

MARCELA MORATO NOTINI

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 apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida e por me manter sempre forte para cumprir meus objetivos.

Aos meus pais, Marcelo e Maurilia, por ser minha base em tudo, terem dedicado suas vidas à minha educação e formação, assim como pelo amor incondicional e compreensão para com minhas ausências. Ao meu irmão Murilo, por ser tão especial e amigo. A todos os familiares pela torcida sempre.

Ao Leandro, companheiro de tantos anos, pelo amor, força e compreensão, e por apoiar e entender minha dedicação à pesquisa.

Às amigas fisiologistas Ana Carla, Cris, Camila, Pri, Ló e Fernanda, cujas presenças em minha vida me faz muito feliz.

À Lorena, minha irmã de coração, por estar incondicionalmente ligada a mim e disposta a tudo pra me ajudar.

Às amigas de Divinópolis Tati e Mi por entenderem minhas ausências, se manterem fiéis à nossa amizade por tantos anos e serem minhas maiores fãs.

Aos membros do Laboratório de Cultura de Tecidos (LCT) em geral, que muito mais que colegas de trabalho se tornaram grandes amigos, com os quais aprendi tanto, e que me proporcionaram muitas risadas em nossos intermináveis cafés. Em especial gostaria de agradecer ao Cléber, João Paulo, Laís, Mariana e Jéssica pelo auxílio na condução dos experimentos, ao Diego pelo auxílio com as pranchas, e Marcos que me salvou na estatística e auxiliou na escrita do trabalho.

À Joseila, que me adotou quando cheguei ao LCT, e foi minha grande referência como pesquisadora, além de ser uma pessoa excepcional.

Ao Zé Maria, que tanto me apoiou nos experimentos em casa de vegetação.

Ao Eduardo e ao Hugo, por realizar nossas análises em HPLC.

À Lili, pela presença, disponibilidade em ajudar e por proporcionar um ambiente de trabalho organizado

À Viçosa, cidade que me adotou tão menina aos 17 anos, e hoje me devolve ao mundo como mulher, mais madura, segura e repleta de planos. Sentirei saudade desse universo único, no qual fui tão feliz.

Aos professores João Paulo e Lyderson por terem aceito o convite pra participar da banca, pela ajuda com as análises e os conhecimentos a mim repassados.

Ao professor Wagner, mestre e amigo, pelos grandes ensinamentos a mim concedidos, apoio, confiança e por se dedicar ao máximo para a realização desse projeto.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia Vegetal pela oportunidade de realização dos cursos de graduação e mestrado e assim proporcionar todo o conhecimento adquirido.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que contribuíram para a minha formação como pessoa e profissional durante a execução do mestrado.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT.....	vii
INTRODUÇÃO GERAL	1

Capítulo I

Avaliação do crescimento e acúmulo de 20-hidroxiecdisona em diploides e tetraploides de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen em resposta à presença de sacarose e concentrações de CO₂

RESUMO.....	17
INTRODUÇÃO.....	18
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
2.1 Material vegetal e condições de cultura.....	21
2.2 Avaliações do crescimento	22
2.3 Determinação de pigmentos fotossintéticos.....	23
2.4 Quantificação do teor de 20-hidroxiecdisona (20E)	23
2.5 Análise estatística	24
3. RESULTADOS	25
3.1 O enriquecimento do ambiente com CO ₂ e adição de sacarose ao meio de cultura aumentam o crescimento da parte aérea de vitroplantas de <i>Pfaffia glomerata</i>	25
3.2 Aumento na concentração de CO ₂ na atmosfera induz acúmulo de pigmentos fotossintéticos em fáfia	28
3.3 Acúmulo de 20E em <i>P. glomerata</i> é influenciado pelo enriquecimento da atmosfera com CO ₂ , adição de sacarose ao meio e duplicação cromossômica das plantas	29
4. DISCUSSÃO	31
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

Capítulo II

Influência da ploidia, do volume de vaso e da aplicação de paclobutrazol no crescimento e no acúmulo de 20-hidroxiecdisona e saponinas em *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen

RESUMO.....	44
1. INTRODUÇÃO.....	45
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	48
2.1 Material vegetal e condições de cultivo	48
2.2 Aplicação dos tratamentos e delineamento experimental	48
2.3 Avaliações do crescimento	49
2.4 Determinação de pigmentos fotossintéticos.....	49
2.5 Densidade estomática	50
2.6 Determinação do teor de 20-hidroxiecdisona.....	50
2.7 Determinação do teor de saponinas totais.....	51

2.8 Análise estatística	52
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
3.1 Variáveis de crescimento	53
3.2 Razão largura/comprimento foliar	56
3.3 Densidade estomática	58
3.4 Quantificação de pigmentos.....	60
3.5 Quantificação de metabólitos secundários	63
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	75

RESUMO

NOTINI, Marcela Morato, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 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.** Orientador: Wagner Campos Otoni.

Pfaffia glomerata (Amaranthaceae), conhecida como ginseng brasileiro, é uma importante espécie medicinal nativa do Brasil. O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da ploidia das plantas e das condições de cultivo *in vitro* e *ex vitro* no crescimento e produção de metabólitos secundários em *P. glomerata*. Nesse trabalho foram utilizados explantes diploides e tetraploides induzidos artificialmente por uso de colchicina. Nas condições *in vitro* foram avaliados os efeitos da poliploidização, da adição de sacarose ao meio de cultura e da concentração atmosférica de CO₂ nos parâmetros de crescimento e acúmulo de 20E em *P. glomerata*. Enquanto nas condições *ex vitro* analisou-se o crescimento, acúmulo de pigmentos, densidade estomática, teores de 20E e saponinas triterpênicas em função da ploidia da planta, volume de vaso e tratamento com paclobutrazol (PBZ). Todos os parâmetros de crescimento avaliados e o acúmulo de metabólitos secundários foram reprimidos em plantas tetraploides comparadas às diploides em condições de cultivo *in vitro* e *ex vitro*. Foram observadas nos indivíduos tetraploides características específicas de poliploidia, como redução da densidade estomática e aumento da relação largura/comprimento foliar. Em condições *in vitro*, a presença de sacarose no meio de cultura promoveu melhor crescimento, porém inibiu o acúmulo de 20E. Assim, a fotoautotrofia mostra-se mais favorável por apresentar potencial na produção comercial massal de mudas dessa espécie com altos teores de 20E. O enriquecimento de CO₂ (1.000 µmol/mol de CO₂) também induziu a produção de plantas com maiores biomassa e acúmulo de 20E, favoráveis ao interesse comercial. Após aclimatização, plantas de *P. glomerata* apresentaram forte indução nos parâmetros de crescimento quando crescidas em vasos de maior volume, enquanto a aplicação de PBZ não interferiu na produção de biomassa e metabólitos secundários. Dessa forma, a utilização de vasos de maior volume é um importante fator na produção em escala comercial de ginseng brasileiro.

ABSTRACT

NOTINI, Marcela Morato, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, January, 2013. **Influence of *in vitro* and *ex vitro* culture conditions on the growth and secondary metabolite accumulation in diploid and tetraploid plants of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen.** Adviser: Wagner Campos Otoni.

Pfaffia glomerata (Amaranthaceae), known as Brazilian ginseng, is an important medicinal species native to Brazil. The objective of this study was to evaluate the influence of the ploidy level and *in vitro* and *ex vitro* culture conditions on the growth and secondary metabolite production in *P. glomerata*. Explants of diploids and tetraploids artificially induced by colchicine explants were used. Under *in vitro* conditions, we evaluated the effects of polyploidization, supplementation of sucrose to the culture medium and atmospheric CO₂ concentration on growth parameters and 20-hydroxyecdysone (20E) accumulation of *P. glomerata* nodal explants. Following transfer to *ex vitro* conditions, growth, pigment content, stomatal density, levels of 20E and saponins were analyzed according to the plant ploidy, vessel volume and treatment with paclobutrazol (PBZ). All growth characteristics and accumulation of secondary metabolites were inhibited in tetraploid background compared with diploids, both under *in vitro* and *ex vitro* conditions. Specific characteristics of polyploidy, such as reduced stomatal density and increased width/length ratio of leaves were found in tetraploid individuals. Under *in vitro* conditions, the presence of sucrose in the culture medium promoted better growth, but inhibited 20E accumulation. Thus, the photoautotrophy seems to be more favorable because shows potential commercial mass production of seedlings of this species with high levels of 20E. CO₂ enrichment also induced plant production with higher biomass and 20E accumulation, favorable for commercial purposes. After acclimatization, *P. glomerata* showed significant increase in growth parameters when it was grown in higher-volume pots, while the PBZ application did not affect the biomass and secondary metabolite production. Thereby, the use of larger pots is an important factor in commercial-scale production of Brazilian ginseng.

INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Pfaffia* pertence à família Amaranthaceae e abrange cerca de 90 espécies, encontradas na América do Sul desde a Guiana até a Bolívia e Argentina. No Brasil, foram descritas 27 espécies (Vidal et al., 1967). Compreende espécies conhecidas popularmente como para-tudo, corango-açu, corango-de-batata ou ainda corango-sempre-viva, enquanto especificamente *Pfaffia glomerata*, *P. iresinoides* e *P. paniculata* são conhecidas como ginseng brasileiro. *Pfaffia glomerata* é a espécie de maior importância medicinal e comercial (Figueiredo et al., 2004; Vigo et al., 2004a; Zimmer et al., 2006). Apresenta ação antidepressiva (De-Paris et al., 2000) e anti-neoplásica (Silva, 2008), auxilia no tratamento de distúrbios gastrointestinais (Freitas et al., 2004), tem efeito anti-inflamatório e analgésico (Neto et al., 2005), tônico e afrodisíaco, para o tratamento de diabetes e reumatismo (Magalhães, 2002), além do esgotamento físico e mental, falta de memória e estresse (Rates & Gosmann, 2002). Extratos hidroalcoólicos da espécie mostram-se ativos contra alguns protozoários, como *Leishmania braziliensis* (Neto et al., 2004).

Dentre os compostos químicos presentes nas raízes de *Pfaffia* destacam-se saponinas triterpênicas e fitoecdisteroides (Shiobara et al., 1993). As propriedades medicinais da espécie são atribuídas à presença do fitoecdisteroide 20-hidroxiecdisona (20E), também conhecido como β -ecdisona (Festucci-Buselli et al., 2008), sendo este composto utilizado como marcador químico no controle de qualidade da matéria-prima e dos medicamentos produzidos com *P. glomerata* (Magalhães, 2000; Zimmer et al., 2006). As raízes de *Pfaffia* apresentam cerca de 11% de saponinas, incluindo grupos químicos singulares denominados pfaffosídeos, assim como ácidos fáficos, glicosídeos e nortriterpenos. A ação destas saponinas foi comprovada na inibição de cultura de células de tumores do tipo melanoma e na regulação dos níveis de açúcares sanguíneos (Alves et al., 2006).

Os fitoecdisteroides são metabólitos secundários sintetizados pelas plantas, cuja estrutura é análoga aos hormônios esteroidais presentes em artrópodes, nos quais estão presentes durante toda a fase de crescimento dos insetos, sendo responsáveis pelo controle de vários aspectos de desenvolvimento, como metamorfose e reprodução (Savchenko et al., 1998; Dinan, 2001; Marion-Poll & Descoins, 2002). Acredita-se que sua função esteja

relacionada à proteção da planta contra insetos fitófagos, uma vez que insetos não adaptados, ao ingerirem fitoecdisteroides sofrem sérios efeitos adversos, tais como redução de peso, perturbações nas mudas, e até morte (Klein, 2004; Dinan, 2009). Pesquisas com esses metabólitos têm demonstrado sua importância para a agricultura ao comprovar sua ação desses no controle de pragas e também no melhoramento de plantas cultivadas através do aumento da produção de fitoecdisteroides (Dinan, 2001; Festucci-Buselli et al., 2008). Em *P. glomerata*, a maior parte dos estudos relata maior acúmulo de 20E nas raízes de plantas cultivadas *ex vitro*, reconhecidamente um órgão acumulador (Flores, 2006; Festucci-Buselli et al., 2008). No entanto, trabalhos recentes envolvendo cultivo *in vitro* demonstram maior acúmulo desse metabólito em folhas (dados não publicados).

A biossíntese dos fitoecdisteroides, assim como das saponinas, envolve a rota acetato-mevalonato (rota do MEV) que ocorre no citosol, bem como a rota do metileritritolfosfato (rota do MEP), que ocorre nos cloroplastos (Croteau, 2000; Klein, 2004; Taiz & Zeiger, 2004). Experimentos utilizando compostos marcados revelam que mevalonato é o precursor preferencial na biossíntese de esteróis (Baisted, 1971; Trojanowska et al., 2000) e triterpenos pentacíclicos (van der Heijden et al., 1989; Akashi et al., 1994). A rota do MEV e do MEP levam a formação do isopentenildifosfato (IPP) e do dimetilalildifosfato (DMAPP) respectivamente. Esses compostos são isômeros e se unem para formar intermediários de vários terpenoides. A união de duas moléculas de farnesildifosfato (FPP), catalisada pela sintase do esqualeno, leva à formação do esqualeno, composto formado por 30 carbonos e precursor dos fitoesteróis e triterpenos. O esqualeno é oxidado para formar o oxidoesqualeno. Existem várias formas alternativas de ciclização do oxidoesqualeno, levando à formação de diferentes esqueletos cíclicos. Esse processo é catalizado por um grupo de enzimas, chamadas ciclases do oxidoesqualeno, dentre as quais destacam-se a sintase do cicloartenol, responsável pela formação do cicloartenol, precursor dos fitoesteróis e ecdisteróis, e a sintase da β -amirina, que catalisa a formação da β -amirina, composto precursor das saponinas pentacíclicas (Croteau, 2000; Lee et al., 2004; Taiz & Zeiger, 2004). Dessa forma, saponinas e fitoecdisteroides competem por um precursor comum, podendo atuar como competidores metabólicos entre si.

A partir dos vários estudos que remeteram à comprovação das atividades farmacológicas dos compostos presentes nas raízes de *P. glomerata* e de outras espécies do gênero (Magalhães, 2002; Freitas et al., 2004; Daniel et al., 2005; Neto et al., 2005; Zimmer et al., 2006; Mendes, 2011) houve grande ascensão do interesse comercial na espécie. Assim, intensificou-se a exploração predatória das populações naturais da espécie, especialmente originárias da bacia do rio Paraná, levando a um risco de extinção da espécie, assim como do fornecimento desta matéria prima aos mercados (Figueiredo et al. 2004). Essa carência de material vegetal justifica pesquisas para viabilizar o estabelecimento de bancos e coleções de germoplasma, fundamentais para amenizar a pressão ecológica sobre a espécie (Montanari Junior et al., 1999) e o desenvolvimento de estratégias que resultem na maior produção de biomassa de fáfia, assim como no acúmulo de seus metabólitos ativos, para atender a demanda industrial.

P. glomerata apresenta grande variabilidade em sua produção de metabólitos secundários, sendo o cultivo *in vitro* uma alternativa para produção mais homogênea ao longo do tempo (Festucci-Buselli et al., 2008). Nessa espécie, a propagação *in vitro* tem sido estabelecida pelo método tradicional com o uso de ágar e em condições heterotróficas através da proliferação de gemas axilares (Russowski & Nicoloso, 2003; Maldaner et al., 2006; Skrebsky et al., 2006; Nicoloso et al., 2008; Flores et al., 2010). Entretanto, estudos apontam para o sucesso da propagação *in vitro* de *P. glomerata* em condições fotoautotróficas (Iarema et al., 2012) e em condições de enriquecimento de CO₂ (Saldanha, 2011)

A propagação *in vitro* tem sido extensivamente usada para a multiplicação rápida de muitas espécies de plantas. No entanto, apesar de seu potencial, essa técnica tem mostrado inúmeros problemas. Uma das principais limitações é a baixa taxa de sobrevivência das plantas transferidas das condições *in vitro* para o ambiente natural, não controlado (Pospisilova et al. 1999). Essa limitação tem restringido muito a aplicação da técnica de micropropagação para a produção em massa de plantas de alto valor comercial, como frutíferas, medicinais e ornamentais (Badr et al., 2011).

Adaptações das condições de cultivo são importantes estratégias na busca por alta biomassa e produção de metabólitos de interesse, adicionalmente, outro fator que pode ser manipulado com esse mesmo objetivo

é a ploidia da planta. A produção sintética de plantas poliploides por duplicação cromossômica tem sido obtida por interferências no ciclo celular vegetal mediante o uso de agentes antimitóticos. (Dhooghe et al., 2011). A colchicina é um alcaloide extraído de sementes e bulbos de *Colchicum autumnale* que impede a formação do fuso acromático em células em divisão mitótica, sendo o agente antimitótico mais comumente utilizado (Xing et al., 2011). Entretanto, outros compostos podem ser utilizados como orizalina (Allum et al., 2007) e trifluralina (Zlesak et al., 2005). Uma das grandes vantagens da colchicina é que ela não reduz sua atividade após ser autoclavada (Zhang et al., 2007), entretanto, em muitas espécies, ela causa efeitos negativos como esterilidade, crescimento anormal, rearranjos cromossômicos e mutação gênica (Lockett, 1989). Além disso, a colchicina tem alta afinidade com microtúbulos de células animais, sendo muito tóxico a humanos (Morejohn et al., 1984).

Observações morfológicas e fisiológicas que indicam a duplicação cromossômica são, via de regra, bastante simples, no entanto variam muito entre espécies (Zlesak et al., 2005). Uma das características mais comumente usadas refere-se aos estômatos. Plantas diploides tendem a ter menores estômatos quando comparadas às tetraploides (Shiga et al., 2009; Sun et al., 2009). Além do tamanho, alterações na densidade estomática também são verificadas. Menor densidade estomática foi observada em poliploides de *Vitis vinifera* (Yang et al., 2006), *Pennisetum* (Campos et al., 2009), *Lagerstroemia indica* (Zhang et al., 2010), *Gerbera jamesonii* (Gantait et al., 2011), *Passiflora edulis* (Rêgo et al., 2011) e *Ocimum basilicum* (Omidibaigia et al., 2012). O aumento no número de cloroplastos por estômato também é um fator indicador de poliploidia (Ewald et al., 2009; Zhang et al., 2010). Além dos caracteres estomáticos, a poliploidização reduz a espessura foliar, aumenta a relação largura/comprimento das folhas e coloração dessas se tornam mais verdes, assim como flores maiores são verificadas (Kermani et al., 2003; Eeckhaut et al., 2004; Allum et al., 2007; Zhang et al., 2007, 2008).

Para plantas medicinais, poliploides são bastante viáveis, uma vez que exibem aumento de biomassa e da quantidade dos compostos de interesse farmacológico (Gao et al., 1996). Indução de metabólitos secundários tem sido verificada em poliploides de *Salvia miltiorrhiza* (Gao et al., 1996), *Artemisia annua* (Jesus-Gonzalez & Weathers, 2003), *Panax ginseng* (Kim et al., 2004), *Centella asiatica* (Kaensaksiri et al., 2011) e *Pinellia ternate* (He et al., 2012).

Uma vez alcançada a produção massal de mudas com alta qualidade morfo-fisiológica através do cultivo *in vitro*, algumas estratégias de cultivo *ex vitro* também vem sendo traçadas na busca por maiores quantidades de biomassa vegetal e, conseqüentemente, maior volume de metabólitos de interesse. Dentre as condições que podem ser alteradas visando esses objetivos, tem-se a variação do volume de vasos e a aplicação de indutores do metabolismo secundário nas plantas, como o paclobutrazol.

O volume dos recipientes de cultivo interfere bastante na capacidade de retenção de água no substrato, determinando a disponibilidade de ar e água ao sistema radicular durante o cultivo (Gruszynski, 2002). Plantas cultivadas em vasos dispõem de um ambiente restrito para a absorção de água e nutrientes pelas raízes. Sendo assim, os mesmos têm de ser fornecidos adequadamente para que as plantas possam apresentar desenvolvimento satisfatório (Hartman & Kester, 1982). Dessa forma, recipientes de maior volume proporcionam melhor arquitetura do sistema radicular (Parvainen, 1981), maior volume de raízes, melhor absorção de nutrientes, melhor oxigenação do substrato (Bezerra, 2003). A soma desses fatores afeta diretamente a fotossíntese, respiração, teor de clorofila nas folhas, florescimento e produção dessas plantas (Nesmith & Duval, 1998). Dessa forma, a utilização de vasos maiores pode atuar favoravelmente na produção de plantas com maior biomassa.

Paclobutrazol (PBZ) [(2RS, 3RS)-1-(4-chlorophenyl)-4,4-dimethyl-2-(1,2,4-triazol-1-yl) pentan-3-ol] é membro do grupo dos triazóis, reguladores do crescimento vegetal por inibição da síntese de giberelinas (Davis & Curry, 1991; Chizhova et al., 2005). O modo primário de ação do PBZ é através da inibição da enzima ent-caureno oxidase, que catalisa a oxidação sequencial do ent-caureno para ácido ent-caurenóico durante a biossíntese de giberelinas (Graebe, 1987; Rademacher et al., 1987). PBZ apresenta também ação fungicida (Webb & Fletcher, 1996), além de aumentar a tolerância de várias espécies a estresses bióticos e abióticos, como fungos patógenos, seca, poluentes atmosféricos, temperaturas extremas entre outros, sendo assim caracterizado como agente multiprotetor das plantas (Fletcher et al., 2000). Existem evidências de que componentes do sistema fotossintético e moléculas reguladoras da atividade antioxidante constituem alguns dos principais alvos durante a indução de tolerância ao estresse promovida pelo PBZ (Krauss & Fletcher, 1994). Esse triazol promove também resistência ao estresse oxidativo

por induzir antioxidantes e reduzir a atividade de enzimas oxidativas (Lin et al., 2006).

Em relação ao desenvolvimento vegetal, os triazóis induzem uma variedade de respostas bioquímicas e morfológicas nas plantas, incluindo o retardo no crescimento caulinar, o estímulo ao enraizamento, o aumento no teor de pigmentos, a inibição da síntese de giberelinas e indução de citocininas e ácido abscísico (Jaleel et al., 2007). Efeitos estimuladores no metabolismo secundário das plantas tem sido registrados para tratamentos com PBZ, como prolina (Mackay et al., 1990), alcaloides (Jaleel et al., 2009), ácidos caftárico e cicórico (Jones et al., 2009), glicina betaína (Jaleel & Salem, 2010), antocianinas e flavonoides (Ribeiro et al., 2012).

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo principal avaliar a influência do nível de ploidia das plantas no crescimento e produção de metabólitos secundários de *P. glomerata* mantidas em condições *in vitro* e *ex vitro*. Como objetivos secundários, buscou-se avaliar a influência da sacarose e enriquecimento com CO₂ na propagação *in vitro* da espécie (Capítulo 1), assim como a influência do volume de vaso utilizado no cultivo *ex vitro* e da aplicação de PBZ no crescimento das plantas (Capítulo 2), ambos visando também condições que proporcionem maior acúmulo de metabólitos secundários de interesse.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKASHI, T.; FURUNO, T.; TAKAHASHI, T.; AYABE, S. Biosynthesis of triterpenoids in cultured cells and regenerated and wild plants organs of *Taraxacum officinale*. **Phytochemistry**, 36: 303–308, 1994.

ALLUM, J.F.; BRINGLOE, D.H.; ROBERTS, A.V. 2007. Chromosome doubling in a *Rosa rugosa* Thunb. hybrid by exposure of *in vitro* nodes to oryzalin: The effects of node length, oryzalin concentration and exposure time. **Plant Cell Reports**, 26:1977-1984.

ALVES, R.B.N.; MENDES, R.A.; MENDES, M.A.; CARNEIRO, R.M.D.G.; SILVA, D.B.; CARDOSO, L.D.; SALOMÃO, A.N.; VIEIRA, R.F. Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] germplasm conservation. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 8: 1-4, 2006.

ARIGITA, L.; CANÁL, J.; TAMÉS, R.S.; GONZÁLEZ, A. CO₂-enriched microenvironment affects sucrose and macronutrients absorption and promotes autotrophy in the *in vitro* culture of kiwi (*Actinidia deliciosa* Chev. Liang and Ferguson). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, 46: 312-322, 2010.

BADR, A.; ANGERS, P.; DESJARDINS, Y. Metabolic profiling of photoautotrophic and photomixotrophic potato plantlets (*Solanum tuberosum*) provides new insights into acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 107: 13-24, 2011.

BAISTED, D.J. Sterol and triterpene synthesis in the developing and germinating pea seed. **Biochemistry Journal**, 124: 375–383, 1971.

BEZERRA, F.C. **Produção de mudas de hortaliças em ambiente protegido**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2003. 22p.

CAMPOS, J.M.S.; DAVIDE, L.C.; SALGADO, C.C.; SANTOS, F.C.; COSTA, P.N.; SILVA, P.S.; ALVES, C.C.S.; VICCINI, L.F.; PEREIRA, A.V. *In vitro* induction of hexaploid plants from triploid hybrids of *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum*. **Plant Breeding**, 128: 101–104, 2009.

CHA-UM, S.; CHANSEETIS, C.; CHINTAKOVID, W.; PICHAKUM, A.; SUPAIBULWATANA, K. Promoting root induction and growth of *in vitro* macadamia (*Macadamia tetraphylla* L. 'Keaau') plantlets using CO₂-enriched photoautotrophic conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 106: 435-444, 2011.

CHIZHOVA, S.I.; PAVLOVA, V.V.; PRUSAKOVA, L.D. Abscisic acid content and growth of spring barley plants treated with triazoles. **Russian Journal of Plant Physiology**, 52: 108-114, 2005.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N.G. Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Eds.).

Biochemistry & Molecular Biology of Plants. Courier Companies, Rockville, 1250-1318, 2000.

DAVIS, T.D.; CURRY, E.A. Chemical regulation of vegetative growth. **Critical Reviews in Plant Sciences**, 10: 151–188, 1991.

DANIEL, J.F. de S.; ALVES, K.Z.; SILVA, J.D.; DA SILVA E SOUZA, P.V.; D CARVALHO, M.G.; FREIRE, R.B.; FERRERIA, D.T.; FREIRE, M.F.I. Free radical scavenging activity of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). **Indian Journal Pharmacology**, v.37, p.174-178, 2005.

De PARIS, F.; NEVES, G.; SALGUEIRO, J. B.; QUEVEDO, J. IZQUIERDO, I.; RATES, S.M. Psychopharmacological screening of *Pfaffia glomerata* Spreng. (Amaranthaceae) in rodents. **Journal Ethnopharmacological**, 73: 261-269, 2000.

DHOOGHE, E.; LAERE, K.V.; EECKHAUT, T.; LEUS, L.; HUYLENBROECK, J.V. Mitotic chromosome doubling of plant tissues *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 104: 359-373, 2011.

DINAN, L. Phytoecdisteroids: biological aspects. **Phytochemistry**, 57: 323-339, 2001.

DINAN, L.; HARMATHA, J.; VOLODIN, V.; LAFONT, R. **Phytoecdysteroids: Diversity, Biosynthesis and Distribution.** In: Smaghe, G.(ed). Ecdysone: Structures and Functions. 2009.

EECKHAUT, T.; WERBROUCK, S.; LEUS, L.; VAN BOCKSTAELE, E.; DEBERGH, P. Chemically induced polyploidization in *Spathiphyllum wallisii* Regel through somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 78: 241–246, 2004.

EWALD, D.; ULRICH, K.; NAUJOKS, G.; SCHRODER, M.B. Induction of tetraploid poplar and black locust plants using colchicine: chloroplast number as an early marker for selecting polyploids *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 99: 353–357, 2009.

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

FIGUEIREDO, L.S.; TEIXEIRA, S.L.; FREITAS, S.P.; VIEIRA, I.J.C.; MARTINS, E.R. Comportamento de acessos de *Pfaffia glomerata* nas condições de campo de Goytacazes-RJ. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, 7: 67-72, 2004.

FLETCHER, R.A.; GILLEY, A.; SANKHLA, N.; DAVIS, T.D. Triazoles as plant growth regulators and stress protectants. **Horticulture Reviews** 24: 55–137, 2000.

FLORES, R. **Cultura de tecidos e produção de β -ecdisona em *Pfaffia glomerata* e *Pfaffia tuberosa* (Amaranthaceae).** 2006. 165p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

FLORES, R.; BRONDANI, D.; CEZAROTTO, V.; GIACOMELLI, S.R.; NICOLOSO, F.T. Micropropagation and β -ecdysone content of the Brazilian ginsengs *Pfaffia glomerata* and *Pfaffia tuberosa*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, 4: 210-217, 2010.

FREITAS, C.S.; BAGGIO, C.H.; Da SILVA-SANTOS, J.E., RIECK L.; De MORAES, C.A.; CORREA, J.R.C.; MING, L.C.; CORTEZ, D.A.G.; MARQUES, M.C.A. Involvement of nitric oxide in the gastroprotective effects of an aqueous extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, Amaranthaceae, in rats. **Life Science**, 74: 1167-1179, 2004.

GANTAIT, S.; MANDAL, N.; BHATTACHARYYA, S.; DAS, P.K. Induction and identification of tetraploids using in vitro colchicine treatment of *Gerbera jamesonii* Bolus cv. Sciella. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 106: 485-493, 2011.

GAO, S.L.; ZHU, D.N.; CAI, Z.H.; XU, D.R. Autotetraploid plants from colchicine-treated bud culture of *Salvia miltiorrhiza* Bge. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 47: 73-77, 1996.

GRAEBE, J.E. Gibberellin biosynthesis and control. **Annual Review of Plant Physiology**, 38:419-465, 1987.

GROUT, B.W.W. Photosynthesis of regenerated plantlets *in vitro*, and the stress of transplanting. **Acta Horticulturae**, 230: 129-135, 1988.

GRUSZYNSKY, C. **Resíduo agro-industrial “casca de Tungue” como componente de substrato para plantas**. 2002, 103f. Dissertação (Mestrado em Horticultura) – Programa de Pós-Graduação em Horticultura, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E. **Plant propagation, principles and practices**. 6.ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1997. 770 p.

HE, L.Y.; DING, Z.; JIANG, F.; JIN, B.; LI, W.; DING, X.; SUN, J.; LV, G. Induction and identification of hexadecaploid of *Pinellia ternate*. **Euphytica**, 186: 479-488, 2012.

HIDDER, C.; DESJARDINS, Y. Effects of sucrose on photosynthesis and phosphoenolpyruvate carboxylase activity of *in vitro* cultured strawberry plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 36: 27-33, 1994.

IAREMA, L.; CRUZ, A.C.F. da; SALDANHA, C.W.; DIAS, L.L.C.; VIEIRA, R.F.; OLIVEIRA, E.J. de; OTONI, W.C. Photoautotrophic propagation of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 110:227-238, 2012.

JALEEL, C.A.; MANIVANNAN, P.; SANKAR, B.; KISHOREKUMAR, A.; SANKARI, S.; PANNEERSELVAM, R. Paclobutrazol enhances photosynthesis and ajmalicine production in *Catharanthus roseus*. **Process Biochemistry**, 42: 1566-1560, 2007.

JALEEL, C.A.; GOPI, R.; GOMATHINAYAGAM, M.; PANNERSELVAM, R. Traditional and non-traditional plant growth regulators alters phytochemical constituents in *Catharanthus roseus*. **Process Biochemistry**, 44: 205-209, 2009.

JALEEL, C.A.; SALEM, M.A. Fate of biochemical components of *Catharanthus roseus* after treatment with different plant growth regulators. **Australian Journal of Agricultural Engineering**, 1: 45-53, 2010.

JESUS-GONZALEZ, L.; WEATHERS, P.J. Tetraploid *Artemisia annua* hairy roots produce more artemisinin than diploids. **Plant Cell Reports**, 21: 809-813, 2003.

JONES, M.P.A.; SAXENA, P.K.; MURCH, S.J. Elicitation of secondary metabolism in *Echinacea purpurea* L. by gibberellic acid and triazoles. **Engineering of Life Sciences**, 9: 205-210, 2009.

KAENSAKSIRI, T.; SOONTORNCHAINAKSAENG, P.; SOONTHORNCHAREONNON, N.; PRATHANTURARUG, S. *In vitro* induction of polyploidy in *Centella asiatica* (L.) Urban. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 107: 187-194, 2011.

KERMANI, M.J.; SARASAN, V.; ROBERTS, A.V.; YOKOYA, K.; WENTWORTH, J.; SIEBER, V.K. Oryzalin-induced chromosome doubling in *Rosa* and its effect on plant morphology and pollen viability. **Theoretical and Applied Genetics** 107: 1195–1200, 2003.

KIM, Y.S.; HAHN, E.J.; MURTHY, H.N.; PAEK, K.Y. Effect of polyploidy induction on biomass and ginsenoside accumulations in adventitious roots of ginseng. **Journal of Plant Biology**, 47: 356-360, 2004.

KLEIN, R. Phytoecdysteroids. **Journal of the American Herbalist Guild**, 7: 10-20, 2004.

KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation - Environmental control for promoting photosynthesis. **Propagation of Ornamental Plants**, 10: 188-204, 2010.

KOZAI, T; KUBOTA, C. Developing a photoautotrophic micropropagation system for woody plants. **Journal of Plant Research**, 114: 525-537, 2001.

KRAUS, T.E.; FLETCHER, R.A. Paclobutrazol protects wheat seedlings from heat and paraquat injury. Is detoxification of active oxygen involved? **Plant Cell Physiology**, 35:45–52, 1994.

LEE, M.; JEONG, J.; SEO, J.; SHIN, C.; KIM, Y.; IN, J.; YANG, D.; YI, J.; CHOI, Y. Enhanced triterpene and phytosterol biosynthesis in *Panax ginseng* overexpressing squalene synthase gene. **Plant and Cell Physiology**, 48: 976-984, 2004.

LIN, K.H.; PAI, F.H.; HWANG, S.Y.; LO, H.F. Pre-treating paclobutrazol enhanced chilling tolerance of sweetpotato. **Plant Growth Regulation**, 49: 249–262, 2006.

- LUCKETT, D. Colchicine mutagenesis is associated with substantial heritable variation in cotton. **Euphytica**, 42: 177–182, 1989.
- MACKAY, C.; HALL, J.; HOFSTRA, G.; FLETCHER, R. Uniconazole-induced changes in abscisic acid, total amino acids and proline in *Phaseolus vulgaris*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 37: 74–82, 1990.
- MAGALHÃES, P.M. de. **Agrotecnologia para o cultivo da *Pfaffia***. Campinas: CPQBA-UNICAMP, 2002, 5p.
- MALDANER, J.; NICOLOSO, F.T.; SANTOS, E.S.; FLORES, R.; SKREBSKY, E.C. Sacarose e nitrogênio na multiplicação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Ciência Rural**, 36: 1201-1206, 2006.
- MARION-POLL, F.; DESCOINS, C. Taste detection of phytoecdysteroids in larvae of *Bombyx mori*, *Spodoptera littoralis* and *Ostrinia nubilalis*. **Journal of Insect Physiology**, 48: 467-476, 2002.
- MENDES, F.R. Tonic, fortifier and aphrodisiac: adaptogens in the Brazilian folk medicine. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 21: 754-763, 2011.
- MINGOZZI, M.; MONTELLO, P.; MERKLE, S. Adventitious shoot regeneration from leaf explants of eastern cottonwood (*Populus deltoides*) cultured under photoautotrophic conditions. **Tree Physiology**, 29: 333-343, 2009.
- MONTANARI JÚNIOR, I. **Aspectos do cultivo comercial do ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen)**. São Paulo: CPQBA-UNICAMP, 1999. 3p. (Boletim Agroecológico, 12).
- MOREJOHN, L.C.; BUREAU, T.E.; TOCCHI, L.P.; FOSKET, D.E. Tubulins from different higher-plant species are immunologically nonidentical and bind colchicine differentially. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 81: 1440–1444, 1984.
- MOSALEEYANON, K.; CHAN-UM, S.; KIRMANEE, C. Enhanced growth and photosynthesis of rain tree (*Samanea saman* Merr.) plantlets *in vitro* under a CO₂-enriched condition with decreased sucrose concentrations in the medium. **Scientia Horticulturae**, 103:51–63, 2004.
- MOSALEEYANON, K.; ZOBAYED, S.M.A.; AFREEN, F.; KOZAI, T. Relationships between net photosynthetic rate and secondary metabolite contents in St. John's wort. **Plant Science**, 169: 523-531, 2005.
- NESMITH, D.S.; DUVAL, J.R. The effect of container size. **HortTechnology**, 8: 495–498, 1998.
- NETO, A.G.; SILVA FILHO, A.A.; COSTA, J.M.L.C.; VINHOLIS, A.H.C.; SOUZA, G.H.B.; CUNHA, W.R.; SILVA, M.L.A.E.; ALBUQUERQUE, S.; BASTOS, J.K. Evaluation of the trypanocidal and leishmanicidal *in vitro* activity of the crude hydroalcoholic extract of *Pfaffia glomerata* (Amaranthaceae) roots. **Phytomedicine**, 11: 662-665, 2004.
- NETO, A.G.; COSTA, J.M.L.C.; BELATI, C.C.; VINHOLIS, A.H.C.; POSSEBOM, L.S.; Da SILVA FILHO, A.A.; CUNHA, W.R.; CARVALHO, J.C.T.;

BASTOS, J.K.; SILVA, M.L.A. Analgesic and anti-inflammatory activity of a crude root extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Journal of Ethnopharmacology**, 96: 87-91, 2005.

NGUYEN, Q.T.; KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation of woody species. In: KOZAI, T.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S.M.A. (Eds.) **Photoautotrophic (sugar-free medium) Micropropagation as a New Micropropagation and Transplant Production System**. Springer: Dodrecht, p.123-146, 2005.

NICOLOSO, F.T.; FERRÃO, G.E.; CASTRO, G.Y. pH do meio de cultivo e crescimento de plântulas de ginseng brasileiro cultivadas *in vitro*. **Ciência Rural**, 38: 2059-2062, 2008.

NORIKANE, A.; TAKAMURA, T.; MOROKUMA, M.; TANAKA, M. In vitro growth and single-leaf photosynthetic response of *Cymbidium* plantlets to super-elevated CO₂ under cold cathode fluorescent lamps. **Plant Cell Reports**, 29: 273-283, 2010.

OMIDBAIGI, R.; MIRZAEI, M.; HASSANI, M.E.; MOGHADAM, M.S. Induction and identification of polyploidy in basil (*Ocimum basilicum* L.) medicinal plant by colchicine treatment. **International Journal of Plant Production**, 4: 87-98, 2010.

PARK, S.Y.; MOON, H.K.; MURTHY, H.N.; KIM, Y.W. Improved growth and acclimatization of somatic embryo-derived *Oplopanax elatus* plantlets by ventilated photoautotrophic culture. **Biologia Plantarum**, 55: 559-562, 2011.

PARVAINEN, J.V, **Avaliação de qualidade de mudas florestais**. In: Seminário de sementes e viveiros florestais, p.59-90, 1981.

POSPÍSILOVÁ J, TICHÁ, I.; KADLECEK, P.; HASEL, D.; PLZÁKOVÁ, S. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. **Biologia Plantarum**, 42: 481–497, 1999.

PREMAKUMAR, A.; MERCADO, J.A.; QUESADA, M.A. Effects of *in vitro* tissue culture conditions and acclimatization on the content of Rubisco, leaf soluble proteins, photosynthetic pigments, and C/N ratio. **Journal of Plant Physiology**, 158: 835–840, 2001.

RADEMACHER, W.; FRITSCH, H.; GRAEBE, J.E.; SAUTER, A.; JUNG, J. Tetcyclacis and triazole plant growth retardants: Their influence on the biosynthesis of gibberellins and other metabolic processes. **Pesticide Science**, 21:241–252, 1987.

RATES, S.M.K.; GOSMANN, G. Gênero *Pfaffia*: aspectos químicos, farmacológicos e implicações para seu emprego terapêutico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 12: 85-93, 2002.

RÊGO, M.M.; RÊGO, E.R.; BRUCKNER, C.H.; FINGER, F.L.; OTONI, W.C. *In vitro* induction of autotetraploids from diploid yellow passion fruit mediated by colchicine and oryzalin. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 107: 451-453, 2011.

RIBEIRO, D.M.; ARAÚJO, W.L.; FERNIE, A.R.; SCHIOOERS, J.H.M.; MUELLER-ROEBER, B. Translatome and metabolome effects triggered by gibberellins during rosette growth in *Arabidopsis*. **Journal of Experimental Botany**, 63: 2769-2786, 2012.

RUSSOWSKI, D.; NICOLOSO, F.T. Nitrogênio e fósforo no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. **Ciência Rural**, 33: 57-63, 2003.

SALDANHA, C.W. **Influência das trocas gasosas e do enriquecimento com CO₂ na propagação *in vitro* de fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]**. 2011. 101p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2011.

SALDANHA, C.W.; OTONI, C.G.; AZEVEDO, J.L.F. de; DIAS, L.L.C.; RÊGO, M.M.do; OTONI, W.C. A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 110: 413-422, 2012.

SAVCHENKO, T.; WHITING, P.; ŠIK, V.; UNDERWOOD, E.; SARKER, SD.; DINAN, L. Distribution and identity of phytoecdysteroids in *Gomphrena* spp. (Amaranthaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, 26: 337-346, 1998.

SCHONHOF, I.; KLÄRING, H.P.; KRUMBEIN, A.; SCHREINER, M. Interaction between atmospheric CO₂ and glucosinolates in broccoli. **Journal of Chemical Ecology**, 33:105-114, 2007.

SHIGA, I.; UNO, Y.; KANECHI, M.; INAGAKI, N. Identification of polyploidy of *in vitro* anther-derived shoots of *Asparagus officinalis* L. by flow cytometric analysis and measurement of stomatal length. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, 78: 103–108, 2009.

SHIOBARA, Y.; INOUE, S.; KATO, K. A nortriterpenoid, triterpenoid and ecdysteroids from *Pfaffia glomerata*. **Phytochemistry**, 32: 1527-1530, 1993.

SILVA, J.A.T.; GIANG, D.D.T.; TANAKA, M. Photoautotrophic micropropagation of *Spathiphyllum*. **Photosynthetica**, 44: 53-61, 2006.

SILVA, T.C. da. **Efeitos anti-neoplásicos da raiz de *Pfaffia paniculata* (Ginseng brasileiro) no modelo de hepatocarcinogênese murina e em cultura de células de hepatocarcinoma humano**. 2008. 178p. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) – Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada), Universidade De São Paulo, São Paulo, 2008.

SKREBSKY, E.C.; NICOLOSO, F.T.; MALDANER, J. Substratos na aclimatização de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen produzida *in vitro* sob diferentes doses de sacarose. **Ciência Rural**, 36: 1416-1423, 2006.

SUN, Q.R.; SUN, H.S.; LI, L.G.; BELL, R.L. *In vitro* colchicine-induced polyploid plantlet production and regeneration from leaf explants of the diploid pear

- (*Pyrus communis* L.) cultivar 'Fertility'. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, 84: 548–552, 2009.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Atmed, 2004. 719p.
- TROJANOWSKA, M.R.; OSBOURN, A.E.; DANIELS, M.J.; THRELFALL, D.R. Biosynthesis of avenins and phytosterols in roots of *Avena sativa* cv. imagine. **Phytochemistry**, 54: 153–164, 2000.
- VAN DER HEIJDEN, R.; THRELFALL, D.R.; VERPOORTE, R.; WHITEHEAD, I.M. Regulation and enzymology of pentacyclic triterpenoid phytoalexin biosynthesis in cell suspension cultures of *Tabernaemontana divaricata*. **Phytochemistry**, 28: 2981–2988, 1989.
- VIDAL, M.R.R. Flórmula de Viçosa. I. Chenopodiaceae e Amaranthaceae. **Revista Ceres**, v: 46-79, 1967.
- VIGO, C.L.S.; NARITA, E.; MARQUES, L.C. Validação da metodologia de quantificação espectrofotométrica das saponinas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 13: 46-49, 2003.
- WEBB, J.A.; FLETCHER, R.A. Paclobutrazol protects wheat seedlings from injury due to waterlogging. **Plant Growth Regulation**, 16: 201–206, 1996.
- XIAO, Y.; KOZAI, T. In vitro multiplication of static plantlets using sugar-free media. **Scientia Horticulturae**, 109: 71-77, 2006.
- XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 105: 149-158, 2011.
- XING, S.H.; GUO, X.B.; WANG, Q.; PAN, Q.F.; TIAN, Y.S.; LIU, P.; ZHAO, J.Y.; WANG, G.F.; SUN, X.F.; TANG, K.X. 2011. Induction and flow cytometry identification of tetraploids from seed-derived explants through colchicine treatments in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, vol. 2011, 10p.
- YANG, L.; ZAMBRANO, Y.; HU, C.J.; CARMONA, E.R.; BERNAL, A.; PÉREZ, A.; ZAYAS, C.M.; LI, Y.R.; GUERRA, A.; SANTANA, I.; ARENCIBIA, A.D. Sugarcane metabolites produced in CO₂-rich temporary immersion bioreactors (TIBs) induce tomato (*Solanum lycopersicum*) resistance against bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 46: 558-568, 2010.
- YANG, X.; CAO, Z.; AN, L.; WANG, Y.; FANG, X. In vitro tetraploid induction via colchicine treatment from diploid somatic embryos in grapevine (*Vitis vinifera* L.). **Euphytica**, 152: 217–224, 2011.
- YOON, Y.J.; MOBIN, M.; HAHN, E.J.; PAEK, K.Y. Impact of *in vitro* CO₂ enrichment and sugar deprivation on acclimatory responses of *Phalaenopsis*

- plantlets to *ex vitro* conditions. **Environmental and Experimental Botany**, 65: 183-188, 2009.
- ZHANG, J.; ZHANG, M.; DENG, X. Obtaining autotetraploids in vitro at a high frequency in *Citrus sinensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 89: 211–216, 2007.
- ZHANG, Z.; DAI, H.; XIAO, M.; LIU, X. *In vitro* induction of tetraploids in *Phlox subulata* L. **Euphytica** 159:59–65, 2008.
- ZHANG, Q.Y.; LUO, F.X.; LIU, L.; GUO, F.C. *In vitro* induction of tetraploids in crape myrtle (*Lagerstroemia indica* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 101:41–47, 2010.
- ZIMMER, A.R.; BRUXEL, F.; BASSANI, V.L.; GOSMANN, G HPLC method for the determination of ecdysterone in extractive solution from *Pfaffia glomerata*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 40: 450-453, 2006.
- ZLESAK, D.C.; THILL, C.A.; ANDERSON, N.O. Trifluralin-mediated polyploidization of *Rosa chinensis minima* (Sims) Voss seedlings. **Euphytica**, 141: 281-290, 2005.
- ZOBAYED, S.M.A.; MURCH, S.J.; RUPASINGHE, H.P.V.; SAXENA, P.K. Elevated carbon supply altered hypericin and hyperforin contents of St. John's wort (*Hypericum perforatum*) grown in bioreactors. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 75:143-149, 2003.

CAPITULO I

**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO E ACÚMULO DE 20-
HIDROXIECDISONA EM DIPLOIDES E TETRAPLOIDES DE
Pfaffia glomerata (SPRENG.) PEDERSEN EM RESPOSTA À
PRESENÇA DE SACAROSE E CONCENTRAÇÕES DE CO₂**

Avaliação do crescimento e acúmulo de 20-hidroxiecdisona em diploides e tetraploides de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen em resposta à presença de sacarose e concentrações de CO₂

RESUMO

Pfaffia glomerata é uma planta medicinal de grande interesse econômico devido ao acúmulo de fitoecdisteroides, em especial o 20-hidroxiecdisona (20E). Fatores como ocorrência de trocas gasosas, adição de sacarose ao meio de cultura, e enriquecimento da atmosfera com CO₂ alteram amplamente as condições de cultivo *in vitro*, levando a alterações morfológicas e fisiológicas em plantas. A poliploidização vem sendo uma estratégia aplicada para promover a maior produção de metabólitos em espécie medicinais. O objetivo desse trabalho foi avaliar a influência da utilização de explantes diploides e tetraploides de fáfia submetidos ao crescimento *in vitro* em meio suplementado ou não com sacarose, em atmosfera com concentrações diferentes de CO₂ no crescimento e acúmulo de 20E em *P. glomerata*. O crescimento das plantas *in vitro* foi induzido em maior extensão pela adição de 15 g/L de sacarose ao meio de cultura. Entretanto, verificou-se que plantas crescidas em meio com sacarose apresentam inibição no acúmulo de 20E. Atmosfera concentrada com 1.000 µmol/mol de CO₂ foi eficiente na indução do crescimento, do acúmulo de pigmentos fotossintéticos e aumento no teor de 20E nas folhas. Os parâmetros de crescimento e quantificação de 20E foram negativamente influenciados pela duplicação cromossômica das plantas. Assim, o cultivo *in vitro* fotoautotrófico de fáfia sob condições de enriquecimento de CO₂ propicia a produção massal de plantas com alto teor de 20E para atender às demandas das indústrias farmacêuticas para a espécie. Conclui-se também que, nas condições experimentais, a indução de poliploidia em *P. glomerata* não corresponde às expectativas esperadas em níveis de crescimento e produção de metabólitos.

Palavras-chave: *Pfaffia glomerata*, 20-hidroxiecdisona, cultivo *in vitro*, poliploidia, sacarose, ventilação forçada; enriquecimento de CO₂.

1. INTRODUÇÃO

Pfaffia glomerata (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae) é uma herbácea perene nativa do Brasil e vem sendo considerada a espécie de ginseng brasileiro de maior importância medicinal e comercial (Zimmer et al., 2006). A atividade farmacológica da espécie é relacionada à presença de fitoecdisteróides, sendo o 20-hidroxiecdisona (20E) o mais frequentemente encontrado e amplamente distribuído no gênero (Bakrim et al., 2008). Estes metabólitos secundários apresentam aplicações agroquímicas, biotecnológicas, medicinais e farmacêuticas, além de ter ação efetiva nos mecanismos de defesa das plantas contra ataque de insetos fitófagos (Festucci-Buselli et al., 2008; Dinan et al., 2009). Várias patentes têm sido registradas em função das propriedades acima descritas do gênero *Pfaffia* (Shibuya et al., 2001; Bernard & Gautier, 2005; Olalde, 2008; Rangel, 2008; Loizou, 2009; Higuchi, 2011).

No entanto, a produção de 20E na espécie é muito baixa, chegando a teores em torno de 0,75% na massa seca de raízes de plantas cultivadas *ex vitro* (Kamada et al., 2009) e a um mínimo de 0,035% na massa seca da parte aérea de plantas mantidas *in vitro* (Iarema et al., 2012). Na tentativa de aumentar a produção de 20E em *P. glomerata* várias estratégias vem sendo desenvolvidas, como modificações nas condições de cultivo *in vitro* para que proporcionem obtenção de material vegetal homogêneo de alta qualidade e maior acúmulo de metabólitos, e também a indução de poliploides para seleção de indivíduos que, potencialmente, apresentem elevados teores de 20E.

A propagação *in vitro* por gemas axilares de segmentos nodais tem se mostrado uma importante alternativa no cultivo de *P. glomerata* (Russowski & Nicoloso, 2003; Maldaner et al., 2007; Iarema et al., 2012), favorecendo a produção de matéria-prima requerida pela indústria farmacêutica, bem como a conservação de recursos genéticos da espécie em bancos de germoplasma estabelecidos *in vitro*.

Tradicionalmente, o cultivo *in vitro* é realizado em sistema heterotrófico, com frascos de cultivo vedados, sendo caracterizado por um ambiente com elevada umidade relativa, reduzida troca gasosa com o ambiente externo, baixa concentração de CO₂, baixa densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (PPFD), elevada quantidade de açúcar no meio de cultura, e acúmulo de etileno (Hazarika, 2006). Esses fatores podem afetar o

vigor dos tecidos, as taxas de multiplicação, a sobrevivência após a transferência das plantas para condições *ex vitro*, além de inúmeras outras características anatômicas, morfológicas e fisiológicas (Kozai et al., 2005; Park et al., 2011). Plantas crescidas neste sistema, dito heterotrófico, apresentam baixas taxas fotossintéticas, e requerem adição de açúcar ao meio de cultivo como fonte de carboidratos (Xiao et al., 2011).

Dessa forma, estudos recentes apontam para o sucesso da propagação *in vitro* de *P. glomerata* em condições fotomixotróficas e fotoautotróficas (Iarema et al., 2012), com ou sem enriquecimento de CO₂ (Saldanha et al., 2012). A fotomixotrofia pode ser obtida pelo aumento das trocas gasosas entre o interior do frasco de cultivo e o ambiente externo, enquanto a fotoautotrofia é obtida também pelo aumento das trocas gasosas, no entanto com a exclusão de carboidratos do meio de cultura (Kozai, 1991).

A utilização de frascos com membranas que permitem as trocas gasosas levam a modificações do microambiente interno dos recipientes pois favorece a manutenção da concentração de CO₂ e a redução da umidade relativa, com conseqüente aumento da evapotranspiração e da efetiva absorção de água e nutrientes pela planta (Kozai & Kubota, 2001). A concentração de CO₂ e a qualidade de luz são consideradas os principais fatores que afetam o crescimento e a capacidade fotossintética de plantas *in vitro* (Kozai, 2010; Norikane et al., 2010). Dessa forma o enriquecimento da atmosfera *in vitro* com CO₂ tem sido uma estratégia para aumentar o crescimento das plantas (Kozai, 2010; Norikane et al., 2010; Badr et al., 2011; Cha-um et al., 2011; Xiao et al., 2011), além de proporcionar alterações do perfil metabólico (Badr et al., 2011) e do acúmulo de metabólitos secundários em função de variações na concentração de CO₂ na atmosfera (Zobayed et al., 2003; Mosaleeyanon et al., 2005; Couceiro et al., 2006; Schonhof et al., 2007; Yang et al., 2010).

Associado ao enriquecimento da atmosfera com CO₂, a remoção de açúcares no sistema fotoautotrófico proporciona o aumento das taxas fotossintéticas sendo capaz de manter os carboidratos necessários ao metabolismo, além de prevenir o rápido crescimento de microrganismos na cultura, reduzir os custos de produção, aumentar a sobrevivência das plantas durante a aclimatização e o acúmulo de metabólitos secundários produzidos pelas plantas (Mosaleeyanon et al., 2004; Kozai, 2010; Xiao et al., 2011).

Como outra estratégia para obtenção de maior biomassa vegetal e, conseqüentemente, maior produção de metabólitos secundários de alto valor econômico, a indução da poliploidização tem tido bastante relevância. Plantas poliploides apresentam características favoráveis em relação às diploides, como aumento da tolerância à seca, da resistência a pesticidas, da biomassa e tamanho dos órgãos, dentre outros (Osborn et al., 2003). A poliploidização induz maior acúmulo de biomassa das partes vegetativas (Dhooghe et al., 2011), nas quais os compostos de interesse se acumulam, assim como promove maior acúmulo de metabólitos secundários em algumas espécies (Gao et al., 1996; Jesus-Gonzalez & Weathers, 2003; Kim et al., 2004; Kaensaksiri et al., 2011; He et al., 2012).

Uma vez que em nosso laboratório obtivemos poliploides de um dos acessos do banco de germoplasma de *P. glomerata*, e nenhum relato de obtenção e posterior avaliação morfofisiológica de poliploides na espécie tem sido verificado na literatura, o presente estudo teve como objetivo avaliar a influência do enriquecimento da atmosfera com CO₂, da suplementação de sacarose ao meio de cultivo e da ploidia de *P. glomerata* na propagação *in vitro* e acúmulo de 20E.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e condições de cultura

As plantas tetraploides foram anteriormente obtidas artificialmente após o tratamento dos segmentos nodais com colchicina, na concentração de 25 μM , durante uma semana, e tiveram o nível de ploidia confirmado por citometria de fluxo (Doležel & Bartos, 2005), realizada em parceria com o Laboratório de Genética da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Segmentos nodais (2 cm de comprimento), com um par de folhas e duas gemas axilares, foram retirados de plantas diploides e tetraploides de *Pfaffia glomerata* (acesso LCT22) cultivadas *in vitro* sob condições heterotróficas e inoculados em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 7 g/L de ágar (Merck[®], Alemanha) e 100 mg/L de mio-inositol. Foram adicionadas ao meio de cultivo 15 g/L de sacarose em apenas metade das unidades experimentais. O pH do meio foi ajustado para 5,7 e autoclavado a 121°C e pressão 1 kgf/cm² durante 15 minutos. Foram utilizados frascos de 750 mL formada da união de duas Magentas[®] (Sigma Chemical Company, EUA) de polipropileno invertidas e unidas por acopladores (Sigma Chemical Company, EUA), contendo cinco explantes e 100 mL de meio de cultura. As culturas foram mantidas em sala de crescimento a 25 \pm 2°C sob irradiância de 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas.

As trocas gasosas entre o ambiente do frasco e o ambiente externo foram proporcionadas por dois orifícios de 10 mm de diâmetro na tampa do frasco cobertos por membrana fluoroporo hidrofóbica (PTFE; MilliSeal[®] Air Vent, Tóquio, Japão) de 0,45 μm de poro. O número de trocas gasosas de cada frasco com membrana foi estimado em 0,36 trocas por hora, conforme Fujiwara & Kozai (1995).

Para a obtenção da atmosfera enriquecida com 1.000 $\mu\text{mol}/\text{mol}$ de CO_2 ou com a concentração ambiente de 360 $\mu\text{mol}/\text{mol}$ de CO_2 , os frascos de cultivo foram colocados dentro de uma câmara de acrílico (41 cm de largura x 26 cm de altura x 50 cm comprimento). O ar enriquecido com CO_2 foi obtido mediante o uso de mistura gasosa comercial com composição de 1.000 $\mu\text{mol}/\text{mol}$ de CO_2 , com balanço de gás Nitrogênio (N_2) (Air Products Brasil Ltda, Mogi das Cruzes, Brasil), o qual foi injetado na câmara enriquecida com fluxo de 1 L/min, assim como o ar atmosférico na câmara sem enriquecimento. A

umidade relativa no interior das câmaras foi mantida em $50 \pm 10\%$. A concentração de CO_2 do ar utilizado no tratamento de $1.000 \mu\text{mol/mol}$ de CO_2 foi ajustada com auxílio de um analisador de gás no infravermelho modelo S153 CO_2 Analyzer (Qubit System, Canadá).

Os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado em arranjo trifatorial ($2 \times 2 \times 2$), composto por dois ambientes de incubação (atmosfera enriquecida ou não com CO_2), duas condições de cultivo do explante no frasco de cultura (meio MS sem sacarose ou suplementado de 15 g/L de sacarose), e de duas ploidias distintas da planta (diploide e tetraploide), totalizando oito tratamentos (Quadro 1). Cada repetição foi composta por cinco magentas, sendo a unidade experimental composta por cinco plantas por Magenta[®].

Quadro 1. Tratamentos utilizados na avaliação do desempenho de explantes nodais de *Pfaffia glomerata* de diferentes ploidias, cultivados em ambientes de incubação distintos, com acréscimo ou não de sacarose ao meio de cultivo.

Tratamento	Ambiente de incubação ($\mu\text{mol/mol}$ de CO_2)	Sacarose (g/L)	Ploidia do explante
1	360	0	Diploide
2	360	0	Tetraploide
3	360	15	Diploide
4	360	15	Tetraploide
5	1.000	0	Diploide
6	1.000	0	Tetraploide
7	1.000	15	Diploide
8	1.000	15	Tetraploide

2.2 Avaliações do crescimento

Aos 30 dias de cultivo *in vitro* nas condições acima descritas, foram avaliadas a altura das plantas (cm) e as massas secas das folhas, caules e raízes por planta (g). As amostras foram secas em estufa com ventilação forçada (ACB Larbor) a 60°C , até obter peso constante.

2.3 Determinação de pigmentos fotossintéticos

Para determinação dos pigmentos fotossintéticos, foi utilizado um disco foliar com 7 mm de diâmetro, sendo retirado do segundo par de folhas expandidas a partir do meristema apical das plantas de fáfia e incubados em 1,25 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) durante 48 horas em tubos mantidos no escuro, à temperatura ambiente (Santos et al., 2008). Após o período de incubação, a absorvância das amostras foi determinada nos comprimentos de onda de 665, 645 e 480 nm (Wellburn, 1994), usando-se um espectrofotômetro Genesys 10UV (Thermo Scientific, EUA) com cubeta de quartzo de 10 mm de caminho ótico. O cálculo das concentrações das clorofilas *a*, *b* e carotenóides foi baseado em metodologia descrita por Wellburn (1994).

2.4 Determinação do teor de 20-hidroxicdisona (20E)

O teor de 20E foi determinado em folha, caule e raiz de plântulas de fáfia pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), segundo metodologia descrita por Kamada et al. (2009).

As amostras foram obtidas por extrato metanólico, utilizando-se 100 mg de material vegetal seco pulverizado de *P. glomerata* misturado com 10 mL de metanol grau HPLC, exceto para as raízes. Para as raízes, por não alcançarem 100 mg, a extração metanólica foi realizada proporcionalmente à massa seca obtida. Durante a extração metanólica, o extrato vegetal foi armazenado em tubos Falcon de 15 mL, mantidos no escuro a temperatura ambiente durante sete dias, sob agitação diária. Posteriormente, os extratos foram centrifugados por 20 minutos a 5.000 rpm em tubos Falcon e o sobrenadante foi coletado e centrifugado novamente por 15 minutos a 5.000 rpm, agora em Eppendorfs de 1,5 mL. Em seguida, o extrato metanólico foi analisado por CLAE, em equipamento Shimadzu LC-10AI, acoplado ao detector de UV-vis SPD-10AI, CBM-10A e coluna Bomdesil C-18 (5,0 µm x 4,6 mm x 250 mm). O interior do equipamento foi mantido em temperatura ambiente $20 \pm 2^\circ\text{C}$. A fase móvel isocrática utilizada consistiu de metanol grau HPLC e água, na proporção 1:1 (v/v), com fluxo de 0,7 mL/min. O volume da amostra injetada foi de 20 µL, sendo que a leitura foi realizada em $\lambda = 245$ nm. O tempo de corrida da amostra foi de 15 minutos. Os dados foram integrados por meio do "software" Shimadzu LC10.

A curva de calibração foi obtida preparando-se soluções-padrão de 20E (Sigma-Aldrich) em metanol grau HPLC nas concentrações de 10, 20, 40, 60, 80 ppm. A equação da reta obtida pela curva de calibração foi $Y = 71918x - 19946$, com $R^2 = 0.981$.

2.5 Análise estatística

Os dados avaliados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparados estatisticamente pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$), por meio do programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2003). Os dados de porcentagem, como o teor de 20E foram transformados utilizando-se a fórmula $\text{arc sen } \sqrt{x}$.

3. RESULTADOS

3.1. Enriquecimento do ambiente com CO₂ e adição de sacarose ao meio de cultura aumentam o crescimento da parte aérea de plantas *in vitro* de *Pfaffia glomerata*

Pela análise de variância para altura das plantas foi possível observar que não houve interação significativa ($p < 0,05$) entre os fatores. Houve um incremento na altura em resposta ao aumento da concentração de CO₂ no ambiente (1.000 $\mu\text{mol/mol}$ de CO₂) (Figuras 1A e 2) e à suplementação do meio de cultura com 15 g/L de sacarose (Figuras 1B e 2), enquanto a duplicação da ploidia das plantas levou à redução da altura das plantas tetraploides (Figuras 1C e 2). O enriquecimento com CO₂ gerou plantas com crescimento em altura duas vezes maior que plantas crescidas em ambiente controle, sendo a diferença menos acentuada para as outras variáveis significativas.

Para a massa seca do caule, foi possível observar que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os fatores. Para a massa seca da folha, o cultivo em meio MS acrescido de 15 g/L de sacarose levou a um ganho de massa quando comparado ao mesmo meio sem adição de açúcares (Figura 1D).

Para a variável massa seca radicular, verificou-se interação tripla ($p < 0,05$) entre os fatores ambiente de incubação, ploidia do explante e suplementação de sacarose ao meio. Plantas diploides mostraram maior ou igual acúmulo de massa seca radicular quando comparadas às tetraploides crescidas em ambiente sem enriquecimento de CO₂ (controle) sem adição de sacarose ou acrescido de 15 g/L de sacarose, respectivamente (Figura 1E). Já para ambiente enriquecido com CO₂, foi verificado maior investimento em biomassa de raízes nas plantas tetraploides, comparadas às diploides, independente da adição ou não de açúcar no meio de cultivo (Figura 1F). O aumento na concentração de CO₂ do ambiente levou a formação de cerca de três vezes mais biomassa de raízes em plantas poliploides crescidas em meio sem sacarose, porém a suplementação do meio com sacarose, independente da ploidia da planta, não gerou diferenças significativas na massa radicular

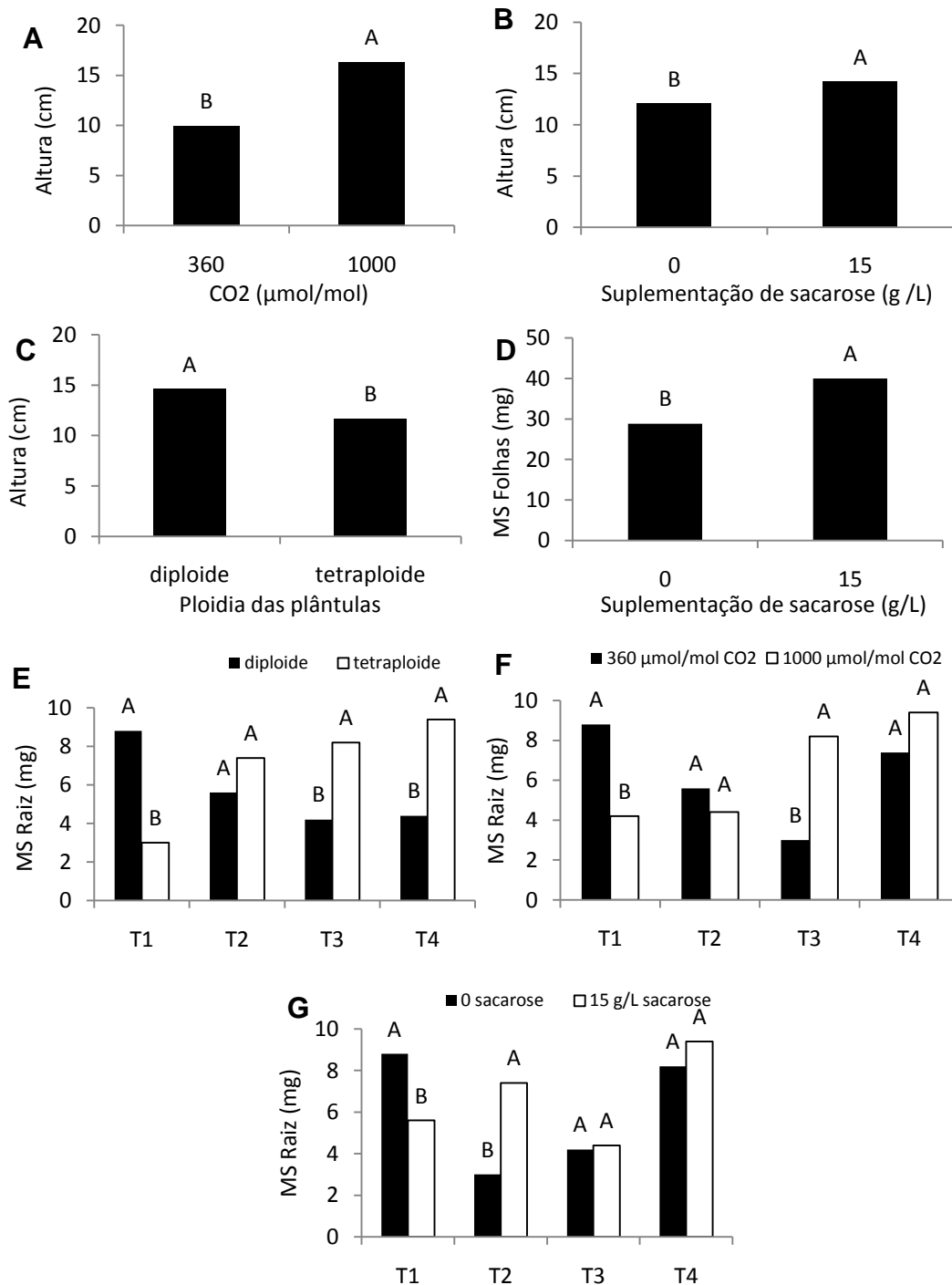


Figura 1. Variáveis de crescimento de vitroplântas de *Pfaffia glomerata* de diferente ploidias, cultivados em ambientes de incubação distintos, com acréscimo ou não de açúcar ao meio de cultivo, aos 30 dias. **A-C:** Altura; **D:** Massa seca da folha; **E-F:** Massa seca da raiz. Letras maiúsculas comparam médias ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey de diferentes fatores dentro de um mesmo tratamento. **E:** T1- Planta crescida em ambiente 360 $\mu\text{mol/mol}$ de CO_2 e meio sem adição de sacarose; T2- Planta crescida em ambiente 360 $\mu\text{mol/mol}$ de CO_2 e meio com adição de sacarose; T3- Planta crescida em ambiente 1.000 $\mu\text{mol/mol}$ de CO_2 e meio sem adição de sacarose; T4- Planta crescida em ambiente 1.000 $\mu\text{mol/mol}$ de CO_2 e meio com adição de sacarose. **F:** T1- Planta diploide e meio sem adição de sacarose; T2- Planta diploide e meio com adição de sacarose; T3- Planta tetraploide e meio sem adição de sacarose; T4- Planta tetraploide e meio com adição de sacarose. **G:** T1- Planta diploide crescida em ambiente 360 $\mu\text{mol/mol}$ de CO_2 ; T2- Planta tetraploide crescida em ambiente 360 $\mu\text{mol/mol}$ de CO_2 ; T3- Planta diploide crescida em ambiente 1.000 $\mu\text{mol/mol}$ de CO_2 ; T4- Planta tetraploide crescida em ambiente 1.000 $\mu\text{mol/mol}$ de CO_2 .

das vitroplantas ($p < 0,05$) (Figura 1G). Plantas crescidas em meio com ausência de sacarose e mantidas em atmosfera com $360 \mu\text{mol/mol}$ de CO_2 apresentaram duas vezes mais massa seca de raízes quando comparadas às mantidas em atmosfera com $1.000 \mu\text{mol/mol}$ de CO_2 nas mesmas condições de meio de cultivo (Figuras 1 e 2). A adição de sacarose ao meio de cultura foi eficiente no acúmulo de biomassa radicular em plantas diploides desenvolvidas em ambiente controle quando comparadas as de ambiente enriquecido com CO_2 .

No entanto, a adição de açúcares não levou a alterações significativas na massa de raízes de plantas poliploides, independente do ambiente no qual se desenvolveram. Já em plantas diploides, a adição de sacarose ao meio levou à redução da massa de raiz, quando crescidas em atmosfera sem adição de CO_2 ($p < 0,05$) (Figuras 1 e 2).

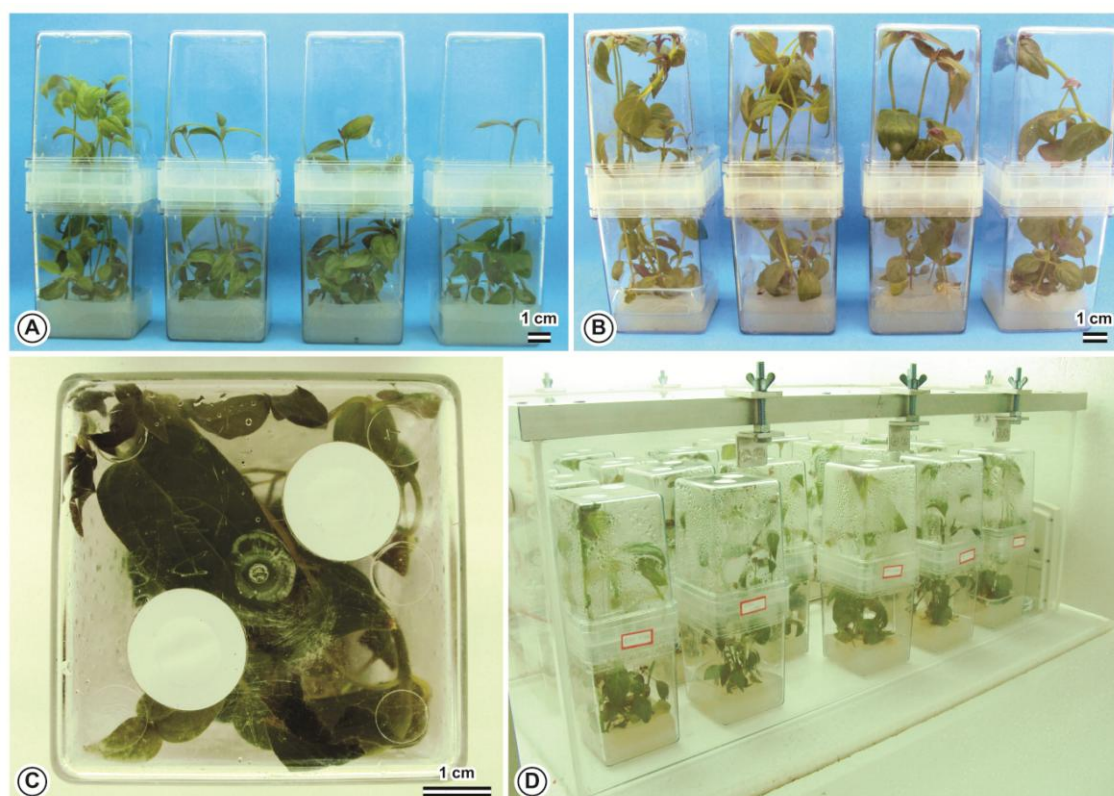


Figura 2. Aspecto geral da cultura *in vitro* de *Pfaffia glomerata*, aos 30 dias de cultivo. **A:** Crescimento vegetativo de plantas de diferentes ploidias crescidas em presença ou ausência de sacarose em atmosfera de $360 \mu\text{mol/mol}$ de CO_2 , da esquerda para a direita: Diploide com 15 g/L de sacarose, diploide sem sacarose, tetraploide com 15 g/L de sacarose, tetraploide sem sacarose. **B:** Crescimento vegetativo de plantas de diferentes ploidias crescidas em presença ou ausência de sacarose em atmosfera de $1.000 \mu\text{mol/mol}$ de CO_2 , da esquerda para a direita: Diploide com 15 g/L de sacarose, diploide sem sacarose, tetraploide com 15 g/L de sacarose, tetraploide sem sacarose. **C:** Detalhe da tampa do frasco de cultivo com orifícios contendo membrana fluoroporo hidrofóbica (PTFE) para trocas gasosas (MilliSeal® Air Vent, Tóquio, Japão) de $0,45 \mu\text{m}$ de poro. **D:** Câmara de acrílico para o enriquecimento de CO_2 com a disposição dos frascos de cultivo.

3.2. Aumento na concentração de CO₂ no ambiente induz acúmulo de pigmentos fotossintéticos em fáfia

O aumento na concentração de CO₂ no ambiente, de 360 para 1.000 µmol/mol resultou em elevação significativa ($p < 0,05$) do teor de clorofilas *a*, *b*, e carotenoides nas folhas de plantas *in vitro* de *P. glomerata* (Figura 3). No entanto, variações na ploidia das plantas e na suplementação de sacarose não promoveram alterações significativas nessas variáveis ($p < 0,05$).

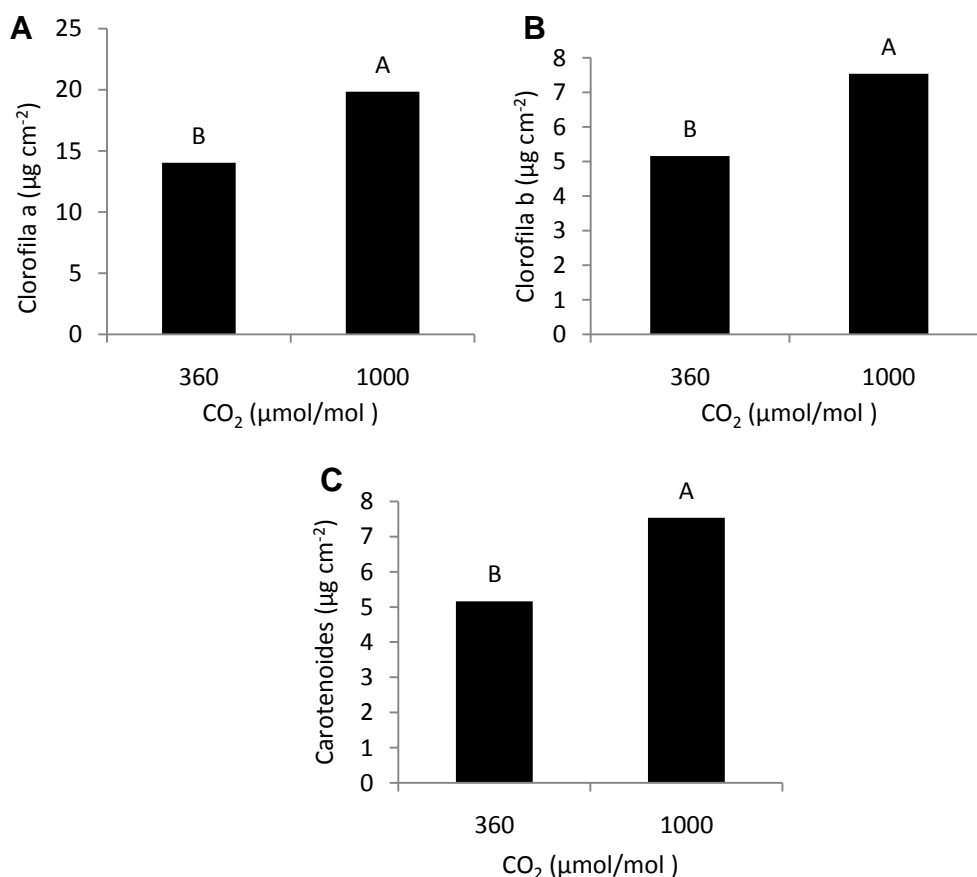


Figura3. Pigmentos fotossintéticos de plantas *in vitro* de *P. glomerata* de diferente ploidias, cultivadas em ambientes de incubação distintos, com acréscimo ou não de açúcar ao meio de cultivo, aos 30 dias de cultivo. **A:** Clorofila *a*. **B:** Clorofila *b*. **C:** Carotenoides. Letras maiúsculas comparam médias ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey de diferentes fatores dentro de um mesmo tratamento.

3.3. O acúmulo de 20E em *P. glomerata* é influenciado por enriquecimento do ambiente com CO₂, adição de sacarose ao meio e nível de ploidia das plantas

Todos os fatores analisados, enriquecimento do ambiente com CO₂, adição de sacarose ao meio e nível de ploidia das plantas levaram a alterações significativas ($p < 0,05$) no teor de 20-hidroxiecdisona (20E).

O enriquecimento do ambiente com CO₂ levou ao maior acúmulo de 20E em folhas de plantas *in vitro* de *P. glomerata* (Figura 4A), e nas raízes de plantas tetraploides, não havendo alteração significativa no teor de 20E nas raízes das plantas diploides em resposta à concentração de CO₂ ($p < 0,05$) (Figura 4G).

A suplementação do meio de cultivo com 15 g/L de sacarose reduziu significativamente o teor de 20E em todos os órgãos analisados quando comparados às plantas cujo meio não apresentava sacarose (Figura 4B). Essa redução foi mais pronunciada nas raízes, cujo acúmulo do metabólito foi 80% menor devido à adição de açúcar no meio (Figura 4F).

A duplicação da ploidia das plantas reduziu significativamente o acúmulo de 20E de folhas (Figura 4C), caule (Figura 4E) e raízes (Figura 4G) de *P. glomerata*, sendo verificada interação significativa entre ploidia do explante e ambiente de incubação para o metabólito nas raízes ($p < 0,05$) (Figura 4G)

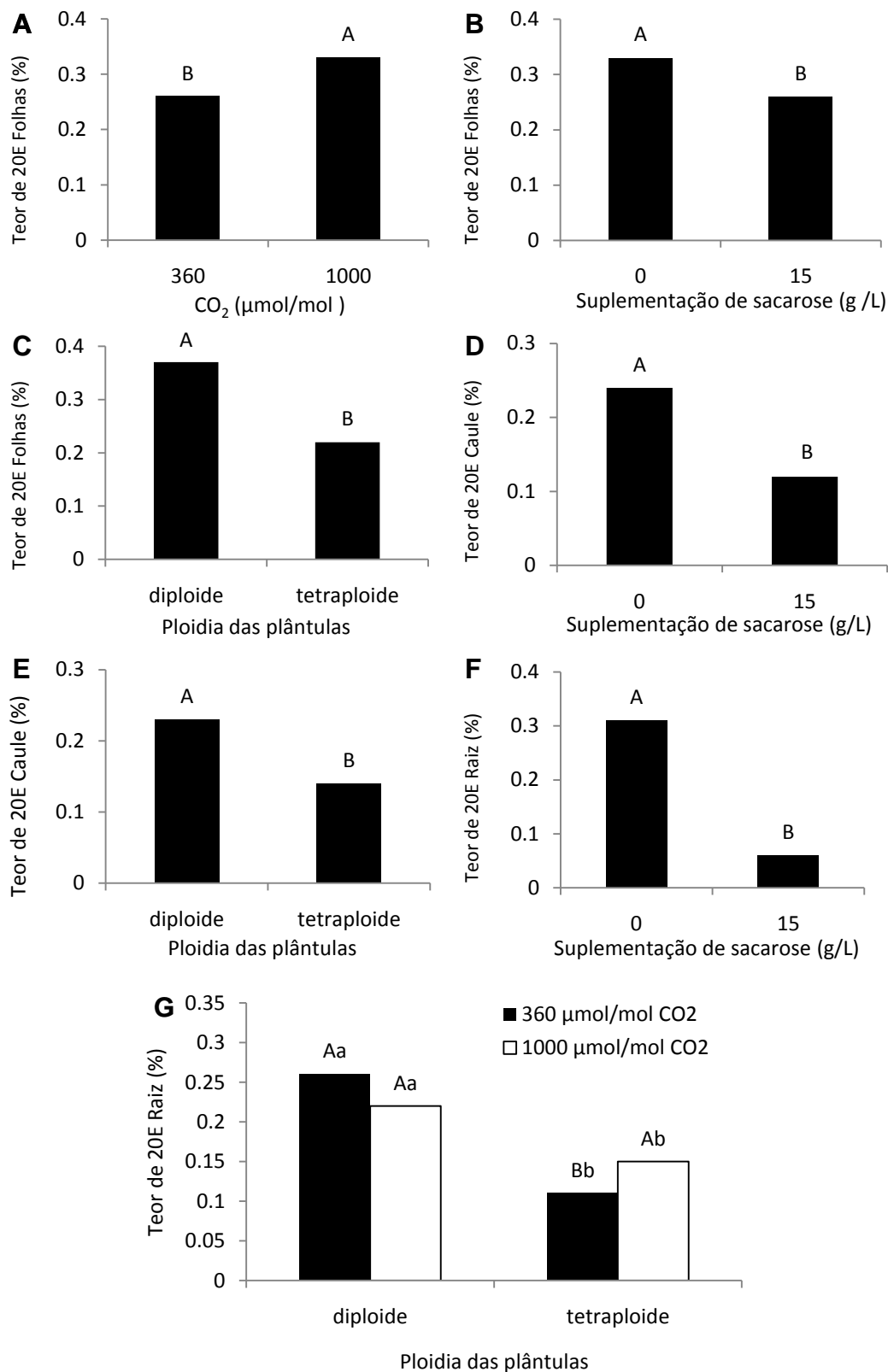


Figura 4. Produção de 20E em folhas (A-C) e caule (D e E) e raízes (F e G) de *P. glomerata* de diferente ploidias, cultivados em ambientes de incubação distintos, com acréscimo ou não de sacarose ao meio de cultivo, aos 30 dias de cultivo. Letras maiúsculas comparam médias ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey de diferentes fatores dentro de um mesmo tratamento. Letras minúsculas comparam médias de um mesmo fator dentro de cada tratamento distinto ($p < 0,05$).

4. DISCUSSÃO

Nesse trabalho foi relatada a influência positiva da suplementação de sacarose ao meio de cultura de plantas crescidas em frascos com trocas gasosas, assim como do enriquecimento da atmosfera com CO₂, no crescimento e desenvolvimento de *Pfaffia glomerata*. Análises do teor do fitoecdisteroide 20-hidroxiecdisona (20E) na espécie mostraram que o acúmulo desse metabólito secundário em folhas, independente da ploidia da planta, e raízes de plantas tetraploides foi positivamente influenciado pelo aumento da concentração de CO₂ da atmosfera na qual o frasco de cultivo foi mantido, mas negativamente relacionado à presença de sacarose no meio de cultura e ao nível de ploidia do explante.

A maior causa do reduzido sucesso da aclimatização de plantas crescidas *in vitro* é a baixa capacidade fotossintética das plantas produzidas, provavelmente devido à presença de sacarose no meio de cultura (Hdider & Desjardins, 1994). Isso ocorre devido a redução da atividade da enzima rubisco acarretada pela presença de sacarose no meio de cultura (Grout et al., 1988), reduzindo também as quantidades das subunidades dessa enzima (Premakumar et al., 2001). Além disso, a suplementação de açúcares ao meio de cultura pode causar um estresse osmótico nas plantas, reduzindo assim seu crescimento (Javed & Ikram, 2008). Desjardins et al. (2007) sugerem que plantas cultivadas *in vitro* sofrem intoxicação pelas elevadas concentrações de sacarose e nitrogênio do meio, sendo necessário ajustar seus metabolismos para sobreviver a essa condição de estresse. Assim, a adição de sacarose tem levado à redução nos parâmetros de crescimento em inúmeras espécies (Xiao et al., 2011).

No entanto, efeitos positivos da suplementação do meio de cultura com sacarose também vem sendo relatados, sendo os açúcares exógenos potencializadores de maiores acúmulos de massa seca e altura atingida em algumas espécies, como *Bacopa monnieri* (Naik et al., 2010), *Rubus idaeus* (Deng & Donnelly, 2010) e *Solanum tuberosum* (Badr et al., 2011). Adicionalmente, neste trabalho a concentração de sacarose adicionada ao meio de cultura foi baixa, metade da usada nos protocolos de micropropagação da espécie (30 g/L), sendo esse teor insuficiente para gerar um estresse osmótico para as plantas, com conseqüente redução no crescimento. Cui et al.

(2000) também observaram crescimento semelhante entre plantas propagadas em meio livre de açúcares ou suplementado com 15 g/L de sacarose, indicando que plantas crescidas em condições de trocas gasosas não necessitam de altas concentrações de açúcares para sua manutenção. Em condições de cultivo que permitam maiores trocas gasosas, a absorção de açúcares do meio é cerca de metade da observada em plantas crescidas em condições heterotróficas, sendo que a sacarose é utilizada apenas nas fases iniciais de crescimento, até que as primeiras folhas sejam emitidas e a planta torne-se auto suficiente na produção de esqueletos de carbono (Arigita et al., 2002).

Como verificou-se no presente trabalho, plantas crescidas em condições fotomixotróficas apresentaram os melhores parâmetros de crescimento dentre as condições de cultivo testadas (Figura 2). Estudos anteriores com *P. glomerata* mostram aumento da massa seca em plantas propagadas *in vitro* com maiores concentrações de sacarose (Nicoloso et al., 2003; Skrebsky et al., 2004; Maldaner et al., 2006, 2007). Entretanto, plantas crescidas em meio de cultura sem sacarose também tiveram altas taxas de crescimento, concordando com os dados obtidos por Iarema et al. (2012), que indicam a capacidade fotoautotrófica da espécie.

A adição de açúcar no meio de cultura altera consideravelmente a bioquímica e a fisiologia das plantas cultivadas *in vitro* (Badr et al., 2011). Dessa forma, a suplementação do meio de cultura com açúcares exógenos levou à redução no teor de 20E em plantas de *P. glomerata* crescidas em condições fotomixotróficas, quando comparadas às condições fotoautotróficas, assim como verificado por Saldanha (2011) e Iarema et al. (2012). Esse resultado difere daquele descrito por Badr et al. (2011) e Hao & Guan (2012), no qual a adição de açúcares aumentou a produção de metabólitos secundários. O menor acúmulo de metabólitos secundários em condições fotomixotróficas pode ser explicado pela menor taxa fotossintética observada em plantas de *P. glomerata* crescidas em meio com sacarose (Kozai et al., 2005; Xiao et al., 2011; Iarema et al., 2012).

O aumento das trocas gasosas nos frascos, possibilitado pela presença de orifícios cobertos com membranas semipermeáveis, proporciona o desenvolvimento normal de características anatômicas e fisiológicas que eram fortemente afetadas pelas condições heterotróficas de cultivo *in vitro*, como parênquima paliçádico e tecidos de sustentação e de condução pouco

desenvolvidos, abundância de espaços intercelulares no mesofilo, má formação de estômatos e redução das ceras epicuticulares (Kozai et al., 1991; Alvarez et al., 2012; Iarema et al., 2012). O somatório desses fatores reflete na baixa capacidade fotossintética e nas altas taxas de mortalidade durante a transferência para condições *ex vitro*.

Desde que a propagação fotoautotrófica foi desenvolvida, muitos estudos vem sendo conduzidos na investigação dos efeitos do microambiente do frasco de cultivo no crescimento e desenvolvimento vegetal visando o estabelecimento de estratégias que forneçam uma condição mais favorável às plantas (Kozai, 1991; Zobayed et al., 2004). Dentre os fatores estudados que podem influenciar no ambiente de cultivo, e conseqüentemente na fotossíntese e crescimento vegetal, está a concentração atmosférica de CO₂ (Lian et al., 2002; Xiao et al., 2011).

O enriquecimento da atmosfera com CO₂ em condições *in vitro* tem sido utilizado com sucesso em diversas espécies vegetais. O efeito direto mais significativo da elevação da concentração de CO₂ é o aumento nas taxas fotossintéticas, na disponibilidade de carboidratos e na eficiência do uso da água, estimulando a divisão e expansão celular que leva a efeitos no crescimento, desenvolvimento e a alterações estruturais (Pritchard et al., 1999). Baixas concentrações de CO₂ restringem a fotossíntese devido à atividade da enzima Rubisco, que em baixas concentrações de CO₂ tem seu sítio de oxigenação mais ativo que de carboxilação, resultando no aumento da fotorrespiração e diminuição da assimilação líquida de carbono (Reddy et al., 2010). Dessa forma, explantes de fáfia crescidos em ambiente enriquecido de CO₂ geram plantas mais altas e vigorosas (Figura 2), em função provavelmente da maior eficiência fotossintética dessas.

No presente trabalho, a massa seca da parte aérea não foi influenciada pelo incremento de CO₂, no entanto, em atmosfera enriquecida, as folhas mostraram-se maiores, semelhante ao verificado em Ferris et al. (2001). O aumento da massa seca de raízes poliploides crescidas em ambiente com 1.000 µmol/mol de CO₂ relaciona-se à maior capacidade fotossintética de plantas crescidas em frascos de trocas gasosas e atmosfera enriquecida de CO₂ (Cha-um et al., 2011), que possibilita maior produção de compostos carbonados, sendo assim alocados em maiores proporções aos drenos, como raízes. Aumento da biomassa radicular também foi verificado em *Salvia*

miltiorrhiza (Gao et al., 1996), espécie medicinal que, de forma semelhante às espécies do gênero *Pfaffia*, acumula seus metabólitos de interesse nas raízes. O aumento da biomassa de raízes de fáfia é de grande interesse econômico, uma vez que é o órgão comercializado pela indústria por apresentar os maiores teores de 20E (Festucci-Buselli et al., 2008).

Além dos parâmetros de crescimento, o teor de pigmentos também foi positivamente influenciado pelo incremento de CO₂, semelhante ao observado anteriormente na espécie (Saldanha, 2011). Apesar do teor de clorofilas não estar diretamente relacionado à capacidade fotossintética (Fujiwara et al., 1992), este parâmetro é um bom indicador do *status* do aparato fotossintético da planta. 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). Significativo aumento no teor de clorofilas *a* e *b* foi observado em função do aumento na concentração de CO₂ atmosférica em *Actinidia deliciosa* (Arigita et al., 2002), *Solanum tuberosum* (Chanemougasoundharam et al., 2004), *Macadamia tetraphylla* (Cha-um et al., 2011) e *Gevuina avellana* (Alvarez et al., 2012). Uma vez que a deficiência de clorofilas é um dos principais fatores que interferem negativamente a propagação *in vitro* tradicional, o aumento nos pigmentos propiciado pelo enriquecimento de CO₂ faz com que os explantes tenham um aumento na capacidade de interação com a radiação luminosa incidente na folha e uma estrutura fotossintética mais eficiente, que favorece o processo de aclimatização *ex vitro* (Alvarez et al., 2012).

Também tem sido relatada alterações no perfil metabólico (Badr et al., 2011) e no acúmulo de metabólitos secundários (Zobayed et al., 2003; Mosaleeyanon et al., 2005; Schonhof et al., 2007; Yang et al., 2010) em função de variações na concentração de CO₂ na atmosfera. Uma vez que o incremento de CO₂ leva a melhores parâmetros de fotossíntese, eficiência do uso da água e absorção de nutrientes, mais energia e moléculas precursoras podem ser redirecionadas ao metabolismo primário, o que justifica o aumento no teor de 20E em *P. glomerata* verificado quando a concentração de CO₂ é alterada de 360 para 1.000 µmol/mol de CO₂. Entretanto, esse resultado difere do verificado por Saldanha (2011), que mostra redução do teor desse metabólito em função do incremento de CO₂ em meio de cultivo semi-sólido com ágar.

Plantas poliploides geralmente diferem de seus genitores diploides em características citológicas, morfológicas, químicas e fisiológicas (Warner & Edwards, 1993; Dhawan & Lavania, 1996; Ramsey & Schemske, 2002; Wu et al., 2006), com grande variabilidade entre espécies (Aina et al., 2012). Dentre as variáveis analisadas, verificou-se redução em altura de plantas tetraploides, comparadas às diploides, em todas as condições de crescimento testadas. No entanto, a massa seca de folhas e caules não diferiu entre plantas de diferentes ploidias, o que indica aumento nas dimensões foliares e no diâmetro caulinar em plantas tetraploides. A menor altura dos poliploides relaciona-se à observação de que explantes tetraploides apresentam um atraso no início da brotação de suas gemas axilares, quando comparadas aos diploides, o que leva essas plantas a iniciar seu desenvolvimento tardiamente, atingindo menores alturas. Entretanto, após iniciarem seu crescimento, explantes poliploides geram plantas de folhas maiores e mais vistosas, assim como caules de maior diâmetro, características indicadoras de poliploidia (Gantait et al., 2011; Rêgo et al., 2011; Leal-Bertiole et al., 2012) (Figura 2).

A poliploidização é relatada em alguns artigos como potencializadora do acúmulo de metabólitos secundários, como quinonas (Gao et al., 1996), artemisinas (Jesus-Gonzalez et al., 2003), ginsenoides (Kim et al., 2004) e alcaloides (Kaensaksiri et al., 2011). Entretanto, o teor de 20E em *Pfaffia glomerata* coletadas aos 30 dias de crescimento *in vitro* foi menor em plantas poliploides quando comparadas às tetraploides. Aos 30 dias, a planta apresenta ainda alto investimento em crescimento vegetativo, estando suas células em cinética de crescimento exponencial. No entanto, o metabolismo secundário vegetal tem sua ativação na fase estacionária de crescimento, uma vez que durante o crescimento exponencial a maior parte dos compostos de carbono sintetizados é direcionada ao metabolismo primário (Neumann et al., 2009). Assim, a manutenção do cultivo por um tempo mais longo seria necessária para verificar-se indução de 20E em *P. glomerata*, o que não foi viável em função da limitação em altura do frasco de cultivo utilizado, cujas plantas já haviam atingido a parede superior em 30 dias de cultivo.

Dessa forma, o presente estudo mostra que, apesar da presença de açúcares no meio ter influenciado positivamente a produção de biomassa, o sistema de propagação fotoautotrófico, principalmente quando somado ao enriquecimento de CO₂, pode ser atrativo para a aplicação na produção

comercial *in vitro* de *P. glomerata* visando obtenção de grande biomassa com maior acúmulo de 20E.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AINA, O.; QUESENBERRY, K.; GALLO, M. In vitro induction of tetraploids in *Arachis paraguariensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 111: 231-238, 2012.

ALVAREZ, C.; SÁEZ, P.; SÁEZ, K.; SÁNCHEZ-OLATE, M.; RÍOS, D. Effects of light and ventilation on physiological parameters during in vitro acclimatization of *Gevuina avellana* mol. . **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 110: 93-101, 2012.

ARIGITA, L.; GONZALES, A.; SÁNCHEZ, T.R. Influence of CO₂ and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinidia deliciosa* explants cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, 115:166–173, 2002.

BADR, A.; ANGERS, P.; DESJARDINS, Y. Metabolic profiling of photoautotrophic and photomixotrophic potato plantlets (*Solanum tuberosum*) provides new insights into acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 107: 13-24, 2011.

BAKRIM, A.; MARIA, A.; SAYAD, F.; LAFONT, R.; TAKVORIAN, N. Ecdysteroids in spinach (*Spinacia oleracea* L.): Biosynthesis, transport and regulation of levels. **Plant Physiology and Biochemistry**, 46: 844-854, 2008.

BERNARD, B.; GAUTIER, B. **Use of ecdysteroids for preparing dermatological or cosmetological anti-hair loss compositions.** *United States Patent*, US 0137175 A1,2005.

CHA-UM, S.; CHANSEETIS, C.; CHINTAKOVID, W.; PICHAKUM, A.; SUPAIBULWATANA, K. Promoting root induction and growth of in vitro macadamia (*Macadamia tetraphylla* L. 'Keaau') plantlets using CO₂-enriched photoautotrophic conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 106: 435-444, 2011.

CHANEMOUGASOUNDHARAM, A.; SARKAR, D.; PANDEY, S.; AL-BISKI, S.; HELALI, O.; MINHAS, J. Culture tube closure-type affects potato plantlets growth and chlorophyll contents. **Biologia Plantarum**, 48:7–11, 2004.

CHRISTENSEN, B.; SRISKANDARAJAH, S.; SEREK, M.; RENATE MÜLLER, R. *In vitro* culture of *Hibiscus rosa-sinensis* L.: Influence of iron, calcium and BAP on establishment and multiplication. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 93: 151-161, 2008.

COUCEIRO, M.A.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S.M.A., KOZAI, T. Enhanced growth and quality of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) under photoautotrophic in vitro conditions. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, 42:278-282, 2006.

CUI, Y.; HAHN, E.J.; KOZAI, T.; PAEK, K. Number of air exchanges, sucrose concentration, photosynthetic photon flux, and differences in photoperiod and dark period temperatures affect growth of *Rehmannia glutinosa* plantlets in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 62:219–226, 2000.

DENG, R.; DONNELLY, D.J. *In vitro* hardening of red raspberry through CO₂ enrichment and relative humidity reduction on sugar-free medium. **Canadian Journal of Plant Science**, 73:1105–1113, 1993.

DESJARDINS, Y.; DUBUC, J.; BADR, A. *In vitro* culture of plants: a stressful activity! **Acta Horticulturae**, 812:29–50, 2007.

DHOOGHE, E.; LAERE, K.V.; EECKHAUT, T.; LEUS, L.; HUYLENBROECK, J.V. Mitotic chromosome doubling of plant tissues *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 104: 359-373, 2011.

DHAWAN, O.P., LAVANIA, U.C. Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy: a review. **Euphytica**. 87: 81-89, 1996.

DINAN, L.; HARMATHA, J.; VOLODIN, V.; LAFONT, R. **Phytoecdysteroids: Diversity, Biosynthesis and Distribution**. In: SMAGGHE, G. (ed). Ecdysone: Structures and Functions, 2009.

DOLEZEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, 95: 99–110, 2005.

FERREIRA, D.F. **Sisvar 5.0**. 2003. Disponível em: <[HTTP://www.dex.ufla.br/~danielff/software.htm](http://www.dex.ufla.br/~danielff/software.htm)>.

FERRIS, R.; SABATTI, M., MIGLIETTA, F., MILLS, R.F.; TAYLOR, G. Leaf area is stimulated in *Populus* by free air CO₂ enrichment (POPFACE), through increased cell expansion and production. **Plant, Cell & Environment**, 24: 305-315, 2001.

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

FUJIWARA, K.; KIRA, S.; KOZAI, T. Time course of CO₂ exchange of potato cultures *in vitro* with different sucrose concentrations in the culture medium. **Journal of Agricultural Meteorology**, 48: 49–56, 1992.

FUJIWARA, K.; KOZAI, T. Physical microenvironment and its effects. In: AITKEN-CHRISTIE, J.; KOZAI, T.; SMITH, M.A.L. (Eds.) **Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture**. Kluwer Academic Publishers: Netherlands, p.319-369, 1995.

GANTAIT, S.; MANDAL, N.; BHATTACHARYYA, S.; DAS, P.K. Induction and identification of tetraploids using *in vitro* colchicine treatment of *Gerbera jamesonii* Bolus cv. Sciella. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 106: 485-493, 2011.

GAO, S.L.; ZHU, D.N.; CAI, Z.H.; XU, D.R. Autotetraploid plants from colchicine-treated bud culture of *Salvia miltiorrhiza* Bge. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 47: 73-77, 1996.

GROUT, B.W.W. Photosynthesis of regenerated plantlets *in vitro*, and the stress of transplanting. **Acta Horticulturae**, 230:129–135, 1988.

HAO, J.; GUAN, Q. Synthesis of saikosaponins in adventitious roots of *Bupleurum chinense* by semi-continuous culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 108:159–165, 2012.

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

HE, L.Y.; DING, Z.; JIANG, F.; JIN, B.; LI, W.; DING, X.; SUN, J.; LV, G. Induction and identification of hexadecaploid of *Pinellia ternate*. **Euphytica**, 186: 479-488, 2012.

HIDDER, C.; DESJARDINS, Y. Effects of sucrose on photosynthesis and phosphoenolpyruvate carboxylase activity of *in vitro* cultured strawberry plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 36:27–33, 1994.

HIGUCHI, M.L. **Compositions for inhibiting atherosclerosis**. *United States Patent*, US 7914781 B2, 2011.

IAREMA, L.; CRUZ, A.C.F. da; SALDANHA, C.W.; DIAS, L.L.C.; VIEIRA, R.F.; OLIVEIRA, E.J. de; OTONI, W.C. Photoautotrophic propagation of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 110:227-238, 2012.

JAVED, F.; IKRAM, S. Effect of sucrose induced osmotic stress on callus growth and biochemical aspects of two wheat genotypes. **Pakistan Journal of Botany**, 40:1487–1495, 2008.

JESUS-GONZALEZ, L.; WEATHERS, P.J. Tetraploid *Artemisia annua* hairy roots produce more artemisinin than diploids. **Plant Cell Reports**, 21: 809-813, 2003.

KAENSAKSIRI, T.; SOONTORNCHAINAKSAENG, P.; SOONTHORNCHAREONNON, N.; PRATHANTURARUG, S. *In vitro* induction of polyploidy in *Centella asiatica* (L.) Urban. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 107: 187-194, 2011.

KAMADA, T.; PICOLI, E.A.T.; VIEIRA, R.F.; BARBOSA, L.C.A.; CRUZ, C.D.; OTONI, W.C. Variação de caracteres morfológicos e fisiológicos de populações naturais de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e correlação com a produção de β -ecdisona. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 11: 247-256, 2009.

KIM, Y.S.; HAHN, E.J.; MURTHY, H.N.; PAEK, K.Y. Effect of Polyploidy Induction on Biomass and Ginsenoside Accumulations in Adventitious Roots of Ginseng. **Journal of Plant Biology**, 47: 356-360, 2004.

KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, 27: 47-51, 1991.

KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation - Environmental control for promoting photosynthesis. **Propagation of Ornamental Plants**, 10: 188-204, 2010.

KOZAI, T.; KUBOTA, C. Developing a photoautotrophic micropropagation system for woody plants. **Journal of Plant Research**, 114: 525-537, 2001.

KOZAI, T.; XIAO, Y.; NGUYEN, Q.T.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S.M.A. Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation systems for large-scale commercialization. **Propagation of Ornamental Plants**, 5: 23-34, 2005.

LEAL-BERTIOLI, S.C.M.; BERTIOLI, D.J.; GUIMARÃES, P.M.; PEREIRA, T.D.; GALHARDO, I.; SILVA, J.P.; BRASILEIRO, A.C.M.; OLIVEIRA, R.D.; SILVA, P.I.T.; VADEZ, V.; ARAUJO, A.C.G. The effect of tetraploidization of wild *Arachis* on leaf morphology and other drought-related traits. **Environmental and Experimental Botany**, 84: 17– 24, 2012.

LIAN, M.L.; MURHTY, H.N.; PAEK, K.Y. Culture method and photosynthetic photon flux affect photosynthesis, growth and survival of *Limonium* “Misty Blue” *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, 95:239-249, 2002.

LOIZOU, N.C. **Health supplement**. *United States Patent*, US 0110674 A1, 2009.

MALDANER, J.; NICOLOSO, F.T.; SANTOS, ES.; FLORES, R.; SKREBSKY, E.C. Sacarose e nitrogênio na multiplicação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Ciência Rural**, 36:1201–1206, 2006.

MALDANER, J.; NICOLOSO, F.T.; SANTOS, E.S.; FAGUNDES, C.K.; FLORES, R.; JUCOSKI, G.O.; SKREBSKY, E.C. Crescimento de plântulas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen cultivadas *in vitro* sob dois níveis de nitrogênio e sacarose, durante seis subculturas sucessivas e aclimatização. **Ciência Rural**, 37:133–140, 2007.

MOSALEEYANON, K.; CHAN-UM, S.; KIRMANEE, C. Enhanced growth and photosynthesis of rain tree (*Samanea saman* Merr.) plantlets *in vitro* under a CO₂-enriched condition with decreased sucrose concentrations in the medium. **Scientia Horticulturae**, 103:51–63, 2004.

MOSALEEYANON, K.; ZOBAYED, S.M.A.; AFREEN, F.; KOZAI, T. Relationships between net photosynthetic rate and secondary metabolite contents in St. John’s wort. **Plant Science**, 169: 523-531, 2005.

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

NAIK, P.; MANOHAR, S.; PRAVEEN, N.; MURTHY, H. Effects of sucrose and pH levels on *in vitro* shoot regeneration from leaf explants of *Bacopa monnieri* and accumulation of bacoside A in regenerated shoots. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 100:235–239, 2010.

NEUMANN, K.H., KUMAR, A., IMANI, J. **Plant Cell and Tissue Culture - A Tool in Biotechnology**. Springer, Berlin-Heidelberg, 2009.

NICOLOSO, F.T.; ERIG, A.C.; RUSSOWSKI, D.; MARTINS, C.F. Efeito de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, 27:84–90, 2003.

NORIKANE, A.; TAKAMURA, T.; MOROKUMA, M.; TANAKA, M. In vitro growth and single-leaf photosynthetic response of *Cymbidium* plantlets to super-elevated CO₂ under cold cathode fluorescent lamps. **Plant Cell Reports**, 29: 273-383, 2010.

OLALDE, J.A. **Multiple sclerosis synergistic phyto-nutraceutical composition**. *United States Patent*, US 0081046 A1, 2008.

OSBORN, T.C.; PIRES, J.C.; BIRCHLER, J.A.; AUGER, D.L.; CHEN, Z.J.; LEE, H.S.; COMAI, L.; MADLUNG, A.; DOERGE, R.W.; COLOT, V.; MARTIENSSEN, R.A. Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. **Trends in Genetics**, 19:141–147, 2003.

PARK, S.Y.; MOON, H.K.; MURTHY, H.N.; KIM, Y.W. Improved growth and acclimatization of somatic embryo-derived *Oplopanax elatus* plantlets by ventilated photoautotrophic culture. **Biologia Plantarum**, 55: 559-562, 2011.

PREMAKUMAR, A.; MERCADO, J.A.; QUESADA, M.A. Effects of *in vitro* tissue culture conditions and acclimatization on the content of Rubisco, leaf soluble proteins, photosynthetic pigments, and C/N ratio. **Journal of Plant Physiology**, 158:835–840, 2001.

PRITCHARD, S.; ROGERS, H.H.; PRIOR, S.A.; PETERSON, C.M. Elevated CO₂ and plant structure: a review. **Global Change Biology**, 5: 807-837, 1999.

RAMSEY, J.; SCHEMSKE, D.W. Neopolyploidy in flowering plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 33: 589–639, 2002.

RANGEL, J.A.O. **Menopause disorder synergistic phyto-nutraceutical composition**. *United States Patent*, US 7381432, 2008.

REDDY, A.R.; RASINENI, G.K.; RAGHAVENDRA, A.S. The impact of global elevated CO₂ concentration on photosynthesis and plant productivity. **Current Science**, 99: 46-57, 2010.

RÊGO, M.M.; RÊGO, E.R.; BRUCKNER, C.H.; FINGER, F.L.; OTONI, W.C. *In vitro* induction of autotetraploids from diploid yellow passion fruit mediated by colchicine and oryzalin. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 107: 451-453, 2011.

RUSSOWSKI, D.; NICOLOSO, F.T. Nitrogênio e fósforo no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. **Ciência Rural**, 33: 57-63, 2003.

SALDANHA, C.W. **Influência das trocas gasosas e do enriquecimento com CO₂ na propagação *in vitro* de fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]**. 2011. 101p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2011.

SCHONHOF, I.; KLÄRING, H.P.; KRUMBEIN, A.; SCHREINER, M. Interaction between atmospheric CO₂ and glucosinolates in broccoli. **Journal of Chemical Ecology**, 33:105-114, 2007.

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

SHIBUYA, T.; ARIO, T.; FUKUDA, S. Composition. *United States Patent*, US 6224872, 2001.

WARNER, D.A., EDWARDS, G.E. Effects of polyploidy on photosynthesis. **Photosynthesis Research**, 35: 135–147, 1993.

WELLBURN, A.R. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, 144: 307-313, 1994.

WU, J., HETTENHAUSEN, C.; BLADWIN, I.T. Evolution of proteinase inhibitor defenses in North American allopolyploid species of *Nicotiana*. **Planta**, 224: 750 – 760, 2006.

XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 105: 149-158, 2011.

YANG, L.; ZAMBRANO, Y.; HU, C.J.; CARMONA, E.R.; BERNAL, A.; PÉREZ, A.; ZAYAS, C.M.; LI, Y.R.; GUERRA, A.; SANTANA, I.; ARENCIBIA, A.D. Sugarcane metabolites produced in CO₂-rich temporary immersion bioreactors (TIBs) induce tomato (*Solanum lycopersicum*) resistance against bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 46: 558-568, 2010.

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

ZOBAYED, S.M.A.; MURCH, S.J.; RUPASINGHE, H.P.V.; SAXENA, P.K. Elevated carbon supply altered hypericin and hyperforin contents of St. John's wort (*Hypericum perforatum*) grown in bioreactors. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 75:143-149, 2003.

ZOBAYED, S.M.A.; AFREEN, F.; XIAO, Y.; KOZAI, T. Recent advancement in research on photoautotrophic micropropagation using large culture vessels with forced ventilation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, 40: 450-458, 2004.

CAPITULO II

**INFLUÊNCIA DA PLOIDIA, DO VOLUME DE VASO E DA
APLICAÇÃO DE PACLOBUTRAZOL NO CRESCIMENTO E NO
ACÚMULO DE 20-HIDROXIECDISONA E SAPONINAS EM *Pfaffia
glomerata* (SPRENG.) PEDERSEN**

**Influência da ploidia, do volume de vaso e da aplicação de
paclobutrazol no crescimento e no acúmulo de 20-hidroxicidisona e
saponinas em *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen**

RESUMO

Pfaffia glomerata é uma importante espécie medicinal nativa do Brasil, cujas propriedades farmacológicas devem-se à presença de fitoecdisteróides, em especial o 20-hidroxicidisona (20E), e saponinas triterpênicas. Entretanto, a espécie apresenta teores baixos de seu metabólito de maior interesse, o 20E. O objetivo desse trabalho foi avaliar a influência da ploidia da planta, do volume do vaso e da aplicação de paclobutrazol (PBZ) no crescimento e acúmulo de metabólitos secundários em *P. glomerata*, visando atender a demanda comercial de matéria-prima da espécie. Plantas diploides e tetraploides foram cultivadas em casa de vegetação em vasos de diferentes volumes submetidas ou não à aplicação de PBZ. As variáveis analisadas foram altura, massa seca dos órgãos, razão largura/comprimento das folhas, densidade estomática, teor de pigmentos e acúmulo de 20E e saponinas. A duplicação da ploidia mostrou-se desfavorável uma vez que levou à redução do crescimento e não afetou significativamente o teor de metabólitos de interesse. Características típicas de plantas poliploidizadas, como redução da densidade estomática e aumento da relação largura/comprimento foliar, foram verificadas nos indivíduos tetraploides. O uso de vasos de maior volume favoreceu significativamente o crescimento em altura e o acúmulo de biomassa total das plantas, influenciando também o teor de pigmentos. Nenhum efeito na indução do acúmulo de metabólitos secundários foi observado em plantas submetidas ao tratamento com PBZ, sendo este eficiente no acúmulo de pigmentos e na redução da altura e massa seca caulinar de fáfia. Dessa forma, esse estudo mostra que a poliploidização de *P. glomerata* não corresponde às expectativas esperadas de indução de metabolismo secundário, assim como conclui-se que a utilização de vasos de maior volume é uma boa alternativa à produção de alta biomassa requerida pela indústria farmacêutica.

Palavras-chave: *Pfaffia glomerata*, poliploidia, volume de vaso, paclobutrazol, metabólitos secundários

1.INTRODUÇÃO

Pfaffia glomerata (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae), popularmente conhecida como fáfia, é uma planta medicinal nativa no Brasil (Pott & Pott, 1994), sendo considerada a mais importante espécie de ginseng brasileiro (Shiobara et al., 1993). Dentre suas várias propriedades medicinais destacam-se os efeitos antidepressivos, tônicos e afrodisíacos, além do uso no tratamento de diabetes, reumatismo, esgotamento físico e mental, falta de memória e estresse (Magalhães, 2002; Zimmer et al., 2006; Mendes, 2011). Outros estudos tem mostrado que extratos de fáfia também apresentam propriedades analgésica e anti-inflamatória (Neto et al. 2005), anti-oxidante (Daniel et al. 2005), gastroprotetora (Freitas et al. 2004) e anti-neoplásicas (Silva, 2008).

Vários compostos foram isolados e identificados a partir das raízes de *P. glomerata*, como o ácido glomérico, ácido oleanólico, ácido famérico, além de vários ecdisteroides e saponinas (Shiobara et al., 1993; Daniel et al., 2005). Porém, sua vasta atividade farmacológica tem sido relacionada principalmente ao acúmulo do fitoecdisteroide 20-hidroxiecdisona (20E), também denominado β -ecdisona (Festucci-Buselli et al., 2008) e diversas classes de saponinas, em especial os pfaffosídeos (Alves et al., 2006). Entretanto, trabalhos têm demonstrado que *P. glomerata* apresenta níveis baixos de acúmulo destes metabólitos secundários, em especial do 20E, cujo teor é cerca de 1% da massa seca total (Vigo et al., 2003; Alves et al., 2006; Flores, 2006; Festucci-Buselli et al., 2008). Assim, buscam-se estratégias que visem à obtenção de maiores acúmulos de metabólitos secundários em fáfia.

No cultivo de plantas medicinais a utilização de poliploides tem se mostrado de grande valor, uma vez que plantas poliploidizadas exibem aumento da biomassa e, em alguns casos, da concentração de compostos efetivos nas funções farmacológicas (Gao et al., 1996). A duplicação cromossômica promove alterações morfológicas, anatômicas e fisiológicas que resultam em inúmeras características específicas, como o aumento no tamanho de células e órgãos, maior vigor e acúmulo de biomassa, maior resistência à seca, entre outros, podendo variar bastante entre espécies (Aina et al., 2012; Osborn et al., 2013). A indução de poliploides tem sido relatada como potencializadora do acúmulo de metabólitos secundários, como por

exemplo, em *Pinellia ternate* (He et al., 2012), *Centella asiatica* (Kaensaksiri et al., 2011), *Panax ginseng* (Kim et al., 2004), *Artemisia annua* (Jesus-Gonzalez & Weathers, 2003), *Datura innoxia* e *D. stramonium* (Berkow, 2001) e *Salvia miltiorrhiza* (Gao et al., 1996).

Outra estratégia para indução de metabólitos secundários é a aplicação de triazóis. Os triazóis, dentre eles o paclobutrazol (PBZ), são reguladores do crescimento vegetal por inibição da biossíntese de giberelinas (Zheng et al., 2012). Esses compostos vêm sendo caracterizados também como agentes multiprotetores de plantas, uma vez que aumentam a tolerância de várias plantas a estresses bióticos e abióticos, como fungos patogênicos, seca, poluentes atmosféricos e estresse por alta e baixa temperaturas (Fletcher et al., 2000), além de atuar na redução do estresse oxidativo (Baninasab & Ghobadi, 2011). Neste sentido, alguns trabalhos reportam a indução de metabólitos secundários em resposta a tratamentos com PBZ, como antocianinas e flavonoides (Ribeiro et al., 2012), alcaloides (Jaleel et al., 2009), ácidos caftárico e cicórico (Jones et al., 2009), e glicina betaína (Jaleel & Salem, 2010).

Muitos estudos em biologia vegetal tem focado na fisiologia e na produção de biomassa de plantas crescendo individualmente em recipientes isolados, entretanto pouca importância tem sido dada aos tamanhos desses recipientes (Poorter et al., 2012). Os volumes dos recipientes influenciam a disponibilidade de água e nutrientes para as plantas, sendo que recipientes de maior volume proporcionam melhor arquitetura do sistema radicular, maior volume de raízes e melhor absorção de nutrientes, além do aumento na fotossíntese, no teor de clorofila, na respiração e na produção em geral, proporcionando assim o desenvolvimento de plantas mais vigorosas e de melhor qualidade. Além disso, um volume reduzido de vaso contribui para a redução do espaço poroso e maior competição por oxigênio no substrato (Nesmith & Duval, 1998). Dessa forma, a restrição do crescimento do sistema radicular, proporcionado pelo volume do recipiente, pode promover o desequilíbrio na razão entre raízes e parte aérea, alterando as respostas fisiológicas da planta e a qualidade da muda (Nicoloso et al., 2000) e, possivelmente, a produção de metabólitos secundários.

Recentemente, induzimos a poliploidização *in vitro* de um dos acessos de fáfia em nosso banco de germoplasma dessa espécie e, nesse contexto, o

presente estudo teve como objetivo avaliar a influência da ploidia das plantas, do volume de vaso e aplicação de PBZ nas condições de crescimento, desenvolvimento e produção dos metabólitos 20E e saponinas totais em *P. glomerata*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e condições de cultura

Plantas diploides e tetraploides de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen pertencentes ao acesso LCT22 foram cultivadas *in vitro* em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 7 g/L de ágar granulado (Merck®, Alemanha), 100 mg/L de mio-inositol e 30 g/L de sacarose. O meio de cultura teve o pH ajustado para 5,7 e foi esterilizado por autoclavagem a 121° C e 1,5 atm durante 15 minutos. As culturas foram mantidas em sala de crescimento a 25 ± 2° C, irradiância de 50 µmol/m².s⁻¹ e fotoperíodo de 16 h. As plantas tetraploides foram obtidas artificialmente em nosso laboratório após tratamento com colchicina a 25 µM durante uma semana, e tiveram a poliploidização confirmada por citometria de fluxo (Doležel & Bartos, 2005), realizadas em parceria com o Laboratório de Genética da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Após 30 dias de crescimento *in vitro*, as plantas foram transferidas para casa de vegetação, onde foram mantidas em sistema hidropônico contendo solução de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950) por uma semana. Em seguida, as plantas foram transferidas para vasos com substrato agrícola Tropstrato Florestal (Vida Verde), constituído de casca de pinus, vermiculita, carvão vegetal, nitrato de cálcio e fibra de coco. Foram usados dois volumes de vasos, 2,5 e 5 L, distribuindo-se as plantas diploides e tetraploides igualmente entre os dois tipos de vaso. Cada repetição constituiu de um vaso com uma única planta.

2.2 Aplicação dos tratamentos e delineamento experimental

Após 30 dias de crescimento em vasos foi realizada aplicação do tratamento com paclobutrazol (PBZ). Aos quatro tratamentos já existentes (planta diploide em vaso de 2,5 L, planta diploide em vaso de 5 L, planta tetraploide em vaso de 2,5 L e planta tetraploide em vaso de 5 L) foram adicionados, diretamente ao substrato, 10 mL de solução de PBZ a 15 mg/L em metade de cada tratamento com vasos de 2,5 L, e 20 mL desta mesma solução em metade dos vasos de 5 L. No restante dos vasos que não receberam PBZ, foi aplicado apenas solução aquosa no mesmo volume. Repetiu-se esta aplicação quando as plantas estavam com 45 dias de crescimento em vasos.

O delineamento experimental utilizado foi em delineamento inteiramente casualizado em esquema trifatorial (2x2X2), com 5 repetições por tratamento. Este trabalho apresenta oito tratamentos distintos (quadro 1) constituídos pela combinação de dois volumes de vaso, duas ploidias da planta fonte de explantes (diploide e tetraploide), além da aplicação ou não de PBZ.

Quadro 1. Tratamentos utilizados na avaliação do desempenho de plantas *ex vitro* de *Pfaffia glomerata* com diferentes ploidias, cultivados em tamanhos de vasos distintos, com subsequente aplicação de paclobutrazol (PBZ) ou não.

Tratamento	Volume do vaso (L)	Aplicação de PBZ (mg/L)	Ploidia do acesso
1	2,5	0	diploide
2	2,5	0	tetraploide
3	2,5	15	diploide
4	2,5	15	tetraploide
5	5	0	diploide
6	5	0	tetraploide
7	5	15	diploide
8	5	15	tetraploide

2.3 Avaliações do crescimento

Após 90 dias de cultivo em vasos foram avaliadas a altura das plantas (cm) e as massas secas de folhas, de caules e de raízes por plantas (g). As amostras foram secas em estufa com ventilação forçada (ACB Larbor) a 60°C até obter peso constante. Além dessas variáveis de crescimento também foi mensurada a razão largura/comprimento das folhas.

2.4 Determinação de pigmentos fotossintéticos

Dois discos foliares com 7 mm de diâmetro foram retirados do segundo par de folhas expandidas a partir do meristema apical das plantas de fáfia e incubados em 2,5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) durante 48 h em tubos mantidos no escuro, à temperatura ambiente (Santos et al., 2008). Após o período de incubação, a absorvância das amostras foi determinada nos

comprimentos de onda de 665, 645 e 480 nm (Wellburn, 1994), em espectrofotômetro Genesys 10UV (Thermo Scientific, EUA) com cubeta de quartzo de 10 mm de caminho ótico. O cálculo das concentrações das clorofilas *a*, *b* e carotenoides foi baseado em metodologia descrita por Wellburn (1994).

2.5 Densidade estomática

Para estimar a densidade estomática, foram amostradas as epidermes das faces abaxial e adaxial da porção mediana do terceiro par de folhas expandidas a partir do meristema apical das plantas, pela técnica de impressão da epiderme (Segatto et al., 2004). A densidade estomática foi calculada a partir da análise das imagens da impressão capturadas em fotomicroscópio (AX70TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão).

2.6 Determinação do teor de 20-hidroxiecdisona

O teor de 20-hidroxiecdisona (20E) foi determinado em folha, caule e raiz de plantas de fáfia pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

As amostras foram obtidas por extrato metanólico (Kamada et al., 2009), utilizando-se 100 mg de material vegetal seco de *P. glomerata* misturado com 10 mL de metanol grau HPLC. Durante a extração o extrato foi armazenado em tubos Falcon de 15 mL no escuro em temperatura ambiente (25 ± 2 °C), durante sete dias, sob agitação diária do extrato. Posteriormente, os extratos foram centrifugados nos próprios tubos Falcon (20 min/5.000 rpm) e o sobrenadante coletado em Eppendorfs de 1,5 mL, e centrifugado novamente (15 min/5.000 rpm). Em seguida, o extrato metanólico foi analisado por CLAE, em equipamento Shimadzu LC-10AI, acoplado ao detector de UV-vis SPD-10AI, CBM-10A e coluna Bomdesil C-18 (5,0 μ m x 4,6 mm x 250 mm). O interior do equipamento foi mantido em temperatura ambiente 20 ± 2 °C. A fase móvel utilizada consistiu de sistema isocrático com mistura de metanol grau HPLC e água deionizada, na proporção 1:1 (v/v), com fluxo de 0,7 mL/min. O volume de amostra injetada foi de 20 μ L, sendo que a leitura foi realizada em comprimento de onda de 245 nm. O tempo de corrida da amostra foi de 15 minutos. Os dados foram integrados por meio do "software" Shimadzu LC10.

A curva de calibração foi obtida preparando-se soluções-padrão de 20E (Sigma-Aldrich) em metanol grau HPLC nas concentrações de 10, 20, 40, 60,

80 ppm. A equação da reta obtida pela curva de calibração foi $Y = 41540x - 10491$, com $R^2 = 0.994$.

2.7 Determinação do teor de saponinas totais

O teor da saponinas totais de raízes de *P. glomerata* foi obtido com o uso da técnica de espectrofotometria, segundo metodologia descrita por Vigo et al. (2003) em parceria com o Laboratório de Biodiversidade da Universidade Federal de Viçosa.

Para desengorduramento das amostras, 30 mL de hexano foi adicionado a 0,2 g de raízes previamente secadas e pulverizadas, submetendo a solução à sonicação por 2 horas em ultrassom Unique 1600A. Filtrou-se a fração líquida obtida e secou-se a amostra desengordurada em estufa (Odontobras 1.2) à 60 °C durante uma hora. Em seguida, as amostras foram submetidas à extração sob refluxo com 20 mL de solução metanol-água (3:1) por 30 min. Esta operação foi repetida três vezes, filtrando-se à vácuo a solução obtida no final de cada etapa, sendo, ao final, reunidas as frações filtradas. A solução metanólica resultante foi concentrada à vácuo em evaporador rotatório a 50 °C, usando equipamento Buchi R-3 acoplado a bomba de vácuo Buchi V-700. Posteriormente, realizou-se uma ressuspensão da fração metanólica concentrada em 20 mL de n-butanol saturado e água (1:1) por 20 minutos em ultrassom Unique 1600A. Este processo foi repetido três vezes, reunindo-se as frações butanólicas obtidas nas três fases e concentrou-se o volume total no evaporador rotatório à 60 °C até a secura. Dissolveu-se o resíduo em balão volumétrico com 100 mL de água. A uma alíquota de 1 mL dessa solução foram adicionados 1 mL de cloreto de cobalto 0,2 % e 1 mL de ácido sulfúrico concentrado, mantendo-se a reação no escuro por 20 min.

Após finalizado o tempo de reação, realizou-se a leitura em espectrofotômetro Genesys 10UV (Thermo Scientific, EUA) com cubeta de quartzo de 10 mm de caminho ótico da solução utilizando comprimento de onda de 284 nm para verificar a absorbância das amostras. A curva de calibração foi obtida adicionando-se padrões de saponina purificada obtida da casca de *Quillaja saponaria* (Sigma-Aldrich), com pureza de 20-35%, em água destilada nas concentrações de 0,125; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 mg/mL. A 1 mL de cada solução padrão também foi adicionada a reação com cloreto de cobalto e ácido sulfúrico. Para construção da curva padrão foi considerada uma pureza

de 27,5% para correção da concentração padrão de saponina. O branco foi feito acrescentando-se cloreto de cobalto e ácido sulfúrico à 1 mL de água destilada, deixando reagir por 20 minutos no escuro, assim como feito com as amostras.

2.8 Análise estatística dos dados

Os dados avaliados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparados estatisticamente pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$), por meio do programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2003). Os dados de porcentagem, como o teor de 20E e de saponinas foram transformados utilizando-se a fórmula $\text{arc sen } \sqrt{x}$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Variáveis de crescimento

O cultivo *ex vitro* de *Pfaffia glomerata* de diferentes ploidias, crescidas em vasos de diferentes volumes, sob aplicação ou não de paclobutrazol (PBZ) originou plantas com diferenças significativas no crescimento. O volume do vaso afetou em grandes proporções a altura das plantas, assim como as massas secas de folhas, de caules e de raízes (Figuras 1 e 2).

Plantas crescidas em vasos de 5 L tiveram altura cerca de 66% maior quando comparadas às crescidas em vasos de 2,5 L (Figura 1A). Uma interação significativa ($p < 0,05$) também foi verificada entre as variáveis ploidia e aplicação de PBZ (Figura 1B). A aplicação de PBZ apenas foi eficiente na redução da altura de plantas tetraploides, não havendo variação significativa nas diploides. De forma semelhante, para plantas submetidas a aplicações de PBZ, as tetraploides mostraram-se mais baixas que as diploides (Figura 1B e 2).

Ainda na análise do crescimento, a duplicação do volume do vaso levou ao aumento de 3,4 vezes na massa seca de folhas em comparação ao menor volume (Figura 1C). Para massa seca caulinar, a interação entre o volume de vaso e aplicação de PBZ mostrou maiores massas em plantas crescidas em vasos de 5 L, independente da aplicação ou não de PBZ (Figura 1D). Em relação às raízes, a massa seca variou em relação à interação entre o volume do vaso e ploidia da planta, observando-se maiores valores em diploides crescidos nos vasos de 5 L. No entanto, é importante observar que a média do aumento na massa radicular em função do aumento do volume do vaso foi de apenas 2 vezes, enquanto o das folhas foi de 3,4 vezes (Figura 1E e 2).

Nas avaliações da variável massa seca, a aplicação de PBZ apenas foi efetiva na redução da massa caulinar em plantas crescidas nos vasos de maior volume. Já a variável ploidia levou à redução apenas da massa radicular em plantas tetraploides quando comparadas às diploides, ambas crescidas em vasos de 5 L (Figura 1).

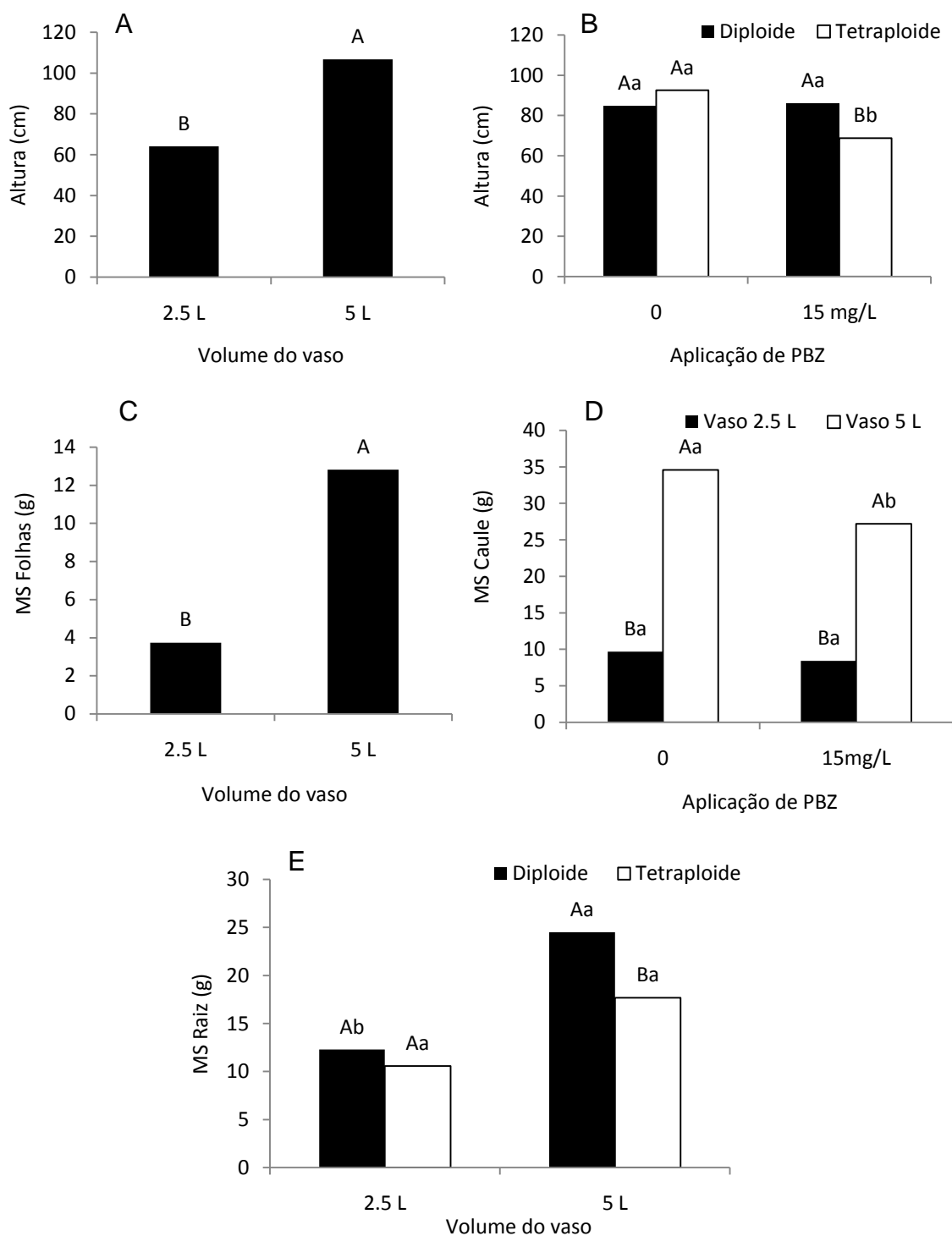


Figura 1. Variáveis de crescimento de plantas de *Pfaffia glomerata* de diferente ploidias, crescidas em vasos de volume distintos, submetidas ou não a tratamento com paclobutrazol (PBZ), aos 90 dias de cultivo em casa de vegetação. Letras maiúsculas comparam médias ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey de diferentes fatores dentro de um mesmo tratamento. Letras minúsculas comparam médias de um mesmo fator dentro de cada tratamento distinto ($p < 0,05$). **A e B:** Altura das plantas (cm). **C:** Massa seca (MS) das folhas (g). **D:** Massa seca de caules (g). **E:** Massa seca das raízes (g).

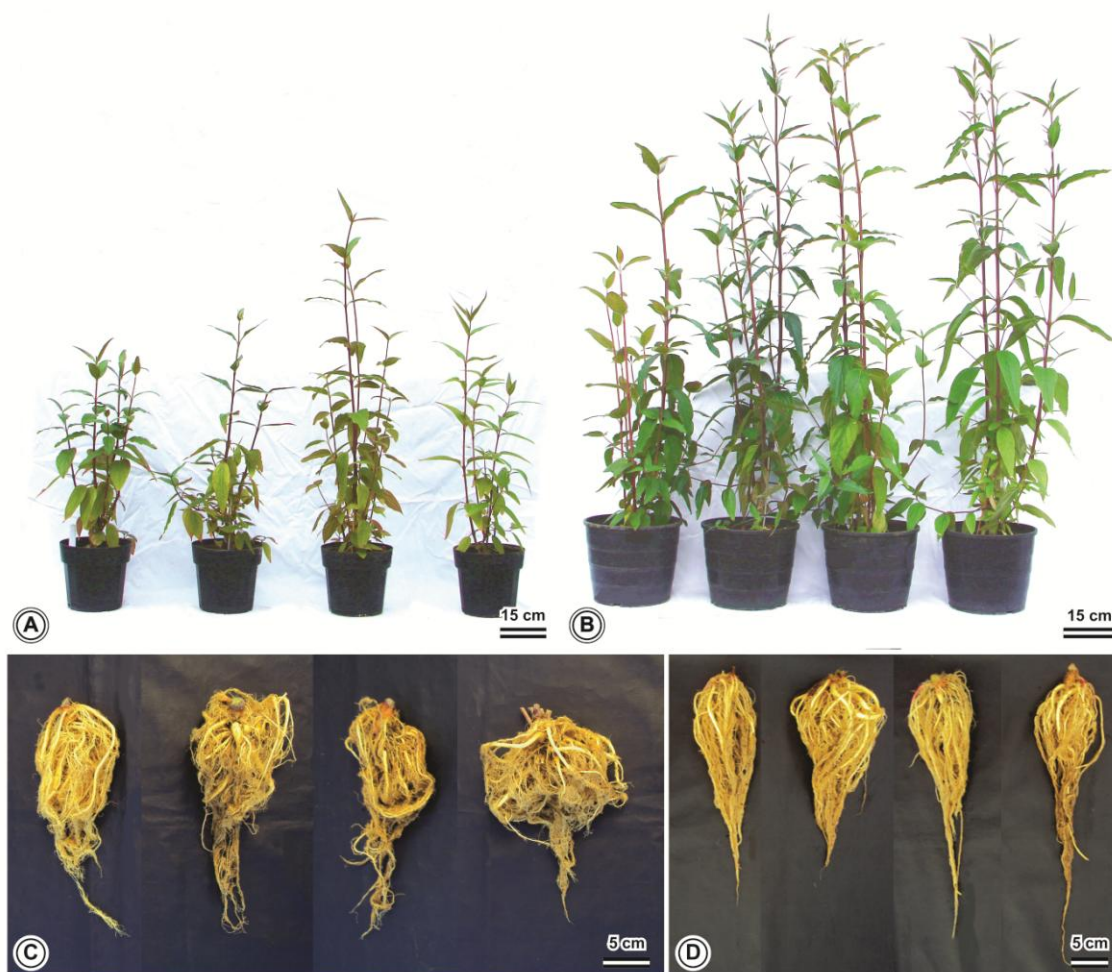


Figura 2. Aspecto da parte aérea (**A** e **B**) e sistema radicular (**C** e **D**) de *Pfaffia glomerata* de diferente ploidias, crescidas em vasos de volume distintos, submetidas ou não a tratamento com paclobutrazol (PBZ), aos 90 dias de cultivo em casa de vegetação. Parte aérea de plantas crescidas em vasos de 2,5 L (**A**) e 5 L (**B**). Sistema radicular de plantas crescidas em vasos de 2,5 L (**C**) e 5 L (**D**). Da esquerda pra direita: Poliploide tratado com 15 mg/L de PBZ, diploide tratado com 15 mg/L de PBZ, poliploide sem aplicação de PBZ, diploide sem aplicação de PBZ.

A utilização de vasos de maior volume levou ao maior desenvolvimento em altura em *Jatropha curcas*, *Maytenus ilicifolia*, *Apuleia leiocarpa*, *Anadenanthera macrocarpa* e maior acúmulo de massa seca da parte aérea e sistema radicular em *Glycine max*, *Zea mays* e *Anadenanthera macrocarpa*, ou apenas radicular e caulinar em *Maytenus ilicifolia* e *Apuleia leiocarpa* (Ray & Sinclair, 1998; Nicoloso et al., 2000; Geplly et al, 2011; Alves et al., 2012; Kasai et al., 2012).

Vasos de menor volume apresentam substrato com reduzida disponibilidade de nutrientes para o sistema radicular, devido ao consumo da planta e à maior perda por lixiviação, reduzindo a distribuição desses elementos para a parte aérea, refletindo no menor desenvolvimento da mesma (José et al., 2005). A redução do volume do vaso de cultivo pode restringir o

desenvolvimento do sistema radicular e reduzir a biossíntese e a translocação de citocininas, giberelinas e aminoácidos específicos das raízes para a parte aérea, afetando a expansão foliar e o crescimento de ramos (Carmi & Heuer, 1981). Yang et al. (2012) observaram que vasos menores tem maior alocação de fotoassimilados para o sistema radicular, o que aumenta a razão de crescimento raiz/parte aérea em soja e milho, assim como verificado em nossas análises.

PBZ, como inibidor giberélico, regula efetivamente o crescimento em altura das plantas por reduzir as taxas de divisão e alongamento celular. No entanto, nossos resultados mostraram redução significativa na altura apenas em plantas tetraploides. Tratamentos com PBZ foram efetivos na redução da altura e massa seca da parte aérea em *Oryza sativa* (Yim et al., 1997), bem como no comprimento de entrenós em *Lilium* (Zheng et al., 2012). A redução de massa seca do caule em função do PBZ verificada em nossos resultados deve-se exatamente à redução do comprimento dos entrenós induzida por esse triazol.

Poucos trabalhos com plantas poliploidizadas artificialmente relatam análises de crescimento, focando-se na maior parte das vezes em avaliações de morfologia foliar e floral, além de alterações no metabolismo. Aumento da massa seca foliar foi verificado em plantas poliploides de *Rosa rugosa* comparativamente aos diploides (Allum et al., 2007), enquanto um aumento na altura das plantas foi observado em *Solidago gigantea*, *Gerbera jamesonii* e *Lathyrus sativus* após duplicação da ploidia (Hull-Sanders et al., 2009; Dibyendu, 2010; Gantait et al., 2011).

3.2. Razão largura/comprimento foliar

A razão largura/comprimento foliar apresentou diferenças significativas em resposta aos fatores cultivo de plantas de diferentes ploidias, vasos de volumes distintos e tratamentos com PBZ (Figura 3). Plantas crescidas em vasos de 5 L mostraram maior razão largura/comprimento foliar (0,32) quando comparada a folhas de vasos de 2,5 L (0,28) (Figuras 3A e 4), o que está diretamente relacionada ao maior desenvolvimento de parte aérea e aumento da área foliar de plantas crescidas em vasos grandes (NeSmith & Duval, 1998).

A ploidia das plantas e a aplicação de PBZ apresentaram efeitos e interação significativa ($p < 0,05$) na razão das dimensões foliares (Figura 3B). A

maior razão foi observada em plantas tetraploides tratadas com PBZ (0,36), sendo que nas plantas que não receberam PBZ as maiores razões também foram mensuradas em tetraploides (Figura 4). Assim, a aplicação de PBZ apenas teve resposta significativa em plantas tetraploides (Figura 3B). Este efeito relacionado ao PBZ pode ser justificado pelo menor tamanho em geral das folhas de plantas que passaram por aplicação de PBZ, com redução principalmente no comprimento da lâmina foliar (Figura 4).

Kermani et al. (2003) observaram aumento significativo na razão largura/comprimento foliar em todos os poliploides obtidos, sendo o aumento nesse parâmetro uma característica típica de plantas poliploidizadas. Um aumento na largura foliar, somado a uma redução ou estabilidade no comprimento, levaram ao aumento da razão largura/comprimento das folhas de plantas poliploides em *Phlox subulata* e *Paulownia tomentosa* (Zhang et al., 2008; Tang et al., 2010), enquanto Gantait et al. (2011) observaram aumento de comprimento e largura da folha de poliploides de *Gerbera jamesonii*.

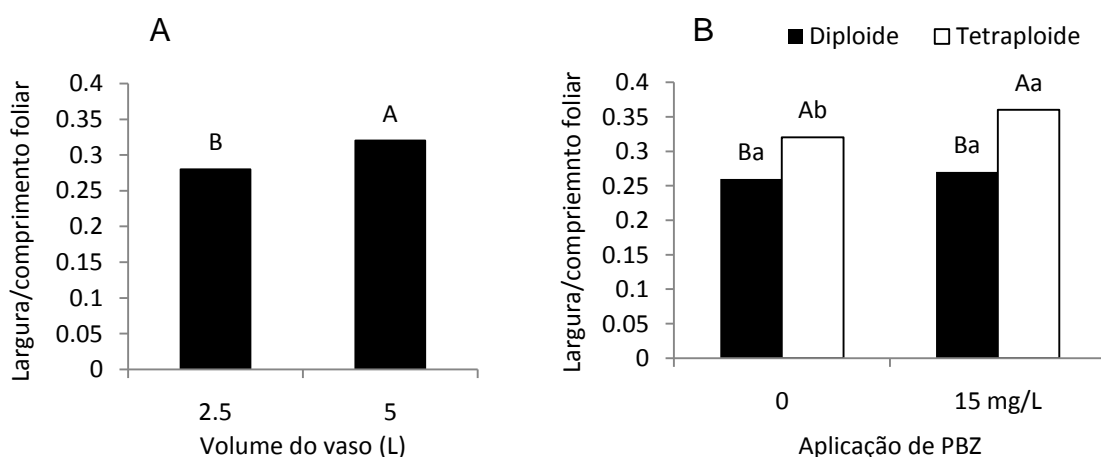


Figura 3. Razão largura/comprimento foliar de *P. glomerata* crescidas em volume de vasos distintos (A), de diferente ploidias e submetidas ou não a tratamento com paclobutrazol (PBZ) (B), aos 90 dias de cultivo em casa de vegetação. Letras maiúsculas comparam médias ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey de diferentes fatores dentro de um mesmo tratamento. Letras minúsculas comparam médias de um mesmo fator dentro de cada tratamento distinto ($p < 0,05$).



Figura 4. Morfologia foliar de *P. glomerata* de diferente ploidias e submetidas ou não a tratamento com paclobutrazol (PBZ), aos 90 dias de cultivo em vasos de 5 L em casa de vegetação. Da esquerda pra direita: diploide sem aplicação de PBZ, diploide tratado com 15 mg/L de PBZ, poliploide sem aplicação de PBZ, poliploide tratado com 15 mg/L de PBZ.

3.3. Densidade estomática

A densidade estomática apresentou variação significativa ($p < 0,05$) na face abaxial em resposta à ploidia das plantas, e na face adaxial em resposta à ploidia, tamanho de vaso e aplicação de PBZ, havendo interação entre os dois últimos fatores (Figura 5). *Pfaffia glomerata* é classificada como anfi-hipoestomática, sendo que a face abaxial apresenta densidade estomática muito superior, com média 265,57 estômatos/mm², quando comparado a face adaxial, com média 23,91 estômatos/mm². Essa análise permite inferir que plantas de fáfia mantidas em condições de casa de vegetação apresentam menor número de estômatos na face abaxial do que aquelas crescidas em cultivo *in vitro* tradicional, porém mostra taxas semelhantes às plantas cultivadas em frascos que permitem trocas gasosas, com média de 450 e 208 estômatos /mm² respectivamente (Saldanha, 2011). Este mesmo autor relata ainda forte redução na densidade estomática quando a atmosfera *in vitro* é enriquecida com CO₂ em concentrações maiores que às naturais, chegando a valores de 72 estômatos/mm². Esse dado nos permite inferir que a disponibilidade de CO₂ atmosférico está diretamente relacionada ao número de

estômatos nas folhas, influenciando possivelmente às taxas fotossintéticas e a transpiração.

O fator ploidia afetou de forma semelhante os valores da densidade estomática nas faces abaxial e adaxial da planta. Plantas diploides apresentaram 63% e 52% mais estômatos nas faces abaxial e adaxial, respectivamente, quando comparadas às tetraploides (Figuras 5A e B). Nossos resultados concordam com Aina et al. (2012), que verificaram que o aumento no nível de ploidia de 2X para 4X levou a redução no número de estômatos por unidade de área foliar na face abaxial de folhas de *Arachis paraguariensis*, assim como em *Lathyrus sativus* (Dibyendu, 2010), *Gerbera jamesonii* (Gantait et al., 2011), *Paulownia tomentosa* (Tang et al., 2010) e *Passiflora edulis* (Rêgo et al., 2011), sendo essa variação um dos fatores indicadores do nível de ploidia.

Na face adaxial também observou-se interação entre os fatores tamanho de vaso e tratamento com PBZ (Figura 5C). Para plantas crescidas em vasos de 2,5 L a aplicação de PBZ não levou a alterações significativas na densidade estomática, entretanto, plantas provenientes de vasos de 5 L tiveram redução no número de estômatos quando passaram por tratamento com PBZ. De forma semelhante, a variação no volume do vaso utilizado afetou significativamente a densidade estomática somente nas plantas que não receberam tratamento com PBZ. Esta variável foi estatisticamente maior em folhas de plantas crescidas em vasos de 5 L (Figura 5C). Assim as maiores e menores densidades estomáticas adaxiais foram obtidas em vaso de 5 L sem aplicação de PBZ (37,01 estômatos/mm²) e com aplicação de PBZ (12,19 estômatos/mm²), respectivamente.

A redução da densidade estomática da face adaxial em vasos de 5 L que passaram pelo tratamento com PBZ pode ser associada à verificação de uma diminuição no tamanho da folha devido ao tratamento com o trizol, principalmente para plantas diplóides. A menor área foliar reduziria as taxas fotossintéticas, por alterar negativamente a superfície de absorção, sendo assim desnecessários investimentos maiores em diferenciação estomática, proporcionando folhas com menor número de estômatos por área.

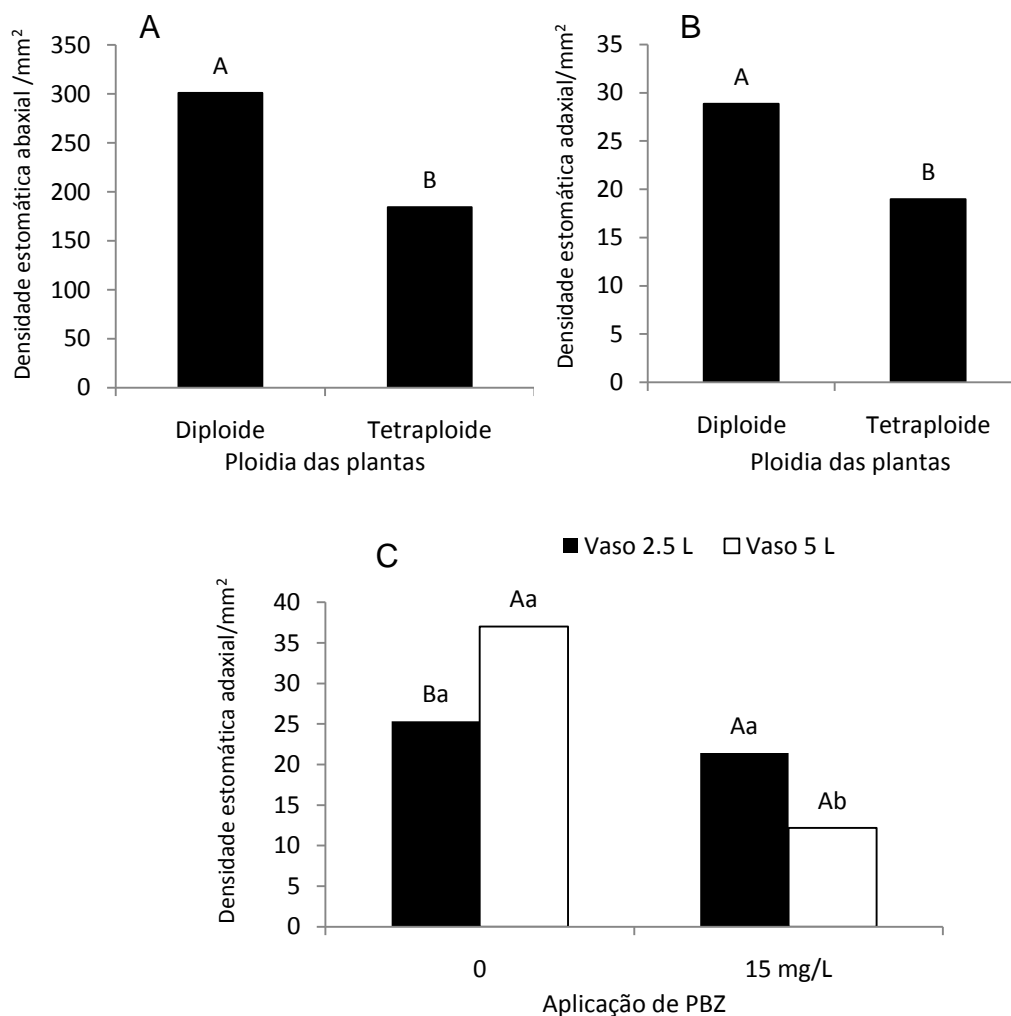


Figura 5. Densidade estomática abaxial (A) e adaxial (B e C) de *P. glomerata* de diferente ploidas, crescidas em volume de vasos distintos e submetidas ou não a tratamento com paclobutrazol (PBZ), aos 90 dias de cultivo em casa de vegetação. Letras maiúsculas comparam médias ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey de diferentes fatores dentro de um mesmo tratamento. Letras minúsculas comparam médias de um mesmo fator dentro de cada tratamento distinto ($p < 0,05$).

3.4 Quantificação de pigmentos

Os teores de clorofilas *a* e *b* foram influenciados pelo volume do vaso, ploidia da planta e aplicação de PBZ. Verificou-se interação significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes volumes de vaso e os tratamentos com PBZ. Já para os carotenoides, apenas o tamanho de vaso e a aplicação de PBZ levaram a alterações significativas no teor desse pigmento (Figura 6).

A aplicação de PBZ aumentou em grandes proporções o teor de clorofilas *a* e *b* de 25,18 para 31,32 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Figura 6A) e 6,27 para 8,53 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Figura 6C), respectivamente. Nosso resultado corrobora com aqueles obtidos por Zheng et al. (2012) que observaram aumento nos níveis das clorofilas *a* e *b* em plantas de *Lilium* tratadas com PBZ, mesmo efeito verificado em

Arabidopsis (Ribeiro et al., 2012), *Catharanthus roseus* (Jaleel et al., 2007) e *Tectona grandis* (Zhou et al., 2012). Esta resposta estaria relacionada ao fato que plantas tratadas com PBZ poderiam sintetizar mais citocinina, que por sua vez poderiam induzir o aumento da diferenciação de plastídeos e biossíntese de clorofilas, assim como prevenir a sua degradação desses pigmentos (Fletcher et al., 1982).

Ainda em relação às clorofilas, a interação de tamanho de vaso e ploidia mostrou maiores teores de clorofilas *a* e *b* em plantas diplóides crescidas em vasos de 5 L. Entretanto, plantas tetraploides apresentaram maiores teores de clorofila *b* quando desenvolvidas em vasos de 2,5 L, não havendo variação significativa para os pigmentos do tipo *a* (Figura 6 B e D). O aumento do teor de clorofilas em plantas diploides nos vasos maiores pode estar diretamente relacionado ao melhor desenvolvimento da parte aérea nestes, o que permite maiores taxas fotossintéticas e, portanto, maior teor de pigmentos para auxiliar nesse processo fisiológico. O mesmo não foi observado em poliploides, em virtude de que plantas dessa ploidia mostraram menores variações de desenvolvimento entre os volumes de vasos testados quando comparado aos diploides, que se desenvolveram pouco em vasos pequenos. A variação positiva do teor de clorofilas em relação ao aumento no volume de vaso foi observada também em soja, onde relacionou-se à maior quantificação deste pigmento ao aumento nas taxas fotossintéticas foliares (Kasai et al., 2012). Apesar de não terem realizado análise quantitativa dos pigmentos, uma coloração verde mais escuro comparada aos diploides foi observada em poliploide de *Rosa rugosa* (Kermani et al., 2003) e de *Ocimum basilicum* (Omidbaigi et al., 2010).

O teor de carotenoides foi influenciado pelo tamanho de vaso e aplicação de PBZ, não havendo interação significativa ($p < 0,05$) entre os fatores (Figura 6E e F). Ao usar vasos de 2,5 L obtivemos teor de carotenoides de $6,30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, significativamente inferior quando comparado a $8,19 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ verificado nos vasos maiores (Figura 6F). Já as plantas que passaram por aplicações de PBZ apresentaram quantificação de $7,83 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de carotenoides, enquanto o controle que não sofreu tratamento apresentou $6,66 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Figura 6E). Tratamentos com PBZ também mostraram-se eficientes no aumento do teor de carotenoides em *Daucus carota* (Gopi et al., 2007) e em cevada (Buchenauer &

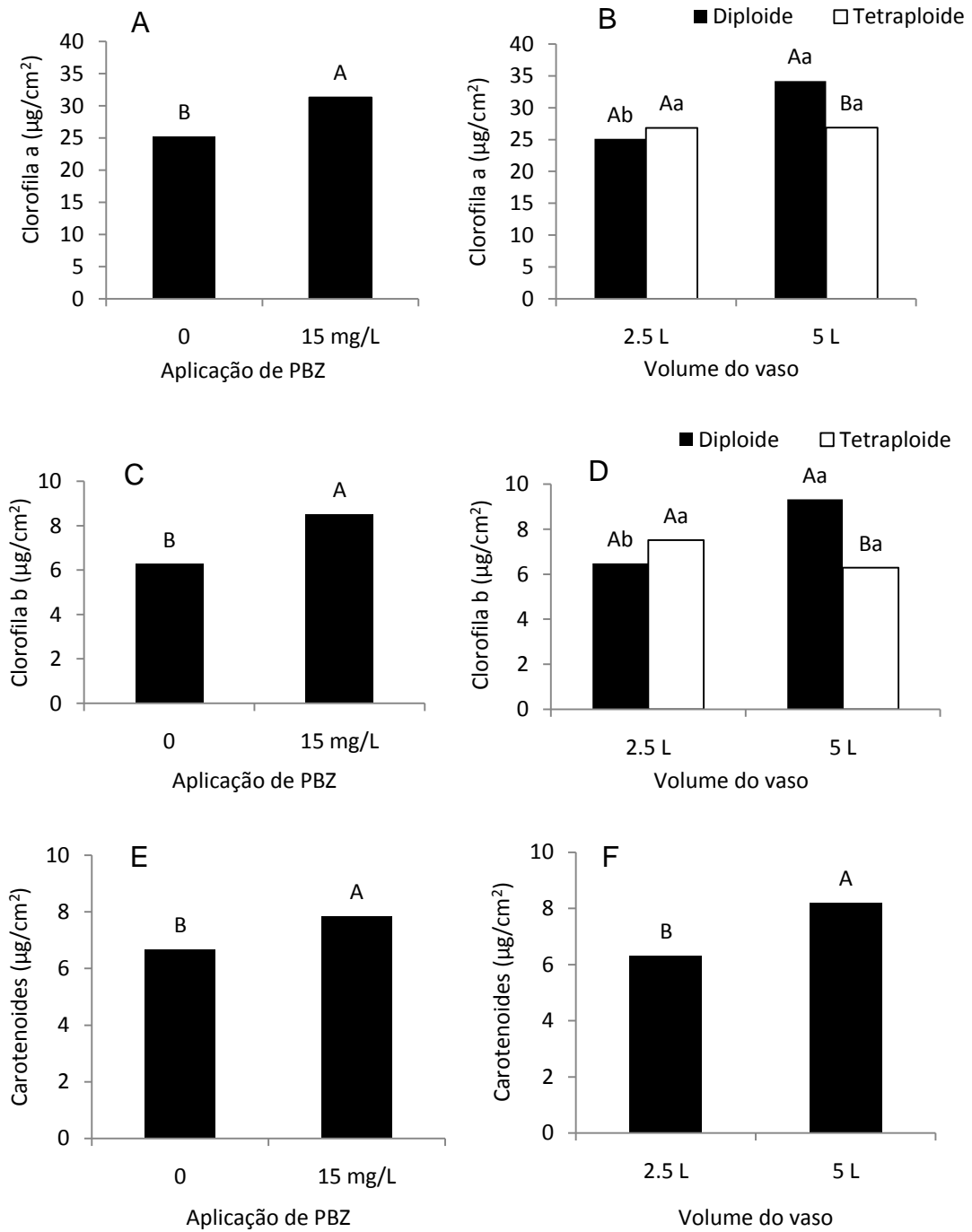


Figura 6. Pigmentos fotossintéticos de plantas de *P. glomerata* de diferente ploidias, crescidas em vasos de volumes distintos e submetidas ou não a tratamento com paclobutrazol (PBZ), aos 90 dias de cultivo em casa de vegetação. Letras maiúsculas comparam médias ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey de diferentes fatores dentro de um mesmo tratamento. Letras minúsculas comparam médias de um mesmo fator dentro de cada tratamento distinto ($p < 0,05$). **A e B:** clorofila a. **C e D:** clorofila b. **E e F:** carotenoides.

Rohner, 1981). Esta indução nos carotenoides totais pode estar relacionado à potencial função do PBZ na inibição dos efeitos de estresses abióticos em plantas, seja por seca, altas e baixas temperaturas, poluentes entre outros, assim como aumento de sua tolerância a essas condições (Fletcher et al., 2000). De forma semelhante, a condição restritiva de crescimento observada em vasos de 2,5 L poderia estar constituindo estresses hídricos e nutricionais para as plantas, aos quais elas responderiam induzindo compostos anti-estresse, como os carotenoides.

3.5. Quantificação de metabólitos secundários

A análise quantitativa de metabólitos secundários em *P. glomerata* também foi objetivo deste trabalho, de forma a avaliar a influência dos fatores ploidia da planta, aplicação de PBZ e volume do vaso sobre a produção de metabólitos secundários na espécie. Os resultados mostram que saponinas totais e 20E responderam de forma diferente a essas variáveis (Figuras 7 e 8).

Avaliação dos teores de 20E mostrou variações significativas ($p < 0,05$) em folhas e caules, havendo interação significativa entre ploidia e aplicação de PBZ nas folhas e entre os três fatores no caule (Figura 7). A duplicação da ploidia foi eficiente na indução do acúmulo de 20E nas folhas de plantas que não sofreram aplicação de PBZ, enquanto a aplicação de PBZ levou redução de 20E em plantas tetraploides (Figura 7A). Já nos caules, plantas tetraploides mostraram maiores teores de 20E comparadas às diploides quando crescidas em vasos de 2,5 L e que não sofreram aplicação de PBZ (Figura 7B), assim como verificou-se que o aumento no volume dos vasos foi eficiente na indução do 20E em plantas diploides que não receberam tratamento com PBZ (Figura 7C). Ainda no caule, observou-se redução no teor de 20E devido à aplicação de PBZ em plantas diploides crescidas em vasos de menor volume e plantas tetraploides crescidas em vasos de maior volume (Figura 7D). Em relação às raízes, o teor de 20E não foi influenciado pelas variações na ploidia, volume de vaso e aplicação de saponinas, apresentando médias de 0,2673%.

Comparações entre os teores de 20E em *P. glomerata* observados em condições *ex vitro* e *in vitro* (Capítulo 1) mostraram um maior acúmulo de 20E nas raízes de plantas mantidas em casa de vegetação, exceto para aquelas mantidas *in vitro* em fotoautotrofia com enriquecimento de CO₂, enquanto maior teor foi verificado nas folhas de plantas *in vitro*. Esse resultado provavelmente

ocorre em função da baixa tuberização das raízes nas condições *in vitro*, que não permite a atuação dessas como órgão acumulador do metabólito. A distribuição de 20E no corpo vegetal mostrou maior acúmulo do metabólito nas raízes, sendo inferiores nas folhas e mínimos nos caules, de acordo com os resultados observados por Festucci-Buselli et al. (2008).

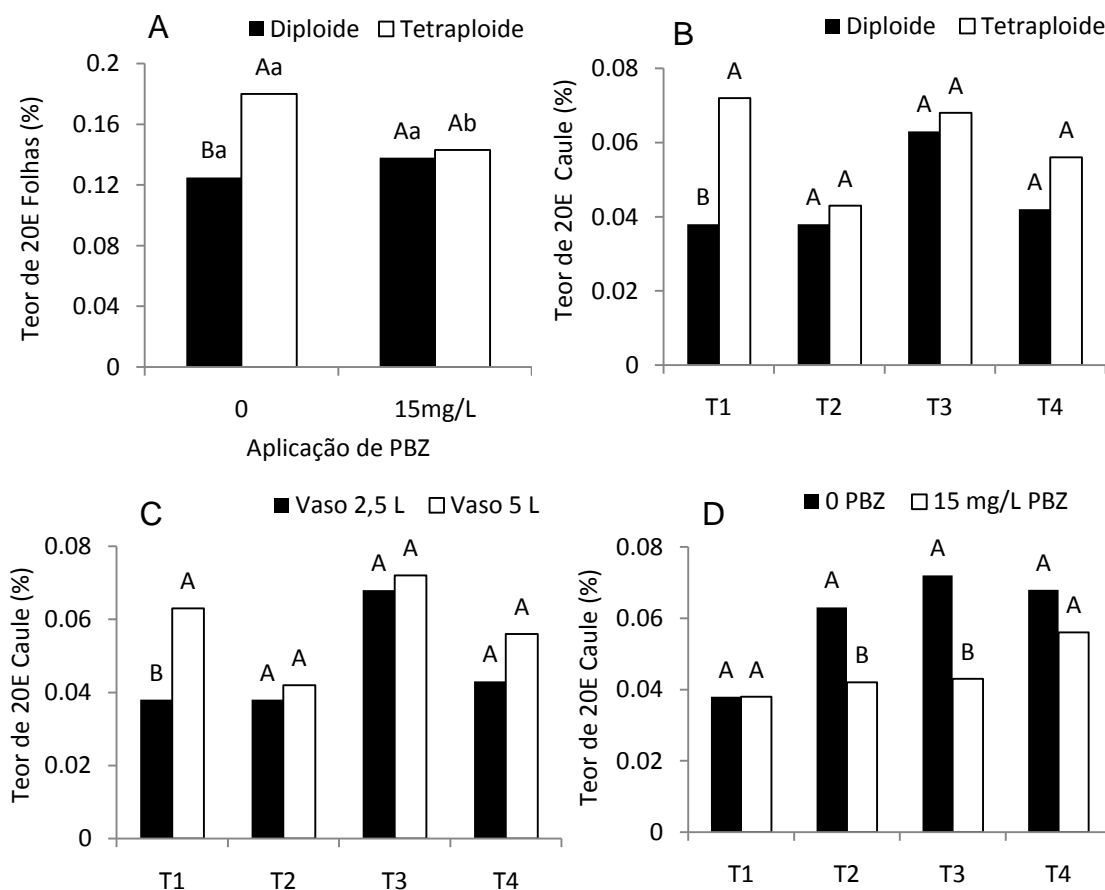


Figura 7. Produção de 20E em folhas (A) e caule (B, C e D) de *P. glomerata* de diferente ploidias, crescidas em vasos de volumes distintos e submetidas ou não a tratamento com paclobutrazol (PBZ), aos 90 dias de cultivo em casa de vegetação. Letras maiúsculas comparam médias ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey de diferentes fatores dentro de um mesmo tratamento. Letras minúsculas comparam médias de um mesmo fator dentro de cada tratamento distinto ($p < 0,05$). **B:** T1- Planta crescida em vaso de 2,5L sem aplicação de PBZ; T2- Planta crescida em vaso de 2,5L com aplicação de PBZ; T3-Planta crescida em vaso de 5L sem aplicação de PBZ; T4- Planta crescida em vaso de 5L com aplicação de PBZ. **C:** T1-Planta diploide sem aplicação de PBZ; T2- Planta diploide com aplicação de PBZ; Planta tetraploide sem aplicação de PBZ; T4- Planta tetraploide com aplicação de PBZ. **D:** T1- Planta diploide crescida em vaso de 2,5L; T2- Planta diploide crescida em vaso de 5L; T3- Planta tetraploide crescida em vaso de 2,5L; T4- Planta tetraploide crescida em vaso de 5L.

A quantificação das saponinas totais foi analisada exclusivamente nas raízes, que é o órgão de *P. glomerata* com maior acúmulo desse metabólito, e por isso é a porção da planta farmacologicamente utilizada. O aumento no volume do vaso levou a redução de saponinas apenas em plantas diploides, mantendo-se constante nas tetraploides, e em plantas que não foram expostas ao PBZ (Figura 8A). A aplicação de PBZ levou a redução no teor de saponinas em vasos pequenos, e manteve-se igual ao controle em vasos maiores. Já a variação na ploidia das plantas teve resposta distinta de acordo com o tamanho de vaso no qual as plantas cresceram, observando-se redução de saponinas em plantas tetraploides crescidas em vasos de 2,5 L e aumento nas crescidas em vasos de 5 L (Figura 8B).

Em relação aos teores de saponinas, os valores obtidos em nosso experimento não correspondem aos valores reais de saponinas em fáfia, uma vez que o padrão por nós utilizado tem pureza que varia em larga escala, 20 a 35%. Além disso, o padrão não consiste do composto químico isolado, e sim de saponinas extraídas da casca da árvore *Quillaja saponaria*. Optou-se, portanto, por este padrão, uma vez que o outro disponível no mercado, da empresa Merck, não tinha a pureza determinada pelo fabricante. Dessa forma, apesar de não corresponderem aos valores reais do metabólito na espécie, a análise quantitativa foi eficiente na verificação da indução do composto pelos tratamentos avaliados.

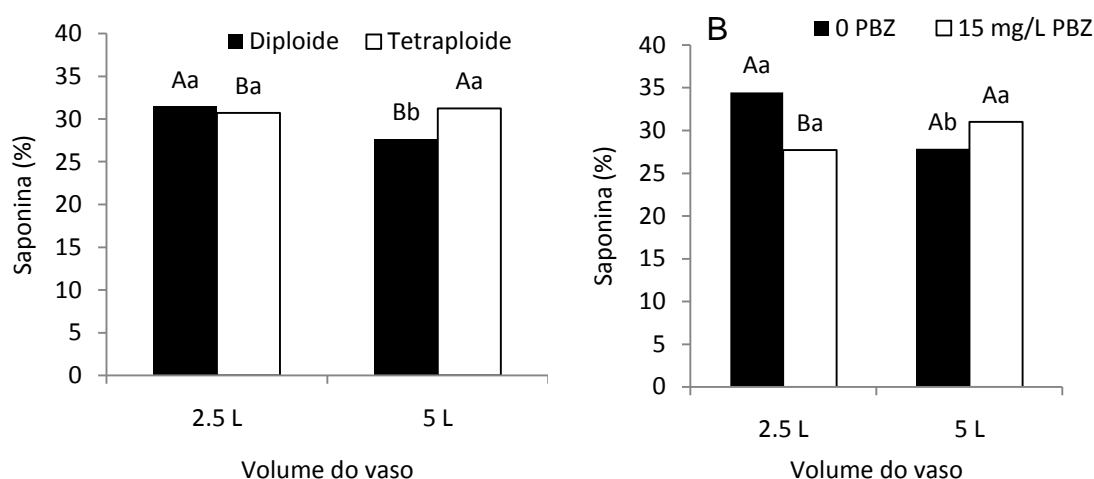


Figura 8. Produção de saponinas totais em raízes de *P. glomerata* de diferente ploidias, crescidas em vasos de volumes distintos e submetidas ou não a tratamento com paclobutrazol (PBZ), aos 90 dias de cultivo em casa de vegetação. Letras maiúsculas comparam médias ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey de diferentes fatores dentro de um mesmo tratamento. Letras minúsculas comparam médias de um mesmo fator dentro de cada tratamento distinto ($p < 0,05$).

A redução de saponinas verificada com a duplicação da ploidia de plantas crescidas nos vasos pequenos pode ser explicada pelo fato que plantas poliploides tendem a ter melhor crescimento vegetativo, e conseqüentemente maior área foliar, proporcionando aumento das taxas fotossintéticas e maior produção de fotoassimilados que poderiam ser investidos também no crescimento e tuberização radicular. Entretanto, o pequeno volume dos vasos poderia estar limitando o desenvolvimento das raízes, prejudicando a síntese de saponinas ou mantendo-se inalterada, como verificado para o 20E acumulado nas raízes. Enquanto isso, vasos de maior volume, por permitirem maior desenvolvimento das raízes, responderam ao aumento da ploidia com indução no acúmulo de saponinas.

Ainda em relação à duplicação cromossômica, a pouca resposta da parte aérea a indução de 20E por poliploidização diverge de muitos trabalhos publicados que relatam que a produção de metabólitos secundários em plantas pode aumentar significativamente em indivíduos poliploides. Dessa forma, a poliploidia poderia ser usada como ferramenta para obtenção de novos cultivares de plantas medicinais, mais eficientes que os de ocorrência natural (Zhang et al., 2010). A exemplo disso, estima-se que o teor de alcaloides em plantas poliploides pode aumentar em até 50% em relação a plantas diploides (Levin, 2002). Alguns estudos evidenciam a possibilidade de aumento de metabólitos secundários na parte aérea de plantas poliploides, como em *Pinellia ternate* (He et al., 2012), *Centella asiatica* (Kaensaksiri et al., 2011) e *Solidago gigantea* (Hull-Sanders et al., 2009), assim como acúmulos nas raízes em *Panax ginseng* (Kim et al., 2004), *Artemisia annua* (Jesus-Gonzalez & Weathers, 2003) e *Salvia miltiorrhiza* (Gao et al., 1996).

Nas condições experimentais, diferentemente do efeito relatado na literatura, a aplicação de PBZ em *P. glomerata* não foi eficiente para induzir o acúmulo de metabólitos secundários. A aplicação de PBZ estimulou a biossíntese de diversos metabólitos secundários, como prolina (Mackay et al., 1990), glicina betaína (Jaleel & Salem, 2010), alcaloides (Gopi et al., 2007; Jaleel et al., 2009) e antocianinas (Ilan & Dougall, 1992). Plantas de *Arabidopsis thaliana* tratadas com PBZ tiveram também marcante regulação positiva dos genes relacionados à biossíntese de antocianinas e flavonoides (Ribeiro et al., 2012).

No entanto, PBZ não foi eficiente na indução dos ácidos cafatório e cicórico em *Echinacea purpurea* (Jones et al., 2009). Ribeiro et al. (2012) também relatam inibição dos genes associados a biossíntese de lipídeos pela redução no teor de giberelinas nas plantas, efeito este proveniente da aplicação de PBZ. Uma vez que lipídeos, como colesterol e estigmasterol, são precursores do fitoecdisteroide 20E, estes metabólitos podem ser afetados negativamente pelo PBZ, mesmo que de forma indireta. Além disso, uma vez que a biossíntese de metabólitos secundários como fitoesteroides e saponinas envolvem reações enzimáticas similares a algumas etapas da biossíntese de giberelinas, a aplicação de inibidores giberélicos acabam por surtir algum efeito no metabolismo desses compostos (Rademacher, 2000). A ação de retardantes do crescimento, como PBZ, inibe a enzima 2,3-oxidoesqualeno ciclase, passo chave na regulação da rota de formação de esteróis (Douglas & Paleg, 1974), assim como de saponinas. Dessa forma, o PBZ pode ter influência nula ou negativa na síntese desses metabólitos triterpenóides, como obtido em nossos resultados, mas não interferir negativamente em outros metabólitos independentes dessa rota biossintética, como os alcaloides.

O aumento nos teores de 20E da parte aérea com o uso de vasos de maior volume apenas ocorreu em plantas que não sofreram aplicação de PBZ, pois o tratamento com este triazol leva a redução do crescimento vegetativo da planta, que fica impossibilitada de aumentar sua área fotossinteticamente ativa, e com isso aumentar a produção de esqueletos carbônicos que poderiam ser direcionados para o metabolismo secundário.

A análise conjunta de saponinas e fitoecdisteroides mostrou que não há relação entre o acúmulo desses metabólitos. Isso mostra que, mesmo sendo derivados de um mesmo precursor, o oxidoesqualeno, em condições naturais a biossíntese de um dos compostos não acarreta na inibição da produção do outro.

Dessa forma, este estudo mostra que o aumento do volume dos vasos, apesar de ter proporcionado melhor crescimento vegetativo das plantas e melhor condições para melhoria da capacidade fotossintética, como densidade estomática e teor de pigmentos, não proporcionou aumento efetivo no teor de metabólitos secundários. Contrariando as expectativas, a duplicação da ploidia mostrou-se pouco eficiente na indução de saponinas e 20E, o que pode estar relacionado ao curto prazo de desenvolvimento do experimento, que não seria

suficiente para adaptação dos processos fisiológicos à duplicação cromossômica ou à variação natural da resposta das espécies ao evento de poliploidização (Aina et al., 2012). De modo semelhante, a aplicação de PBZ também não respondeu como esperado, o que pode ser relacionado à baixa assimilação desse composto pelas raízes, ou baixa concentração aplicada. Assim, novos estudos são necessários, utilizando de preferência vasos de volume maiores, porém mantendo-se o crescimento das plantas por tempo mais prolongado ou aplicando-se concentrações mais elevadas de PBZ.

4. FERERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AINA, O.; QUESENBERRY, K.; GALLO, M. In vitro induction of tetraploids in *Arachis paraguariensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 111: 231-238, 2012.

ALLUM, J.F.; BRINGLOE, D.H.; ROBERTS, A.V. Chromosome doubling in a *Rosa rugosa* Thunb. hybrid by exposure of in vitro nodes to oryzalin: the effects of node length, oryzalin concentration and exposure time. **Plant Cell Reports**, 26:1977–1984, 2007.

ALVES, R.B.N.; MENDES, R.A.; MENDES, M.A.; CARNEIRO, R.M.D.G.; SILVA, D.B.; CARDOSO, L.D.; SALOMÃO, A.N.; VIEIRA, R.F. Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] germplasm conservation. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 8: 1-4, 2006.

ALVES, A.S.; OLIVEIRA, L.S.M. de; ANDRADE, L.A. de; GONÇALVES, G.S.; SILVA, J.M. da. Produção de mudas de angico em diferentes tamanhos de recipientes e composições de substratos. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, 7(2): 39-44, 2012.

BANINASAB, B. Amelioration of chilling stress by paclobutrazol in watermelon seedlings. **Scientia Horticulture**, 121:144–148, 2009.

BERKOW, S. Size and alkaloid content of seeds in induced autotetraploids of *Datura innoxia*, *Datura stramonium* and *Hyoscyamus niger*. **Pharmaceutical Biology**, 39:329–31, 2001.

BUCHENAUER, R.H. Effects of triadimefon and triadimenol on various plant species as well as gibberellin content and sterol metabolism in shoots of barley seedlings. **Pest Biochemistry Physiology**, 15: 58–70, 1981.

CARMI, A.; HEUER, B. The role of roots in control of bean shoot growth. **Annals of Botany**, 48:519-527, 1981.

DANIEL, J.F. de S.; ALVES, K.Z.; SILVA, J.D.; DA SILVA E SOUZA, P.V.; D CARVALHO, M.G.; FREIRE, R.B.; FERRERIA, D.T.; FREIRE, M.F.I. Free radical scavenging activity of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). **Indian Journal Pharmacology**, v.37, p.174-178, 2005.

DIBYENDU, T. Cytogenetic characterization of induced autotetraploids in grass pea (*Lathyrus sativus* L.) **Caryologia**, 63(1): 62-72, 2010.

DOUGLAS, T.J.; PALEG, L.G. Inhibitionn of sterol biosynthesis and stem elongation of tobacco seedlings induced by some hypocholesterolemic agents. **Journal of Experimental Botany**, 32: 59-68, 1981.

FERREIRA, D.F. **Sisvar 5.0**. 2003. Disponível em: <[HTTP://www.dex.ufla.br/~danielff/software.htm](http://www.dex.ufla.br/~danielff/software.htm)>.

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

FLETCHER, R.A.; KALLIDUMBIL, V.; STEELE, P. (1982) An improved bioassay for cytokinins using cucumber cotyledons. **Plant Physiology**, 69: 675–677

FLETCHER, R.A.; GILLEY, A.; SANKHLA, N.; DAVIS, T.D. Triazoles as plant growth regulators and stress protectants. **Horticulture Reviews** 24: 55–137, 2000.

FLORES, R. **Cultura de tecidos e produção de β -ecdisona em *Pfaffia glomerata* e *Pfaffia tuberosa* (Amaranthaceae)**. 2006. 165p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

FREITAS, C.S.; BAGGIO, C.H.; Da SILVA-SANTOS, J.E., RIECK L.; De MORAES, C.A.; CORREA, J.R.C.; MING, L.C.; CORTEZ, D.A.G.; MARQUES, M.C.A. Involvement of nitric oxide in the gastroprotective effects of an aqueous extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, Amaranthaceae, in rats. **Life Science**, 74: 1167-1179, 2004.

GANTAIT, S.; MANDAL, N.; BHATTACHARYYA, S.; DAS, P.K. Induction and identification of tetraploids using in vitro colchicine treatment of *Gerbera jamesonii* Bolus cv. Sciella. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 106: 485-493, 2011.

GAO, S.L.; ZHU, D.N.; CAI, Z.H.; XU, D.R. Autotetraploid plants from colchicine-treated bud culture of *Salvia miltiorrhiza* Bge. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 47: 73-77, 1996.

GEPLY, O.A.; BAIYEWU, R.A.; ADEGOKE, I.A.; AYODELE, O.O.; ADEMOLA, I.T. Effect of Different Pot Sizes and Growth Media on the Agronomic Performance of *Jatropha curcas*. **Pakistan Journal of Nutrition**, 10: 952-954, 2011.

GOPI, R.; JALEEL, C.A.; SAIRAM, R.; LAKSHMANAN, G.M.A.; GOMATHINAYAGAM, M.; PANNEERSELVAM, R. Differential effects of hexaconazole and paclobutrazol on biomass, electrolyte leakage, lipid peroxidation and antioxidant potential of *Daucus carota* L. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 60: 180–186, 2007.

HE, L.Y.; DING, Z.; JIANG, F.; JIN, B.; LI, W.; DING, X.; SUN, J.; LV, G. Induction and identification of hexadecaploid of *Pinellia ternate*. **Euphytica**, 186: 479-488, 2012.

HOAGLAND, D.R., ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experiment Station**, 394, 32p, 1950.

HULL-SANDERS, H.M.; JOHNSON, R.H.; OWEN, H.A.; MEYER, G.A. Effects of polyploidy on secondary chemistry, physiology, and performance of native and invasive genotypes of *Solidago gigantea* (Asteraceae). **American Journal of Botany**, 96: 762–770. 2009.

ILAN, A.; DOUGALL, D.K. The effect of growth retardants on anthocyanin production in carrot cell suspension cultures. **Plant Cell Reports**, 11: 304–309, 1992.

JALEEL, C.A.; MANIVANNAN, P.; SANKAR, B.; KISHOREKUMAR, A.; SANKARI, S.; PANNEERSELVAM, R. Paclobutrazol enhances photosynthesis and ajmalicine production in *Catharanthus roseus*. **Process Biochemistry**, 42: 1566-1560, 2007.

JALEEL, C.A.; GOPI, R.; GOMATHINAYAGAM, M.; PANNEERSELVAM, R. Traditional and non-traditional plant growth regulators alters phytochemical constituents in *Catharanthus roseus*. **Process Biochemistry**, 44: 205-209, 2009.

JALEEL, C.A.; SALEM, M.A. Fate of biochemical components of *Catharanthus roseus* after treatment with different plant growth regulators. **Australian Journal of Agricultural Engineering**, 1: 45-53, 2010.

JESUS-GONZALEZ, L.; WEATHERS, P.J. Tetraploid *Artemisia annua* hairy roots produce more artemisinin than diploids. **Plant Cell Reports**, 21: 809-813, 2003.

JONES, M.P.A.; SAXENA, P.K.; MURCH, S.J. Elicitation of secondary metabolism in *Echinacea purpurea* L. by gibberellic acid and triazoles. **Engineering of Life Sciences**, 9: 205-210, 2009.

JOSÉ, A.C.; DAVIDE, A.C.; OLIVEIRA, S.L. Produção de mudas de aroeira (*Schinus terebinthifolius* raddi) para recuperação de áreas degradadas pela mineração de bauxita. **Cerne**, 11(2): 187-196, 2005.

KAENSAKSIRI, T.; SOONTORNCHAINAKSAENG, P.; SOONTHORNCHAREONNON, N.; PRATHANTURARUG, S. *In vitro* induction of polyploidy in *Centella asiatica* (L.) Urban. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 107: 187-194, 2011.

KAMADA, T.; PICOLI, E.A.T.; VIEIRA, R.F.; BARBOSA, L.C.A.; CRUZ, C.D.; OTONI, W.C. Variação de caracteres morfológicos e fisiológicos de populações naturais de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e correlação com a produção de β -ecdisona. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 11: 247-256, 2009.

KASAI, M.; KOIDE, K.; ICHIKAWA, Y. Effect of pot size on various characteristics related to photosynthetic matter production in soybean plants. **International Journal of Agronomy**, 2012, 7p.

KERMANI, M.J.; SARASAN, V.; ROBERTS, A.V.; YOKOYA, K.; WENTWORTH, J.; SIEBER, V.K. Oryzalin-induced chromosome doubling in *Rosa* and its effect on plant morphology and pollen viability. **Theoretical and Applied Genetics** 107: 1195–1200, 2003.

KIM, Y.S.; HAHN, E.J.; MURTHY, H.N.; PAEK, K.Y. Effect of polyploidy induction on biomass and ginsenoside accumulations in adventitious roots of Ginseng. **Journal of Plant Biology**, 47: 356-360, 2004.

- LEVIN, D.A. **The Role of Chromosomal Change in Plant Evolution**. Oxford University Press, 2002, 240p.
- MAGALHÃES, P.M. de. **Agrotecnologia para o cultivo da *Pfaffia***. Campinas: CPQBA-UNICAMP, 2002, 5p.
- MACKAY, C.; HALL, J.; HOFSTRA, G.; FLETCHER, R. Uniconazole-induced changes in abscisic acid, total amino acids and proline in *Phaseolus vulgaris*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 37: 74–82, 1990.
- MENDES, F.R. Tonic, fortifier and aphrodisiac: adaptogens in the Brazilian folk medicine. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 21: 754-763, 2011.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15: 473-497, 1962.
- NESMITH, D.S.; DUVAL, J.R. The effect of container size. **HortTechnology**, 8: 495–498, 1998.
- NETO, A.G.; COSTA, J.M.L.C.; BELATI, C.C.; VINHOLIS, A.H.C.; POSSEBOM, L.S.; Da SILVA FILHO, A.A.; CUNHA, W.R.; CARVALHO, J.C.T.; BASTOS, J.K.; SILVA, M.L.A. Analgesic and anti-inflammatory activity of a crude root extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Journal of Ethnopharmacology**, 96: 87-91, 2005.
- NICOLOSO, F.T.; FORTUNATO, R.P.; ZANCHETTI, F.; CASSOL, L.F.; EISINGER, S.M. Recipientes e substratos na produção de mudas de *Maytenus ilicifolia* e *Apuleia leiocarpa*. **Ciência Rural**, 30: 987-992, 2000.
- OMIDBAIGI, R.; MIRZAEI, M.; HASSANI, M.E.; MOGHADAM, M.S. Induction and identification of polyploidy in basil (*Ocimum basilicum* L.) medicinal plant by colchicine treatment. **International Journal of Plant Production**, 4: 87-98, 2010.
- OSBORN, T.C.; CHRIS PIRES, J.; BIRCHLER, J.A.; AUGER, D.L.; CHEN, Z.F.; LEE, H.; COMAI, L.; MADLUNG, A.; DOERGE, R.W.; COLOT, V.; MARTIENSSEN, R.A. Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. **Trends in Genetics**, 19: 141-147, 2003.
- POORTER, H. Plant growth and carbon economy. In 'Encyclopedia of life sciences', 2002. (Nature Publishing Group: London) Available at: <http://www.els.net>
- POTT, A.; POTT, V.S. **Plantas do pantanal**. Corumbá: Embrapa-SPI, 1994. 320p.
- RADEMACHER, W. Growth Retardants: Effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 51: 501–531, 2000.
- RAY, J.D.; SINCLAIR, T.R. The effect of pot size on growth and transpiration of maize and soybean during water deficit stress. **Journal of Experimental Botany**, 49(325):1381–1386, 1998

RÊGO, M.M.; RÊGO, E.R.; BRUCKNER, C.H.; FINGER, F.L.; OTONI, W.C. *In vitro* induction of autotetraploids from diploid yellow passion fruit mediated by colchicine and oryzalin. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 107: 451-453, 2011.

RIBEIRO, D.M.; ARAÚJO, W.L.; FERNIE, A.R.; SCHIOOERS, J.H.M.; MUELLER-ROEBER, B. Translatome and metabolome effects triggered by gibberellins during rosette growth in *Arabidopsis*. **Journal of Experimental Botany**, 63: 2769-2786, 2012.

SANTOS, R.P.; CRUZ, A.C.F.; IAREMA, L.; KUKI, K.N.; OTONI, W.C. Protocolo para extração de pigmentos foliares em porta-enxertos de videira micropropagados. **Revista Ceres**, 55: 356-364, 2008.

SEGATTO, F.B.; BISOGNIN, D.A.; BENEDETTI, M.; COSTA, L.C.; RAMPELOTTO, M.V.; NICOLOSO, F.T. Técnica para o estudo da anatomia da epiderme foliar de batata. **Ciência Rural**, 34: 1597-1601, 2004.

SHIOBARA, Y.; INOUE, S.; KATO, K. A nortriterpenoid, triterpenoid and ecdysteroids from *Pfaffia glomerata*. **Phytochemistry**, 32: 1527-1530, 1993.

SILVA, T.C. da. **Efeitos anti-neoplásicos da raiz de *Pfaffia paniculata* (Ginseng brasileiro) no modelo de hepatocarcinogênese murina e em cultura de células de hepatocarcinoma humano**. 2008. 178p. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) – Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada), Universidade De São Paulo, São Paulo, 2008.

TANG, Z-Q.; CHEN, D-L.; SONG, H-J.; HE, Y-C.; CAI, D-T. In vitro induction and identification of tetraploid plants of *Paulownia tomentosa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 102: 213-220, 2012.

VIGO, C.L.S.; NARITA, E.; MARQUES, L.C. Validação da metodologia de quantificação espectrofotométrica das saponinas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 13: 46-49, 2003.

WELLBURN, A.R. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, 144: 307-313, 1994.

YIM, K.O., KWON, Y.W., BAYER, D.E. Growth responses and allocation of assimilates of rice seedlings by paclobutrazol and gibberellin treatment. **Journal of Plant Growth Regulation**, 16: 35-41, 1997.

ZHANG, Z.; DAI, H.; XIAO, M.; LIU, X. In vitro induction of tetraploids in *Phlox subulata* L. **Euphytica**, 159: 59–65, 2008.

ZHANG, X-Y.; HU, C-G.; YAO, J-L. Tetraploidization of diploid *Dioscorea* results in activation of the antioxidant defense system and increased heat tolerance. **Journal of Plant Physiology**, 167: 88-94, 2010.

ZHENG, R.; WU, Y.; XIA, Y. Chlorocholine chloride and paclobutrazol treatments promote carbohydrate accumulation in bulbs of *Lilium* Oriental hybrids 'Sorbonne'. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)**, 13: 136-144, 2012.

ZHOU, Z.; MA, H.; LIANG, K.; HUANG, G.; PINYOPUSARERK, K. Improved tolerance of Teak (*Tectona grandis* L.f.) seedlings to low-temperature stress by the combined effect of arbuscular mycorrhiza and paclobutrazol. **Journal of Growth Plant Regulation**, 31: 427-435, 2012.

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

CONCLUSÕES GERAIS

O presente estudo avaliou a influência da ploidia da planta no crescimento e produção de metabólitos secundários em *Pfaffia glomerata* em diferentes condições de cultivo *in vitro* e *ex vitro*. Na literatura não há relatos acerca da geração de poliploides na espécie, assim como de suas características específicas.

No primeiro capítulo, envolvendo o cultivo *in vitro*, foi verificado que a poliploidização levou à redução no crescimento e no acúmulo do metabólito 20-hidroxicdisona (20E) em todas as condições de cultivo testadas. Também foi comprovado que a espécie apresenta elevado potencial para a propagação *in vitro* fotoautotrófica em atmosfera enriquecida com CO₂ devido ao aumento das características de crescimento e do acúmulo de 20E. Apesar da condição de cultivo fotomixotróficas terem gerado plantas com parâmetros de crescimento superiores às fotoautotróficas, o acúmulo de 20E nestes indivíduos é fortemente inibido pela presença de sacarose no meio de cultivo, sendo a fotomixotrofia uma condição desfavorável para produção da espécie visando interesse comercial.

O segundo capítulo apresentou o efeito do uso de vasos de volumes diferentes, assim como a influência de tratamentos com paclobutrazol (PBZ), no crescimento, características morfológicas e estruturais e acúmulo de metabólitos secundários em plantas diploides e poliploides de fáfia cultivadas *ex vitro*. As análises mostraram que tetraploides de *P. glomerata* apresentam características típicas de plantas poliploidizadas, como aumento da relação largura/comprimento foliar e redução da densidade estomática. Entretanto, o aumento nos parâmetros de crescimento e o acúmulo de saponinas e 20E mostraram-se inferiores em plantas tetraploides, diferentemente do relatado na literatura para algumas espécies. A utilização de vasos de maior volume favoreceu fortemente o vigor e o crescimento das plantas, sendo o volume dos recipientes uma variável que deve ser bem selecionada para se obter uma boa produção vegetal no cultivo *ex vitro*. Por fim, o uso de PBZ correspondeu às expectativas reduzindo o crescimento em altura e aumentando a pigmentação das plantas, no entanto, sua atuação na indução do metabolismo secundário não mostrou-se eficiente.

Dessa forma, o presente estudo mostra que a indução e utilização de plantas poliploides em *P. glomerata* não são eficientes no objetivo de maior acúmulo de biomassa e metabólitos de interesse em ambas as condições *in vitro* e *ex vitro*. Entretanto, novos estudos devem ser feitos para verificar se em tempos de cultivo mais longos do que os utilizados nesse trabalho as respostas esperadas seriam alcançadas com sucesso, uma vez que as plantas podem necessitar de um tempo maior para adaptar sua fisiologia à condição de duplicação do material genômico.

Além disso, comprovou-se que um sistema fotoautotrófico com enriquecimento de CO₂ pode ser atrativo para a aplicação na produção comercial massal de mudas de fáfia ou ainda, para a produção de biomassa de fáfia com um teor elevado de 20E. O cultivo de plantas em vasos de maiores volumes também pode favorecer a produção comercial de fáfia, uma vez que os maiores custos com substrato e maior necessidade de espaço disponível são compensados pelo grande aumento de biomassa por vaso.