados e arranjo desorganizado, o que favoreceu a união entre o epibioto e hipobioto. (Figura 4C). Aos 35 dias, o epibioto e hipobioto apresentaram-se consolidados e observou-se que o sistema vascular do epibioto foi direcionado para a região de contato (Figura 4D). Aos 45 dias, observou-se a diferenciação das células procambiais no parênquima do calo, tornando assim a região com continuidade de conexão vascular (Figura 4E).



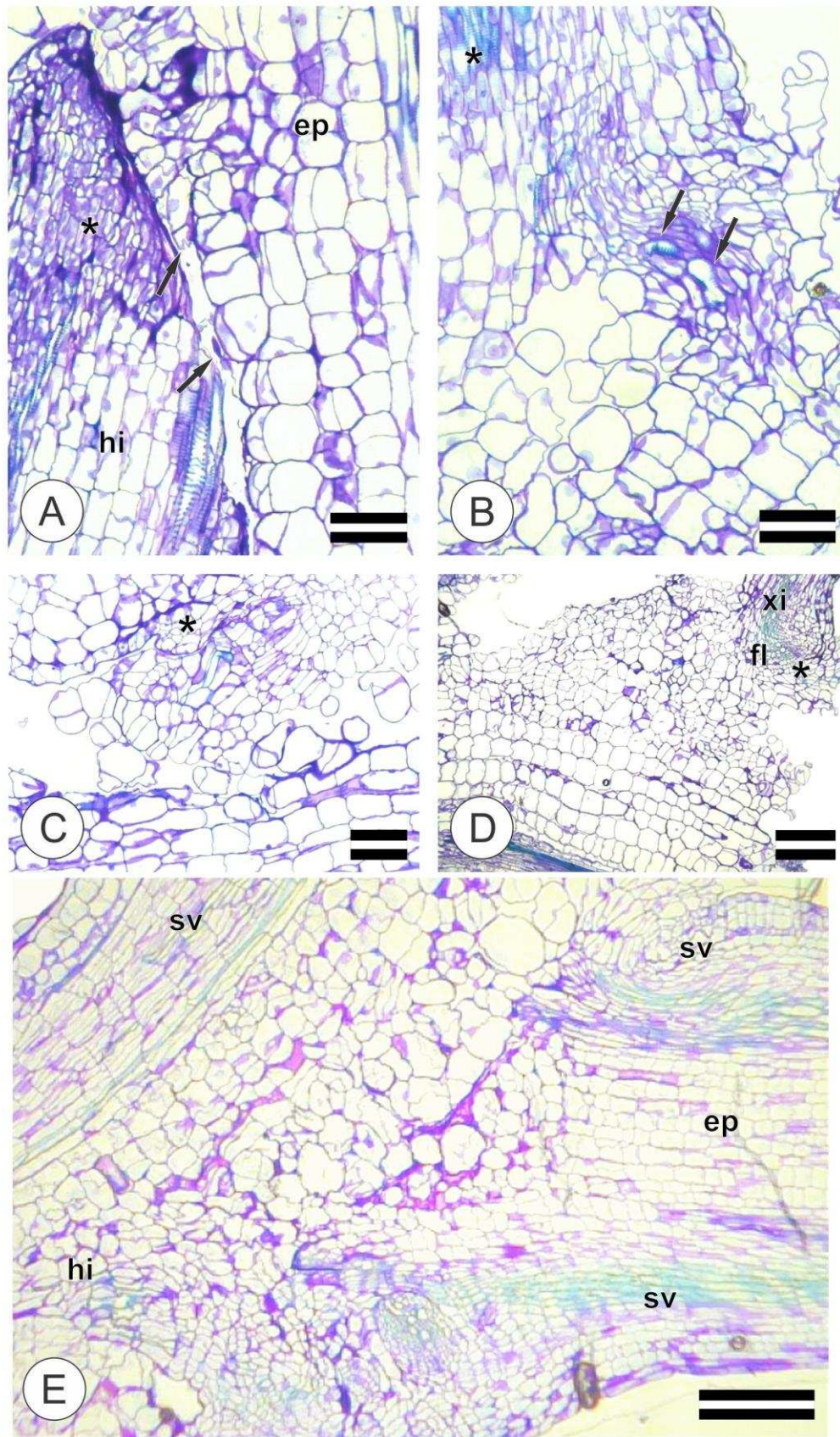
**Figura 4.** Microenxertias entre os acessos 22 (epibioto) e 22 (hipobioto). **A.** Aos 7 dias: epibioto e hipobioto aderidos. Presença de divisão celulares (setas) **B.** Aos 14 dias: resíduos das células danificadas e presença de células frouxamente arranjadas no hipobioto (asterisco). **C.** Aos 21 dias: proliferação celular no epibioto (seta) e presença de células de formatos variados e arranjo desorganizado (asterisco). **D.** Aos 35 dias: sistema vascular direcionados para a região de contato. **E.** Aos 45 dias: diferenciação das células procambiais no parênquima do calo. Abreviações: sv: sistema vascular; xi: xilema; fl: floema; ep: epibioto; hi: hipobioto. Barras: A: 10  $\mu\text{m}$ ; B, C e D: 30  $\mu\text{m}$ ; E= 15  $\mu\text{m}$ .

A autoenxertia do acesso LCT28, aos sete dias de cultivo, apresentou o sistema vascular do hipobioto direcionando-se à região de contato com o epibioto (Fig. 5A), ao passo que o epibioto apresentou células parenquimáticas medulares medula ainda organizadas (Fig. 5B). Aos 14 dias, a intensa proliferação de células pode ser observada em algumas regiões da conexão entre o epibioto e o hipobioto, onde observou-se traços do sistema vascular (Fig. 5C). Aos 21 dias (Fig. 5C), 35 dias (Fig. 5D) e 45 dias (Fig. 5E) o epibioto e hipobioto já apresentavam o sistema vascular conectados.



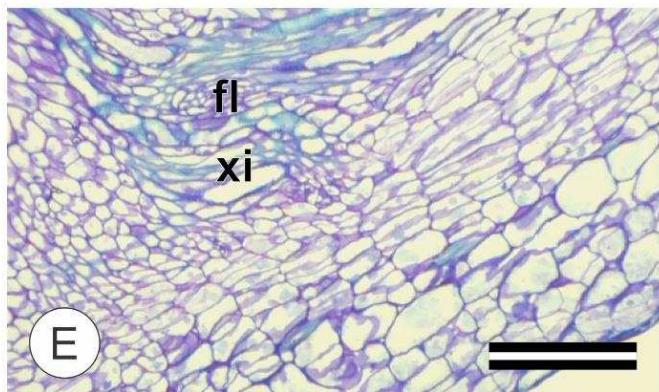
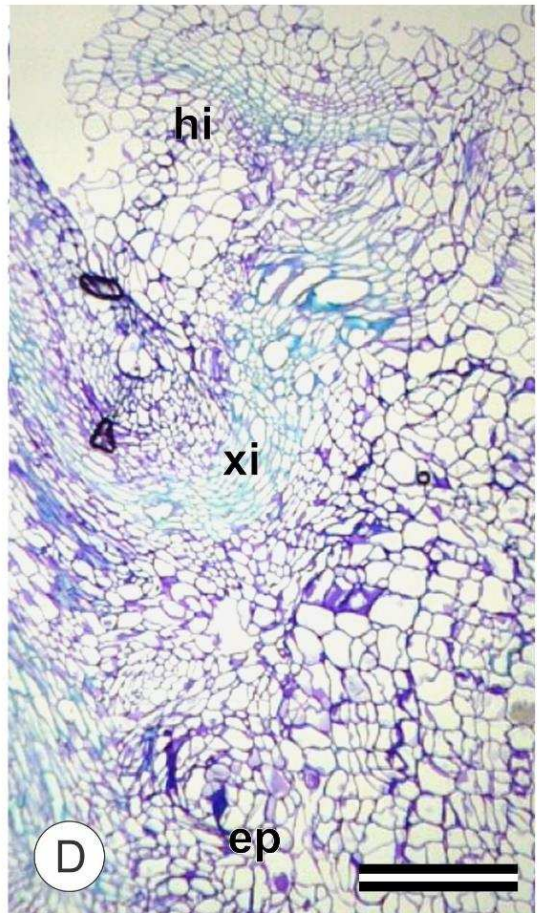
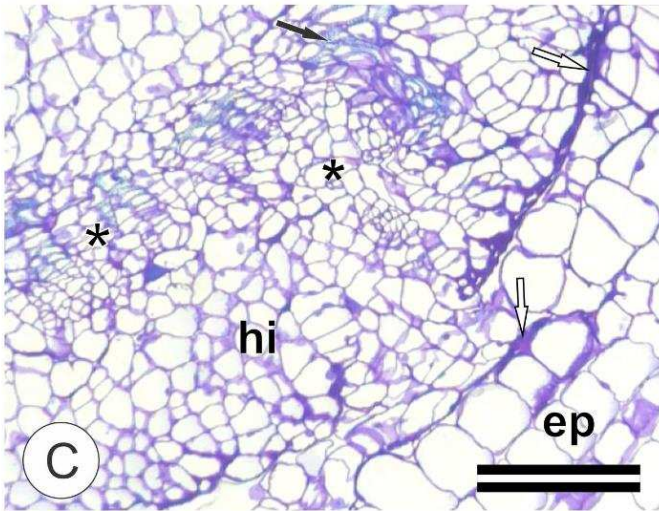
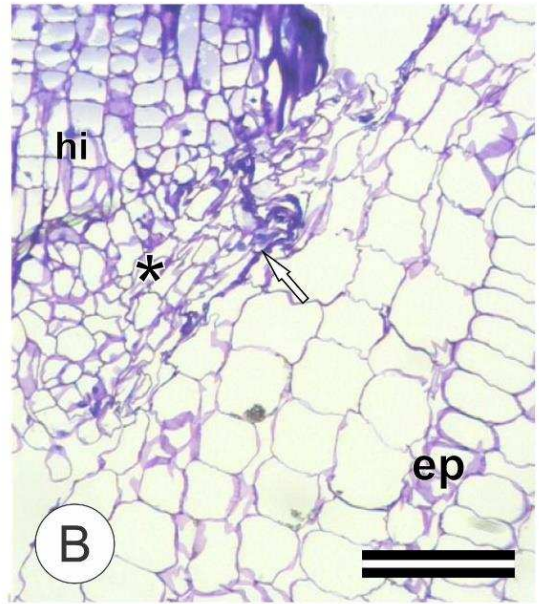
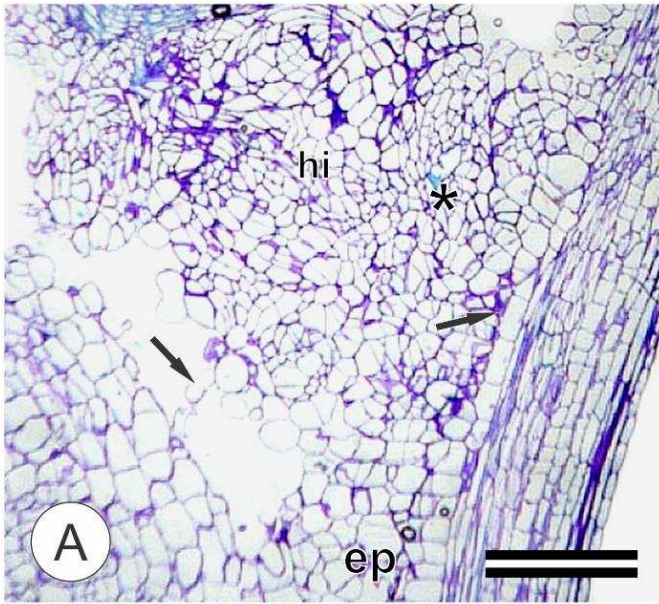
**Figura 5.** Microenxertias entre os acessos 28 (epibioto) e 28 (hipobioto). **A.** Aos 7 dias: sistema vascular direcionado do hipobioto para epibioto. **B.** Aos 14 dias: proliferação celular na região de contato (seta) aos **C.** 21, **D.** 35 e **E.** 45 dias: conexão do sistema vascular do epibioto e hipobioto (seta). Abreviações: sv: sistema vascular; xi: xilema; fl: floema; ep: epibioto; hi: hipobioto. Barras: A, B, C: 10  $\mu\text{m}$ ; D e E= 30  $\mu\text{m}$ .

Após sete dias da microenxertia na combinação 22-28, observou-se alterações nos tecidos do epibioto e hipobioto. No epibioto (LCT 22) foram observados os resíduos das paredes celulares de células danificadas, ao passo que no hipobioto (LCT 28) foram observadas a proliferação de células com organização irregular a partir do parênquima medular (Figura 6A). Aos 14 dias, observou-se que cordões procambiais estavam direcionados para a região de contato com o hipobioto. Este apresentava células diminutas com citoplasma denso e algumas células de protoxilema (Figura 6B). Aos 21 dias, a proliferação de células pode ser observada em algumas regiões no parênquima medular do epibioto, próximo da região da incisão (Figura 6C). Estas características também foram observadas aos 35 dias (Figura 6D). Aos 45 dias, observou-se que os tecidos do epibioto e hipobioto estavam unidos e que o sistema vascular do epibioto estava direcionado para os tecidos do hipobioto, mas ainda não havia conexão por meio do sistema vascular (Figura 6E).



**Figura 6.** Microenxertias entre os acessos 22 (epibioto) e 28 (hipobioto). **A.** Aos 7 dias: presença de resíduos de células danificadas (setas) e proliferação celular no hipobioto (asterisco) **B.** Aos 14 dias: presença de cordões cambiais direcionados para o hipobioto (asterisco) e protoxilema conectando ao enxerto (setas). **C.** Aos 21 dias e **D.** Aos 35 dias: proliferação celular no epibioto (asterisco) **E.** 45 dias: ausência de conexão vascular entre epibioto e hipobioto. Abreviações: sv: sistema vascular; xi: xilema; fl: floema; ep: epibioto; hi: hipobioto. Barras: A, B, C: 10  $\mu\text{m}$ ; D e E= 30  $\mu\text{m}$ .

Aos 7 (Figura 7A) e 14 (Figura 7B) dias de microenxertia do tratamento 28-22, observou-se que o hipobioto (LCT 22) apresentava alterações em seus tecidos com a formação de calo com células de formatos variados e paredes delgadas, próximo à região de contato com o epibioto (LCT 28) (Figura 7A), ao passo que o epibioto apresentou células parenquimáticas da medula ainda organizadas (Figura 7B). Aos 21 dias, nota-se intensa proliferação celular em algumas regiões no parênquima medular do epibioto e na região da incisão do hipobioto, assim os conectando (Figura 7C). Nesta fase, não foram observados traços vasculares nessa região. Aos 35 dias (Figura 7D) e 45 dias (Figura 7E), o epibioto e hipobioto apresentavam-se unidos e observou-se a conexão dos sistemas vasculares.

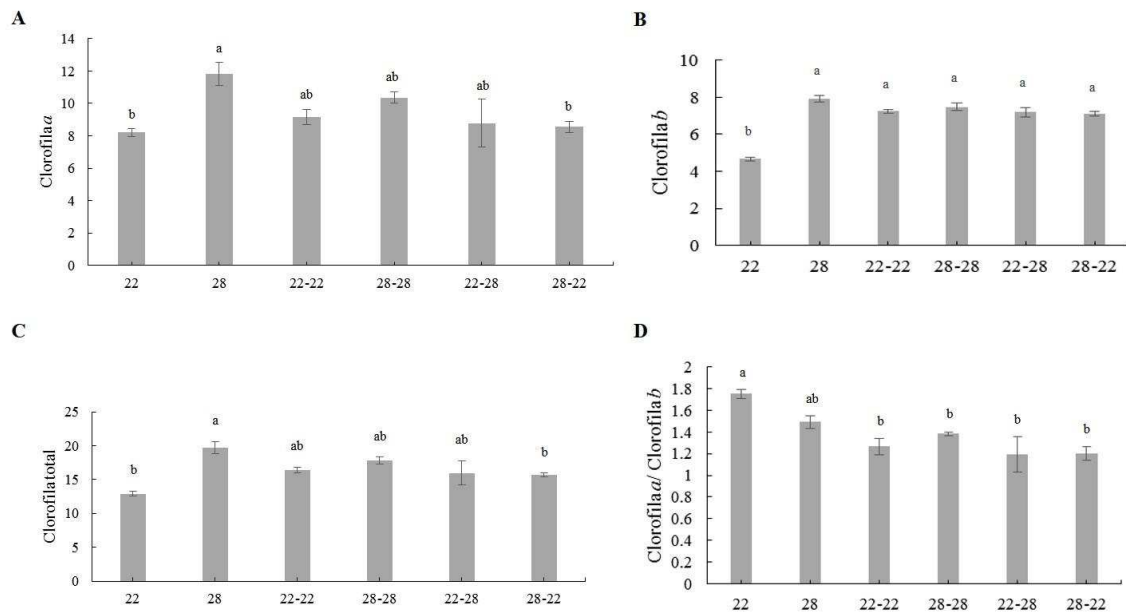


**Figura 7.** Microenxertias entre os acessos 28 (epibioto) e 22 (hipobioto). **A.** Aos 7 dias: inserção do epibioto 28 no hipobioto 22. Notar a proliferação de células no hipobioto (asterisco). Observar o espessamento das paredes celulares na zona de contato dos explantes (setas pretas). **B.** Aos 14 dias: zona de proliferação celular do epibioto (asterisco). Notar o espessamento das paredes celulares na zona de contato dos explantes (setas brancas). **C.** Aos 21 dias: diferenciação do sistema vascular na zona de proliferação do hipobioto (asterisco). Notar cordões cambiais (seta preta) e o espessamento das paredes celulares (setas brancas). **D.** Aos 35 dias: região de conexão entre os explantes. Notar que o sistema vascular se apresenta contínuo entre o epibioto e hipobioto. **E.** Aos 45 dias: detalhe do sistema vascular diferenciado conectando os explantes. Abreviações: hi: hipobioto; ep: epibioto; xi: xilema; fl: floema. Barras: A, D: 50 µm; B, E: 25 µm; C: 20 µm.

#### Variações no teor de clorofilas de plântulas microenxertadas

O acesso LCT28 sem enxertia apresentou o maior teor de clorofila a. Em contrapartida, o acesso LCT22 sem enxertia e a microenxertia 28-22 apresentaram menor teor de clorofila a (Figura 8A).

Em relação ao teor de clorofila b, o acesso LCT22 sem microenxertia apresentou menor valor em comparação aos demais tratamentos (Figura 8B). O acesso LCT22 sem microenxertia e a microenxertia 28-22 apresentaram menor valor de teor de clorofila (Chl) total (Figura 8C). A microenxertia influenciou negativamente na relação Chla/Chlb, em que os tratamentos sem microenxertia apresentaram maiores teores Chla do que Chlb. Já os tratamentos com microenxertia apresentaram um aumento no teor de Chlb (Figura 8D).



**Figura 8.** Teor de clorofilas *a* (A), *b* (B), total (C) e Chl*a*/Chl*b* (D) dos acessos LCT22, LCT28 e das microenxertias (autoenxertias e recíprocas) de *Pfaffia glomerata* após 45 dias de cultivo *in vitro*. As médias seguidas de uma mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

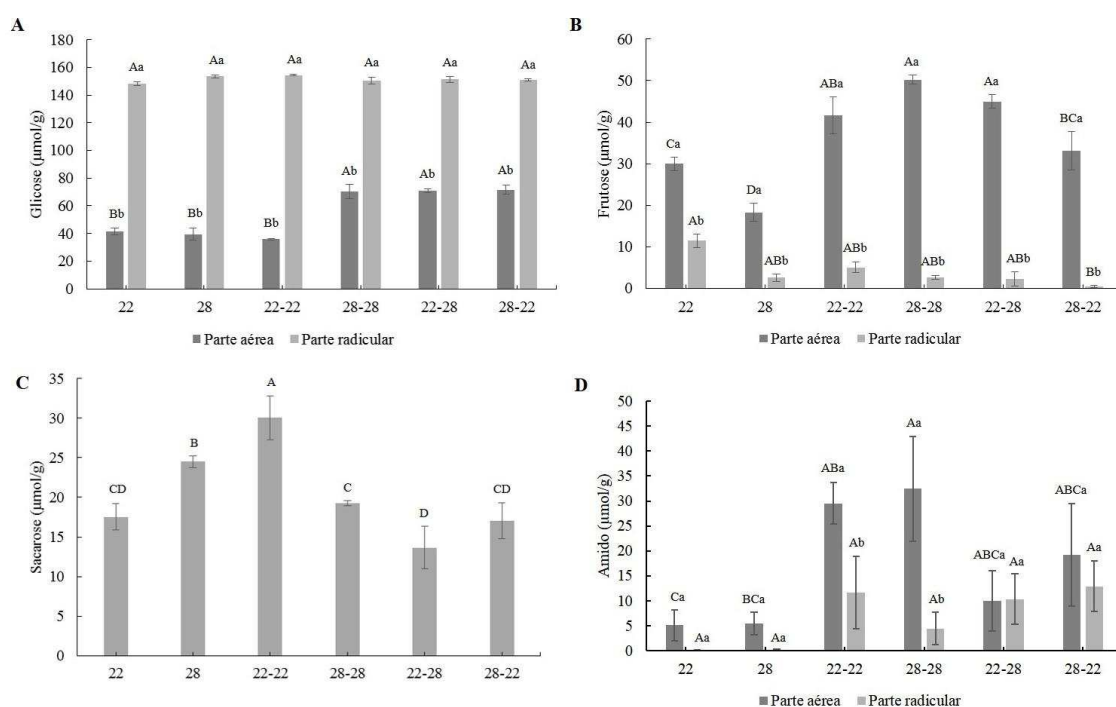
#### Análise dos teores de açúcares redutores e amido

Nas microenxertias que foram realizadas com o acesso LCT28, observou-se maior teor de glicose na parte aérea. Por outro lado, a microenxertia 22-22, acesso LCT22 e acesso LCT28 sem enxertia apresentaram menor teor de glicose na parte aérea. Já na parte radicular, observou-se altos teores de glicose em todos os tratamentos em comparação com a parte aérea dos mesmos (Figura 9A).

Entre os tratamentos, o acesso LCT28 sem enxertia apresentou menor teor de frutose. Em todos os tratamentos, a parte aérea apresentou maior teor de frutose do que a parte radicular (Figura 9B).

Dentro os tratamentos, a microenxertia 22-22 apresentou maior teor de sacarose na parte aérea. Já em relação a parte radicular, todos os tratamentos apresentaram valores imperceptíveis à análise de açúcares realizada neste trabalho (Figura 9C).

As autoenxertias 22-22 e 28-28 apresentaram maior teor de amido na parte aérea, em comparação entre os órgãos vegetais (Figura 9D).

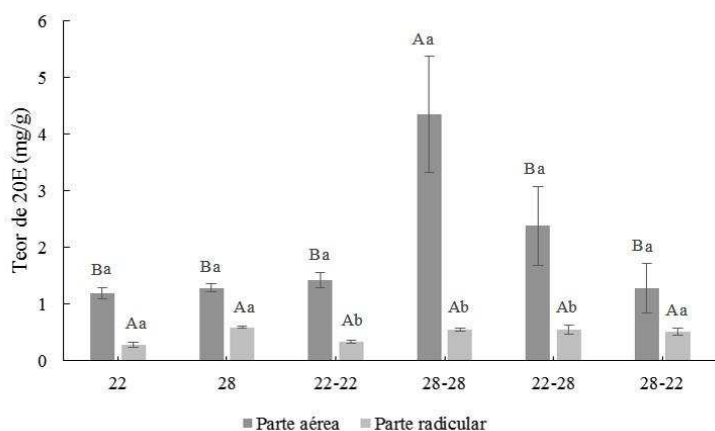


**Figura 9.** Teores de açúcares das partes aérea e radicular dos acessos LCT22, LCT28 e das microenxertias (autoenxertias e recíprocas) de *Pfaffia glomerata* após 45 dias de cultivo in vitro. **A.** Glicose; **B.** Frutose; **C.** Sacarose; **D.** Amido. As médias seguidas de uma mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras minúsculas na vertical equivalem as diferenças entre as partes aérea e radicular do mesmo tratamento e as letras maiúsculas na horizontal equivalem a diferenças entre os tratamentos.

Teor e expressão de genes envolvidos na rota da síntese de 20-hidroxicidisona

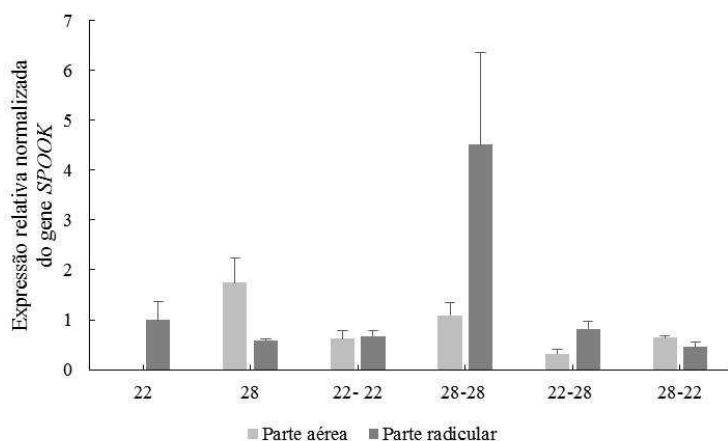
A microenxertia atuou positivamente na produção de 20-hidroxicidisona (20E), sendo que autoenxertia envolvendo o acesso LCT28 apresentou maior teor de 20E na parte

aérea. Não houve diferença estatística quando observada a produção de 20E pelas raízes (Figura 10).



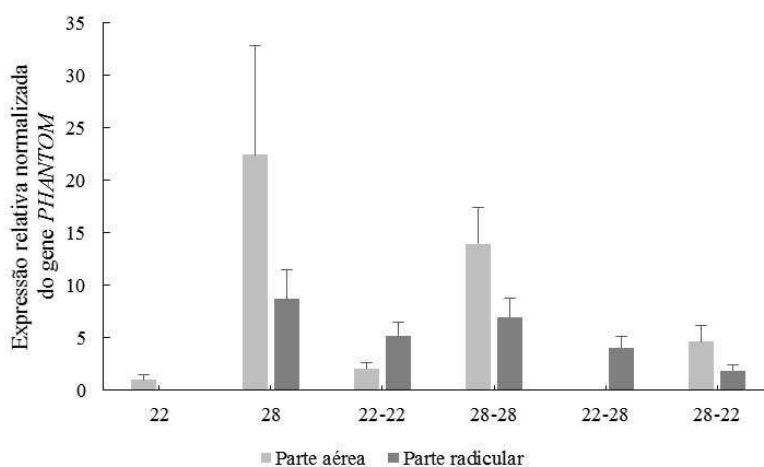
**Figura 10.** Teor de 20-hidroxiecdisona (20E) das partes aérea e radicular dos acessos controle e das microenxertias (autoenxertias e recíprocas) de *Pfaffia glomerata* aos 45 dias. As médias seguidas de uma mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras minúsculas na vertical equivalem a diferenças entre as partes aérea e radicular e letras maiúsculas na horizontal equivalem a diferenças entre os tratamentos.

Não houve diferença estatística na expressão do gene SPOOK entre tratamentos e entre os órgãos vegetais (Figura 11).



**Figura 11.** Expressão relativa normalizada do gene SPOOK das partes aérea e radicular dos acessos LCT22, LCT28 e das microenxertias (autoenxertias e recíprocas) de *Pfaffia glomerata* após 45 dias de cultivo *in vitro*. Utilizou-se o teste Durmett a 5% de significância.

Não houve diferença estatística na expressão do gene PHANTOM entre tratamentos e entre os órgãos vegetais (Figura 12).



**Figura 12.** Expressão relativa normalizada do gene PHANTOM das partes aérea e radicular dos acessos LCT22, LCT28 e das microenxertias (autoenxertias e recíprocas) de *Pfaffia glomerata* após 45 dias de cultivo in vitro. Utilizou-se o teste Durmett a 5% de significância.

## DISCUSSÃO

A microenxertia e ploidia dos acessos incrementaram o crescimento vegetal

A intensidade com que a enxertia promove o crescimento vegetativo depende das características dos epibiotos e hipobiotos (Ito 1992). O hipobioto interfere no desenvolvimento do epibioto de várias formas, afetando o desenvolvimento vegetativo, tolerância ao estresse, dentre outros (Lee et al. 2010; Gregory et al. 2013). O controle desta interferência é, possivelmente, realizada por meio de alterações dos sinais químicos da raiz para o caule e/ou vice versa (Gregory et al. 2013). Recentemente diversos estudos de sinalização à longa distância via enxertia evidenciaram vários tipos de sinais móveis, tais como hormônios (Sorce et al 2007; Etehadnia et al. 2008; Aloni et al. 2010; El-Sharkawy et al. 2012), proteínas (Corbesier et al. 2007), RNAs (Harada et al. 2010) e outros.

Os poliploides apresentam o início da brotação das gemas axilares tardiamente, quando comparadas aos diploides, o que leva ao desenvolvimento de plantas com menores estaturas (Notini 2013). Neste trabalho observou-se esse decréscimo na estatura das plantas quando ocorreu a inversão de hipobioto para epibioto, ou vice-versa do acesso poliploide LCT28, o que pode ser constatado no encurtamento dos nós das plântulas provindas da combinação 28-22 e, ainda, no atraso ou ausência de conexão vascular na combinação 22-28. Estes fatos podem ter relação também com incompatibilidade entre os acessos ou algum empecilho no transporte de nutrientes e água para a parte aérea (Khalafalla e Daffalla 2008), com isso prejudicando o desenvolvimento vegetativo das plântulas microenxertadas. A formação de conexões vasculares entre tecidos é um dos principais marcos do sucesso da enxertia, embora isso não garanta o sucesso a longo prazo. Uma falha na formação das conexões vasculares quase sempre levará a falha na enxertia (Aloni et al. 2010).

As alterações morfológicas e fisiológicas dos tecidos adjacentes para compensar e cicatrizar o “ferimento” (Melnyk 2017) acarreta mudanças no desenvolvimento vegetal (Mudge et al. 2009; Lee et al. 2010), como foi constatado com as autoenxertias dos acessos LCT22 e LCT28, onde observou-se incremento do desenvolvimento da parte aérea e radicular por meio do acréscimo de massa vegetal.

Corroborando as premissas de que poliploidização induz maior acúmulo de biomassa das partes vegetativas (Dhooghe et al. 2011), quando utilizou-se o acesso LCT28 como epibioto, apresentou-se o incremento da massa seca na parte aérea e radicular das plântulas microenxertadas.

## Alterações anatômicas na microenxertia

Inicialmente pode-se pensar que a camada de células danificadas seja uma reação de incompatibilidade entre as plantas utilizadas na microenxertia, ao contrário, é uma resposta ao ferimento realizado no tecido vegetal (Yeoman et al. 1978). Essa resposta atua como um mecanismo da planta para reduzir a perda de água e nutrientes e, ainda, uma barreira de resistência contra infecção por patógenos (Mo et al. 2017).

A presença do calo permite uma via de comunicação entre o epibioto e hipobioto e também uma região que proporcionará a conexão vascular (Mo et al. 2017). De acordo com Wang e Kollmann (1996), o calo não deve ser associado como uma reação de compatibilidade e sim como uma resposta passiva ao ferimento realizado por meio da técnica de microenxertia.

Em *Carya illinoensis*, a diferenciação dos elementos do tecido vascular e a conexão vascular ocorreu no intervalo de 20-30 dias do cultivo (Mo et al. 2017). Já nas microenxertias de fáfia observou-se uma variação grande nessas fases, sendo que o intervalo foi de 14 a 45 dias, dependendo do acesso utilizado.

Também observou-se diferenças, como a conexão vascular prematura aos 21 dias de cultivo da combinação 28-28, sendo que os demais tratamentos apresentaram tal conexão a partir dos 35 dias. Essa rapidez na conexão vascular pode ser devido o epibioto e hipobioto serem do mesmo acesso, a poliploidia que acarreta em maior taxa de desenvolvimento vegetal e o estresse causado à planta pela microenxertia, o que faz com que a planta acelere o seu metabolismo para compensar o estresse. Para a maioria dos pesquisadores a conexão vascular é o marco de sucesso da enxertia (Olmstead et al. 2006).

A microenxertia influenciou na redução da relação Cla/Clb

O teor de clorofilas não apresenta uma relação direta com a capacidade fotossintética, porém é um bom indicador do status do aparato fotossintético vegetal. Sendo assim, o seu decréscimo pode limitar a taxa fotossintética devido à diminuição da absorção de luz (Christensen et al. 2008). A autoenxertia atuou de forma antagonista nos diferentes acessos em relação ao teor de clorofila a, sendo que com o acesso LCT22 ocorreu um acréscimo, e com o acesso LCT28 tendeu a um decréscimo. Nas microenxertias variando os dois acessos observou-se menor teor de clorofila a quando o acesso LCT28 foi o epibioto. Já em relação ao teor de clorofila b, o acesso LCT22 sem microenxertia apresentou menor valor em comparação aos demais tratamentos. O acesso LCT22 sem microenxertia e a microenxertia 28-22 apresentou menor valor de teor de clorofila total. A microenxertia influenciou negativamente na relação Chla/Chlb, ou seja, os acessos LCT22 e LCT28 apresentaram maior teor de Chla do que Chlb. Já os tratamentos com microenxertia apresentaram aumento no teor de Chlb, indicado possivelmente que as plantas microenxertadas estão sob estresse, o que acarreta no aumento de exigência energética da planta. Com isso necessita-se de pigmentos acessórios, no caso a Chlb, para maior captação de energia luminosa, com intuito de compensar os gastos energéticos.

Diante disso, pode-se pressupor não só que a enxertia influenciou nos teores de clorofila a e b, mas também a ploidia de cada acesso de fáfia. Plântulas poliploides tendem a apresentar maior quantidade de clorofilas (Notini 2013) e dependendo da compatibilidade ou incompatibilidade entre as plântulas envolvidas na microenxertia pode ocorrer alterações nos parâmetros relacionados com o crescimento vegetal (Melnyk 2017). Uma vez que a redução de clorofilas é um dos principais fatores que afetam negativamente o

cultivo in vitro tradicional, o aumento no teor das mesmas facilita a interação das plântulas com a radiação luminosa incidente nas folhas e o estabelecimento de uma estrutura fotossintética mais eficiente que favoreça o desenvolvimento vegetal (Alvarez et al. 2012).

#### Acúmulo de açúcares solúveis e amido

Carboidratos são sintetizados nas folhas vegetais a partir da fotossíntese. Açúcares solúveis consistem primariamente de sacarose, glicose e frutose (Webb e Burley 1964). Elevados níveis de carboidratos e hormônios vegetais específicos são requeridos para a formação de calo (Hunter et al. 2004), mas poucos trabalhos descrevem a relação entre os dois (Phillips et al. 2015). O acúmulo de açúcares é um indicador de estresse, e com frequência interfere na resposta aos ajustes e reprogramação da planta (Ferreira 2017).

A sacarose é a principal fonte de carbono e energia, na qual a formação ocorre por meio de vários processos metabólicos (Xing et al. 2015). É sintetizada no citoplasma das células das folhas, onde é levada para o floema e transportada para os tecidos (Tognetti 2013). Os tratamentos LCT28 sem enxertia e a microenxertia 22-22 apresentaram maior teor de sacarose na parte aérea. Já em relação a parte radicular, todos os tratamentos apresentaram valores imperceptíveis à análise de sacarose realizada neste trabalho. Sacarose é um composto osmorregulatório bem caracterizado, no qual o acúmulo é observado em muitas plantas em resposta a estresse osmótico e hídrico (Gavaghan et al. 2011).

Nas microenxertias que foram realizadas com o acesso LCT28, observou-se maior teor de glicose na parte aérea. Por outro lado, a microenxertia 22-22, acesso LCT22 e acesso LCT28 apresentaram menor teor de glicose na parte aérea. Já na parte radicular,

observou-se altos teores de glicose em todos os tratamentos em comparação com a parte aérea dos mesmos. Sacarose e glicose estimulam proliferação celular, resultando em maior crescimento e eventualmente em diferenciação de tecidos (Roitsch e Gonzalez 2004).

Os tratamentos com microenxertia apresentaram maior teor de frutose na parte aérea do que os tratamentos sem enxertia. Em todos os tratamentos, a parte aérea apresentou maior teor de frutose do que a parte radicular. Os resultados do trabalho de Karimi (2017) indicaram uma correlação positiva entre teor de açúcares solúveis do epibioto e percentagem de sucesso da enxertia. Isto pode ser devido a função dos carboidratos na divisão celular na enxertia. Também resultados identificaram que não houve correlação entre teor de açúcares solúveis de hipobioto e sucesso de enxertia e mortalidade. (Yildiz et al. 2003; Karimi 2017).

Observou-se incremento do teor de amido nas partes aérea e radicular dos tratamentos com microenxertia, e os tratamentos sem enxertia apresentaram menores teores de amido tanto para parte aérea quanto radicular. Amido está diretamente envolvido na formação de calo e no crescimento vegetativo (Hunter et al. 2004). O hipobioto pode afetar o status hídrico, fotossíntese, o acúmulo de amido e massa seca do epibioto (Padgett-Johnson et al. 2000), e conseqüentemente influencia no crescimento vegetativo e na produtividade vegetal (Sabbatini e Howell 2013).

#### Incremento do teor de 20E

Os poliploides são bastante notáveis para plantas medicinais, em virtude de exibirem aumento da biomassa e da quantidade dos compostos de interesse farmacológicos (Gao et al. 1996). Como foi notado em poliploides de *Artemisia annua* (Jesus-Gonzalez e

Weathers 2003), *Panax ginseng* (Kim et al. 2004), *Centella asiatica* (Kaensaksiri et al. 2011) e *Pinellia ternate* (He et al. 2012). No trabalho realizado por Gomes et al. (2014), constatou-se teor elevado de 20-hidroxiecdisona nas plantas do acesso poliploide LCT28, o que indica o seu potencial em relação à produção do composto secundário de interesse nesse trabalho. No presente estudo observou-se um incremento discrepante do teor de 20E na parte aérea da autoenxertia do acesso poliploide LCT28. Por meio deste, podemos constatar que além da poliploidia influenciar no aumento do teor do princípio ativo de interesse, a microenxertia também atuou nesse incremento consideravelmente.

Em estudos realizados por Ferreira (2017) a infecção das raízes de plantas de *Pfaffia glomerata* com nematoides incrementou o teor de 20E, o que foi acompanhado pelo aumento e redução da expressão dos genes SPOOK e PHANTOM, respectivamente. Além disto, demonstrou-se que o acúmulo de 20E em algumas plantas como a fáfia pode ser induzido por ferimentos de insetos (Ferreira 2017) ou mecânicos, como observado no presente trabalho.

## **CONCLUSÃO**

De acordo com os resultados deste trabalho, a utilização da técnica de microenxertia induziu o aumento dos teores de açúcares solúveis, amido e clorofilas, sendo que estes influenciaram na obtenção de plantas autoenxertadas vigorosas e produtivas do acesso poliploide LCT28. Além disso, na parte aérea deste último, ocorreu o incremento do teor de 20E.

Diante dessas informações, faz-se necessário estudos relacionados com características morfoanatômicas iniciais e um perfil hormonal das plantas autoenxertadas

do acesso LCT28, com intuito de detalhar esse processo que demonstrou grande importância principalmente devido ao incremento do teor do 20E.

## REFERÊNCIAS

Aloni B, Cohen R, Karni L, Aktas H, Edelstein M (2010). Hormonal signaling in rootstock–scion interactions. **Sci Hortic**, 127(2):119–126.

Alvarez C, Sáez P, Sáez K, Sánchez-Olate M, Ríos D (2012) Effects of light and ventilation on physiological parameters during in vitro acclimatization of *Gevuina avellana* mol. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, 110: 93-101.

Araújo FP, Castro Neto MT (2002) Influência de fatores fisiológicos de plantas-matrizes e de épocas do ano no pegamento de diferentes métodos de enxertia do umbuzeiro. **Rev Bras Frut**, 24: 752-755.

Bakrim A, Maria A, Sayah F, Lafont R, Takvorian N (2008) Biosynthesis and regulation of phytoecdysteroids in spinach (*Spinacia oleracea* L.) **Plant Physiol Biochem**, 46: 844-854.

Bandeira FS, Xavier A, Otoni WC (2006) Enxertia in vitro na propagação de clones de *Eucalyptus urophylla* e *E. grandis*. **Pesq Agropec Bras**, 41:223-232.

Birnbaum KD, Sanchez Alvarado A (2008) Slicing across kingdoms: regeneration in plants and animals. **Cell**, 132(4):697–710.

Canals D, Irurre-Santilari J, Casas J (2005) The first cytochrome P450 in ferns. Evidence for its involvement in phytoecdysteroid biosynthesis in *Polypodium vulgare*. **FEBS J**, 272: 4817-4825.

Christensen B, Sriskandarajah S, Serek M, Renate Müller R (2008) In vitro culture of *Hibiscus rosa-sinensis* L.: Influence of iron, calcium and BAP on establishment and multiplication. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, 93: 151-161.

Corbesier L, Vincent C, Jang S, Fornara F, Fan Q, Searle I, (2007) FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. **Science**, 316: 1030–1033.

Corrêa Júnior C (2006) **Fáfia - O ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Sprengel) Pedersen)**: aspectos agronômicos e fitoquímicos. Curitiba: Clichetec, 22p.

Cruz CD (2013) GENES - software para análise de dados em estatística experimental e em genética quantitativa. **Acta Sci Agron**, 35 (3).

Dhooghe E, Laere KV, Eeckhaut T, Leus L, Huylenbroeck JV (2011) Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, 104: 359-373.

El-Sharkawy I, El Kayal W, Prasath D, Fernandez H, Bouzayen M, Svircev AM (2012) Identification and genetic characterization of a gibberellin 2-oxidase gene that controls tree stature and reproductive growth in plum. **J Exp Bot**, 63: 1225–1239.

Etehadnia M, Waterer D, De Jong H, Tanino KK (2008) Scion and rootstock effects on aba-mediated plant growth regulation and salt tolerance of acclimated and unacclimated potato genotypes. **J Plant Growth Regul**, 27: 125–140.

Féher A (2014) Somatic embryogenesis - stress-induced remodeling of plant cell fate. **Biochim Biophys Acta**, 1849(4):385-402.

Fernie AR, Roscher A, Ratcliffe RG, Kruger NJ (2001) Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate:fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. **Planta**, 212: 250–263.

Ferreira PRB (2017) **Metabolic profile, ultrastructure and gene expression of brazilian-ginseng [Pfaffia glomerata (Spreng.) Pedersen] under photoautotrophic growth and interaction with nematodes.** Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) Universidade Federal de Viçosa.

Festucci-Buselli RA, Contim LAS, Barbosa LCA, Stuart JJ, Otoni WC (2008) Biosynthesis and potential functions of the ecdysteroid 20-hydroxyecdysone – a review. **Botany**, 86: 978-987.

Flores R (2006) **Cultura de tecidos e produção de ecdisona em Pfaffia glomerata e Pfaffia tuberosa (Amaranthaceae).** Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade Federal de Santa Maria. Rio Grande do Sul.

Gao SL, Zhu DN, Cai ZH, Xu DR (1996) Autotetraploid plants from colchicine-treated bud culture of *Salvia miltiorrhiza* Bge. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, 47:73-77.

Gavaghan CL, Li JV, Hadfield ST, Hole S, Nicholson JK, Wilson ID, Howe PW, Stanley PD, Holmes E (2011) Application of NMR-based metabolomics to the investigation of salt stress in maize (*Zea mays*). **Phytochem Anal**, 22:214–224.

Goldschmidt EE (2014) Plantgrafting: new mechanisms, evolutionary implications. **Frontiersin**, 5:1.

Gomes SSL, Saldanha CW, Neves CS, Trevizani M, Raposo NRB, Notini MM, Santos MO, Campos JMS, Otoni WC, Viccini LF (2014) Karyotype, genome size, and in vitro chromosome doubling of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, 118:45–56.

Gregory PJ, Atkinson CJ, Bengough AG, Else MA, Fernandez-Fernandez F, Harrison RJ (2013) Contributions of roots and rootstocks to sustainable, intensified crop production. **J Exp Bot**, 64: 1209–1222.

- Harada T (2010) Grafting and RNA transport via phloem tissue in horticultural plants. **Sci Hortic-Amsterdam**, 125: 545–550.
- Hartmann HT, Kester DE, Daveis FT Jr, Geneve RL (1997) **Plant propagation-Principales and Practices**, 6th ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- He LY, Ding Z, Jiang F, Jin B, Li W, Ding X, Sun J, Lv G (2012) Induction and identification of hexadecaploid of *Pinellia ternate*. **Euphytica**, 186: 479-488.
- Hunter JJ, Volschenk CG, Le Roux DJ, Fouché GW, Adams L (2004) **The physiological and morphological quality of plant material**. ARC Infruitec-Nietvoorbij, Private Bag X5026, 7599 Stellenbosch, South Africa.
- Ikeuchi M, Sugimoto K, Iwase A (2013). Plant callus: mechanisms of induction and repression. **The Plant Cell**, 25(9):3159–3173.
- Işikalan Ç, Namli S, Akbas F, Erol B (2011) Micrografting of almond (*Amygdalus communis*) cultivar ‘Nonpareil’. **AJCS**, 5(1):61-65.
- Ito T (1992) Present state of transplant production practices in Japanese horticultural industry, p. 65–82. In: K. Kurata and T. Kozai (eds.). **Transplant production systems**. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Jesus-Gonzalez L, Weathers PJ (2003) Tetraploid *Artemisia annua* hairy roots produce more artemisinin than diploids. **Plant Cell Rep**, 21: 809-813.
- Kaensaksiri T, Soontornchainaksaeng P, Soonthornchareonnon N, Prathanturarug S (2011) In vitro induction of polyploidy in *Centella asiatica* (L.) Urban. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, 107: 187-194.
- Kamada T (2006) **Avaliação da diversidade genética de populações de fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] por RAPD, caracteres morfológicos e teor de  $\beta$ -ecdisona**. (Tese de Doutorado Genética e Melhoramento de Plantas). Universidade Federal de Viçosa.
- Karimi HR, Nowrozy M (2017) Effects of rootstock and scion on graft success and vegetative parameters of pomegranate. **Sci Hortic-Amsterdam**, 214:280–287.
- Karnovsky M J (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **J Cell Biol Plants**, 10: 188-204.
- Khalafalla MM, Daffalla HM (2008). In vitro micropropagation and micrografting of gum arabic tree (*Acacia senegal* (L.) Wild). **IJSCP**, 3:19–27.
- Kim YS, Hahn EJ, Murthy HN, Paek KY (2004) Effect of polyploidy induction on biomass and ginsenoside accumulations in adventitious roots of Ginseng. **J Plant Biol**, 47: 356-360.

- Kumari A, Kumar J, Kuma Ar, Chaudhury A, Singh SP (2015) Grafting Triggers Differential Responses between Scion and Rootstock. **PLOS ONE**, 13.
- Lafont R, Dauphin-Villemant C, Warren JT, Rees H (2005) Ecdysteroid chemistry and biochemistry. In: Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS (Eds) **Comprehensive Molecular Insect Science**, Elsevier, 125-195.
- Lee J, Kubotab C, Tsaoc SJ, Bied Z, Echevarriae PH, Morra L (2010) Current status of vegetable grafting: Diffusion, grafting techniques, automation. **Sci Hortic-Amsterdam**, 127: 93–105.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, 25(4):402-8.
- Lough TJ, Lucas WJ (2006) Integrative plant biology: role of phloem long-distance macromolecular trafficking. **Annu Rev Plant Biol**, 57, 203–232.
- Melnyk CW (2017) Plant grafting: insights into tissue regeneration. **Regeneration**, 4: 3–14.
- Mo Z, He H, Su W, Peng F (2017) Analysis of differentially accumulated proteins associated with graft union formation in pecan (*Carya illinoensis*). **Sci Hortic-Amsterdam**, 224:126–134.
- Montanari JR, Perecin MB (2006) Evaluation of morphological and agricultural characteristics and their phenotypic correlations in genotypes of a *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen population. **Rev Bras Pl Med**, 8:46-48.
- Mudge K, Janick J, Scofield S, Goldschmidt EE (2009) **A history of grafting**. Hoboken: John Wiley.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol Plant**, 15: 473-497.
- Noori SAS, Norouzi M, Karimzadeh G, Shirkoool K, Niazian M (2017) Effect of colchicine-induced polyploidy on morphological characteristics and essential oil composition of ajowan (*Trachyspermum ammi* L.). **Plant Cell Tiss Organ Cult**, 130(3):543-551.
- Notini MM (2013) **Influência das Condições de cultivo in vitro e ex vitro no crescimento e acúmulo de metabólitos secundários em plantas diploides e tetraploides de Pfaffia Glomerata (Spreng.) Pedersen**. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal). Universidade Federal de Viçosa.
- O'Brien TP, McCully ME (1981) **The study of plant structure principles and selected methods**. 1st edn. (Termarkarphi Pty: Melbourne) 14: 357.

Olmstead M, Lang NS, Ewers FW, Owens SA (2006) Xylem vessel anatomy of sweet cherries grafted onto dwarfing and nondwarfing rootstocks. **J Am Soc Hortic Sci**, 131 577–585.

Osborn TC, Pires JC, Birchler JA (2003) Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. **Trends Genet**, 19:141-147.

Padgett-Johnson M, Williams LE, Walker MA (2000) The influence of *Vitis riparia* rootstock on water relations and gas exchange of *Vitis vinifera* cv Carignane scion under non-irrigated conditions. **Amer J Enol Viticult**, 51:137–143.

Phillips N, Reynolds A, Di Profio F (2015) Nonstructural carbohydrate concentrations in dormant grapevine scionwood and rootstock impact propagation success and vine growth. **Horttechnology**, 25:4.

Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. **Biochim Biophys Acta**, 975: 384–394.

Richardson FVM, Mac Ant Saoir S, Harvey BMR (1996) A study of the graft union in in vitro micrografted apple. **Plant Growth Regul**, 20:17-23.

Roitsch T, González MC (2004) Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. **Trends Plant Sci**, 9(12).

Sabbatini P, Howell GS (2013) Rootstock scion interaction and effects on vine vigor, phenology, and cold hardiness of interspecific hybrid grape cultivars (*Vitis* spp.). **IJFS**, 13: 466-477.

Sachs T (1969) Polarity and the induction of organised vascular tissues. **Ann Bot**, 3:263–275.

Sorce C, Mariotti L, Lorenzi R, Massai R (2007) Hormonal factors involved in the control of vigour of grafted peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] trees and hybrid rootstocks. **Adv Hortic Science**, 21: 68–74.

Sugimoto K, Jiao Y, Meyerowitz EM (2010) Arabidopsis regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway. **Dev Cell**, 18(3):463–471.

Tognetti JA, Pontis HG, Martínez-Noël GMA (2013) Sucrose signaling in plants roseus. **Process Biochem**, 42:1566-70.

Turnbull CGN, Booker JP e Leyser HMO (2002) Micrografting techniques for testing long-distance signalling in Arabidopsis. **Plant J**, 32, 255–262.

Wang Y, Kollmann R. (1996) Vascular differentiation in the graft union of in vitro-grafts with different compatibility. Structural and functional aspects. **J Plant Physiol**, 147:521-33.

Webb KL, Burley WA (1964) Stachyose translocation in plants. **Plant Physiol**, 39:974-977.

Xing W, Li L, Gao P, Li H, Shao Q, Shu S, Sun J, Guo S (2015) Effects of grafting with pumpkin rootstock on carbohydrate metabolism in cucumber seedlings under Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> stress. **Plant Physiol Bioch**, 87:124-132.

Yeoman LC, Woolf LM, Taylor CW, Busch H (1978) **Nuclear antigens of tumor cell chromatin. In biological markers of neoplasia: basic and applied aspects** (Edited by Ruddon RW). pp. 409-418. Elsevier. New York.

Yildiz K, Yilmaz H, Balta F (2003) The effects of soluble sugars, total flavan and juglone concentration in walnut scions on graft survival. **J Am Pomol Soc**, 54:173–176.

Zakariyya F, Yuliasmara F (2015). Top grafting performance of some cocoa (*Theobroma cocoa* L.) clones as affected by scion budwood number. **CCRJ**, 31(3):163–174.

## CAPITULO 2

### **Efeito do paclobutrazol e sacarose sobre o teor de 20-hidroxiecdisona, expressão dos genes SPOOK e PHANTOM, sistema antioxidante e teor de açúcares de plântulas de *Pfaffia glomerata***

#### **RESUMO**

Paclobutrazol (PBZ) e sacarose são compostos que atuam efetivamente no acúmulo de biomassa e interferem na síntese de metabólitos secundários. Além disso são agentes que induzem a tuberização in vitro. Este processo ocorre quando há a repressão do desenvolvimento do sistema caulinar, o que aumenta a biomassa das raízes, culminando no estímulo do metabolismo secundário. O objetivo desse trabalho foi observar alterações na produção do metabólito secundário (20-hidroxiecdisona; 20E) e na expressão dos genes SPOOK e PHANTOM provindas do processo de tuberização in vitro induzido em plantas de *Pfaffia glomerata*. Os tratamentos influenciaram na redução do crescimento vegetal, acúmulo de biomassa na parte aérea e radicular. A concentração 8% de sacarose atuou como agente protetivo do estresse oxidativo, culminando na redução da atividade enzimática. O PBZ, associado com a sacarose, não aumentou o teor de 20E, porém alterou a modulação dos genes SPOOK e PHANTOM.

**Palavras-chave:** paclobutrazol, sacarose, citocromo P450, 20-hidroxiecdisona

## **ABSTRACT**

Paclobutrazol (PBZ) and sucrose are compounds that effectively act on the accumulation of biomass and interfere with the synthesis of secondary metabolites. In addition, they are agents that induce in vitro tuberization. This process occurs when there is repression of the development of the caulinar system, which increases the biomass of the roots, culminating in the stimulation of the secondary metabolism. The objective of this work was to observe changes in the production of the secondary metabolite (20-hydroxyecdysone; 20E) and the expression of the SPOOK and PHANTOM genes from the in vitro tuberization process induced in *Pfaffia glomerata* plants. The treatments influenced in the reduction of the plant growth, accumulation of biomass in the aerial and radicular part. Concentration 8% of sucrose acted as a protective agent of oxidative stress, culminating in the reduction of enzymatic activity. PBZ associated with sucrose did not increase the 20E content, but altered the SPOOK and PHANTOM gene modulation.

**Key words:** paclobutrazol, sucrose, cytochrome P450, 20-hydroxyecdysone

## INTRODUÇÃO

*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae) é popularmente conhecida como fáfia, ginseng brasileiro, dentre outros. O centro de coleta mais importante das espécies desse gênero é o Brasil (Corrêa Júnior et al. 2006). As raízes de fáfia são utilizadas na medicinal tradicional na prevenção e cura de várias doenças (Flores 2006).

*P. glomerata* produz e acumula fitoesteroides, como o estigmasterol, sitosterol, alantoína, ecdisteroides, triterpenoides e nortriterpenoides. Fitoecdisteroide é o maior grupo isolado em fáfia, e 20-hidroxiecdisona (20E) é o mais encontrado no gênero (Bakrim et al. 2008). Esses compostos apresentam utilidade agroquímica, biotecnológica medicinal e farmacêutica e estão envolvidos em processos bioquímicos e fisiológicos das plantas (Festucci-Buselli et al. 2008). É possível que 20E atue na defesa de plantas contra insetos fitófagos (Dinan et al. 2009). No entanto, sua via de biossíntese, bem como os fatores que nela interferem, ainda não estão claramente elucidados (Festucci-Buselli et al. 2008).

Vários estudos foram realizados com o intuito de aumentar o conteúdo de 20E e esclarecer sua rota de biossíntese em fáfia. Dentre eles encontra-se o trabalho de Saldanha et al. (2013), onde plantas foram submetidas a ambiente enriquecido com CO<sub>2</sub>, indução de poliploidização (Corrêa et al. 2016), e recentemente infecção de plantas por nematoides (Ferreira 2017).

Além desses estudos, outra possibilidade de aumentar o conteúdo de 20E e colaborar para esclarecimento dessa lacuna do conhecimento científico é a indução da tuberização *in vitro*. Entretanto, para que haja sucesso, a escolha do acesso a ser utilizado é fundamental. Desta forma, optou pela utilização do acesso LCT22, visto apresentar maior acúmulo de 20E nas raízes (Cruz 2011).

A indução de tuberização *in vitro* é uma via promissora para otimizar a produtividade de espécies medicinais, e atender a demanda da indústria farmacêutica (Ashraf et al. 2013). Várias espécies como *Solanum tuberosum*, *Plectranthus esculentus*, *Chlorophytum Borivilianum*, *Dioscorea alata* (Bazabakana et al. 2003; Allemann e Hammes 2006; Fogaça et al. 2010; Ashraf et al. 2013) são investigadas quanto ao processo de tuberização.

Vários fatores controlam a tuberização, como sacarose (Teixeira e Pinto 1991), reguladores de crescimento (Harvey et al. 1991; Pelacho e Mingo-Castel 1991; Leclerc et al. 1994), fotoperíodo (Ortiz-Montiel e Lozoya-Saldana 1987; Pelacho e Mingo-Castel 1991; Seabrook et al. 1993), luz (Slimmon et al. 1989) e componentes do meio de cultura (Teixeira e Pinto 1991). Neste trabalho a indução de tuberização *in vitro* foi realizada a partir da adição de concentrações distintas de sacarose e paclobutrazol ao meio de cultivo de plantas de *P. glomerata*.

A sacarose atua como fonte de carbono e agente osmótico (Liu et al. 2018). Em altas concentrações suprime o efeito inibitório do ácido giberélico (Aksenova et al. 2012) e atua como um sinal inicial da tuberização (Perl et al. 1991). Além disso, esse agente osmótico afeta o crescimento vegetal e a diferenciação celular, acarretando aumento de biomassa e mudanças profundas no formato das plantas (Tognetti et al. 2013; Liu et al. 2018). Alguns trabalhos indicaram a sacarose como sinal inicial de indução de vias relacionadas com a defesa das plantas e como fonte essencial de carbono para o metabolismo secundário (Berger et al. 2004; Bolton, 2009).

Os compostos triazois, como paclobutrazol, são fungicidas sistêmicos, que apresentam propriedades de reguladores de crescimento vegetal. São capazes de alterar o equilíbrio dos hormônios vegetais, incluindo giberelinas, ácido abscísico e citocininas

(Ribeiro et al. 2012). Esses compostos induzem uma variedade de respostas morfológicas e bioquímicas em plantas, incluindo inibição do alongamento caulinar, estímulo do desenvolvimento radicular e aumento da síntese de citocininas (Pinto et al. 2006). Com o aumento da biomassa vegetal, em plantas medicinais, o paclobutrazol induziu o aumento de vários metabólitos secundários como em *Catharanthus roseus* (Jaleel et al. 2007). A redução da síntese de giberelinas causada pela adição de paclobutrazol estimula o processo de tuberização (Simko 1994; Jackson e Prat 1996).

A identificação de metabólitos primários como glicose, frutose, sacarose e amido é uma abordagem interessante para compreender o metabolismo e a fisiologia vegetal envolvidos nas adaptações de plantas a diferentes ambientes (Guarnerio et al. 2012), uma vez que estes metabólitos influenciam no crescimento e metabolismo do vegetal.

O sistema antioxidante está envolvido na regulação do metabolismo dos radicais livres quando as plantas são expostas a experiências de estresses bióticos ou abióticos (Adição de PBZ e alta concentração de sacarose). Essa regulação pode ser investigada por meio das alterações nas mensurações das atividades das enzimas antioxidantes (Jaleel et al. 2007). Um dos mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo é o aumento das atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD) e ascorbato peroxidase (APX).

As enzimas do citocromo P450 (CYP) são codificadas pelos genes Halloween – spook (spo), phantom (phm), disembodied (dib), shadow (sad), e shade (shd), que catalisam uma série de passos de hidroxilações, resultando no hormônio ativo de muda, o 20E (Zhou et al. 2016). A relação da biossíntese de ecdisteroides envolvidos na muda dos insetos como nas plantas é uma ferramenta interessante para entender a regulação dessa rota biossintética

nas plantas (Festucci-Busceli et al. 2008), visto que a síntese de 20E foi observada em várias plantas (Lafont et al. 2005). Plantas de *Pfaffia glomerata* infectadas com nematoide apresentaram alto teor de 20E relacionado com a regulação dos genes SPOOK e PHANTOM (Ferreira 2017).

As hipóteses deste trabalho baseiam-se nas seguintes questões: Como o perfil de açúcares se comporta em plantas de fáfia cultivadas em meio de cultura com agentes indutores de tuberização *in vitro*? Como o sistema antioxidante se comporta em plantas de fáfia cultivadas em meio de cultura com agentes indutores de tuberização *in vitro*? Como é a expressão de genes SPOOK e PHANTOM na biossíntese de 20E de plantas de fáfia cultivadas em meio de cultura cultura com agentes indutores de tuberização *in vitro*?

Desse modo, o objetivo desse trabalho foi verificar se as concentrações de PBZ e sacarose adicionadas ao meio de cultivo de plantas de fáfia induziriam a tuberização *in vitro*, alterariam a produção do princípio ativo 20E e o comportamento da expressão dos genes SPOOK e PHANTOM.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### Material vegetal

Plantas do acesso LCT22 mantidas por subcultivos mensais heterotrófico foram transferidas para diferentes concentrações combinadas de Paclobutrazol (PBZ) x Sacarose [(0 e 0,6 mg L<sup>-1</sup>) x (3% e 8%)]. Quatro segmentos nodais (1 cm de comprimento) com folhas, foram inoculados em frascos (600 mL) contendo 120 mL de meio constituído pelos sais MS (Murashige e Skoog 1962), vitaminas MS (0,5 mg L<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 0,5 mg L<sup>-1</sup> de piridoxina, 0,1 mg L<sup>-1</sup> de tiamina e 2 mg L<sup>-1</sup> de glicina) 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol.

O meio de cultura foi ajustado para pH 5,7 e geleificado com 2,8 g L<sup>-1</sup> de fitagel, sendo posteriormente esterilizado por autoclavagem a 121 °C e 1,5 atm, durante 15 min. As culturas foram mantidas a 25 ± 2 °C sob irradiância de 150 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 h.

Ao final de 45 dias de cultivo foram retiradas amostras vegetais para a análise anatômica, teores de açúcares amido, clorofilas, 20E, enzimas do estresse oxidativo e expressão gênica.

Inicialmente foram realizados experimentos pilotos para estabelecer as concentrações viáveis. Diversas concentrações ocasionaram na redução extrema do crescimento ou morte das plantas, o que dificultou a coleta de massa vegetal suficiente para realização das análises pretendidas.

Diante disso, os tratamentos propostos foram: paclobutrazol (PBZ) x sacarose x região da planta [(0 e 0,6 mg L<sup>-1</sup>) x (3% e 8%) x (Parte aérea e radicular)]. Dispostos em delineamento inteiramente casualizado em arranjo trifatorial (2x2x2). A unidade experimental foi composta por quatro plantas por frasco e o experimento foi composto por 10 repetições/tratamento.

#### Avaliação do crescimento

Após 45 dias foram avaliados parâmetros do crescimento: número de nós, comprimento das partes aérea e radicular, massa fresca e seca das partes aérea e radicular.

#### Teor de 20E

As amostras foram preparadas a partir de 100 mg de material vegetal para 10 mL de metanol, as quais ficaram armazenadas em temperatura ambiente (25 ± 2 °C), durante

oito dias, sob agitação diária do extrato. Após esse período, os extratos foram centrifugados (15 min/5.000 rpm) e o sobrenadante coletado. O extrato metanólico, foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando as seguintes condições: equipamento da Shimadzu modelo LC-10AI, equipado com detector SPD-10AI, CBM-10A; coluna Bomdesil C 18 (5,0  $\mu\text{m}$  x 4,6 mm x 250 mm); a fase móvel foi composta por metanol-água na proporção 50:50 (v/v), com fluxo esperado de 1,2 mL  $\text{min}^{-1}$  e tempo de corrida da amostra de 15 min.

A curva de calibração foi obtida com padrão de 97% de pureza de  $\beta$ -ecdisona (Sigma Chem. Co., EUA), em concentrações de 5, 10, 20, 40, 80, 100 e 160 mg  $\text{L}^{-1}$  metanol, os quais foram injetados (20  $\mu\text{L}$ ). Os valores obtidos nos cromatogramas, correspondentes às concentrações das amostras-padrão, foram plotados no gráfico e obtido a equação para cálculo do teor de 20E dos indivíduos.

#### Determinação do teor de açúcares e de clorofilas

Amostras das partes aérea e radicular dos tratamentos foram coletadas no fim do dia (1 h antes do escurecer) e submetidas à extração etanólica determinando-se, na fração solúvel, os teores de glicose, frutose e sacarose segundo metodologia descrita por Fernie et al. (2001). Inicialmente, em cada microplaca, foram adicionados em cada poço 160  $\mu\text{L}$  do meio de reação (HEPES/KOH 100 mM com  $\text{MgCl}_2$  3 mM pH 7, ATP 118 mM,  $\text{NADP}^+$  48,4 mM, e 56 unidades de desidrogenase da glicose-6-fosfato - G6PDH (5 mg  $\text{mL}^{-1}$ )), 30  $\mu\text{L}$  do extrato e 20  $\mu\text{L}$  de etanol 80%. Por meio de um leitor de microplacas (OptiMax Tunable Microplate Reader) foram realizadas leituras das absorvâncias a 340 nm com intervalos entre leituras de 1 min. Uma vez ocorrida a estabilização da densidade ótica (OD), adicionou-se 5  $\mu\text{L}$ , sucessivamente, das seguintes enzimas: hexocinase (1,5 U por

reação), fosfoglicose isomerase (0,7 U por reação) e invertase (5 U por reação), após intervalo aproximado de 25 min entre cada aplicação. Para estimar a concentração dos açúcares, resultados expressos em  $\mu\text{mol g}^{-1}$ , utilizou-se a equação baseada na lei de Lambert-Beer:  $\mu\text{mol NADPH} = \Delta\text{OD} / (2,85 * 6,22)$ .

Os pigmentos fotossintéticos foram determinados de amostras da parte aérea de todos os tratamentos, como descrito por Porra et al. (1989).

#### Determinação do teor de amido

A concentração de amido foi determinada como descrito previamente por Fernie et al. (2001). Aos tubos contendo o precipitado resultante da extração etanólica e o NaOH 0,1 M, foram adicionados 70  $\mu\text{L}$  de ácido acético 1 M, para neutralização do extrato. Uma alíquota de 40  $\mu\text{L}$  da suspensão foi retirada e colocada em uma microplaca, a qual continha 60  $\mu\text{L}$  do mix de hidrólise do amido, composto pelas enzimas amiloglicosidase (0,14 unidades  $\mu\text{L}^{-1}$ ) e  $\alpha$ -amilase (0,01 U  $\mu\text{L}^{-1}$ ) ressuspendidas em acetato de sódio 0,5 M pH 4,9. A microplaca foi vedada com fita de alumínio (3M Modelo 425<sup>®</sup>) e incubada por 1 h a 55 °C, com leve agitação. Posteriormente, 25  $\mu\text{L}$  do extrato hidrolisado foram transferidos para uma microplaca nova, que continha 160  $\mu\text{L}$  do meio de reação composto por tampão Hepes/KOH 1M pH 7,0 MgCl<sub>2</sub> 3 mM, ATP 118 mM, NADP<sup>+</sup> 48,4 mM e 56 unidades de desidrogenase da glicose-6-fosfato– G6PDH (0,7 unidades  $\mu\text{L}^{-1}$ ), por poço. Por meio de um leitor de microplacas (OptiMax Tunable Microplate Reader) foram lidas as absorvâncias das respectivas amostras a 340 nm, com 1 min de intervalo entre as leituras. Uma vez estabilizado a OD, foi adicionado aos poços 2  $\mu\text{L}$  de hexocinase (2 unidades por reação). O conteúdo de amido foi então calculado de acordo com a equação Lambert-Beer e os resultados expressos em  $\mu\text{mol}$  de glicose por  $\text{g}^{-1}$  de massa seca (MS).

## Enzimas do estresse oxidativo

Foi quantificada a atividade das enzimas peroxidase, ascorbato peroxidase, catalase e superóxido dismutase. Para isso, foram adicionados 100 mg de parte aérea e parte radicular de cada tratamento, maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas, 2 mL de tampão de extração (Tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8; EDTA 0,1 mM; fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 1 mM; polivinilpolipirrolidona (PVPP) 1%) com posterior centrifugação a 12.000 g, por 15 min. O sobrenadante obtido foi utilizado como extrato bruto na determinação das atividades enzimáticas. Todas as etapas necessárias ao processo de extração foram conduzidas à 4°C.

**Peroxidase (POX):** A atividade da POX foi determinada pela adição de 0,1 mL do extrato enzimático bruto a 4,9 mL de meio de reação (tampão fosfato de potássio 50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 6,8, pirogalol 20 mmol L<sup>-1</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 mmol L<sup>-1</sup> (Kar e Mishra, 1976). A produção de purpurogalina foi determinada pelo aumento da absorvância durante o primeiro minuto de reação a 420 nm, a 25°C. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,47 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Chance e Maehley, 1955) e expressa em μmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína.

**Ascorbato peroxidase (APX):** A atividade da APX foi determinada de acordo com o método de Nakano e Asada (1981), modificado por Koshiba (1993). Alíquota de 100 μL do extrato enzimático foi adicionada a 2,9 mL de meio de reação (tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, ácido ascórbico 0,8 mM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM). O decréscimo na absorvância a 290 nm, a 25°C, foi medido durante o primeiro minuto de reação, sendo, a atividade da APX determinada com base na inclinação da reta nos primeiros segundos, após o início da reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de

extinção molar de  $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Nakano e Asada 1981) e o resultado expresso em  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  proteína.

Catalase (CAT): A atividade da CAT foi determinada pela adição de 0,1 mL do extrato enzimático bruto a 2,9 mL de meio de reação (tampão fosfato de potássio  $50 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7,0 e  $\text{H}_2\text{O}_2$   $12,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ) (Havir e Mchale, 1987). O decréscimo na absorvância, no primeiro minuto de reação, foi medido a 240 nm a  $25^\circ\text{C}$ . A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de  $36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Anderson et al. 1995) e expresso em  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  proteína.

Superóxido dismutase (SOD): A atividade da SOD foi determinada pela adição de 50  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático bruto a 5 mL de meio de reação (tampão fosfato de sódio  $50 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7,8, contendo metionina  $13 \text{ mmol L}^{-1}$ , azul de p-nitro tetrazólio (NBT)  $75 \mu\text{mol L}^{-1}$ , EDTA  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$  e riboflavina  $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). A reação foi conduzida a  $25^\circ\text{C}$ , numa câmara de reação sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W, mantida no interior de uma caixa coberta com papel alumínio. Após 5 min de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul, produzida pela fotorredução do NBT, foi medida pela absorvância a 560 nm. A absorvância a 560 nm de um meio de reação exatamente igual ao anterior, mantido no escuro por igual período, serviu de branco e foi subtraído da leitura das amostras que receberam iluminação (Giannopolitis e Ries 1977). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (Beauchamp e Fridovich 1971).

#### Extração de RNA, síntese de cDNA e análise de RT-qPCR

Aos 45 dias de cultivo, o RNA total foi isolado a partir de amostras das partes aérea e radicular de plântulas de *P. glomerata* de todos os tratamentos já descritos acima, usando

TRI Reagent<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) e tratado com DNase I (Thermo Scientific NanoDrop Technology, Wilmington, Delaware, USA) para remover contaminação do DNA genômico.

O cDNA foi sintetizado a partir de 500 ng de RNA total usando a enzima MMLV Transcriptase reversa, (Ludwig Biotec<sup>®</sup>, Alvorada, Brazil). Níveis de expressão do ecdisteroide 25-hidroxilase (“Phantom” - Cyp306a1) e citocromo P450 família 307 subfamília A (“Spook” - Cyp307a1) foram acessados pelo RT-qPCR com gene de primers específicos. RT-qPCR foi conduzido em CFX96 Touch<sup>™</sup> (BIO-RAD). O gene glicerol-3-fosfato desidrogenase (PgGAPDH) de *Pfaffia glomerata* foi usado com um gene de referência interno com primers específicos. Os primers foram obtidos a partir do transcriptoma de *P. glomerata* (Batista et al., submetido).

Os primers foram obtidos a partir do transcriptoma de *P. glomerata* (em preparação). Os primers utilizados foram: GAPDH gliceraldeido 3-fosfato desidrogenase, primer direto (5'-GCCAGCCCTCAATGGTAAGT-3'), primer reverso (5'-CGGTGTAACCAAAATGCCC-3'), e *P. glomerata* CYP306A1, ecdisteroide 25-hidroxilase [Phantom], primer direto (5'-GTCCTGGTGATGTTGGCCT-3'), primer reverso (5'-TGGGCATGGAATAGCACGTA-3'), e citocromo P450, família 307, subfamília A [Spook], primer direto (5'-GCGGTACGATGAAGGTCGAT-3'), primer reverso (5'-TCAACCCTAGCCACGTTTCC-3').

Os programas de PCR foram os seguintes: 2 min a 50 °C e 10 min a 90 °C, seguido por 40 ciclos de 16 s a 95 °C e 1 min a 60°C, e 15 s a 95 °C, 1 min a 60 °C, 30 s a 95 °C, e 15 s a 60 °C. Os níveis de transcrito foram determinados usando o método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak e Schmittgen 2001) com três réplicas biológicas e pelo menos três réplicas técnicas (reações), estando cada réplica técnica composta por uma reação de PCR.

## Análise dos dados

Os dados provindos da expressão gênica foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA), com as médias comparadas pelo teste de Dunnett, com nível de significância de 5%.

As análises de crescimento, fisiológicas e bioquímicas foram analisadas pelo teste de variância ANOVA a 5% de probabilidade e separação de médias pelo teste Tukey a 5% de significância utilizando o programa estatístico GENES (Cruz 2013).

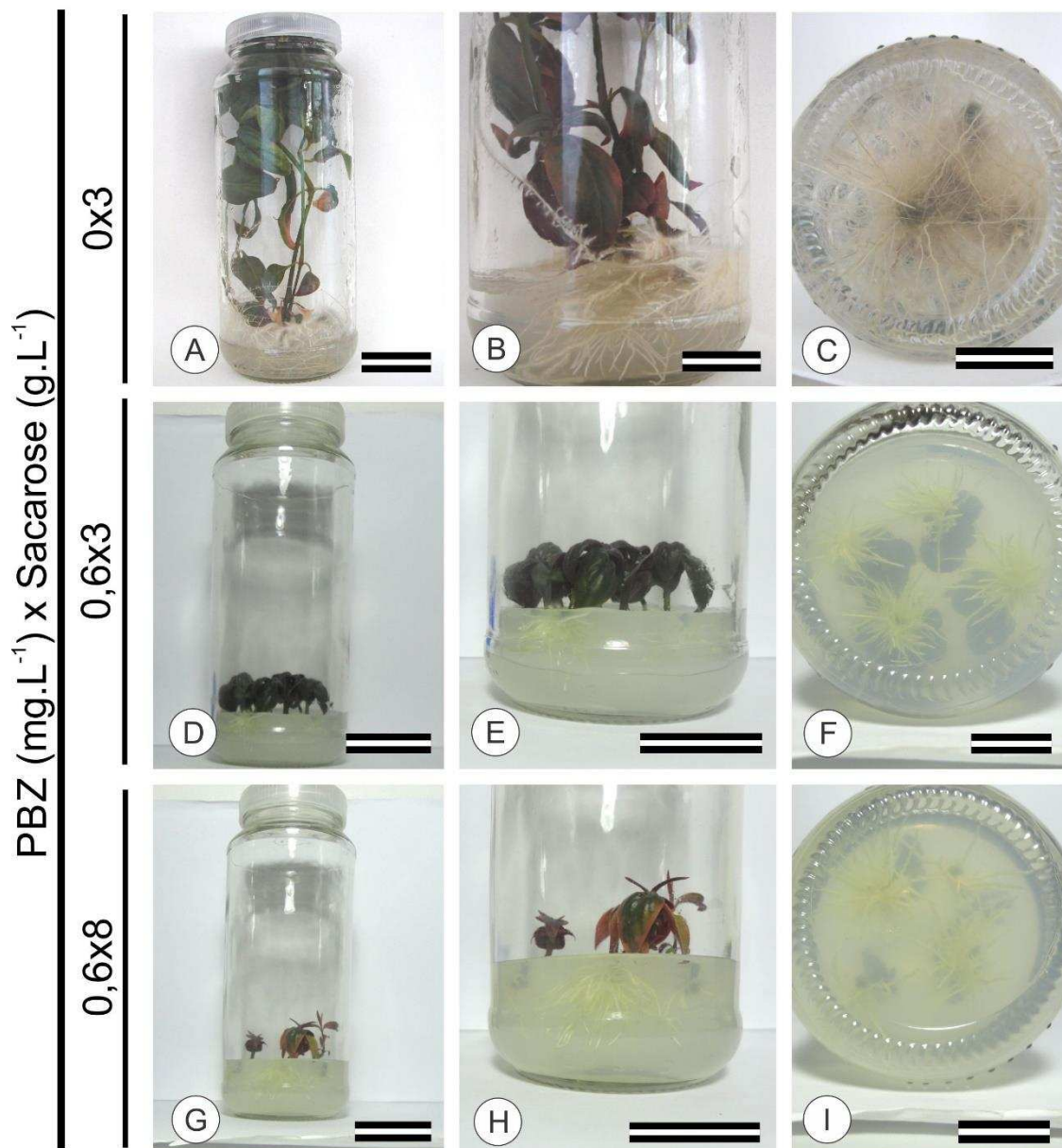
## RESULTADOS

### Aspectos morfológicos e de crescimento

No tratamento controle (0x3), as plântulas apresentaram crescimento normal tanto da parte aérea quanto radicular (Figura 1A). Presença de folhas grandes e expandidas e com raízes finas e longas (Figura 1B e Figura 1C).

Por outro lado, no tratamento com acréscimo de PBZ (0,6x3) observou-se plântulas com redução do crescimento da parte aérea e radicular (Figura 1D). Presença de folhas pequenas, mais espessas, coloração verde escuro, formato cordiforme e redução considerável do tamanho dos nós (Figura 1E). Raízes mais curtas, porém mais espessas (Figura 1F).

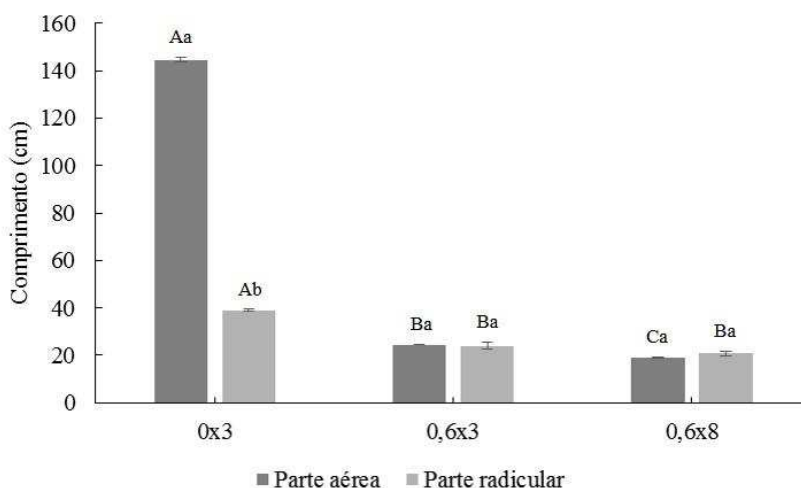
No tratamento com acréscimo de 8% de sacarose (0,6x8) apresentou também prejuízo no crescimento vegetal (Figura 1G). Presença de folhas pequenas, mais espessas, coloração verde escuro a amarelada, formato cordiforme e redução considerável do tamanho dos nós (Figura 1H). Raízes mais curtas, porém mais espessas (Figura 1I).



**Figura 1.** Efeito das concentrações de PBZ e sacarose sobre explantes de *Pffafia glomerata* após 45 dias de cultivo in vitro. **A-C.** Explantes cultivados sem PBZ + sacarose 3%. **D-F.** Explantes cultivados em 0,6 mg/L PBZ + sacarose 3%. **G-I.** Explantes cultivados em 0,6 mg L<sup>-1</sup> PBZ + sacarose 8%. Barras: A: 5 cm; B-C: 2,5 cm; D-H: 4,5 cm.

## Aspectos do crescimento das plantas de *Pfaffia glomerata* expostas a PBZ x Sacarose

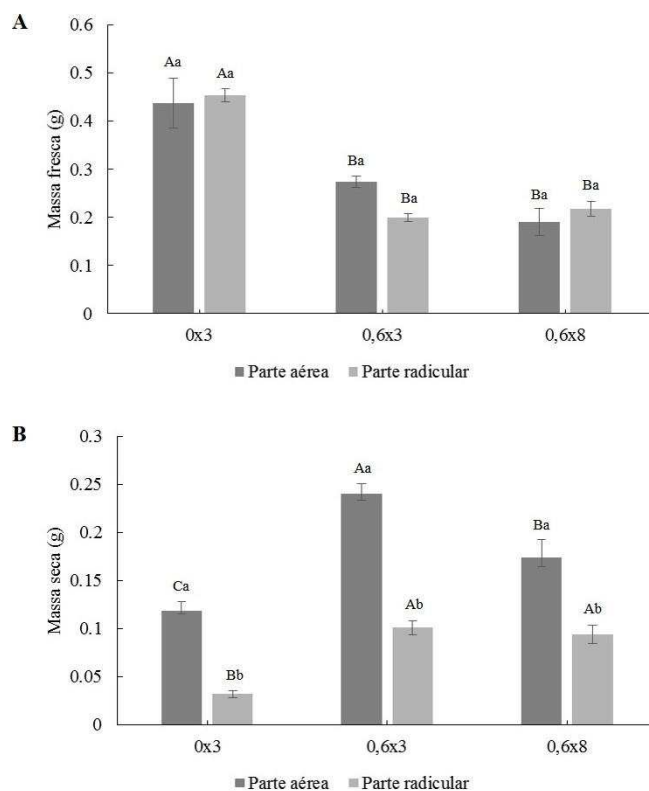
O tratamento 0x3 apresentou maiores valores para o comprimento da parte aérea e radicular. Observou-se também que a adição de PBZ e o aumento da sacarose atuaram na diminuição dos comprimentos da parte aérea e radicular (Figura 2).



**Figura 2.** Comprimento das partes aérea e radicular da plantas de fáfia expostas a concentrações de PBZ e sacarose após 45 dias de cultivo in vitro. As médias seguidas de uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras minúsculas equivalem a diferenças entre as partes aérea e radicular e letras maiúsculas equivalem a diferenças entre os tratamentos.

Os maiores valores para massa fresca da parte aérea e radicular foram do tratamento 0x3 (Figura 3A).

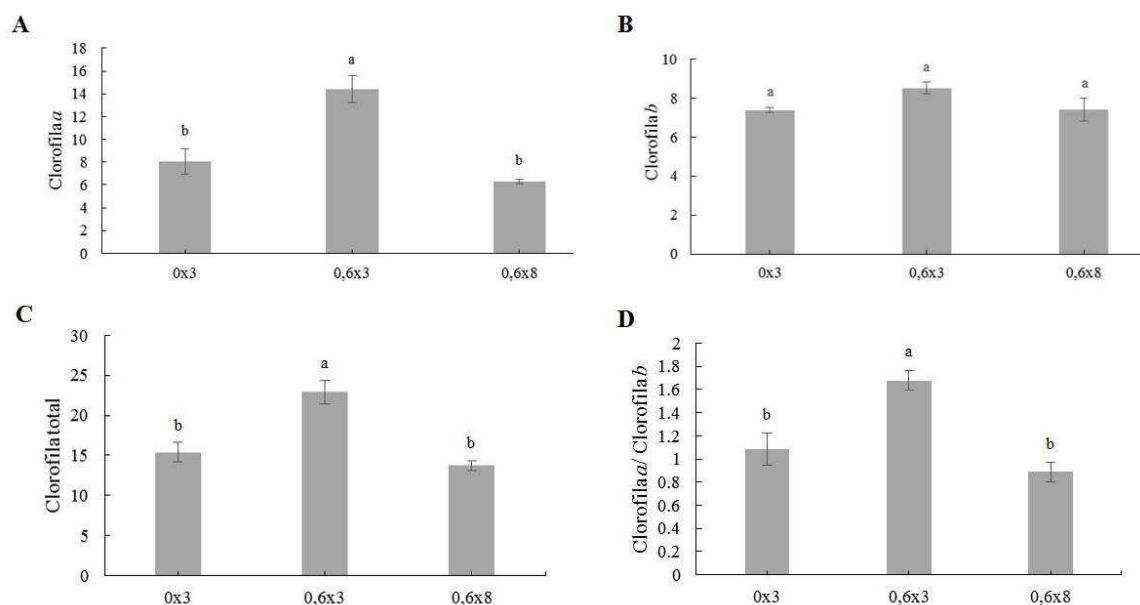
Observou-se que o PBZ atuou no aumento da massa seca da parte aérea e radicular. Já o aumento da concentração de sacarose influenciou no decréscimo do valor de massa seca da parte aérea. O tratamento 0x3 apresentou os menores valores para massa seca tanto da parte aérea quanto radicular (Figura 3B).



**Figura 3.** Massas fresca (A) e seca (B) das partes aérea e radicular da plantas de fáfia expostas a concentrações de PBZ e sacarose após 45 dias de cultivo in vitro. As médias seguidas de uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras minúsculas equivalem a diferenças entre as partes aérea e radicular e letras maiúsculas equivalem a diferenças entre os tratamentos.

### Variações no teor de clorofilas

O tratamento 0,6x3 apresentou maiores valores de clorofila a (Figura 5A), clorofila total (Figura 5C) e razão Cla/Clb (Figura 5D). Nos dados apresentados pelos gráficos observou-se que a adição de PBZ aumentou todas as variáveis analisadas, exceto clorofila b (Figura 5B), enquanto à adição de sacarose promoveu a redução desses teores.



**Figura 5.** Teores de clorofila a (A), b (B), total (C) e a razão Clorofila a/clorofila b (D) das plantas de fava expostas a concentrações de PBZ e sacarose após 45 dias de cultivo in vitro. As médias seguidas de uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras minúsculas equivalem a diferenças entre as partes aérea e radicular e letras maiúsculas equivalem a diferenças entre os tratamentos.

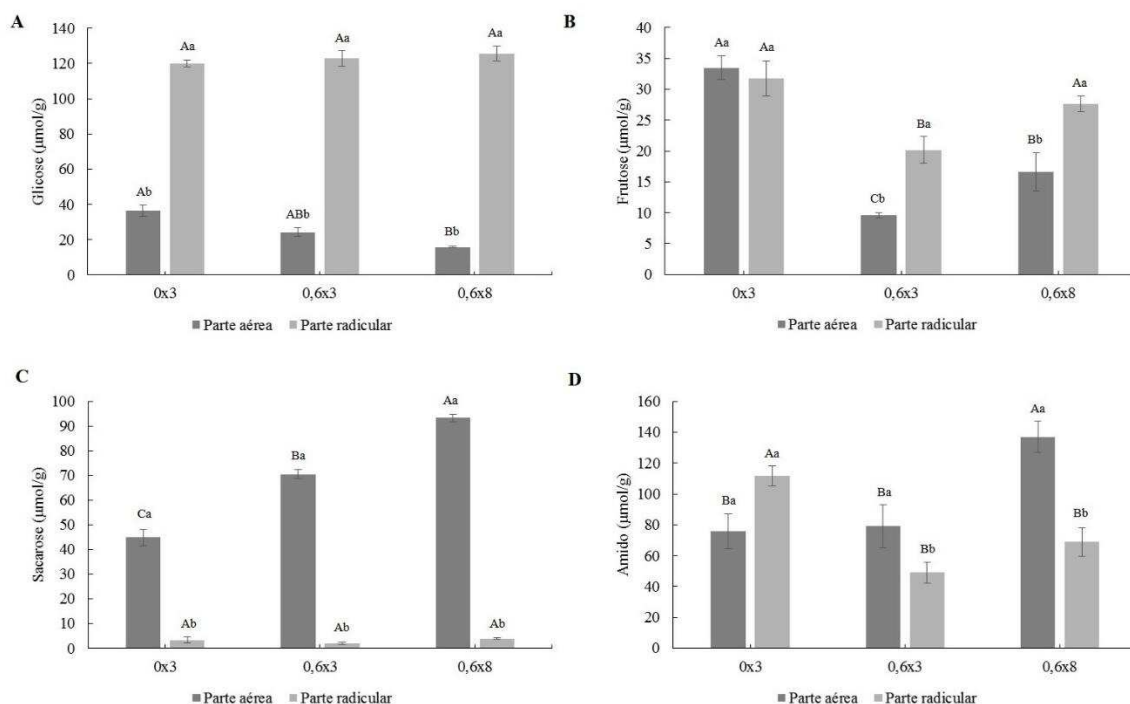
#### Análise dos teores de açúcares redutores e amido

Todos os tratamentos apresentaram maior teor de glicose na parte radicular comparando-se com a parte aérea. (Figura 6A).

O tratamento 0x3 apresentou maior teor de frutose na parte aérea. E o tratamento 0,6x3 apresentou menores teores de frutose para as partes aérea e radicular. A parte radicular dos tratamentos 0,6x3 e 0,6x8 apresentaram maior teor de frutose do que a parte aérea dos mesmos tratamentos (Figura 6B).

O tratamento 0x3 apresentou menor teor de sacarose na parte aérea. Houve um aumento do teor de sacarose com a adição de PBZ. (Figura 6C).

O tratamento 0,6x8 apresentou maior teor de amido na parte aérea. Já o 0x3 apresentou maior teor de amido na parte radicular. A parte aérea dos tratamentos 0,6x3 e 0,6x8 apresentaram maior teor de amido do que a parte radicular dos mesmos tratamentos (Figura 6D).

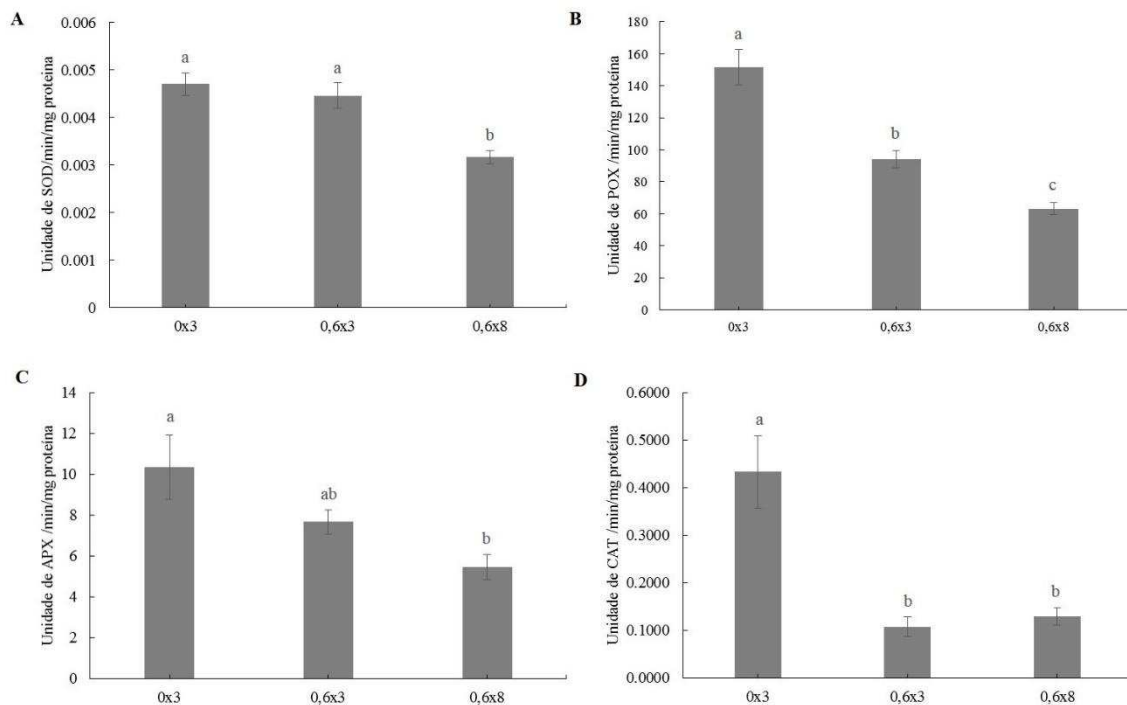


**Figura 6.** Teores de glicose (A), frutose (B), sacarose (C) e amido (D) das partes aérea e radicular das plantas de fáfia expostas a concentrações de PBZ e sacarose após 45 dias de cultivo in vitro. As médias seguidas de uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras minúsculas equivalem a diferenças entre as partes aérea e radicular e letras maiúsculas equivalem a diferenças entre os tratamentos.

#### Análise da atividade de enzimas do estresse oxidativo

A Superóxido dismutase (SOD) demonstrou menor atividade no tratamento 0,6x8 (Figura 7A). A Peroxidase (POX) teve sua maior atividade detectada no tratamento 0x3. A presença de PBZ implicou em uma menor expressão de POX no tratamento, e expressão

dessa enzima diminuiu ainda mais com o aumento da concentração de sacarose (Figura 7B). No caso da Ascorbato peroxidase (APX) apresentou menor atividade com a adição de PBZ e 8% de sacarose (Figura 7C). Já a Catalase (CAT) demonstrou maior atividade no tratamento 0x3. A adição de PBZ e 8% de sacarose influenciou na redução considerável da expressão da Catalase (Figura 7D).

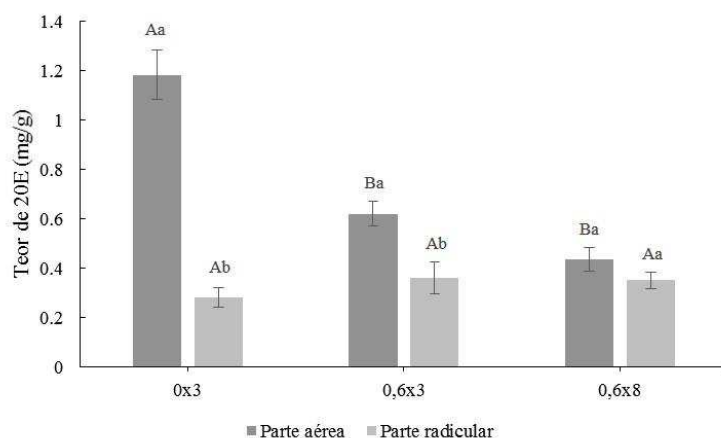


**Figura 7.** Atividade das enzimas do estresse oxidativo SOD (A), POX (B), APX (C) e CAT (D) da parte aérea das plantas de fáfia expostas a concentrações de PBZ e sacarose após 45 dias de cultivo in vitro. As médias seguidas de uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras minúsculas equivalem a diferenças entre as partes aérea e radicular e letras maiúsculas equivalem a diferenças entre os tratamentos.

#### Teor de 20E e expressão de genes envolvidos na rota da síntese de 20E

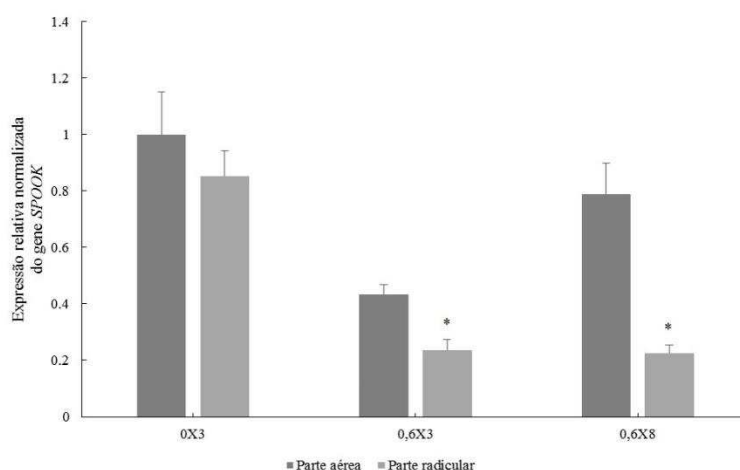
O tratamento 0x3 apresentou maior teor de 20E na parte aérea. A adição de PBZ e 8% de sacarose ao meio de cultura influenciou na redução do teor de 20E na parte aérea. A parte aérea dos tratamento 0x3 e 0,6x3 apresentaram maior teor de 20E do que a parte

radicular dos mesmos tratamentos. Não houve alteração no teor de 20E da parte radicular entre os tratamentos (Figura 8).



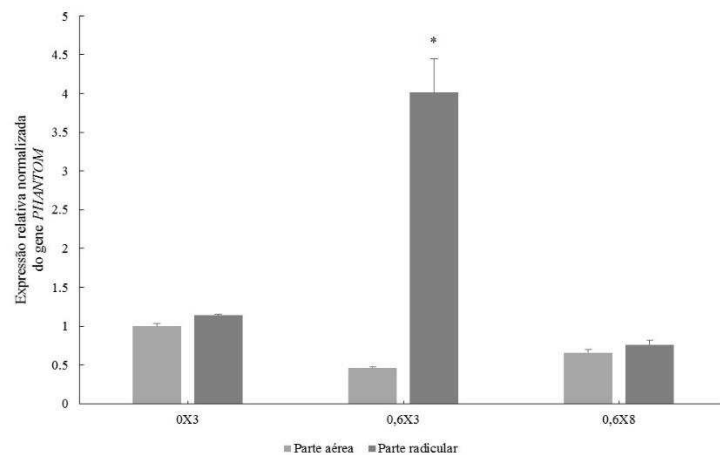
**Figura 8.** Teor de 20E das partes aérea e radicular das plantas de fáfia expostas a concentrações de PBZ e sacarose após 45 dias de cultivo in vitro. As médias seguidas de uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras minúsculas equivalem a diferenças entre as partes aérea e radicular e letras maiúsculas equivalem a diferenças entre os tratamentos.

O gene SPOOK apresentou menor expressão na parte radicular dos tratamentos 0,6x3 e 0,6x8 (Figura 9).



**Figura 9.** Expressão relativa do gene SPOOK em plântulas de fáfia expostas a concentrações de PBZ e sacarose após 45 dias de cultivo in vitro. As médias foram comparadas pelo teste de Dunnet, a 5% de significância de. O asterisco (\*) indica a média que apresentou diferença estatística.

O gene PHANTOM apresentou maior expressão na parte radicular do tratamento 0,6x3 (Figura 10).



**Figura 10.** Expressão relativa do gene PHANTOM em plântulas de fáfia expostas a concentrações de PBZ e sacarose após 45 dias de cultivo in vitro. As médias foram comparadas pelo teste de Dunnet, a 5% de significância. O asterisco (\*) indica a média que apresentou diferença estatística.

## DISCUSSÃO

Plantas de fáfia expostas à PBZxSacarose apresentaram redução no crescimento da parte aérea e radicular

O PBZ possui certa similaridade estrutural com o ent-caureno e ent-caurenol, compostos essenciais na via da biossíntese de giberelinas (Ribeiro et al. 2011). Conseqüentemente, inibe o citocromo P450 monoxigenases, prejudicando a oxidação de ent-caureno e ent-ácido caurenico (ICI 1986; Rademarcher 2000). Como consequência dessa inibição, o PBZ pode acarretar na redução nos níveis de giberelinas ao longo da planta (Rademarcher 2000), levando à redução do crescimento da parte aérea e radicular, e ainda podendo causar colorações verde escuro nas folhas (ICI 1986).

Corroborando as informações anteriores, neste trabalho observou-se plantas com crescimento da parte aérea e radicular prejudicadas, presença de folhas pequenas e

coloração verde escuro, nos tratamentos com acréscimo de PBZ (0,6x3 e 0,6x8). O aumento da concentração de sacarose desencadeou na diminuição do potencial hídrico, e conseqüentemente no prejuízo para absorção de água e nutrientes (Lédo et al. 2007), resultando na coloração amarelada das folhas das plântulas de fáfia.

Em plantas tratadas com PBZ, a parte aérea apresentou menor desenvolvimento e acumulou maior quantidade de massa seca, porém devido ao seu tamanho reduzido, o excedente de assimilados produzidos pela planta foi redirecionado para a parte radicular, o que induziu o aumento da massa seca dessa região (Ribeiro et al. 2011). Na espécie estudada observou-se o mesmo comportamento, onde ocorreu o aumento da massa seca da parte aérea e radicular.

Já com o aumento da concentração de sacarose observou-se o decréscimo da massa seca da parte aérea, o que é embasado pelo fato da sacarose atuar negativamente na biossíntese de giberelinas (Xu et al. 1998). A presença de PBZ e aumento da concentração de sacarose induziu a tuberização in vitro do sistema radicular, indicado pelo aumento da massa seca desse órgão.

#### Variações no teor de clorofilas

Na análise de todos os teores relacionados com clorofila, observou-se aumento quando adicionou-se PBZ e redução quando aumentou-se a concentração de sacarose.

Elevado conteúdo de clorofila pode ser induzido pelo PBZ, pois este estimula a síntese de citocinina que aumenta a diferenciação de cloroplastos e biossíntese de clorofila, e ainda previne a degradação de clorofila (Jaleel et al. 2007). Inibidores da biossíntese de

giberelinas aumentaram o conteúdo de citocinina em *Dianthus caryophyllus* (Sebastian et al. 2002). Em contrapartida, altas concentrações de sacarose no meio de cultura podem inibir o acúmulo de clorofila de plantas in vitro (Neumann e Bender 1987). A redução no teor de clorofila em explantes cultivados in vitro pode limitar a taxa fotossintética pela redução na absorção de luz (Christensen et al. 2008).

#### Análise dos teores de açúcares redutores e amido

Houve um aumento do teor de sacarose com adição de PBZ. E como era esperado, também observou-se aumento do teor de sacarose conforme a adição de maior concentração de sacarose ao meio de cultura. Possivelmente, isso ocorreu devido o PBZ estimular as enzimas envolvidas na síntese de sacarose, o que corrobora com os resultados de vários trabalhos que também constataram o aprimoramento da produção de carboidratos em distintos tecidos por meio da exposição a PBZ (Wieland e Wample 1985).

Conforme adicionou-se o PBZ e aumentou a concentração de sacarose no meio, observou-se aumento/redução do teor de amido da parte aérea e radicular, respectivamente. Esse comportamento foi visto no trabalho de Hua et al. (2016), onde a redução do teor de amido na raiz foi explicada pelo aumento transitório no crescimento das folhas e caules, em que o amido foi clivado e redirecionado para gastos energéticos do crescimento da parte aérea. E o incremento do teor de amido nas partes aéreas é devido ao atividade de enzimas metabólicas relacionadas com carboidrato.

## Análise da atividade de enzimas do estresse oxidativo

A Superóxido dismutase (SOD) demonstrou maior atividade no tratamento 0x3 e 0,6x3. Isso indica que essa enzima está cumprindo com o seu papel, convertendo as moléculas de superóxido em peróxido de hidrogênio (Mittler 2002), assim provocando redução da formação do radical hidroxil e mantendo concentrações baixas de superóxido (Sarvajeet e Narendra 2010).

Por outro lado, com a elevação da concentração de sacarose para 8% observou-se a redução da atividade da SOD, provavelmente pela atuação da sacarose como agente osmótico (Liu et al. 2018). Esta habilidade lhe permite auxiliar no ajuste osmótico, culminando na desintoxicação de espécies reativas de oxigênio e integridade da membrana das células vegetais (Pireivatloum et al. 2010).

A atividade da POX, APX e Catalase induzem resistência ao estresse em plantas por meio da remoção do peróxido de hidrogênio dos ciclos biológicos (Hodges et al. 1997). As enzimas POX, APX e Catalase demonstraram menor atividade na presença de PBZ e maior quantidade de sacarose. A atividade reduzida dessas enzimas pode ser devido a elevada atuação da sacarose como agente protetivo do estresse oxidativo (Liu et al. 2018).

Estudos de Uemura e Steponkus (2003) demonstraram a capacidade da sacarose de reduzir as espécies reativas de oxigênio. Em baixas concentrações, a sacarose atua como sinal e substrato às alterações induzidas por estresse, enquanto que em altas concentrações pode funcionar como um agente protetivo. Este mecanismo deve estar ligado aos radicais livres de sacarose oxidada, o que fornece um mecanismo eficiente e estável devido à grande capacidade desses radicais livres se regenerarem in vivo. Estes processos devem ser de grande importância em vacúolos de tecidos de células que acumulam açúcar, em tecidos

associados com o floema ou em algumas células com alta concentração de sacarose (Ende et al. 2009).

#### Teor de 20E e expressão dos genes SPOOK e PHANTOM

A adição de PBZ ao meio de cultura reduziu o teor de 20E na parte aérea, enquanto que na parte radicular não houve diferença estatística entre os tratamentos.

PBZ apresenta uma certa similaridade estrutural com ent-caureno e lanosterol que são compostos intermediários das vias de biossíntese de giberelinas e esteroides (Sugavanam 1984; Ribeiro et al. 2011). Essa similaridade deve acarretar no bloqueio da atividade das enzimas da família citocromo P450 envolvidas nas duas vias de biossíntese (Sugavanam 1984), assim resultando na redução do níveis de giberelinas e conteúdo de esteroides, dentre eles o 20E.

O gene PHANTOM codifica 25-hidroxiase em insetos (Warren et al. 2004) e o gene SPOOK é essencial nos passos de hidroxilação terminal na biossíntese de ecdisteroides nos insetos (Namiki et al. 2005). Em estudo relacionado com transcriptoma de fáfia (Batista et al., submetido) constatou-se a presença dos genes SPOOK e PHANTOM. Diante disso, em estudo com plantas de fáfia infectadas com nematoides constatou-se o incremento do teor de 20E, modulação da rota desse composto por meio dos genes SPOOK e PHANTOM e forneceu maior embasamento da teoria de que esses genes são análogos na modulação de 20E em plantas e insetos (Ferreira 2017).

Esses dois genes, denominados de genes HALLOWEEN, codificam essas enzimas do citocromo P450 em insetos (Zhou et al. 2016). Essas enzimas catalisam hidroxilações, resultando no hormônio 20E. Em espinafre observou-se catálise da hidroxilação de

ecdisona em 20E nos microsossomos (Grebenok e Galbaraiith 1996), indicando que esses genes e enzimas atuam também nas plantas. Plântulas de fáfia infectadas com nematoide apresentaram alto teor de 20E, e maior e menor expressão dos genes SPOOK e PHANTOM, repectivamente (Ferreira 2017). Em contrapartida, no presente trabalho, a expressão dos genes SPOOK e PHANTOM apresentaram menor e maior expressão, respectivamente, na parte radicular das plantas de fáfia exposta a PBZ, resultando na redução de 20E na parte aérea.

## **CONCLUSÃO**

Diante dos resultados desse trabalho, pode-se constatar que o PBZ induziu a redução no crescimento vegetal e o acúmulo de biomassa na parte aérea e radicular. Alta concentração de sacarose atuou como agente protetivo do estresse oxidativo, culminando na redução da atividade enzimática.

Por fim, a exposição às concentrações de PBZ e sacarose induziu tuberização in vitro do sistema radicular, entretanto não apresentou acréscimo do teor de 20E. Com a adição de PBZ, a modulação dos genes SPOOK e PHANTOM na parte radicular foi alterada e houve a redução do teor de 20E na parte aérea.

Sugere-se estudos futuros correlacionando concentrações menores de PBZ com o teor de 20E, modulação dos genes ligados a rota biossintética do 20E, conteúdo de giberelinas e ontogênese do processo de tuberização in vitro.

## REFERÊNCIAS

Aksenova NP, Konstantinova TN, Golyanovskaya SA, Sergeeva LI, Romanov GA (2012) Hormonal regulation of tuber formation in potato plants. **Russ J Plant Physiol**, 4:451-466.

Anderson MD, Prasad TK, Stewart CR (1995) Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. **Plant Physiol**, 109:1247-1257.

Ashraf MF, Aziz MA, Kadir MA, Stanslas J, Farokhian E (2013) In vitro tuberization of *Chlorophytum borivillianum* Sant & Fern (Safed Musli) as influenced by sucrose, CCC and culture systems. **Plant Cell Physiol**, 54(8):1356–1364.

Bakrim A, Maria A, Sayah F, Lafont R, Takvorian N (2008) Biosynthesis and regulation of phytoecdysteroids in spinach (*Spinacia oleracea* L.) **Plant Physiol Biochem**, 46: 844-854.

Beauchamp C, Fridovich I. (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Anal Biochem**, 44(1):276-87.

Berger, Allen N (2004) “**Potential competitive effects of basel II on banks in SME credit markets in the United States**”, Federal Reserve Board Working Paper.

Bolton M. D. (2009). Primary metabolism and plant defense – fuel for the fire. **Mol Plant Microbe Interact**, 22:487–497.

Chance, B. and Maehly, A.C. (1955) Assay of catalase and peroxidase. **Method Enzymol**, 2:764-775.

Christensen B, Sriskandarajah S, Serek M, Renate M R. (2008) In vitro culture of *Hibiscus rosa-sinensis* L.: Influence of iron, calcium and BAP on establishment and multiplication. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, 93:151-161.

Corrêa JPO, Vital C E, Pinheiro MV M, Batista DS, Saldanha CW, Cruz ACF, Notini MM, Freitas DM, Matta FM, Otoni WC (2016) Induced polyploidization increases 20-hydroxyecdysone content, in vitro photoautotrophic growth, and ex vitro biomass accumulation in *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **In Vitro Cell Dev Biol Plant**, 52:45-55.

Corrêa Júnior C (2006) **Fáfia - O ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Sprengel) Pedersen)**: aspectos agronômicos e fitoquímicos. Curitiba: Clichetec, 22p.

Cruz ACF (2011). **Interações entre acessos de fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] com nematoides (*Meloidogyne incognita* e *M. javanica*): aspectos fitoquímicos e estruturais**. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa. UFV-Viçosa-Minas Gerais.

Cruz CD (2013) GENES - software para análise de dados em estatística experimental e em genética quantitativa. **Acta Sci Agron**, 35 (3).

Dinan L, Harmatha J, Volodin V, Lafont R (2009) Phytoecdysteroids: Diversity, Biosynthesis and Distribution. In: Smaghe G. (Ed.). **Ecdysone: Structures and Functions**, Springer. p.43.

Ende WV, Valluru R (2009) Sucrose, sucrosyl oligosaccharides, and oxidative stress: scavenging and salvaging? **J Exp Bot**, 60:9–18.

Fernie AR, Roscher A, Ratcliffe RG, Kruger NJ (2001) Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate:fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. **Planta**, 212: 250–263.

Ferreira PRB (2017) **Metabolic profile, ultrastructure and gene expression of brazilian-ginseng [Pfaffia glomerata (Spreng.) Pedersen] under photoautotrophic growth and interaction with nematodes**. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) Universidade Federal de Viçosa.

Festucci-Buselli RA, Contim LAS, Barbosa LCA, Stuart JJ, Otoni WC (2008) Biosynthesis and potential functions of the ecdysteroid 20-hydroxyecdysone – a review. **Botany**, 86: 978-987.

Flores R (2006) **Cultura de tecidos e produção de ecdisona em Pfaffia glomerata e Pfaffia tuberosa (Amaranthaceae)**. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade Federal de Santa Maria. Rio Grande do Sul.

Fogaça CM, Sant'Anna-Santos BF, Cordeiro DC, Correia TD, Finger FL, Otoni WC, Cargin A (2010) Microtuberização in vitro de cultivares de Mandioca: aspectos morfológicos e anatômicos. **Acta Bot Bras**, 24(3):624-630.

Giannopolitis CN, Reis SK (1997) Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiol**, 59:309-314.

Grebenok RJ, Galbraith DW, Benveniste I, Feyereisen R (1996) Ecdysone 20-monooxygenase, a cytochrome P450 enzyme from spinach, *Spinacia oleracea*. **Phytochemistry**, 42:927-933.

Guarnerio CF, Fraccaroli M, Gonzo I, Pressi G, Dal Toso R, Guzzo F, Levi M (2012) Metabolomic analysis reveals that the accumulation of specific secondary metabolites in *Echinacea angustifolia* cells cultured in vitro can be controlled by light. **Plant Cell Rep**, 31: 361-7.

Harvey BMR, Crothers SH, Evans NE, Selby C (1991) The use of growth retardants to improve microtuber formation by potato (*Solanum tuberosum*). **Plant Cell Tiss Organ Cult**, 27:59-64.

- Havir EA, McHale NA (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiol**, 84(2):450-5.
- Hodges DM, Andrews CJ, Johnson DA, Hamilton RI (1997) Antioxidant enzyme responses to chilling stress in differentially sensitive inbred maize lines. **J Exp Bot**, 48:1105-1113.
- Hua S, Zhang Y, Yu H, Lin B (2016) Paclobutrazol application effects on plant height, seed yield and carbohydrate metabolism in canola. **IJAB**, 16(3):471–479.
- ICI (Imperial Chemical Industries) and PLC (1986) **Plant protection division**. Clipper, Surrey.
- Jackson SD, Prat S (1996) Control of tuberization in potato by gibberellins and phytochrome B. **Physiol Plant**, 98:407–411.
- Jaleel CA, Manivannan P, Sankar B, Kishorekumar A, Sankari S, Panneerselvam R (2007) Paclobutrazol enhances photosynthesis and ajmalicine production in *Catharanthus roseus*. **Process Biochem**, 42:1566–1570.
- Koshiha T, Matsuyama H (1993) An in vitro system of indole-3-acetic acid formation from tryptophan in maize (*Zea mays*) coleoptile extracts. **Plant Physiol**, 102(4):1319-1324.
- Lafont R, Dauphin-Villemant C, Warren JT, Rees H (2005) Ecdysteroid chemistry and biochemistry. In: Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS (Eds) **Comprehensive Molecular Insect Science**, Elsevier, pp 125-195.
- Leclerc Y, Donnelly DJ, Seabrook JEA (1994) Microtuberisation of layered shoots and nodal cuttings of potato: the influence of growth regulators and incubation periods **Plant Cell Tiss Organ Cult**, 37:113-120.
- Ledo ADAS, Gomes KKP, Barboza SBSC, Vieira GSS, Tupinambá EA, Aragão WM (2007) Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e aclimação de plântulas de coqueiro anão. **Pesq Agropec Bras**, 42:147-154.
- Liu YJ, Wang GL, Ma J, Xu ZS, Wang F, Xiong AS (2018) Transcript profiling of sucrose synthase genes involved in sucrose metabolism among four carrot (*Daucus carota* L.) cultivars reveals distinct patterns. **BMC Plant Biol**, 18:8.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC(T)</sup> Method. **Methods**, 25(4):402-8.
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Sci**, 7:405-410.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol Plant**, 15: 473-497.

- Nakano, Y. and Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiol**, 22, 867-880.
- Namiki T, Niwa R, Sakudoh T, Shirai KI, Takeuchi H, kataoka H (2005) Cytochrome P450 CYP307A1/Spook: a regulator for ecdysone synthesis in insects. **Biochem Biophys Res Commun**, 337: 367-374.
- Neumann KH, Bender L (1987) Photosynthesis in cell and tissue culture systems. In: Green CE, Somers DA, Hackett WP, Biesboer DD (eds) **Plant tissue and cell culture**. Alan R, Liss, pp 151–165.
- Ortiz-Montiel G, Lozoya-Saldana H (1987) Potato minitubers: Technology validation in Mexico. **Am Potato J**, 64:535-544.
- Pelacho AM, Mingo-Castel AM (1991) Effects of photoperiod on kinetin-induced tuberisation of isolated potato stolons cultured in vitro. **Am Potato J**, 68:533-541.
- Perl A, Aviv D, Willmitzer L, Galun E (1991) In vitro tuberization potatoes harboring  $\beta$ -glucuronidase linked to a patatin promoter: effects of sucrose levels and photoperiods. **Plant Sci**, 73:87-95.
- Pinto ACR, Graziano TT, Barbosa JC, Lasmar FB (2006) Retardadores de crescimento na produção de plantas floridas envasadas de açafrão-daconchinchina. **Bragantia**, 65:369-380.
- Pireivatloum J, Qasimov N, Maralian H (2010). Effect of soil water stress on yield and proline content of four wheat lines. **Afr J Biotech**, 9: 36-40.
- Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. **Biochim Biophys Acta**, 975: 384–394.
- Rademacher W (2000) Growth retardants: Effects on gibberellins biosynthesis and other metabolic pathways. **Annu Rev Plant Phys**, 51:501-531.
- Ribeiro DM, Araújo WL, Alisdair RF, Schippers JHM, Mueller-Roeber B (2012) Transcriptome and metabolome effects triggered by gibberellins during rosette growth in Arabidopsis. **J Exp Bot**, 63: 2769–2786.
- Ribeiro DM, Müller C, Bedin J, Rocha GB, Barros RS (2011) Effects of autoclaving on the physiological action of paclobutrazol. **Agr Sci**, 2:191-197.
- Saldanha CW, Otoni CG, Notini MN, Kuki KN, Cruz ACF, Neto AR, Dias LLC, Otoni WC (2013) A CO<sub>2</sub>-enriched atmosphere improves in vitro growth of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **In Vitro Cell Dev Biol Plant**, 49:433-444.

Sarvajeet SG, Narendra T (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in a biotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiol Biochem**, 3:1-22.

Seabrook JEA, Shirlyn C, Levy D (1993) Effect of photoperiod on in vitro tuberisation of potato (*Solanum tuberosum* L.). **Plant Cell Tiss Organ Cult**, 34:43-51.

Sebastian B, Alberto G, Emilio AC, Jose AF, Juan AF (2002) Growth, development and color response of potted *Dianthus caryophyllus* cv. Mondriaan to paclobutrazol treatment. **Sci Hort**, 1767:1-7.

Simko I (1994) Effect of paclobutrazol on in vitro formation of potato microtubers and their sprouting after storage. **Biol Plantarum**, 36:15-20.

Slimmon T, Machado VS, Coffin R (1989) The effect of light on in vitro microtuberisation of potato cultivars. **Am Potato J**, 66:843-848.

Sugavanam B (1984) Diastereoisomers and enantiomers of paclobutrazol: Their preparation and biological activity. **Pest Manag Sci**, 15:296-302.

Teixeira DMC, Pinto JE BP (1991) Minituberização da batata em diferentes níveis de N, Sacarose e BAP. **Rev Bras Fisiol Veg**, 3(2):77-81.

Tognetti JA, Pontis HG, Martínez-Noël GMA (2013) Sucrose signaling in plants roseus. **Process Biochem**, 42:1566-70.

Uemura M, Steponkus PL (2003) Modification of the intracellular sugar content alters the incidence of freeze-induced membrane lesions of protoplasts isolated from *Arabidopsis thaliana* leaves. **Plant Cell Environ**, 26:1083–1096.

Warren JT, Petryk A, Marqués G, Parvy JP, Shinoda T, Itoyama K, Kobayashi J, Jarcho M, Li Y, O'Connor MB, Dauhin-Villemant C, Gilbert LI (2004) Phantom encodes the 25-hydroxylase of *Drosophila melanogaster* and *Bombyx mori*: a P450 enzyme critical in ecdysone biosynthesis. **Insect Biochem Mol**, 34: 991-1010.

Wieland WF, Wample RL (1985) Effects of paclobutrazol on growth, photosynthesis and carbohydrate content of 'dDlicious' apples. **Sci Hortic-Amsterdam**, 26:139-147.

Xu X, Vreugdenhil D, van Lammeren AAM (1998) Cell division and cell enlargement during potato tuber formation: a comparison of in vitro and in vivo tuber development. **J Exp Bot**, 49:573–582.

Zhou J, Li J, Wang R, Sheng X, Zong S, Weng Q, Luo Y (2016) Ecdysteroid titers and expression of Halloween genes and ecdysteroid receptor in relation to overwintering and the long larval phase in the seabuckthorn carpenterworm, *Holcocerus hippophaecolus*. **Entomol Exp Appl**, 1–14.

## CONCLUSÕES GERAIS

1. A utilização da técnica de autoenxertia no acesso LCT28 induziu o aumento dos teores de açúcares solúveis, amido e clorofilas;
2. A autoenxertia do acesso poliploide LCT28 influenciou no incremento do conteúdo de 20-hidroxiecdisona;
3. O PBZ reduziu o crescimento vegetal e aumentou o acúmulo de biomassa na parte aérea e radicular;
4. O PBZ influenciou na redução dos teores de glicose e frutose nas plantas;
5. Alta concentração de sacarose atuou como agente protetivo do estresse oxidativo, culminando na redução da atividade da POX, APX e CAT;
6. A exposição ao PBZ influenciou na modulação dos genes SPOOK e PHANTOM na parte radicular.