

CLEBER WITT SALDANHA

**INFLUÊNCIA DAS TROCAS GASOSAS E DO
ENRIQUECIMENTO COM CO₂ NA PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE
FÁFIA [*Pfaffia glomerata* (SPRENG.) PEDERSEN]**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2011**

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

T

S162i
2011

Saldanha, Cleber Witt, 1981-

Influência das trocas gasosas e do enriquecimento com CO₂
na propagação *in vitro* de fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.)
Pedersen] / Cleber Witt Saldanha. – Viçosa, MG, 2011.
xi, 107f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Wagner Campos Otoni.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Pfaffia glomerata*. 2. Ginseng. 3. Plantas - Propagação
in vitro. 4. Dióxido de carbono. 5. Beta-ecdisona.

I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

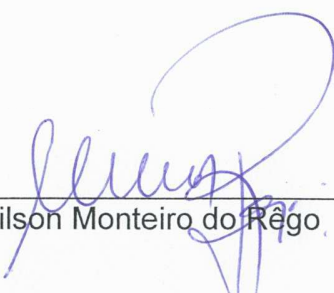
CDD 22. ed. 583.53

CLEBER WITT SALDANHA

**INFLUÊNCIA DAS TROCAS GASOSAS E DO
ENRIQUECIMENTO COM CO₂ NA PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE
FÁFIA [*Pfaffia glomerata* (SPRENG.) PEDERSEN]**

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

APROVADA: 21 de novembro de 2011.




Mailson Monteiro do Rêgo



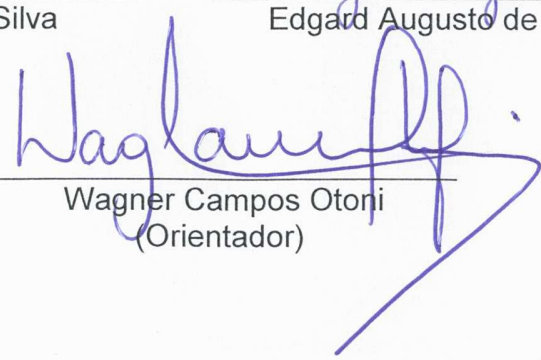
Leonardo Lucas Carnevalli Dias



Crislene Viana da Silva



Edgard Augusto de Toledo Picoli



Wagner Campos Otoni
(Orientador)

À minha mãe
Marelaine (*in memoriam*)

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), pela oportunidade de realização do curso de Doutorado em Fisiologia Vegetal.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa durante a realização do doutorado.

Ao professor Wagner Campos Otoni, pelo profissionalismo e amizade durante a realização do doutorado, um orientador e amigo.

À minha família, pelo apoio durante a realização do doutorado. E principalmente à minha mãe que, enquanto esteve presente, sempre me incentivou a estudar.

Aos colegas e ex-colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais/BIOAGRO, pela amizade e troca de ideias. Em especial meus agradecimentos aos colegas Ana Cláudia, Crislene, Débora, Denise, Diego I e II, Elyabe, Evelyn, Jéssica, Joice, Joseila, Juliana, Leandro, Leonardo, Lorena, Mailson, Mariana, Marcos, Tiago e Virgílio.

À Lili, pelo auxílio fundamental durante a realização deste trabalho no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, BIOAGRO/UFV.

Ao Caio Gomide Otoni, pela ajuda nas análises efetuadas no Laboratório de Embalagens (LABEM), do Departamento de Tecnologia de Alimentos/UFV.

Ao professor Fábio DaMatta, pela oportunidade de realizar algumas análises no Laboratório de Nutrição e Metabolismo da UFV, e ao Paulo César e a Kelly pelo auxílio nas mesmas.

Ao Laboratório de Anatomia Vegetal, do Departamento de Biologia Vegetal, pelo suporte nas análises de microscopia de luz.

Aos professores Maria Catarina Kasuya e Hilário Mantovani, do Departamento de Microbiologia, e profa. Nilda Soares, do Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela possibilidade de uso do HPLC, fundamental e essencial na condução dessa pesquisa.

À Kacilda Kuki, pela ajuda no estabelecimento do sistema de enriquecimento de CO₂.

Ao Aurélio, pela ajuda valorosa na avaliação de experimentos e troca de idéias.

Ao Diego Ismael, pelo processamento do material na MET e pelas dicas valiosas na interpretação e discussão dos resultados.

Ao Wemerson, pelo auxílio nas análises de HPLC.

Aos colegas e professores do Curso de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pela amizade adquirida.

À minha namorada Vanessa, pelo apoio e compreensão durante a realização do doutorado.

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

Finalmente, a DEUS pelo dom da vida.

Muito obrigado!

BIOGRAFIA

Cleber Witt Saldanha, filho de José Carpes Saldanha e Marelaine Witt, nasceu em 30 de dezembro de 1981, em São Francisco de Assis, RS.

Ingressou no curso de Engenharia Florestal na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) em 2000. De 2001 até o final da graduação realizou atividades de iniciação científica no Laboratório de Biotecnologia Florestal da UFSM. No início de 2005, diplomou-se no curso de Engenharia Florestal. Em 2005 ingressou no curso de mestrado em Geomática, na mesma instituição, concluindo-o em 2007.

Em março de 2008, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, como doutorando, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em novembro de 2011.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO GERAL	1

Capítulo I

A atmosfera enriquecida com CO₂ incrementa o crescimento *in vitro* de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]

1. INTRODUÇÃO	9
2. MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1 Material vegetal e condições de cultura	13
2.2 Desenvolvimento da câmara para a obtenção da atmosfera enriquecida com CO ₂	15
2.3 Medidas de crescimento.....	17
2.4 Teor relativo e perda de água das folhas	17
2.5 Quantificação de pigmentos fotossintéticos e densidade estomática.....	18
2.6 Determinação do teor de β-ecdisona	19
2.7 Microscopia de luz da folha	20
2.8 Análise estatística dos dados	21
3. RESULTADOS.....	22
3.1 A atmosfera enriquecida com CO ₂ incrementa o crescimento <i>in vitro</i> de ginseng brasileiro	22
3.2 O teor e a perda relativa de água nas folhas de vitroplantas de ginseng brasileiro são afetados pela condição de cultura no frasco e pela concentração de CO ₂ na atmosfera.....	27
3.3 O CO ₂ induz o aumento dos pigmentos fotossintéticos de vitroplantas de ginseng brasileiro cultivadas <i>in vitro</i> e influencia a densidade e morfologia estomática	29
3.5 As características anatômicas das folhas foram diferenciadas entre tratamentos	35
4. DISCUSSÃO	37
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

Capítulo II

Uso de fitas microporosas combinadas com Politetrafluoretileno (PTFE): alternativa de baixo custo para promover trocas gasosas e o crescimento *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen

1. INTRODUÇÃO	50
2. MATERIAL E MÉTODOS	54
2.1 Material vegetal	54
2.2 Condições de cultivo	54
2.3 Comparação entre os sistemas de vedação	55

2.4 Determinação da taxa de perda de vapor de água de frascos com diferentes vedações	57
2.5 Microscopia de varredura	57
2.6 Medidas de crescimento.....	57
2.7 Determinação dos pigmentos fotossintéticos	58
2.8 Aclimatização das plantas.....	58
2.9 Análise estatística	59
3. RESULTADOS.....	60
3.1 Comparação entre os sistemas de vedação	60
a. Taxa de perda de vapor d'água de frascos com diferentes vedações	60
b. Microscopia eletrônica de varredura	61
c. Crescimento das vitroplantas	63
d. Teores de pigmentos fotossintéticos	67
4. DISCUSSÃO	69
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

Capítulo III

O enriquecimento com CO₂ e o tipo de suporte dos explantes promovem o crescimento e o acúmulo de β-ecdisona em vitroplantas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen em condições fotoautotróficas

1. INTRODUÇÃO.....	77
2. MATERIAL E MÉTODOS	80
2.1 Material vegetal e condições de cultura	80
2.2 Medidas de crescimento.....	81
2.3 Determinação dos pigmentos fotossintéticos	82
2.4 Avaliação da atividade da Rubisco.....	82
2.5 Determinação de fenóis, açúcares e amido	83
2.6 Determinação do teor de β-ecdisona	83
2.7 Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	84
2.8 Análise estatística	84
3. RESULTADOS.....	85
3.1 O crescimento das vitroplantas de fáfia é aumentado em função do tipo de suporte e da concentração de CO ₂ no ambiente.....	85
3.2 Os pigmentos fotossintéticos aumentam com a elevação de CO ₂ e em resposta ao tipo de suporte em baixa concentração de CO ₂	88
3.3 A atividade da Rubisco não foi influenciada pelos tratamentos.....	89
3.4 O teor de amido, FST e AST variou em função das concentrações de CO ₂ e com o tipo de suporte.....	90
3.5 O teor de β-ecdisona é aumentado em função do tipo de suporte e da concentração de CO ₂ no ambiente	92
4. DISCUSSÃO	96
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	106

RESUMO

SALDANHA, Cleber Witt, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2011. **Influência das trocas gasosas e do enriquecimento com CO₂ na propagação *in vitro* de fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen].** Orientador: Wagner Campos Otoni. Coorientadores: Aloisio Xavier e Miguel Pedro Guerra.

O objetivo geral do presente estudo foi verificar a influência das trocas gasosas e do enriquecimento com CO₂ na propagação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). Neste estudo foram utilizados como explantes segmentos nodais, a partir de culturas-estoque de vitroplantas de fáfia, mantidas sob subcultivos mensais. Foram avaliadas características relacionadas ao crescimento, aspectos anatômicos da folha, pigmentos fotossintéticos, teor de β-ecdisona (20E), atividade da Rubisco, amido, fenóis e açúcares. O primeiro capítulo teve como objetivo avaliar a influência da atmosfera ambiente e enriquecida com CO₂ (360 ou 720 μmol mol⁻¹ de CO₂), vedação do recipiente de cultura e presença ou não de sacarose no meio de cultura durante o crescimento e desenvolvimento de explantes nodais de *P. glomerata*. Todas as características de crescimento das vitroplantas de fáfia aumentaram em condições de elevação de CO₂. Nessas condições de atmosfera enriquecida com CO₂ foram produzidas vitroplantas de *P. glomerata* com características desejáveis para produção clonal massal, sendo uma alternativa para o estabelecimento de plantios comerciais que visem uniformidade e objetivem a produção de 20E para suprir a demanda industrial. A menor perda relativa de água das folhas oriundas de vitroplantas cultivadas em meio de cultura com ou sem sacarose e em condição de elevação de CO₂, mostra que um sistema fotoautotrófico ou fotomixotrófico com enriquecimento de CO₂ é atrativo para a aplicação na produção comercial massal de mudas

dessa espécie, possivelmente reduzindo as perdas que ocorrem durante a aclimatização *ex vitro*, devido à desidratação das vitroplantas. O segundo capítulo teve como objetivo comparar a eficiência de novos tipos alternativos de membranas para vedação com as membranas MilliSeal[®], sobre a morfogênese e crescimento *in vitro* de fáfia. Dentre as membranas testadas, foi possível selecionar uma que mostrou características desejáveis para um sistema de propagação *in vitro* de plantas em larga escala, pois, aumentou o crescimento das vitroplantas de fáfia e apresenta custo unitário reduzido em comparação com membranas comercializadas atualmente. No terceiro capítulo é relatado o uso de substrato poroso combinado com o enriquecimento da atmosfera com CO₂. Todas as características de crescimento das vitroplantas cultivadas em condições de elevação de CO₂ e em Florialite[®] aumentaram. Em atmosfera enriquecida com CO₂ foram produzidas plantas de *P. glomerata* com alto acúmulo de biomassa e de 20E e apresentando alterações ultraestruturais. O presente estudo mostra que um sistema fotoautotrófico com enriquecimento de CO₂ pode ser atrativo para a aplicação na produção massal de mudas de fáfia ou ainda, para a produção de biomassa de fáfia com teor elevado de β-ecdisona.

ABSTRACT

SALDANHA, Cleber Witt, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2011. **Influence of gas exchange and CO₂ enrichment on the *in vitro* propagation of *Pfaffia* [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]**. Adviser: Wagner Campos Otoni. Co-Advisers: Aloisio Xavier and Miguel Pedro Guerra.

The overall objective of this study was to investigate the influence of gas exchange and CO₂ enrichment on the *in vitro* propagation of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). Nodal segments from *Pfaffia* vitroplants maintained by monthly subculture were used as explants. Characteristics related to growth, leaf anatomy, photosynthetic pigments, β-ecdysone (20E) content, Rubisco activity, starch, phenols and sugars were evaluated. The objective of the first chapter was to evaluate the influence of the ambient atmosphere and the atmosphere enriched with CO₂ (360 or 720 μmol mol⁻¹ CO₂), the closure system of culture vessels and presence or absence of sucrose in the culture medium during growth and development of *Pfaffia* nodal explants. All growth characteristics of *Pfaffia* vitroplants increased under high CO₂. Under conditions of CO₂-enriched atmosphere, *P. glomerata* vitroplants were produced with good characteristics for clonal mass production, which is an alternative for the establishment of homogeneous commercial plantations aiming to the production of 20E to meet the industrial demands. The low relative water loss from leaves of vitroplants grown in culture medium with or without sucrose and high CO₂, shows that a photoautotrophic or photomixotrophic system with CO₂ enrichment is beneficial for mass production of seedlings of this species, possibly reducing losses during acclimatization due to dehydration of vitroplants. The second chapter aimed to compare the effectiveness of new alternative types of membranes for closure with the MilliSeal® membrane on the

growth and morphogenesis *in vitro* of *Pfaffia*. Among the membranes tested, the M3 showed the desirable characteristics for a system of large-scale *in vitro* propagation of plants, because it increased the growth of *Pfaffia* vitroplants and has reduced unit cost compared with currently marketed membranes. The third chapter reports on results obtained using porous substrates combined with atmosphere CO₂ enrichment. Vitroplants grown under high CO₂ and Florialite® had all growth characteristics increased. Seedlings of *P. glomerata* produced in CO₂-enriched atmosphere had high accumulation of biomass and 20E and showed ultrastructural alterations. The present study shows that a photoautotrophic system with CO₂ enrichment can be beneficial for either mass production of *Pfaffia* seedlings or the production of *Pfaffia* biomass with high 20E content.

INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil, existe grande diversidade na flora que possibilita a obtenção de diferentes tipos de fitoquímicos, representando grande interesse científico, econômico e social, e pode contribuir com o avanço do conhecimento em diversas áreas relacionadas. Além de apresentar aplicações industriais potenciais para a melhoria da saúde e a qualidade de vida (Braz-Filho, 1999).

O aumento na produção de matéria-prima de qualidade de plantas medicinais com interesse comercial apresenta alta importância econômica e social no Brasil, pois contribui para a geração de empregos. Além disso, a ampliação dos cultivos de plantas com propriedades farmacológicas e nutricionais de interesse industrial é necessária para reduzir a prática extrativista, permitindo assim a conservação do *pool* gênico das populações naturais (Ferreira, 2006).

Segundo estimativa da Organização Mundial da Saúde (OMS), 80% da população mundial, utiliza plantas medicinais no atendimento básico de problemas de saúde (Zucchi, 2009). No Brasil, o mercado de plantas medicinais movimenta cerca de 800 milhões de dólares anuais, o que corresponde a 10% do mercado de medicamentos (Zucchi, 2009).

Dentre as espécies com interesse fitoterápico e fitofármaco pode-se citar a *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, de ocorrência natural no Brasil (Pott & Pott, 1994; Souza & Lorenzi, 2005), e conhecida popularmente como fáfia, “ginseng” do pantanal ou “ginseng” brasileiro (Nascimento et al., 2007). A *P. glomerata* é uma espécie com metabolismo fotossintético do tipo C3 (Marchese et al., 2006). A *P. glomerata*, como muitas outras plantas

medicinais, está ameaçada pela coleta indiscriminada e pela diminuição das áreas de ocorrência natural (Guerreiro et al., 2009).

A *P. glomerata* é de grande interesse para a indústria farmacêutica devido à produção do metabólito β -ecdisona (20E) (Festucci-Buselli et al., 2008a). Várias propriedades têm sido atribuídas a *Pfaffia* sp., como anabolizante, analgésica, antiinflamatória, antimutagênica, afrodisíaca, sedativa, antidiabética e de tônico muscular (Fernandes et al., 2005; Corrêa Júnior et al., 2008; Festucci-Buselli et al., 2008a, b).

Para suprir a demanda de matéria-prima de qualidade para a indústria, o desenvolvimento de um sistema de propagação vegetativa torna-se fundamental. Através da propagação clonal em larga escala de acessos de *P. glomerata*, com elevada produção de 20E, pode ser possível o fornecimento de mudas de qualidade para o estabelecimento de grandes plantações e estimular pequenos produtores rurais a produzir plantas medicinais como alternativa econômica.

A propagação *in vitro* (micropropagação) refere-se ao crescimento e multiplicação de células, tecidos e órgãos em um meio de cultura específico semi-sólido ou líquido em condições ambientais controladas, e na ausência de patógenos (Chandra et al., 2010). Essa técnica tem contribuído para a produção de propágulos livres de patógenos, para a propagação vegetativa de clones selecionados e multiplicação de clones que apresentam baixa eficiência de propagação pelos métodos tradicionais de clonagem (Kubota, 2001).

A propagação clonal *in vitro* de *P. glomerata* tem sido conduzida tradicionalmente pela proliferação de gemas axilares de segmentos nodais em condições fotomixotróficas, ou até mesmo heterotróficas (Russowski &

Nicoloso, 2003; Skrebsky et al., 2006; Maldaner et al., 2006; Nicoloso et al., 2008; Flores et al., 2010).

Entretanto, no sistema convencional de micropropagação geralmente as trocas gasosas são realizadas pela ventilação natural que ocorre através da difusão de ar na área de contato entre a tampa e o frasco. Esta troca gasosa ocorre em função dos gradientes de pressão e temperatura entre o interior e o exterior do frasco, pelo gradiente de concentração de gases (CO₂, H₂O, dentre outros) e pela velocidade e padrão de movimento do ar em torno do frasco (Xiao et al., 2011). Estas condições, aliadas a características fotomixotróficas que os explantes adquirem no sistema convencional de propagação *in vitro*, ocasionam perdas elevadas durante a aclimatização, devido à mortalidade das plantas em função de desordens morfo-fisiológicas (Zobayed, 2005; Chandra et al., 2010; Kozai, 2010). Uma possibilidade para a redução desses problemas é o uso da propagação *in vitro* de plantas sob condições fotoautotróficas e enriquecimento de CO₂ (Kubota, 2001; Kozai, 2010; Xiao et al., 2011). A propagação *in vitro* de plantas em sistemas fotoautotróficos geralmente resulta em melhoria do crescimento, redução das perdas por contaminações, maior vigor das plantas, maior sobrevivência durante a aclimatização e redução dos custos de produção. Esse sistema tem sido indicado para a propagação em larga escala de espécies medicinais (Zobayed et al., 2003; Arora et al., 2010), além do relato do aumento de metabólitos secundários em condições de elevação de CO₂ no ambiente (Zobayed & Saxena, 2004). A promoção do crescimento, a redução das perdas durante a aclimatização e a propagação fotoautotrófica *in vitro* de plantas medicinais permitem a produção dos componentes fitoquímicos em ambiente controlado (Couceiro et al., 2006).

Em *P. glomerata* foi verificado que a propagação *in vitro* em sistema fotoautotrófico é viável, pois, esta espécie apresenta crescimento adequado em frasco com membranas permeáveis a gases e meio de cultura sem sacarose (Iarema, 2008).

Dessa maneira, o presente estudo teve como objetivo avaliar a influência das trocas gasosas e do enriquecimento com CO₂ na propagação *in vitro* de *P. glomerata*. No primeiro capítulo, foi avaliada a influência de diferentes condições de cultivo no crescimento e desenvolvimento de segmentos nodais de “ginseng” brasileiro em condições fotomixotróficas e fotoautotróficas em atmosfera com 360 ou 720 µmol mol⁻¹ de CO₂. O segundo capítulo teve como objetivo comparar a eficiência de novos tipos de membranas de vedação com as membranas MilliSeal[®], sobre a morfogênese e crescimento *in vitro* de explantes nodais de fáfia. O terceiro capítulo teve como objetivo maximizar as condições de crescimento de vitroplantas de fáfia pelo uso de substrato poroso combinado com o enriquecimento da atmosfera com CO₂, visando à aplicação em sistemas de propagação *in vitro* em larga escala.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARORA, R.; MATHUR, A.; MATHUR, A.K. Emerging trends in medicinal plant biotechnology. In.: ARORA, R. (Ed.) **Medicinal Plant Biotechnology**. CABI International: London, p.1-12, 2010.

BRAZ-FILHO, R. Brazilian phytochemical diversity: bioorganic compounds produced by secondary metabolism as a source of new scientific development, varied industrial applications and to enhance human health and the quality of life. **Pure and Applied Chemistry**, 71: 1663-1672, 1999.

CHANDRA, S.; BANDOPADHYAY, R.; KUMAR, V.; CHANDRA, R. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. **Biotechnology Letters**, 32: 1199-1205, 2010.

CORRÊA JÚNIOR C; MING L.C.; CORTEZ D.A.G. Sazonalidade na produção de raízes e teor de β -ecdisona em acessos de fáfia. **Horticultura Brasileira**, 26: 393-397, 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.

FERNANDES, J.F.O.; BRITO, L.C.; FRYDMAN, J.N.G.; SANTOS-FILHO, S.D.; BERNARDO-FILHO, M. An aqueous extract of *Pfaffia* sp. does not alter the labeling of blood constituents with technetium-99m and the morphology of the red blood cells. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 15: 126-132, 2005.

FERREIRA, M.G.R. **Aspectos sociais da fitoterapia**. Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 2006.14 p.

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, 2008a.

FESTUCCI-BUSELLI, R.A.; CONTIM, L.A.S.; BARBOSA, L.C.A.; STUART, J.J.; VIEIRA, R.F.; OTONI, W.C. Level and distribution of 20-hydroxyecdysone during *Pfaffia glomerata* development. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 20: 305-311, 2008b.

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.

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

IAREMA, L. **Enxertia e propagação *in vitro* de fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]**. Tese (Doutorado em Botânica). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 191p., 2008.

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

KUBOTA, C. Concepts and background of photoautotrophic micropropagation. In.: MOROHOSHI, N. & KOMAMINE, A. (Eds.) **Molecular Breeding of Woody Plants**. Elsevier, p.325-334, 2001.

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.

MARCHESE, J.A.; MING, L.C.; DUCATTI, C.; BROETTO, F.; DA SILVA, E.T.; LEONARDO, M. Carbon isotope composition as a tool to control the quality of herbs and medicinal plants. **Photosynthetica**, 44: 155-159, 2006.

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

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.

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

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.

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.

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

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

ZOBAYED, S.M.A. Ventilation in micropropagation. In.: KOZAI, T.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S.M.A. (Eds.) **Photoautotrophic (Sugar-free Medium) Micropropagation as a New Micropropagation and Transplant Production System**. Springer: Netherlands, p.147-186, 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.

ZOBAYED, S.; SAXENA, P.K. Production of St. John's Wort plants under controlled environment for maximizing biomass and secondary metabolites. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 40: 108-114, 2004.

ZUCCHI, M.I. **Diversidade genética em espécies medicinais**. 2009. Artigo em http://www.infobibos.com/Artigos/2009_4/DiversidadeGenetica/index.htm. Disponível em: Acesso em: 21/7/2011.

CAPITULO I

A atmosfera enriquecida com CO₂ incrementa o crescimento *in vitro* de plantas de ginseng brasileiro
[*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Pfaffia* pertence à família Amaranthaceae, a qual possui 170 gêneros e 2.000 espécies, sendo que no Brasil ocorrem 20 gêneros nativos e estima-se a ocorrência de 100 espécies (Souza & Lorenzi, 2005). Dentre as plantas de interesse medicinal que ocorrem no Brasil pode-se citar a *Pfaffia glomerata*, conhecida como fáfia, ginseng do pantanal ou ginseng brasileiro (Nascimento et al., 2007). A *P. glomerata* é típica de vegetação ciliar e de campos de inundação de rios, com ocorrência em todo o Brasil e países limítrofes; é frequente no cerrado e matas do Estado de Mato Grosso do Sul (Pott & Pott, 1994).

A fáfia possui grande importância econômica devido ao potencial para consumo no mercado interno brasileiro e, também, para exportação (Nascimento et al., 2007). Seu valor econômico está relacionado a diferentes usos potenciais como fitoterápico e fitofármaco. Diversas propriedades e ações têm sido atribuídas a *Pfaffia* sp., como anabolizante, analgésico, antiinflamatório, antimutagênico, afrodisíaco, sedativo e tônico muscular (Fernandes et al., 2005; Festucci-Buselli et al., 2008). O extrato hidroalcoólico de raízes de *P. glomerata* mostrou efeitos antiinflamatórios e analgésicos, similares a drogas não esteroidais, como a indometacina (Neto et al., 2005). Nos últimos anos têm sido registradas diversas patentes relacionadas às propriedades farmacológicas e nutricionais do gênero *Pfaffia* (Higuchi, 2011; Rangel, 2008; Loizou, 2009; Olalde, 2008; Bernard & Gautier, 2005; Shibuya et al., 2001).

Devido à importância econômica da fáfia, a sua propagação torna-se fundamental para a produção de matéria prima para a indústria. A propagação

in vitro da espécie tem sido conduzida tradicionalmente pela proliferação de gemas axilares de segmentos nodais (Flores et al., 2010; Skrebsky et al., 2006; Maldaner et al., 2006; Nicoloso et al., 2008; Russowski & Nicoloso, 2003). Estudos relacionados ao desenvolvimento e melhoria de protocolos para a propagação *in vitro* de *P. glomerata* podem contribuir para a produção massal de mudas com alta qualidade morfo-fisiológica.

O crescimento satisfatório em frascos com trocas gasosas e meio de cultura sem sacarose revelou que *P. glomerata* possui potencial para ser cultivada *in vitro* em sistema fotoautotrófico (Iarema, 2008). O cultivo *in vitro* de plantas sob condições fotoautotróficas e com enriquecimento da atmosfera com CO₂ proporciona condições para maior acúmulo de biomassa, e pode promover o aumento da absorção de nutrientes (Arigita et al., 2010; Kozai, 2010).

O ambiente na propagação *in vitro* convencional é geralmente caracterizado por alta umidade relativa, baixa irradiância, grande variação na concentração diurna de CO₂, temperatura constante do ar, presença de açúcar, vitaminas, reguladores de crescimento e substâncias tóxicas como fenóis no meio de cultura, ausência de microrganismos e acúmulo de etileno e outros gases dentro do frasco (Nguyen & Kozai, 2005; Kozai, 2010). A presença de açúcar no meio de cultura favorece o rápido crescimento e desenvolvimento de microrganismos que venham a contaminar o ambiente do frasco de cultura (Qu et al., 2009).

Na propagação *in vitro* convencional, geralmente são usados frascos pequenos com vedação para impedir a contaminação por microrganismos, restringindo as trocas gasosas com ambiente externo ao frasco e, conseqüentemente, podendo causar desordens morfológicas e fisiológicas.

Devido a essas desordens, ocorrem elevadas perdas no processo de aclimatização, o que eleva o custo de produção (Kozai, 2010). Geralmente, as folhas das plantas cultivadas no sistema tradicional de propagação *in vitro* apresentam mesofilo com grandes espaços intercelulares, sistema vascular pouco desenvolvido e estômatos não-funcionais (Hazarika, 2006). Além disso, a adição de açúcar no meio de cultura altera consideravelmente a bioquímica e fisiologia das plantas cultivadas *in vitro* (Badr et al., 2011).

A vedação do frasco de cultura, no sistema tradicional de propagação *in vitro*, faz com que reduza a concentração de CO₂ no seu interior durante o fotoperíodo devido à atividade fotossintética da planta. A baixa concentração de CO₂ inibe a atividade fotossintética da planta *in vitro* e a força a desenvolver um padrão de crescimento heterotrófico ou fotomixotrófico, pela absorção do açúcar do meio de cultura como sua principal fonte de carbono (Kozai & Kubota, 2005; Nguyen & Kozai, 2005; Kozai, 2010).

O cultivo do material vegetal clorofilado em condições de fornecimento adequado de CO₂ é um pré-requisito para a propagação *in vitro* fotoautotrófica. O fornecimento de CO₂ pode ser através do cultivo dos explantes em recipientes vedados com filmes permeáveis a gases, em frascos grandes com ventilação forçada ou com um sistema de fornecimento de CO₂, uso de agentes químicos que produzam CO₂ dentro do frasco de cultura e uso de filmes permeáveis nos frascos em sala com enriquecimento de CO₂ (Kozai, 1991; Kubota, 2001).

A elevação das trocas gasosas nos frascos de cultivo *in vitro* e o uso de sistema fotoautotrófico reduzem a ocorrência das limitações para a utilização da propagação *in vitro* tradicional em escala comercial, a saber: perda de

plantas devido à contaminação microbiana, crescimento reduzido e desenvolvimento prejudicado, desordens morfo-fisiológicas nas plantas propagadas *in vitro*, baixa taxa de fotossíntese líquida e reduzido estabelecimento *ex vitro* (Zobayed, 2005; Kozai, 2010).

Em diversas espécies de plantas a propagação *in vitro* fotoautotrófica tem sido empregada com sucesso, dentre essas: *Macadamia tetraphylla* (Cha-um et al., 2011), *Oplopanax elatus* (Park et al., 2011), *Solanum tuberosum* (Badr et al., 2011), *Actinidia deliciosa* (Arigita et al., 2010) *Cymbidium* Music Hour 'Maria' (Norikane et al., 2010), *Populus deltoides* (Mingozzi et al., 2009), *Phalaenopsis* 'Amaglade' (Yoon et al., 2009), *Limonium latifolium* (Xiao & Kozai, 2006) e *Spathiphyllum* cv. Merry (Silva et al., 2006).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência de diferentes condições de cultivo sobre o crescimento e desenvolvimento de segmentos nodais de "ginseng brasileiro" em condições fotomixotróficas e fotoautotróficas em atmosfera com 360 ou 720 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 . Relata-se, pela primeira vez, o uso de condições fotoautotróficas com enriquecimento de CO_2 na propagação *in vitro* de *P. glomerata*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e condições de cultura

Segmentos nodais (2 cm de comprimento), sem folhas e com dois meristemas axilares pré-existentes, foram retirados de vitroplantas de fáfia (acesso LCT22) mantidas sob condições fotomixotróficas e inoculados em meio de cultura constituído pelos sais MS (Murashige & Skoog, 1962), vitaminas MS (0,5 mg L⁻¹ de ácido nicotínico, 0,5 mg L⁻¹ de piridoxina.HCl, 0,1 mg L⁻¹ de tiamina.HCl e 2 mg L⁻¹ de glicina) e 100 mg L⁻¹ de mio-inositol. Os sais do meio MS foram incorporados ao meio de cultura na forma de pó (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA; Cat. nº M5519). O meio de cultura teve o pH ajustado para 5,7 e geleificado com 7 g L⁻¹ de ágar granulado (Merck®, Alemanha) posteriormente, foi esterilizado por autoclavagem a 121° C e 1,5 atm durante 15 minutos. As culturas foram mantidas a 25 ± 2° C sob irradiância de 50 µmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 h.

As trocas gasosas entre o microambiente do frasco e o ambiente da sala de crescimento 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 diâmetro do poro. O número de trocas gasosas (Fujiwara & Kozai, 1995) de cada frasco com membrana foi estimado em 0,36 trocas por hora, sendo que no frasco sem membrana as trocas foram consideradas como zero. Durante o período de cultivo não foram realizados subcultivos.

O delineamento experimental utilizado foi em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (2x3). Sendo constituído pela combinação de

dois ambientes de incubação combinados com três condições de cultivo do explantes no frasco de cultura, totalizando seis tratamentos (Quadro 1), com seis repetições por tratamento. Cada repetição foi constituída por um frasco de 750 mL formado pela união de duas Magentas[®] (Sigma Chemical Company, EUA) de polipropileno invertidas e unidas por acopladores (Sigma Chemical Company, EUA), contendo cinco segmentos nodais e aproximadamente 100 mL de meio de cultura.

Quadro 1. Tratamentos utilizados na avaliação do desempenho de explantes nodais de *Pfaffia glomerata* cultivados em ambiente enriquecido com CO₂, sob diferentes condições de cultivo no frasco.

Tratamento	Ambiente de incubação (± μmol mol ⁻¹ de CO ₂)	Condições de cultivo no frasco
1	360	VED30
2	360	MEMB30
3	360	MEMB0
4	720	VED30
5	720	MEMB30
6	720	MEMB0

VED30: Vedado + MS com 30 g L⁻¹ de sacarose; **MEMB30:** Com membrana + MS com 30 g L⁻¹ de sacarose; **MEMB0:** Com membrana + MS sem sacarose.

O experimento foi repetido três vezes para a otimização das condições ambientais da câmara de acrílico usada para a obtenção do ambiente enriquecimento com CO₂ e do ambiente controle. Os dois primeiros experimentos foram realizados para a otimização das condições de crescimento nas câmaras de acrílico, sendo os resultados do terceiro utilizados para as análises.

2.2 Desenvolvimento da câmara para a obtenção da atmosfera enriquecida com CO₂

A câmara foi construída em acrílico com dimensões externas de 41 cm de largura x 26 de altura x 50 cm comprimento (Figuras 1 e 2). A distribuição de ar no interior da câmara ocorreu através de um tubo de aço inoxidável (diâmetro de 0,8 cm) e perfurado, localizado na parte inferior da câmara de acrílico (Figura 2, item 6). Todo ar injetado na câmara passou por um misturador para a homogeneização do ar (Figura 2, item 3), e no centro da câmara adaptou-se outro misturador (ventoinha) (Figura 2, item 5) para homogeneizar as condições atmosféricas no interior da câmara. Para o enriquecimento da atmosfera da câmara com CO₂ foi utilizado um reservatório com capacidade de 600 L (Figura 1A), composto por seis embalagens de polietileno conectadas a um tubo flexível de cloreto de polivinila (PVC) para a condução do ar até o misturador; posteriormente o ar foi injetado na câmara de acrílico com fluxo de 0,7 L/min. A cada 12 horas as embalagens foram abastecidas separadamente com uma mistura de ar ambiente e CO₂ comercial em proporção que atingisse o valor de $720 \pm 50 \mu\text{mol mol}^{-1}$. A concentração de CO₂ nas embalagens foi verificada com auxílio de um analisador de gás no infravermelho modelo S153 CO₂ Analyzer da Quibit System. Para a concentração de $360 \pm 50 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂ a bomba de ar do misturador captou o ar do ambiente externo à sala de crescimento. No interior de cada câmara foi colocado um termohigrômetro digital para o registro da umidade e temperatura durante o período de condução do experimento.

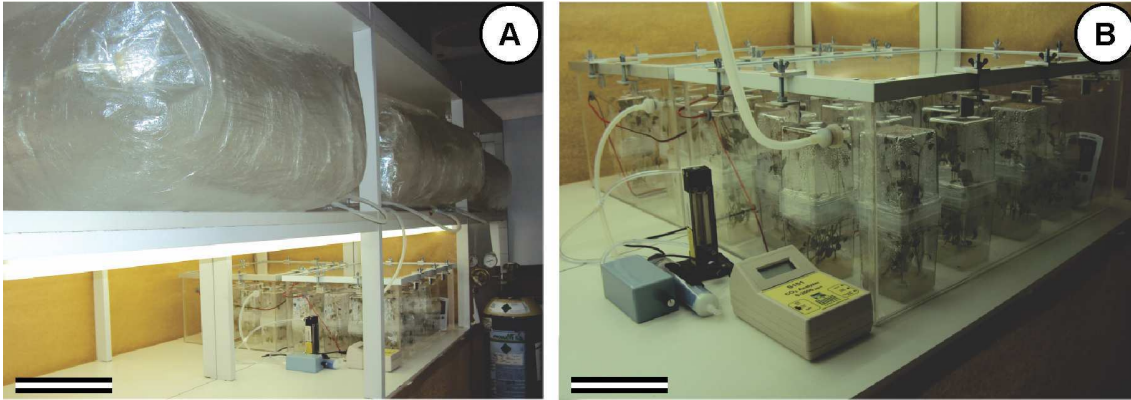


Figura 1. A: Aspecto geral do sistema utilizado para o enriquecimento com CO₂ em culturas *in vitro*. **B:** Câmara de acrílico para o enriquecimento de CO₂ com a disposição dos frascos de cultivo. Barra: A= 30 cm, B= 20 cm.

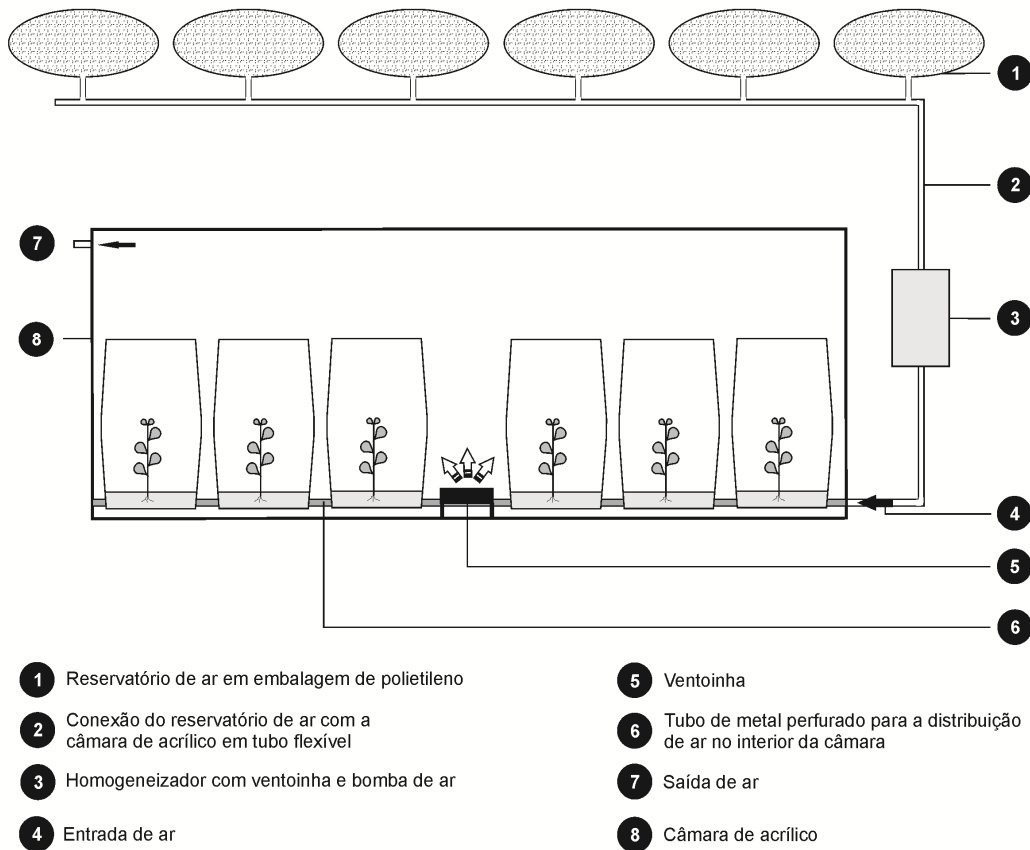


Figura 2. Diagrama esquemático da câmara de acrílico usada para a obtenção da atmosfera enriquecida com CO₂.

2.3 Medidas de crescimento

Foram avaliadas as seguintes características de crescimento: altura das plântulas (cm), área foliar (cm²), número de folhas (n), comprimento da raiz (cm), diâmetro do colo (mm), massas secas da parte aérea (PA) (g) e do sistema radicular (RA) (g), massa seca total (MST) (g) e volume radicular (VR) (cm³). Todas as avaliações foram realizadas aos 35 dias de cultivo *in vitro*.

Para a determinação da massa seca as amostras foram submetidas à estufa a 60 °C em estufa com circulação forçada de ar (ACB LABOR[®]), até obter peso constante. O volume radicular de cada unidade experimental foi obtido em uma proveta contendo um volume inicial de água conhecido, o volume radicular foi calculado pela diferença entre o volume final e o volume inicial. O diâmetro do colo foi medido a 2 cm acima da axila do segmento nodal (explante), de onde a brotação surgiu. Para a obtenção da área foliar foi retirada aleatoriamente uma vitroplanta, dentre as cinco presentes na unidade experimental, perfazendo seis plantas por tratamento.

2.4 Teor relativo e perda de água das folhas

Para a determinação do teor relativo de água (TRA) (%), amostras compostas por dez discos foliares com 7 mm de diâmetro foram retiradas do centro do limbo foliar, evitando-se as nervuras, e imediatamente pesadas, obtendo-se a massa fresca (MF) (g). Os discos foram retirados do segundo par de folhas expandidas a partir do meristema apical. Para cada tratamento foram realizadas cinco repetições.

Em seguida, os discos foram submersos em água desionizada, para atingirem a saturação hídrica. Após 4 horas (tempo determinado em pré-teste), os discos foliares foram retirados da água, eliminando-se o excesso de água com auxílio de papel absorvente, e pesados imediatamente para a determinação da massa túrgida (MT) (g). Posteriormente, foi obtida a massa seca (MS), através da secagem em estufa. O TRA foi calculado pela seguinte fórmula: $TRA(\%) = \frac{MF - MS}{MT - MS} \cdot 100$, em que MT, MF e MS representam, respectivamente, a massa túrgida, a massa fresca e a massa seca (González & González-Vilar, 2001).

A perda relativa de água foi determinada em folhas completamente expandidas do segundo par a partir do meristema apical, as quais foram destacadas aleatoriamente entre as vitroplantas de cada unidade experimental. As folhas foram submetidas à desidratação em condições de laboratório (umidade relativa de $40 \pm 5\%$ e temperatura de $27 \pm 1^\circ \text{C}$). No total foram amostradas 12 folhas por tratamento. Cada repetição foi constituída por duas folhas colocadas em um suporte de folha de alumínio, uma com a face abaxial e a outra com a face adaxial exposta ao ambiente. A perda de massa (água) foi determinada por método gravimétrico e expressa em porcentagem.

2.5 Quantificação de pigmentos fotossintéticos e densidade estomática

Seis discos foliares com 6 mm de diâmetro foram retirados do terceiro par de folhas expandidas a partir do meristema apical das vitroplantas de fáfia e incubados em 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 absorbância das amostras foi determinada nos comprimentos de onda de 665, 645 e 480 nm (Wellburn, 1994), usando 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 carotenoides foi baseado em metodologia descrita por Wellburn (1994).

Para estimar a densidade estomática, foi amostrada a epiderme da face abaxial e adaxial do terceiro par de folhas expandidas a partir do meristema apical das vitroplantas de fáfia pela técnica de impressão da epiderme (Segatto et al., 2004). As impressões da epiderme foram realizadas no período de escuro da sala de crescimento. 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 β -ecdisona

O teor de β -ecdisona (20E) foi determinado na parte aérea das plântulas de fáfia pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), analisando-se amostras obtidas por extrato metanólico (Kamada et al., 2009). No sistema radicular não foi determinado o teor de 20E devido à baixa produção de massa seca.

O extrato para a análise de 20E foi obtido com 100 mg de material vegetal seco de *P. glomerata* misturado com 10 mL de metanol, durante a extração o extrato foi armazenado no escuro em temperatura ambiente (25 ± 2 °C), durante sete dias, sob agitação diária do extrato. Posteriormente, os extratos foram centrifugados (15 minutos/5.000 rpm) e o sobrenadante coletado e centrifugado novamente (15 minutos/5.000 rpm). Posteriormente, o extrato

metanólico, foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando as seguintes condições: equipamento da Shimadzu modelo LC-10AI, equipado com detector SPD-10AI, CBM-10A; coluna Bomdesil C 18 (5,0 μm x 4,6 mm x 250 mm); fase móvel composta por metanol-água na proporção 1:1 (v/v) com fluxo de 0,7 mL min^{-1} ; volume de amostra injetada de 20 μL ; leitura em $\lambda = 245$ nm. O tempo médio de corrida da amostra foi de 15 minutos. Os dados foram integrados por meio do "software" Shimadzu LC10.

2.7 Microscopia de luz da folha

Para a microscopia de luz, foram coletadas em cada tratamento quatro amostras foliares no segundo par de folhas completamente expandidas e fixadas em Karnovsky (glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,05 M, pH 7,2) (Karnovsky, 1965). Posteriormente, as amostras foram desidratadas em série etílica e incluídas em metacrilato (Historesin, Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha). Para montagem das lâminas, cortes transversais das folhas (5 μm de espessura) foram obtidos em micrótomo rotativo de avanço automático (RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, EUA) e, corados por 15 minutos com Azul de Toluidina pH 4,0 (O'Brien & McCully, 1981). E, a seguir, foram montados em Permunt, para a caracterização estrutural. Para a identificação da presença de amido os cortes foram corados com solução de lugol.

As observações e registros fotográficos foram realizados em fotomicroscópio (AX70TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) equipado com o sistema U-Photo.

2.8 Análise estatística dos dados

Todas as características avaliadas foram submetidas ao teste de Bartlett para verificar a homogeneidade das variâncias e ao teste de Kolmogorov-Smirnov para a normalidade dos erros. Para as análises estatísticas foram transformadas as seguintes características: altura (\sqrt{x}), comprimento de raiz ($\frac{1}{x}$), diâmetro do colo ($\frac{1}{\sqrt{x}}$), número de folhas (\sqrt{x}), volume radicular [$\log (x+1)$], clorofila a ($\frac{1}{x}$) e total ($\frac{1}{\sqrt{x}}$), massa seca da parte aérea, radicular e total [$\log (x+1)$]. Posteriormente os parâmetros foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey ($p < 0,05$). Entretanto, nas tabelas e gráficos serão apresentados às médias não transformadas. Todas as análises estatísticas foram efetuadas usando o software SAS 9.0 (SAS Institute, 2003).

3. RESULTADOS

3.1 A atmosfera enriquecida com CO₂ incrementa o crescimento *in vitro* de ginseng brasileiro

O cultivo *in vitro* de segmentos nodais de *P. glomerata* sob diferentes concentrações de CO₂ (ambiente de incubação) combinadas com diferentes condições de cultivo no frasco de cultura (com e sem sacarose e com ou sem membranas para facilitar as trocas gasosas) originou vitroplantas com diferenças significativas no crescimento (Tabela 1). As seguintes características de crescimento diferiram significativamente ($p < 0,05$) em resposta aos tratamentos aplicados: massa seca da parte aérea e do sistema radicular, a altura das plântulas, comprimento radicular, área foliar, diâmetro do colo, volume radicular e número de folhas.

Entre todos os tratamentos testados as características de crescimento das vitroplantas de fáfia apresentaram as menores médias em meio de cultura sem adição de sacarose tanto em 360 como em 720 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂ (Tabela 1), o comprimento de raiz e área foliar que não diferiu entre os tratamentos. A presença de sacarose no meio de cultura e de membrana em ambiente enriquecido com CO₂ proporcionou as maiores médias para a maioria das características de crescimento, à exceção para o número de folhas por vitroplanta e diâmetro do colo.

Tabela 1. Variáveis de crescimento de vitroplantas de *Pfaffia glomerata* propagadas em diferentes concentrações de CO₂ e condições de cultivo nos frascos, aos 35 dias de cultivo.

Características	CO ₂ ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)	Condições de cultivo no frasco		
		VED30 ^a	MEMB30	MEMB0
Altura (cm planta ⁻¹)	360	18,9 aA*	20,9 aA	7,9 bB
	720	18,1 bA	21,6 aA	14,8 cA
Área foliar (cm ² planta ⁻¹)	360	116,7 aA	162,0 aA	108,2 bA
	720	108,7 bA	162,6 aA	132,5 aA
Número de folhas (planta ⁻¹)	360	19,2 aA	16,7 aA	8,4 bB
	720	20,3 aA	18,0 aA	10,7 bA
Comprimento da raiz (cm planta ⁻¹)	360	3,60 aA	4,18 aA	4,21 aA
	720	3,54 aA	4,69 aA	4,60 aA
Diâmetro do colo (mm planta ⁻¹)	360	1,36 bA	1,27 bA	0,92 aA
	720	1,30 bA	1,29 bA	0,97 aA
Massa seca PA (g UE ⁻¹) ^b	360	0,295 bA	0,409 aA	0,071 cA
	720	0,279 bA	0,493 aA	0,160 cA
Massa seca RA (g UE ⁻¹)	360	0,054 aA	0,066 aA	0,004 bA
	720	0,053 aA	0,079 aA	0,004 bA
Massa seca total (g UE ⁻¹)	360	0,349 bA	0,475 aA	0,075 cA
	720	0,332 bA	0,572 aA	0,164 cA
Volume radicular (cm ³ UE ⁻¹)	360	0,62 aA	0,42 aA	0,08 bB
	720	0,82 aA	0,98 aA	0,15 bA

*Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna e minúsculas nas linhas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. ^aVED30: vedado + MS com 30 g L⁻¹ de sacarose. MEMB30: Com membrana + MS com 30 g L⁻¹ de sacarose. MEMB0: Com membrana + MS sem sacarose. ^bUnidade experimental composta por cinco vitroplantas.

O ambiente de incubação e as condições de cultivo no frasco de cultura apresentaram efeitos e interação significativos ($p < 0,05$) na altura, número de folhas e volume radicular das vitroplantas de fáfia (Tabela 1, Figura 3). A maior altura foi observada em vitroplantas cultivadas em frascos contendo meio de cultura com sacarose e com membranas que permitem trocas gasosas, independentemente da concentração de CO₂ no ambiente. Entretanto, em meio de cultura sem sacarose o aumento na concentração de CO₂ de 360 para 720 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ promoveu o crescimento em altura das vitroplantas (Tabela 1).

A área foliar não apresentou interação entre as concentrações de CO₂ e condições de cultivo. Entretanto, entre as condições de cultivo foi observada diferença significativa (Tabela 1), sendo a maior área foliar observada em frasco com membrana contendo meio MS suplementado com sacarose (MEMB30). A concentração de CO₂ não aumentou significativamente a área foliar das vitroplantas em relação às plantas cultivadas em atmosfera com 360 μmol mol⁻¹ de CO₂ (Tabela 1). Em condições de enriquecimento de CO₂ a área foliar não diferiu entre MEMB30 e MEMB0 (Tabela 1); já em 360 μmol mol⁻¹ de CO₂ MEMB30 e MEMB0 diferiram significativamente.

O número de folhas por vitroplanta foi aumentado em vitroplantas submetidas a 720 μmol mol⁻¹, em condições de ausência de sacarose no meio de cultura (MEMB0). Entre as condições de cultivo, no frasco vedado observou-se o maior número de folhas em relação aos demais tratamentos (Tabela 1), não diferindo de MEMB30, tanto em 360 ou 720 μmol mol⁻¹ de CO₂.

O comprimento de raiz não foi afetado pela concentração de CO₂ (Tabela 1). Maior comprimento de raiz foi observado em plantas de fáfia cultivadas em frascos com membranas com ou sem sacarose no meio de cultura, em frasco sem membranas foram observadas as menores médias.

Em meio de cultura sem sacarose (MEMB0) e em ambiente com 360 ou 720 μmol mol⁻¹ de CO₂ foram observadas as maiores médias (0,92 e 0,97 mm, respectivamente) de diâmetro do colo (Tabela 1), diferindo de MEMB30 e VED30. Não foi observada interação significativa entre os fatores estudados (p>0,05).

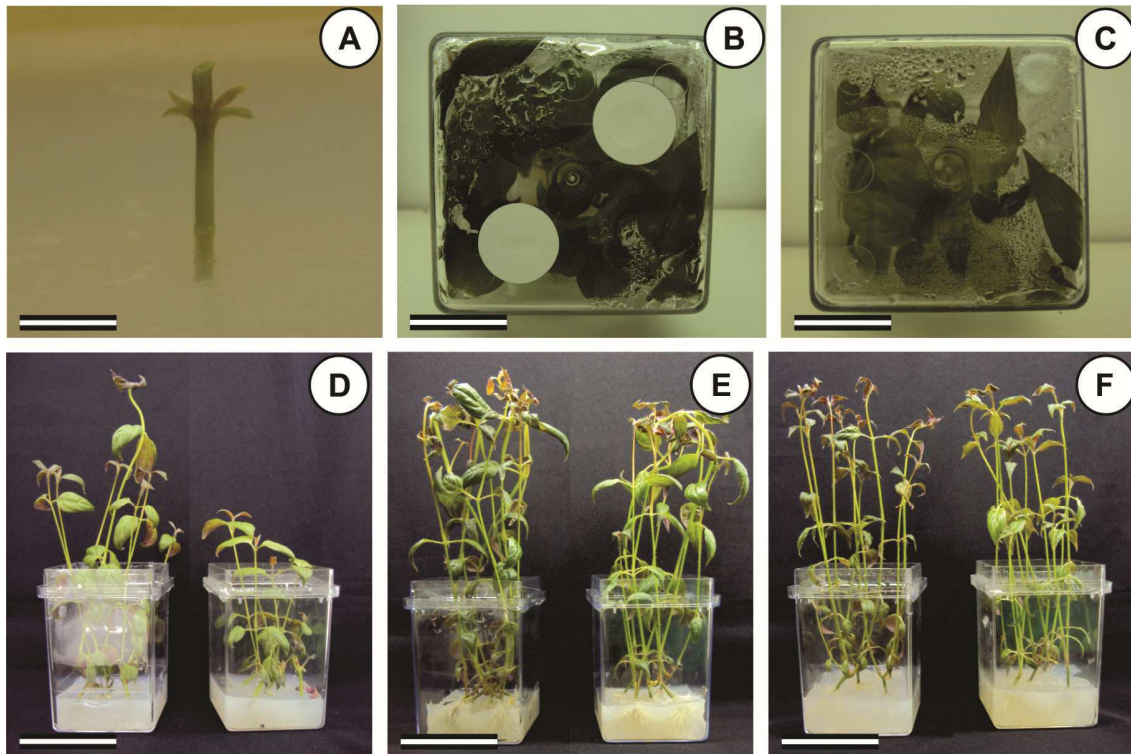


Figura 3. Aspecto geral da cultura *in vitro* de *Pfaffia glomerata*. **A:** Segmento nodal sem folhas expandidas, usado como explante inicial. **B:** Detalhe da tampa do frasco de cultivo com orifícios contendo membrana fluoroporo hidrofóbica (PTFE) para trocas gasosas (MilliSeal[®] Air Vent, Tóquio, Japão) de 0,45 µm de poro. **E:** Tampa do frasco de cultivo sem membrana. **F:** Vitroplantas crescidas na condição MEMB0 com 720 (esquerda) ou 360 µmol mol⁻¹ (direita) de CO₂. **G:** Vitroplantas crescidas na condição MEMB30 com 720 (esquerda) ou 360 µmol mol⁻¹ (direita) de CO₂. **H:** Vitroplantas crescidas na condição VED30 com 720 (esquerda) ou 360 µmol mol⁻¹ (direita) de CO₂. Barra: A= 0,5 cm, B,C= 2 cm e D,E, F= 5 cm.

A massa seca da parte aérea foi influenciada pela concentração de CO₂ e pela condição de cultura no frasco (Tabela 1), e não houve interação significativa entre os fatores. O maior acúmulo de biomassa na PA (0,493 g UE⁻¹) ocorreu em vitroplantas cultivadas em frascos com membranas e meio de cultura com 30 g L⁻¹ de sacarose (MEMB30) em 720 µmol mol⁻¹ de CO₂. O menor acúmulo (0,071 g UE⁻¹) foi em meio de cultura sem sacarose (MEMB0) m 720 µmol mol⁻¹ de CO₂ (Tabela 1). A biomassa seca da do sistema radicular (RA) não foi aumentada em resposta a elevação da concentração de CO₂ no ambiente (Tabela 1). As menores médias de massa seca do sistema

radicular ($0,004 \text{ g UE}^{-1}$) foram observadas no meio de cultura sem sacarose, diferindo de MEMB30 e VED30.

O acúmulo de massa seca total foi afetado pela concentração de CO_2 e pela condição de cultura no frasco (Tabela 1). A maior média de massa seca ($0,572 \text{ g UE}^{-1}$) foi observada em vitroplantas cultivadas em ambiente com $720 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 , em frascos com membranas e meio com sacarose (MEMB30). Verificou-se maior acúmulo de massa seca total nas naquelas cultivadas em frascos com ventilação natural e meio de cultura com açúcar em atmosfera com concentração elevada de CO_2 ($720 \mu\text{mol mol}^{-1}$). Não foi observada diferença significativa entre o acúmulo de massa seca total daquelas cultivadas em meio de cultura sem sacarose e frasco com membranas, entre os ambientes com 360 e $720 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 . Porém, a biomassa produzida em $720 \mu\text{mol mol}^{-1}$ ($0,164 \text{ g}$) dobrou em relação a $360 \mu\text{mol mol}^{-1}$ ($0,076 \text{ g}$) (Tabela 1).

O volume radicular foi influenciado pela concentração de CO_2 e pelas condições de cultivo no frasco (Tabela 1), com interação significativa entre os fatores. Maior volume radicular ($0,98 \text{ cm}^3 \text{ UE}^{-1}$) foi observado em vitroplantas de fáfia cultivadas em frascos com membranas e em meio de cultura com sacarose incubados em ambiente com $720 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 . A menor média ($0,08 \text{ cm}^3 \text{ UE}^{-1}$) foi observada em meio de cultura sem sacarose em ambiente sem enriquecimento com CO_2 . Foi observado que em vitroplantas de fáfia cultivadas sob $720 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 , em presença (MEMB30) ou ausência de sacarose no meio de cultura (MEMB0), o volume radicular dobrou em relação àquelas cultivadas nesse mesmo meio, porém sob $360 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 (Tabela 1).

3.2 O teor e a perda relativa de água nas folhas de vitroplantas de ginseng brasileiro são afetados pela condição de cultura no frasco e pela concentração de CO₂ na atmosfera

A perda de água em folhas destacadas de *P. glomerata* ocorreu rapidamente. A maioria dos tratamentos perdeu mais de 50% da massa total da folha em 60 minutos (Figura 4). A desidratação das folhas diferiu estatisticamente entre os tratamentos em todos os tempos avaliados (Figura 4). Nos diferentes tempos a maior perda de água ocorreu em folhas oriundas de vitroplantas cultivadas em frascos vedados. O tratamento que apresentou a menor desidratação em todos os tempos foi o ambiente com 720 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂ e meio MS sem sacarose (MEMB0 720). No tratamento com membranas no frasco e meio de cultura com sacarose verificou-se que no tempo de 60 minutos ocorreu diferença significativa para a perda de água entre os ambientes com 360 e 720 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂ (Figura 4).

Em todos os tempos subsequentes ao início da desidratação a menor perda de água ocorreu em folhas de vitroplantas de fáfia cultivadas em frascos com trocas gasosas (Figura 4). Em 80 minutos de desidratação, a menor desidratação das folhas destacadas ocorreu em resposta ao tratamento (MEMB0 720) com a ausência de sacarose no meio de cultura, presença de membranas e ambiente enriquecido com 720 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂, não diferindo estatisticamente de MEMB30 360 e MEMB30 720.

O teor relativo de água nas folhas (%) diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) entre os tratamentos (Figura 5), ocorrendo interação entre os fatores condições de cultivo no frasco e concentração de CO₂ na atmosfera.

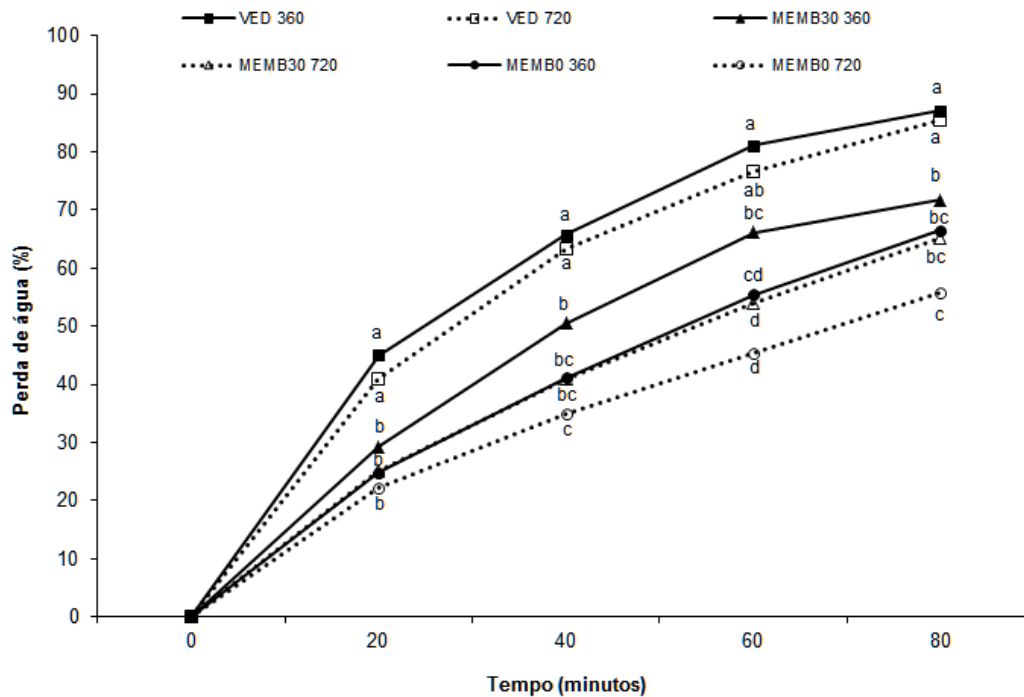


Figura 4. Perda de água de folhas destacadas de vitroplantas de *Pfaffia glomerata*, aos 35 dias de cultivo. Ambiente com 360 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 : frasco vedado (VED360), frasco com membrana e meio MS com 30 g L^{-1} de sacarose (MEMB30 360) e frasco com membrana e meio MS sem sacarose (MEMB0 360). Ambiente com 720 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 : frasco vedado (VED720), frasco com membrana e meio MS com 30 g L^{-1} de sacarose (MEMB30 720) e frasco com membrana e meio MS sem sacarose (MEMB0 720). Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas dentro do mesmo tempo, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

As maiores médias do teor relativo de água (TRA) foram observadas em folhas de vitroplantas cultivadas em frascos com membranas e meio de cultura sem sacarose independentemente da concentração de CO_2 no ambiente (Figura 5), a menor média de TRA (84%) foi observada em MEMB30 em ambiente sem enriquecimento com CO_2 . Dentro da condição de cultivo MEMB30 o TRA das folhas de fáfia aumentou significativamente em resposta à elevação da concentração de CO_2 no ambiente (Figura 5).

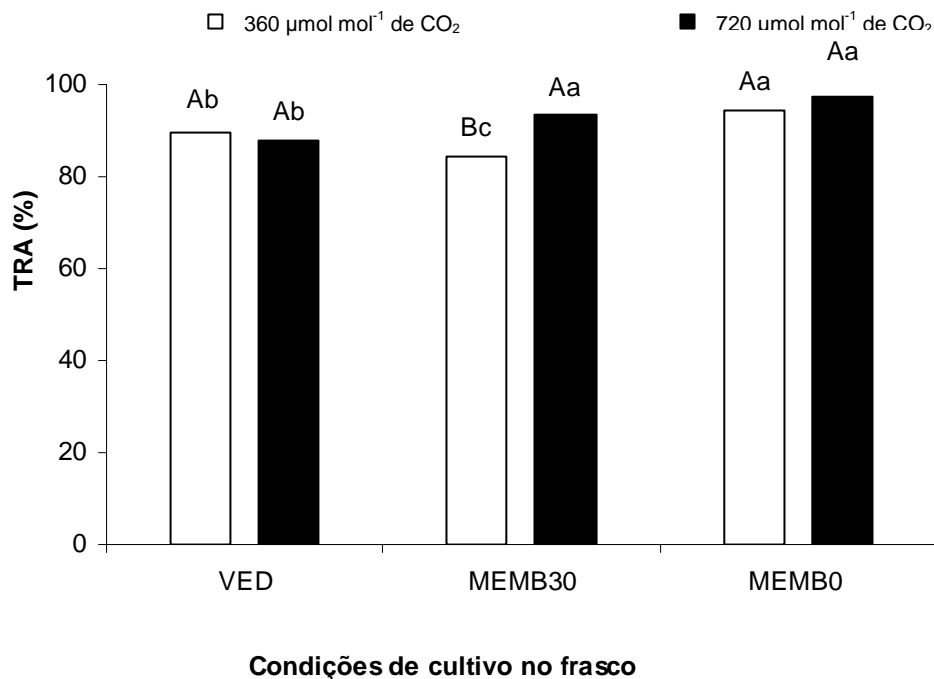


Figura 5. Teor relativo de água (TRA) em folhas de vitroplantas de *Pfaffia glomerata* cultivadas *in vitro*, aos 35 dias de cultivo. Ambiente com 360 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 (barra clara): frasco vedado (VED360), frasco com membrana e meio MS com 30 g L^{-1} de sacarose (MEMB30 360) e frasco com membrana e meio MS sem sacarose (MEMB0 360). Ambiente com 720 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 (barra escura): frasco vedado (VED720), frasco com membrana e meio MS com 30 g L^{-1} de sacarose (MEMB30 720) e frasco com membrana e meio MS sem sacarose (MEMB0 720). Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade dentro de cada condição de cultivo. Médias do ambiente (coluna preta ou branca) dentro de cada condição de cultivo, seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem.

3.3 O CO_2 induz o aumento dos pigmentos fotossintéticos de vitroplantas de ginseng brasileiro cultivadas *in vitro* e influencia a densidade e morfologia estomática

O teor de clorofilas *a*, *b*, total e carotenoides foi influenciado pelas condições de cultivo no frasco e pelas diferentes concentrações (360 ou 720 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) de CO_2 no ambiente (Figura 6). Dentre essas características não foram verificadas interações significativas ($p < 0,05$) entre as diferentes concentrações de CO_2 e as condições de cultivo no frasco.

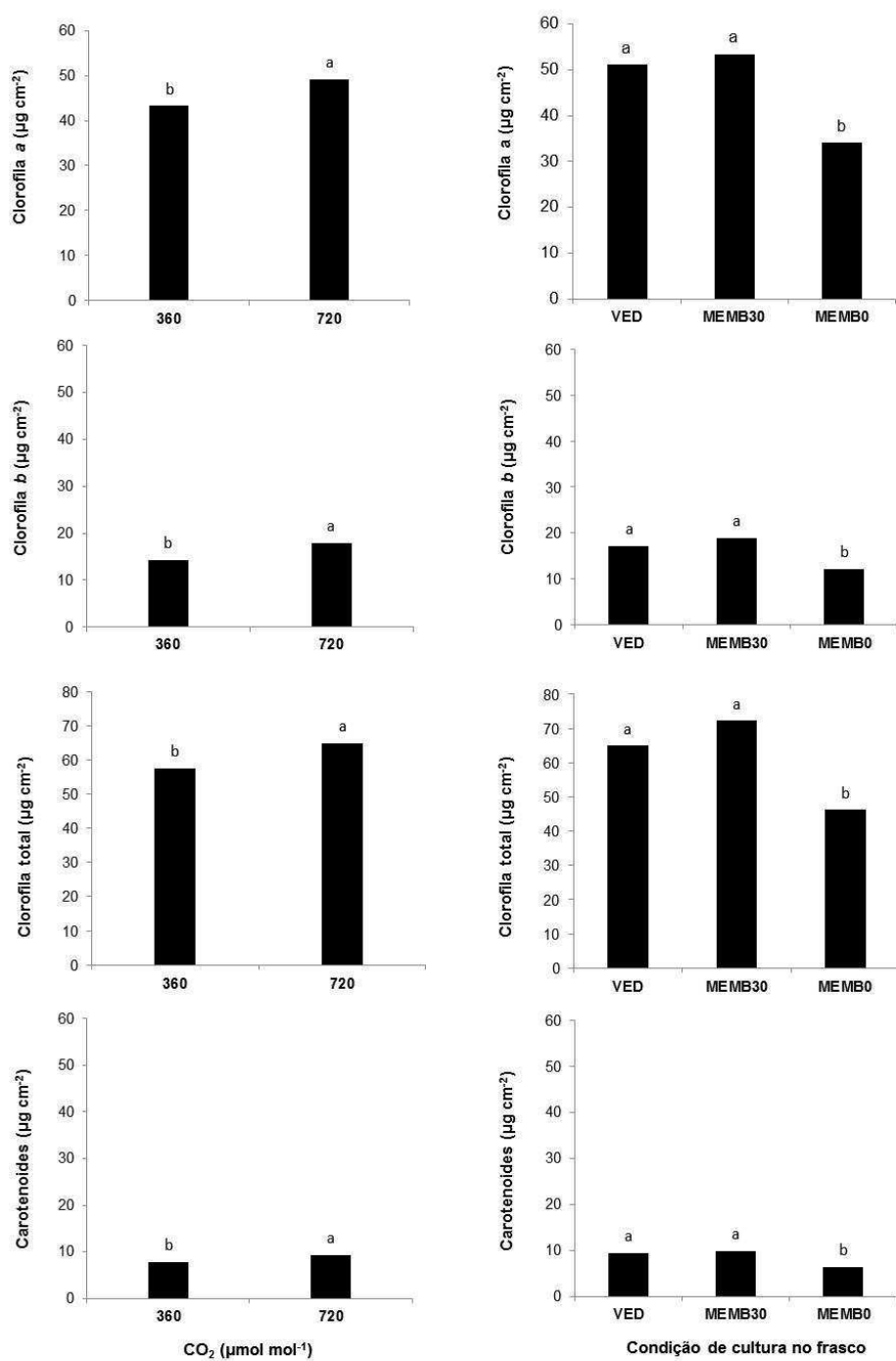


Figura 6. Pigmentos fotossintéticos de folhas de vitroplantas de *Pfaffia glomerata* propagadas em diferentes condições de cultivo e concentrações de CO₂, aos 35 dias de cultivo. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

O cultivo de fáfia em atmosfera enriquecida com 720 μmol mol⁻¹ de CO₂ promoveu o aumento significativo de todos os pigmentos cloroplásticos. As

plantas crescidas em meio de cultura com sacarose, em frascos com ou sem membranas, não apresentaram diferenças significativas entre si (Figura 6). Enquanto que as cultivadas em meio de cultura sem sacarose e frasco com membranas apresentaram as menores médias de pigmentos cloroplastídicos.

A densidade estomática apresentou variação significativa ($p < 0,05$) na face abaxial das folhas, em resposta à condição de cultura no frasco e a concentração de CO_2 no ambiente de cultivo (Figura 7), havendo interação entre os dois fatores. Na face adaxial das folhas também foram observados estômatos, porém sem diferenças contrastantes (dados não mostrados). Vitroplantas de fáfia crescidas em frasco sem membranas e meio com sacarose (VED) apresentaram alta densidade estomática (450 estômatos mm^{-2}). Porém, quando cultivadas em frascos com membranas (MEMB30 e MEMB0) ocorreu diminuição na densidade estomática (Figura 7). O ambiente enriquecido com CO_2 combinado com a condição de cultivo MEMB30 promoveu a diminuição da densidade estomática. Na condição de cultivo MEMB30 a elevação da concentração de CO_2 de 360 para 720 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ reduziu a densidade estomática de 208 para 72 estômatos mm^{-2} (Figura 7). Nos demais tratamentos a densidade estomática não foi alterada em função da concentração de CO_2 na atmosfera.

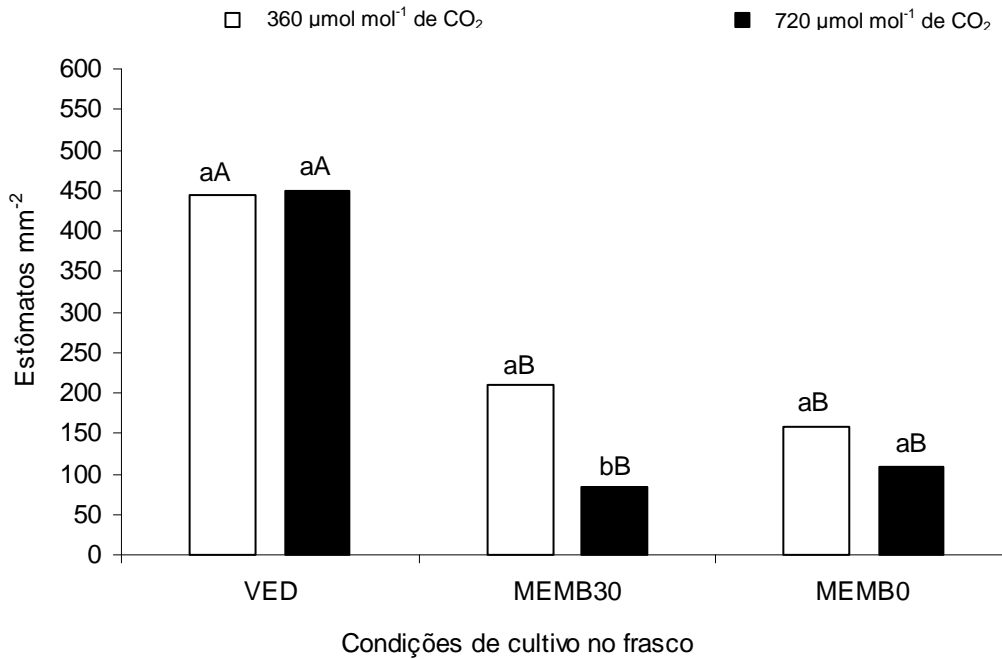


Figura 7. Densidade estomática na face abaxial de folhas de vitroplantas de *Pfaffia glomerata* propagadas em diferentes condições de cultivo e concentrações de CO_2 , aos 35 dias de cultivo. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade dentro de cada condição de cultivo. Médias do ambiente (coluna preta ou branca) dentro de cada condição de cultivo, seguidas pelas mesmas letras maiúsculas não diferem.

Observações microscópicas dos estômatos das vitroplantas submetidas aos diferentes tratamentos mostraram diferenças morfológicas (Figura 8). Os estômatos das vitroplantas cultivadas em frascos vedados e em meio com sacarose apresentaram formato arredondado (Figura 8A, 8B, 8C e 8D). Em tratamentos com a ausência de sacarose e com membranas nos frascos apresentaram estômatos em formato elíptico (Figura 8E e 8F). Menor poro estomático foi observado nos tratamentos com enriquecimento de CO_2 (Figura 8C e 8E). Os estômatos de folhas oriundas de frascos com membranas e sacarose no meio de cultura em ambiente com $720 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 (Figura 8D) apresentaram menor poro estomático em relação aos estômatos de plantas cultivadas em $720 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 (Figura 8C). As impressões da

epiderme para a captura das imagens da morfologia estomática foram realizadas em período de escuro. Entretanto, verificou-se que nos tratamentos com frasco vedado os estômatos não possuíam controle estomático, pois, não responderam ao estímulo do escuro para o fechamento.

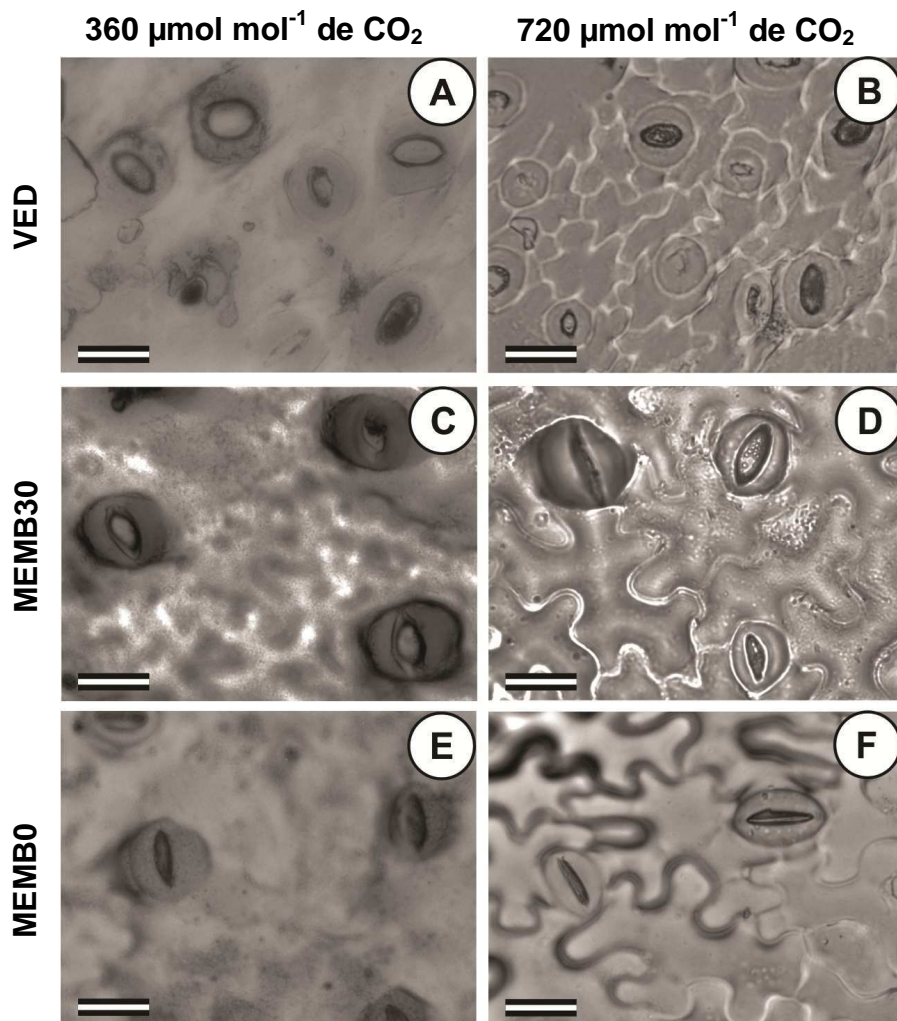


Figura 8. Morfologia dos estômatos de *Pfaffia glomerata* em diferentes condições de cultivo e em diferentes concentrações de CO₂ no ambiente. **A:** Frasco vedado em ambiente enriquecido com CO₂. **A-E:** Ambiente com 360 μmol mol⁻¹ de CO₂. **B-F:** Ambiente com 720 μmol mol⁻¹ de CO₂. **A e B:** Frasco vedado e meio com sacarose. **C e D:** Frasco com membranas e meio com sacarose. **E e F:** Frasco com membranas e meio sem sacarose. Barra = 25 μm.

3.4 A ausência de sacarose no meio de cultura estimula o aumento no teor de β -ecdisona

A interação entre as concentrações de CO_2 e as condições de cultivo no frasco para o acúmulo de 20E não foi significativa ($p > 0,05$). Entretanto, as condições de cultivo no frasco e a concentração de CO_2 afetaram de modo independente o acúmulo de 20E (Figura 9). O maior acúmulo de 20E na parte aérea das plântulas de fáfia foi dependente da maior troca gasosa proporcionada por membranas na tampa frasco e da ausência de sacarose no meio de cultura (Figura 9B). O aumento na concentração de CO_2 no ambiente de cultivo não promoveu maior acúmulo de 20E (Figura 9A). O menor acúmulo de 20E foi observado em frascos sem membranas e meio de cultura com sacarose.

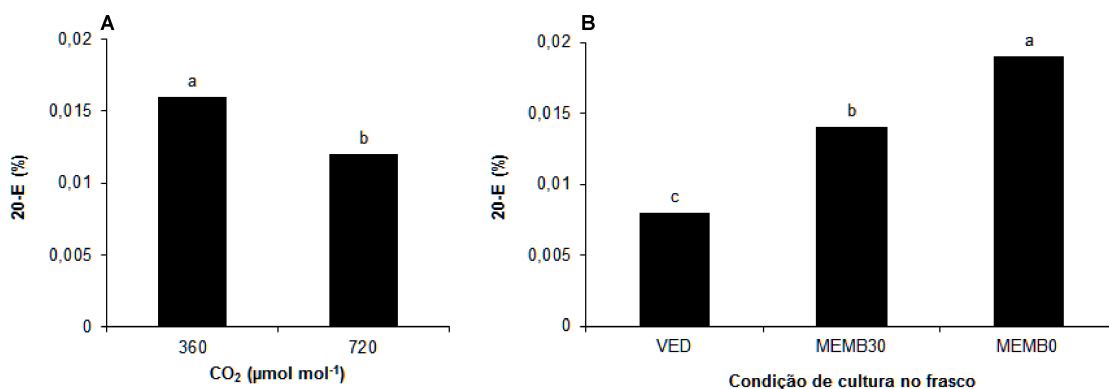


Figura 9. Produção de β -ecdisona na parte aérea em plantas de *Pfaffia glomerata* cultivadas *in vitro*, aos 35 dias de cultivo. **A:** Efeito da concentração de CO_2 no ambiente. **B:** Efeito da condição de cultivo no frasco. Médias seguidas pelas mesmas letras, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

3.5 As características anatômicas das folhas foram diferenciadas entre tratamentos

Observações em microscopia de luz mostraram que os tratamentos promoveram diferenças anatômicas entre os tratamentos (Figura 10), em que o cultivo das vitroplantas de fáfia em condições de enriquecimento da atmosfera com CO₂ favoreceu a diferenciação do sistema vascular das folhas (Figura 10E, 10F). No tratamento com sacarose e membranas no frasco de cultivo observou-se maior estruturação do parênquima de preenchimento (Figura 10B, 10E), ocorrendo menores espaços intercelulares em relação ao tratamento controle, frasco vedado (Figura 10A, 10D). Em folhas de vitroplantas de fáfia cultivadas em meio de cultura em ausência de sacarose (Figura 10C, 10F) foi observado espaços intercelulares no parênquima de preenchimento. Entretanto, o enriquecimento da atmosfera com CO₂ promoveu o aparecimento de tecido vascular (Figura 10C) mais volumoso em relação àquelas cultivadas em meio de cultura sem sacarose e em ambiente com 360 μmol mol⁻¹ de CO₂ (Figura 10F).

Em tratamentos com membranas (MEMB30) em ambiente com 360 μmol mol⁻¹ de CO₂ foi possível observar que o feixe vascular da nervura mediana foi menos desenvolvido (Figura 10B) em relação ao ambiente com 720 μmol mol⁻¹ de CO₂ (Figura 10E). O teste histoquímico com o reagente Lugol não mostrou a presença de grãos de amido no limbo foliar.

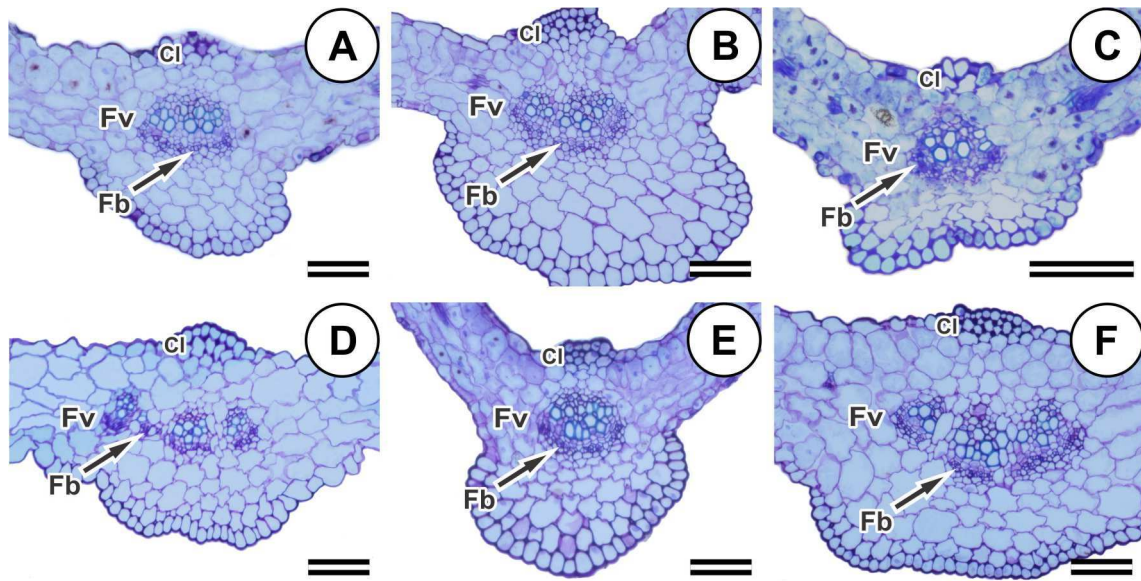


Figura 10. Secções transversais da nervura mediana de folhas de *Pfaffia glomerata* propagada *in vitro* em diferentes condições de cultivo e concentrações de CO₂, aos 35 dias de cultivo. **A-C:** Ambiente com 360 μmol mol⁻¹ de CO₂. **D-F:** Ambiente com 720 μmol mol⁻¹ de CO₂. **A e D:** Frasco vedado e meio com sacarose. **B e E:** Frasco com membranas e meio com sacarose. **C e F:** Frasco com membranas e meio sem sacarose. Fv = feixe vascular. Fb = fibras perivasculares. Cl= colênquima angular. Barra = 200 μm.

4. DISCUSSÃO

No presente estudo foi relatado pela primeira vez na literatura o crescimento de vitroplantas de *P. glomerata* sob condições de enriquecimento da atmosfera com CO₂. O enriquecimento de CO₂ e as condições de cultivo no frasco (trocas gasosas e meio de cultura com ou sem sacarose) promoveram alterações significativas em características relacionadas ao crescimento, produzindo vitroplantas com vigor fisiológico e características desejáveis para a aclimatização. As trocas gasosas proporcionadas pelas membranas permeáveis ocasionaram o incremento de CO₂ no interior do frasco de cultura, aumentando o crescimento em condições fotoautotróficas ou fotomixotróficas em atmosfera com alta concentração de CO₂ (Tabela 1; Figura 3).

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 na disponibilidade de carboidratos e na eficiência de uso da água, estimulando a divisão e expansão celular que leva a efeitos no crescimento, desenvolvimento e a alterações estruturais (Pritchard et al., 1999). Em geral, a ventilação natural ou forçada dos frascos em sistemas de propagação *in vitro* promove o crescimento e desenvolvimento de explantes clorofilados (Kozai, 2010; Xiao et al., 2011). Em *Populus deltoides* condições fotoautotróficas *in vitro* diminuíram a indução de brotos e aumentaram o vigor do enraizamento dos mesmos (Mingozzi et al., 2009). Vitroplantas de *Macadamia tetraphylla* cultivadas em condições de enriquecimento de CO₂ tiveram aumento de pigmentos cloroplastídicos e da fotossíntese líquida, conseqüentemente favorecendo o crescimento do sistema radicular e da parte aérea (Cha-um et al., 2011). No

presente estudo foi verificado que a produção de massa seca total das vitroplantas de fáfia foi aumentada 2,1 vezes em frascos com membranas e com meio de cultura sem sacarose (MEMB0) e em atmosfera enriquecida com CO₂. Em geral, vitroplantas que crescem em condições que estimulam a capacidade fotossintética, apresentam elevada sobrevivência durante a aclimatização e favorecem o crescimento *ex vitro* (Zobayed et al., 2000).

Nossos resultados demonstram que a concentração elevada de CO₂ promoveu o crescimento *in vitro* de *P. glomerata* e a menor desidratação de folhas destacadas (Figura 4) em condições *ex vitro*, representando uma possibilidade efetiva para a eficiente aclimatização. Na propagação *in vitro* conduzida em frascos que permitam mais trocas gasosas, planta pode apresentar características que favoreçam a diminuição da perda de água na transferência para condições *ex vitro*, devido à elevada deposição de cera epicuticular e pela produção de estômatos funcionais (Majda et al., 1997). Além disso, o aumento da concentração de CO₂ pode favorecer as características cinéticas da Rubisco, como a velocidade de carboxilação e, ao mesmo tempo, inibe a atividade oxigenase, resultando na redução da fotorrespiração e aumento da assimilação líquida de carbono (Pinto et al., 2000; Reddy et al., 2010).

A área foliar das vitroplantas de fáfia não aumentou em resposta ao aumento da concentração de CO₂ na atmosfera de 360 para 720 $\mu\text{mol mol}^{-1}$. Entretanto, foi observado maior área foliar em vitroplantas crescidas em frascos com membranas para trocas gasosas (Tabela 1), sugerindo que a manutenção da concentração de CO₂ dentro do frasco de cultura é fundamental para o aumento da área foliar. O crescimento da folha é altamente responsivo ao

ambiente, incluindo a disponibilidade de CO₂ (Ferris et al., 2001). Em *Populus x euramericana*, *P. nigra* e *P. alba* o crescimento da folha dessas espécies foi estimulado quando as mesmas foram submetidas à atmosfera enriquecida com CO₂ (550 μmol mol⁻¹ CO₂) (Ferris et al., 2001).

Verificou-se que o teor relativo de água nas folhas de fáfia variou em resposta a concentração de CO₂ do ambiente e a presença ou ausência de sacarose no meio de cultura (Figura 5). Maior teor relativo de água foi observado em folhas de vitroplantas de fáfia cultivadas em meio de cultura sem sacarose, independentemente da concentração de CO₂. Entretanto, em folhas de vitroplantas crescidas em meio com sacarose e frascos com membranas, o maior teor relativo de água foi observado em ambiente com 720 μmol mol⁻¹ de CO₂.

Sugere-se que na condição de enriquecimento com CO₂ aumentou o teor de água nas folhas das vitroplantas de fáfia pelo fato de ter ocorrido diminuição da densidade estomática em folhas de plantas cultivadas neste ambiente, conduzindo a uma menor transpiração. Por outro lado, analisando os resultados de perda de água de folhas destacadas de fáfia (Figura 4) verifica-se que a menor perda de água ocorreu em tratamentos que apresentaram maior TRA. O menor TRA foi observado em folhas de fáfia cultivadas em meio de cultura com sacarose em relação às cultivadas em meio sem sacarose, provavelmente, influenciado pelo potencial osmótico do meio de cultura. A quantidade de sacarose no meio de cultura está diretamente relacionada com a regulação osmótica do meio de cultura (Paiva Neto & Otoni, 2003), a qual interfere no teor de água nos tecidos da planta cultivada *in vitro* (Cha-um et al., 2011). Em *M. tetraphylla* o teor de água nos tecidos das raízes e a capacidade

fotossintética das vitroplantas diminuíram com o aumento da concentração de sacarose no meio de cultura (Cha-um et al., 2011).

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). Foi verificado que o aumento do crescimento em massa seca total das vitroplantas de fáfia esteve relacionado com o aumento no teor de clorofila *a*, *b* e carotenoides (Tabela 1, Figura 6). O maior teor de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b*, total e carotenoides) em vitroplantas de fáfia cultivadas em atmosfera enriquecida com CO₂, é indicativo que essa condição estimula o crescimento fotoautotrófico. O estímulo da fotossíntese, em condições fotomixotróficas, pelo aumento do teor de pigmentos fotossintéticos em vitroplantas de *Solanum tuberosum* (cv. Sandy) cultivadas *in vitro*, foi dependente das trocas gasosas no frasco de cultura e do enriquecimento da atmosfera com CO₂ (Mohamed & Alsadon, 2010).

Vários estudos têm apontado que o crescimento de plantas em condições de elevação do CO₂ na atmosfera pode causar modificações na densidade estomática, podendo aumentar, diminuir ou inalterar a densidade em relação a condições normais de concentração de CO₂ (Pritchard et al., 1999). No presente estudo, o cultivo de vitroplantas de fáfia em frascos contendo membranas e em condições de elevação do CO₂ na atmosfera, ocasionou a redução da densidade estomática. Sugere-se que em função do elevado número de estômatos por área (Figura 7) e a ausência de controle estomático em folhas oriundas de tratamentos sem membranas tenha contribuído para a alta desidratação das folhas de fáfia. A exposição das vitroplantas em sistemas de propagação *in vitro* que apresentem alta umidade relativa e baixa

concentração de CO₂, leva a produção de estômatos não funcionais (Zobayed et al., 2000). Observou-se que em vitroplantas cultivadas em condições de enriquecimento de CO₂ ocorreu diminuição na densidade estomática (Figura 7) e, conseqüentemente redução na desidratação de folhas destacadas (Figura 5).

A aclimatização de plantas crescidas *in vitro* às condições *ex vitro* é um passo determinante no sucesso da propagação *in vitro* em larga escala (Pospíšilová et al., 2007). Assim, o cultivo de vitroplantas de fáfia em condições de enriquecimento com CO₂ pode representar ganhos durante a aclimatização, visto que o elevado número de estômatos por área e a baixa regulação estomática em folhas *in vitro*, têm se constituído nos principais fatores relacionados à falta ou reduzida capacidade das plantas em controlar a dessecação logo no início da aclimatização sob condições *ex vitro* (Hazarika, 2006).

Foi verificado que em condições de enriquecimento com CO₂ ocorreu simultaneamente o estímulo do metabolismo primário e redução do teor do metabólito secundário β-ecdisona na parte aérea das vitroplantas de fáfia, sugerindo que as mesmas aos 35 dias de cultivo ainda estavam em pleno crescimento vegetativo. A cinética de crescimento das células vegetais geralmente apresenta uma fase exponencial de crescimento, porém, muitos metabólitos secundários são produzidos durante a fase estacionária do crescimento. A redução na produção de metabólitos secundários durante os estádios iniciais de crescimento, pode ser explicada pela alocação de carbono que ocorre principalmente, pelo metabolismo primário durante a fase de crescimento (Neumann et al., 2009). Estes mesmos autores relatam que

quando a fase de crescimento atinge uma condição estacionária, ocorre diminuição na demanda de carbono para o metabolismo primário e, os compostos secundários passam a ser mais ativamente sintetizados.

Além da concentração de CO₂ na atmosfera, a presença de membranas no frasco de cultivo e a presença ou ausência de sacarose no meio de cultura interferiram nas características anatômicas das folhas de vitroplantas de fáfia. Características anatômicas desfavoráveis ao crescimento, como reduzida diferenciação do mesofilo e reduzida vascularização, foram observadas em vitroplantas de fáfia com menor acúmulo de massa seca. A alta umidade dentro do frasco de cultivo e a limitação na concentração de CO₂ durante o fotoperíodo são fatores que contribuem para a reduzida diferenciação do mesofilo e do tecido vascular em plantas propagadas *in vitro* (Mohamed & Alsadon, 2010). Estudos anatômicos em folhas de vitroplantas de *Solanum melongena* L. cultivadas *in vitro* demonstram que o uso de vedações que permitem as trocas gasosas no frasco de cultivo favorece a diferenciação de tecidos parenquimáticos e vasculares (Ribeiro et al., 2009).

No presente estudo verificou-se que a *P. glomerata* apresenta potencial para a propagação *in vitro* em atmosfera com enriquecimento de CO₂. Todas as características de crescimento das vitroplantas de fáfia aumentaram em condições de elevação de CO₂. Nessas condições de atmosfera enriquecida com CO₂ foram produzidas vitroplantas de *P. glomerata* com características desejáveis para produção clonal massal, sendo uma alternativa para o estabelecimento de plantios comerciais que visem uniformidade e objetivem a produção de 20E.

A menor perda relativa de água das folhas oriundas de plântulas cultivadas em meio de cultura com ou sem sacarose e em condição de elevação de CO₂, mostra que um sistema fotoautotrófico ou fotomixotrófico com enriquecimento de CO₂ é atrativo para a aplicação na produção comercial massal de mudas dessa espécie, possivelmente reduzindo as perdas que ocorrem durante a aclimatização *ex vitro*, devido à desidratação das vitroplantas. Além disso, pode ser um sistema atrativo para estudos relacionados à regulação da via de biossíntese de β-ecdisona.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

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.

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.

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.

FERNANDES, J.F.O.; BRITO, L.C.; FRYDMAN, J.N.G.; SANTOS-FILHO, S.D.; BERNARDO-FILHO, M. An aqueous extract of *Pfaffia* sp. does not alter the labeling of blood constituents with technetium-99m and the morphology of the red blood cells. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 15: 126-132, 2005.

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.

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.

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.

GONZÁLEZ, L.; GONZÁLEZ-VILAR, M. Determination of relative water content. In.: ROGER, M.J.R. **Handbook of Plant Ecophysiology Techniques**. Kluwer Academic Publishers: Dodrecht, p.207-212, 2001.

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

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

IAREMA, L. **Enxertia e propagação *in vitro* de fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]**. Tese (Doutorado em Botânica). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 191p., 2008.

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.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, 27: 137-138, 1965.

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. Concepts, definitions, ventilation methods, advantages and disadvantages. 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.19-30, 2005.

KUBOTA, C. Concepts and background of photoautotrophic micropropagation. In.: MOROHOSHI, N. & KOMAMINE, A. (Eds.) **Molecular Breeding of Woody Plants**. Elsevier, p.325-334, 2001.

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

MAJDA, J.P.; FAL, M.A.; SANCHEZ-TAMES, R. The effect of ventilation rate on proliferation and hyperhydricity of *Dianthus caryophyllus* L. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 33: 62-69, 1997.

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.

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.

MOHAMED, M.A.H.; ALSADON, A.A. Influence of ventilation and sucrose on growth and leaf anatomy of micropropagated potato plantlets. **Scientia Horticulturae**, 123: 295-300, 2010.

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

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

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.

NEUMANN, K.H.; KUMAR, A.; IMANI, J. **Plant Cell and Tissue Culture - A Tool in Biotechnology**. Springer: Berlin-Heidelberg, 331p. 2009.

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.

O'BRIEN, T.P.; McCULLY, M.E. **The study of plant structure principles and selected methods**. Melbourne: Termacarphi, 45p. 1981.

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

PAIVA NETO, V.B.; OTONI, W.C. Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture: does it matter? **Scientia Horticulturae**, 97: 193-202, 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.

PINTO, J.M.; BOTREL, T.A.; MACHADO, C.E. Uso de dióxido de carbono na agricultura. **Ciência Rural**, 30: 919-925, 2000.

POSPÍŠILOVÁ, J.; SYNKOVÁ, H.; HAISEL, D.; SEMORÁDOVÁ, Š. Acclimation of plantlets to *ex vitro* conditions: effects of air humidity, irradiance, CO₂ concentration and abscisic acid (a review). **Acta Horticulturae**, 748: 29-38, 2007.

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

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.

QU, Y.H.; LIN, C.; ZHOU, W.; LI, Y.; CHEN, B.; CHEN, G.Q. Effects of CO₂ concentration and moisture content of sugar-free media on the tissue-cultured plantlets in a large growth chamber. **Communications in Nonlinear Science and Numerical Simulation**, 14: 322-330, 2009.

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.

RIBEIRO, A.P.O.; PICOLI, E.A.T.; LANI, E.R.G.; VENDRAME, W.A.; OTONI, W.C. The influence of flask sealing on *in vitro* morphogenesis of eggplant (*Solanum melongena* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 45: 421-428, 2009.

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.

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.

SAS Institute Inc. **Statistical Analysis System user's guide**. Version 9.1 ed. Cary, 2003.

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

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

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.

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

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

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.

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.

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.

ZOBAYED, S.M.A. Ventilation in micropropagation. In.: KOZAI, T.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S.M.A. (Eds.) **Photoautotrophic (sugar-free medium) Micropropagation as a New Micropropagation and Transplant Production System**. Springer: Netherlands, p.147-186, 2005.

ZOBAYED, S.M.A.; AFREEN, F.; KUBOTA, C.; KOZAI, T. Water control and survival of *Ipomoea batatas* grown photoautotrophically under forced ventilation and photomixotrophically under natural ventilation. **Annals of Botany**, 86: 603-610, 2000.

CAPITULO II

**Uso de fitas microporosas combinadas com
Politetrafluoretileno (PTFE): alternativa de baixo custo
para promover trocas gasosas e o crescimento *in vitro*
de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen**

1. INTRODUÇÃO

Na propagação *in vitro* de plantas, o sistema de vedação normalmente utilizado em frascos tem como objetivo prevenir a desidratação dos explantes e do meio de cultura, além de evitar contaminações por microrganismos, como bactérias e fungos. Os tipos de vedações dos frascos mais empregados no sistema convencional de propagação *in vitro* são: tampas rosqueáveis, filmes de alumínio, filmes plásticos transparentes (cloreto de polivinila) e tampas padrão de polipropileno. Todos esses materiais por apresentarem propriedades de barreira a gases normalmente restringem as trocas gasosas entre a atmosfera interna do frasco de cultura e a atmosfera externa da sala de cultura. Entretanto, existe grande interesse na promoção da aeração dos frascos utilizados na propagação *in vitro* de plantas para minimizar as diferenças entre o ambiente gasoso *in vitro* e a atmosfera em torno do frasco (Zobayed, 2005).

Entretanto, esse tipo de vedação restringe as trocas gasosas entre os ambientes *in vitro* e *ex vitro*, levando a desordens morfo-fisiológicas que ocasionam altos índices de mortalidade de plantas durante a aclimatização (Nguyen & Kozai, 2005; Zobayed, 2006). Nessa condição de vedação, ocorrem baixas taxas de transpiração e de fotossíntese, dificuldade na absorção de água e nutrientes, elevada taxa de respiração no escuro, causando redução na taxa de crescimento dos explantes (Kozai et al., 1997). Além disso, a alta umidade relativa no interior dos frascos de cultura diminui a deposição de ceras epicuticulares e o desenvolvimento de estômatos funcionais nos explantes, podendo ocasionar elevadas perdas durante a aclimatização (Chandra et al., 2010).

O uso de diferentes tipos de vedação dos frascos de cultura *in vitro* que permitam trocas gasosas pode aumentar o crescimento dos explantes e a viabilização de sistemas de propagação fotoautotrófica. A modificação do microambiente do frasco de cultura promovida pelas trocas gasosas favorece a manutenção da concentração de CO₂ adequada para estimular a fotossíntese e reduz a concentração de etileno e a umidade relativa dentro dos frascos de cultivo (Kozai & Kubota, 2001).

Nestes sistemas convencionais de propagação *in vitro* as trocas gasosas são realizadas pela ventilação natural que ocorre mediante a difusão de ar na área de contato entre a tampa e o frasco. Essa troca gasosa ocorre em função dos gradientes de pressão e temperatura entre o interior e o exterior do frasco, pelo gradiente de concentração de gases (O₂, CO₂, vapor de água, dentre outros) e pela velocidade e padrão de movimento do ar em torno do frasco (Xiao et al., 2011).

A concentração reduzida de CO₂ no frasco de cultura durante o fotoperíodo é parcialmente devido à baixa taxa de ventilação no sistema tradicional de cultura *in vitro*, limitando a disponibilidade de CO₂ em frascos pequenos. A baixa concentração desse gás inibe a atividade fotossintética das plantas *in vitro* e força o crescimento heterotrófico ou fotomixotrófico pela absorção do açúcar do meio de cultura como principal fonte de carbono (Nguyen & Kozai, 2005).

O aumento ou a manutenção da concentração de CO₂ durante o fotoperíodo e a diminuição na umidade relativa no interior do frasco podem reduzir o custo de produção de plantas propagadas *in vitro*, devido a redução

das perdas durante a aclimatização devido maior capacidade fotossintética dos explantes (Kozai, 2010).

Para melhorar a ventilação de frascos na cultura *in vitro* de plantas tem sido utilizadas tampas com membranas que permitem trocas gasosas, reduzindo a umidade relativa no interior do frasco de cultura, conseqüentemente aumentando a evapotranspiração e a efetiva absorção de água e nutrientes pela planta (Xiao et al., 2011; Kozai, 2010). Além disso, o uso de filmes permeáveis a gases contribuem para a redução da porcentagem de hiperhidricidade (Kozai et al., 1997).

Atualmente, diferentes tipos de membrana têm sido disponibilizados comercialmente para proporcionar trocas gasosas em frascos de cultura *in vitro* de plantas, como: membranas MilliSeal[®] (MilliSeal, Nihon Millipore Ltda., Yonezawa, Japan), MilliWrap[®] (Millipore Corporation, USA), disco transparente de polipropileno (Courtaulds Films, Bridgewater, Somerset, UK), membranas de Teflon (Flora Laboratories; Austrália), Suncap[®] (Sigma, USA) e discos TQPL[®] (TQPL Supplies, UK) (Zobayed, 2005).

Diversas espécies já foram propagadas *in vitro* com sucesso usando membranas MilliSeal[®] para melhorar as trocas gasosas do frasco de cultura *in vitro*, dentre essas: *Azadirachta indica* (Rodrigues et al., 2011), *Solanum melongena* (Ribeiro et al., 2009), *Pfaffia glomerata* (Iarema, 2008), *Uniola paniculata* (Valero-Aracama et al., 2007), *Hypericum perforatum* (Couceiro et al., 2006), *Alha gigracorum* (Zobayed et al., 2006), *Eucalyptus tereticornis* (ShaValli Khan et al., 2002). Entretanto, o custo desses dispositivos que permitem maiores trocas gasosas é alto, restringindo seu uso em sistemas comerciais. A redução no preço dessas membranas é necessária para maior

aplicabilidade na propagação autotrófica *in vitro* em larga escala (Nguyen & Kozai, 2005).

Assim, o presente estudo teve como objetivo comparar a eficiência de novos tipos de membranas de vedação com as membranas MilliSeal[®], sobre a morfogênese e o crescimento *in vitro* de *P. glomerata* (Spreng.) Pedersen, uma importante planta medicinal produtora de fítoecdisteroides, conhecida popularmente como fáfia ou ginseng brasileiro. Pela primeira vez na literatura é relatado o uso de fitas microporosas combinadas com fita de Politetrafluoretileno (PTFE) como alternativa de baixo custo para promover trocas gasosas e o crescimento *in vitro* de explantes clorofilados de plantas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Segmentos nodais com aproximadamente 2 cm de comprimento, foram retirados do acesso 22 pertencente ao banco de germoplasma de fáfia mantido *in vitro* na UFV em condições fotomixotróficas, e foram utilizados como explantes nesse experimento.

2.2 Condições de cultivo

Os explantes foram inoculados sem folhas em meio de cultura constituído pelos sais MS (Murashige & Skoog, 1962), vitaminas MS (0,5 mg L⁻¹ de ácido nicotínico, 0,5 mg L⁻¹ de piridoxina.HCl, 0,1 mg L⁻¹ de tiamina.HCl e 2 mg L⁻¹ de glicina), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e 30 g L⁻¹ de sacarose. O meio de cultura teve o pH ajustado para 5,7 e geleificado com 7 g L⁻¹ de ágar (Merck®, Alemanha). Os sais do meio MS foram incorporados ao meio de cultura na forma de pó (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA; Cat. nº M5519). O meio foi acondicionado em frascos de vidro com 12 cm de altura por 5 cm de diâmetro interno, contendo aproximadamente 50 mL de meio em cada. O meio de cultura foi esterilizado através da autoclavagem a 121 °C e 1,5 atm durante 15 minutos. As culturas foram mantidas em 25 ± 2 °C sob irradiância de 60 µmol m⁻² s⁻¹ com fotoperíodo de 16 h.

2.3 Comparação entre os sistemas de vedação

Os tratamentos foram constituídos por diferentes tipos de vedação: 1. **TR**: Tampa rígida de polipropileno autoclavável; 2. **MJ**: TR com dois orifícios de 10 mm de diâmetro cobertos por membrana fluoroporo hidrofóbica [Politetrafluoretileno (PTFE); MilliSeal[®] Air Vent, Tóquio, Japão]; 3, 4. **C2 e M2**: membrana (Figura 1A) composta por duas camadas de fita microporosa C (Cremer[®]) ou M (Missner & Missner[®]) e uma de PTFE Amanco[®] de $0,05 \pm 0,01$ mm de espessura (C2 e M2, respectivamente); 5, 6. **C3 e M3**: membrana (Figura 1B) composta por três camadas de fita microporosa C ou M e uma de PTFE Amanco[®] (C3 e M3, respectivamente), totalizando seis tratamentos. As plantas crescidas em frascos com TR foram usadas como testemunha, por ser a condição encontrada no sistema tradicional de propagação *in vitro*. As plantas crescidas em frascos com tampas com MJ foram consideradas como controle positivo pois, as membranas comerciais MJ são eficientes no auxílio do crescimento em diversas espécies de plantas cultivadas *in vitro*. Durante o período de cultivo não foram realizados subcultivos. As tampas com membranas foram esterilizadas através de autoclavagem, sendo que os resultados apresentados se referem à membranas autoclavadas três vezes.

O número de trocas gasosas que cada membrana proporcionou nos frascos foi determinado conforme metodologia descrita por Fujiwara & Kozai (1995). Para tanto, o *headspace* (espaço livre do frasco) de cada frasco contendo um diferente tipo de vedação foi saturado com uma mistura de dióxido de carbono (CO₂) na concentração de 2,5%. As leituras da concentração de CO₂ no interior do frasco foram realizadas com o equipamento Head space Gas Analyzer 6600 (Illinois[®]). A estimativa do número de trocas

gasosas por hora (N') em cada condição de vedação foi estimada pela seguinte

equação: $N' = \frac{1}{T} \ln \frac{C_1 - C_{out}}{C_2 - C_{out}}$ (Fujiwara & Kozai, 1995). Em que T, representa o

tempo em horas entre as leituras em C_1 e C_2 ; C_1 e C_2 , a concentração de CO_2 no interior do frasco nos tempos 1 e 2; C_{out} , a concentração de CO_2 no ambiente externo ao frasco.

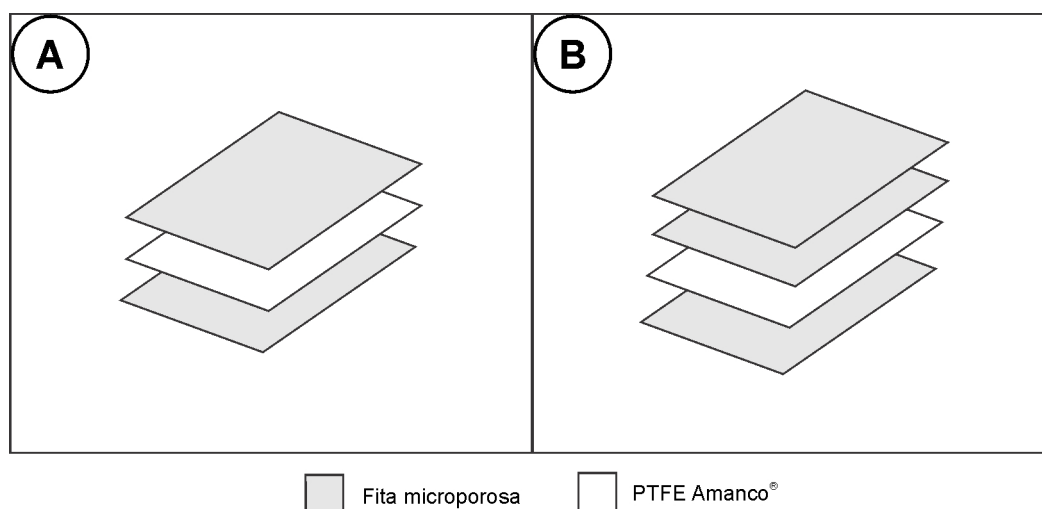


Figura 1. Diagrama esquemático da montagem das membranas com fita microporosa e filme de teflon. **A:** Membrana composta por duas camadas de fita microporosa C ou M e uma de PTFE Amanco® (C2 e M2). **B:** Membrana composta por três camadas de fita microporosa C ou M e uma de PTFE (C3 e M3).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 6 tratamentos e 9 repetições. Cada repetição foi constituída por um frasco de vidro com capacidade de 300 mL, contendo quatro segmentos nodais de fáfia ($2 \pm 0,1$ cm de comprimento) e aproximadamente 50 mL de meio de cultura.

2.4 Determinação da taxa de perda de vapor de água de frascos com diferentes vedações

Os frascos com os diferentes tipos de vedação foram caracterizados quanto à taxa de perda de vapor d'água (TPVA) na condição de 25°C e 30% de umidade relativa (UR), por meio do método gravimétrico. Para tanto, frascos vedados com tampa rígida ou tampas contendo as diferentes membranas e 20 mL de meio de cultura MS foram pesados em balança analítica de precisão (0,001 g), a cada 24 horas, registrando-se a perda de peso durante uma semana.

2.5 Microscopia de varredura

Três amostras de cada fita microporosa ou de PTFE tiveram a estrutura de sua superfície observada e registrada usando um microscópio eletrônico de varredura (Hitachi TM 3000).

2.6 Medidas de crescimento

As seguintes características de crescimento foram avaliadas: altura, área foliar, número de folhas, massa fresca (MFPA) e massa seca da parte aérea (MSPA) e massa fresca (MFRA) e massa seca do sistema radicular (MSRA). Todas as avaliações foram realizadas aos 35 dias após a inoculação dos explantes de fáfia.

As amostras para a determinação da massa seca foram secas a 60 °C em estufa com circulação forçada de ar, até atingir peso constante. Para a estimativa da área foliar foi amostrada aleatoriamente uma vitroplanta, dentre

as quatro presentes na unidade experimental, perfazendo sete amostras por tratamento.

2.7 Determinação dos pigmentos fotossintéticos

Para a determinação dos pigmentos fotossintéticos foram utilizados quatro discos foliares com 7 mm de diâmetro retirados do terceiro par de folhas expandidas a partir do meristema apical. Os discos foram incubados em 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), usando um espectrofotômetro Genesys 10UV (Thermo Scientific) com cubeta de quartzo de 10 mm de caminho ótico. O cálculo das concentrações das clorofilas *a* (C_{la}), *b* (C_{lb}), total (C_{ltotal}) e carotenoides foi baseado em metodologia descrita por Wellburn (1994). O teor de clorofila foi determinado também pelo uso do SPAD-502 (Minolta, Osaka, Japão). As leituras com o SPAD-502 foram realizadas em três pontos do limbo foliar do segundo par de folhas completamente expandidas, na face adaxial da folha de uma das vitroplantas de cada unidade experimental.

2.8 Aclimatização das plantas

As plantas de fáfia foram aclimatizadas aos 35 dias, transferindo-as do ambiente *in vitro* para recipientes (copos plásticos com capacidade de 300 mL) contendo aproximadamente 260 cm³ de substrato comercial Bioplant[®]. A etapa

de aclimatização foi inicialmente conduzida em laboratório, e posteriormente as vitroplantas foram transferidas para casa de vegetação.

2.9 Análise estatística

As características avaliadas foram submetidas ao teste de Bartlett, os dados de massa seca da parte aérea e taxa de perda de vapor d'água foram transformados, usando (\sqrt{x}) , para atender a pressuposição de homogeneidade das variâncias. Posteriormente os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software SAS 9.1 (SAS Institute, 2003).

3. RESULTADOS

3.1 Comparação entre os sistemas de vedação

a. Taxa de perda de vapor d'água de frascos com diferentes vedações

A comparação entre os sistemas de vedação em relação à taxa de perda de vapor d'água (TPVA) nos diferentes sistemas de vedação encontram-se na figura 2. Observa-se que há diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os sistemas de vedação avaliados durante 7 dias (Figura 2) em relação ao controle negativo (TR) e ao positivo (MJ). As melhores respostas para TPVA foram observadas em frascos com membranas que apresentaram maior permeabilidade ao vapor de água, sendo que M3 não diferiu do controle positivo MJ. O sistema de vedação com M2 apresentou maior perda de água, diferindo de MJ (Figura 2). A vedação com membranas C2 e C3 apresentou valores intermediários de perda de água, diferindo do controle positivo e do negativo. A testemunha negativa (TR) apresentou a menor TPVA. Dentre as novas membranas avaliadas, a M3 apresentou melhor desempenho, comparando-se à membrana de Politetrafluoretileno (PTFE) (MJ). O tratamento M2 apresentou melhor desempenho do que M3, indicando assim que há influência do número de camadas de fitas microporosas na confecção das membranas sobre a TPVA. É importante salientar que quanto maior a TPVA maior será desidratação do meio de cultura. O número de trocas gasosas por hora estimado com uso de CO₂ em cada condição de vedação do frasco de cultivo mostrou comportamento semelhante a TPVA, sendo o seguinte: 0,03 (TR); 0,86 (MJ); 0,20 (C2); 0,22 (C3); 0,76 (M2) e 0,77 (M3).

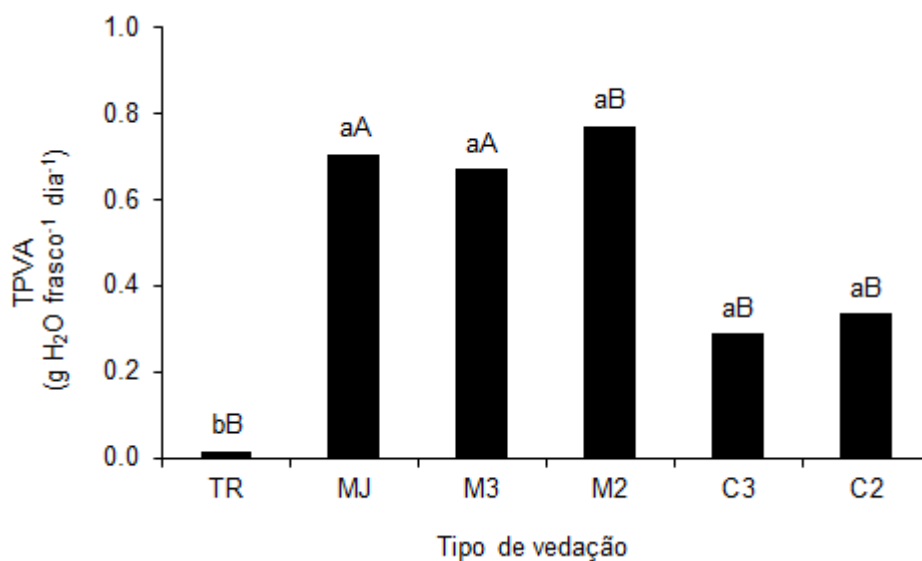


Figura 2. Caracterização dos frascos com diferentes vedações quanto à taxa de perda de vapor d'água (TPVA). A taxa de perda de vapor d'água foi obtida na condição de 25°C e 30% de umidade relativa (UR). Letras diferentes representam diferença estatística pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade, letras minúsculas comparam as médias com o controle negativo (TR) e maiúsculas com o positivo (MJ). **TR**: tampa rígida de polipropileno. **MJ**: TR com dois orifícios cobertos com membranas MilliSeal®; **C2 e M2**: TR com dois orifícios cobertos com duas camadas de fita microporosa C (Cremer®) ou M (Missner & Missner®) e uma de PTFE Amanco®; **C3 e M3**: TR com dois orifícios cobertos com três camadas de fita microporosa C ou M e uma de PTFE Amanco®.

b. Microscopia eletrônica de varredura

Quando analisamos a superfície das membranas em microscopia eletrônica de varredura, verificou-se que os materiais utilizados na confecção das novas membranas apresentam características físicas bem diferentes, particularmente o arranjo, o tamanho e o número de poros (Figuras 3A e 3B). Observa-se que a membrana PTFE MilliSeal® (MJ) apresenta arranjo uniforme das fibras de PTFE e poros menores, quando comparado a membrana PTFE Amanco®. Além disso, essa última, apresenta maior acúmulo de resíduos sobre as fibras e orifícios maiores. Através da microscopia de varredura, foi possível observar que o arranjo das fibras que compõe as fitas microporosas é irregular (Figuras 3A e 3C). A fita microporosa Missner & Missner® apresenta poros

grandes, e em maior número na face com adesivo, quando comparado à mesma face da fita microporosa Cremer® (Figuras 3B e 3D, respectivamente), o que resulta em maior capacidade para trocas gasosas.

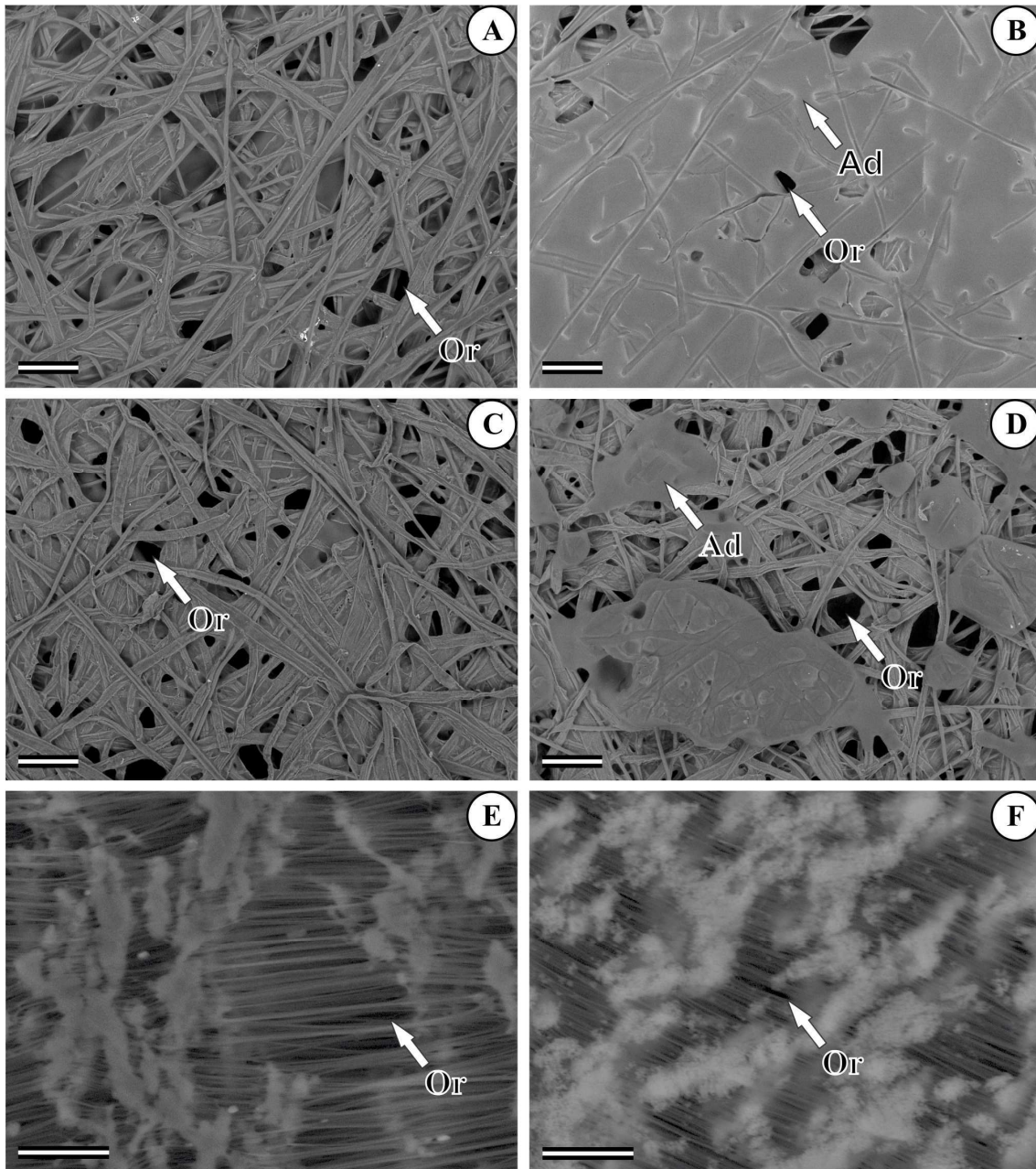


Figura 3. Caracterização em microscopia eletrônica de varredura da superfície dos materiais usados nos diferentes tipos de vedação. **A,C:** Face sem adesivo da fita microporosa Missner & Missner® ou Cremer® (barra= 200 µm). **B, D:** Fita Missner & Missner® ou Cremer® com adesivo (barra= 200 µm). **E, F:** Membrana de PTFE MilliSeal® ou Amanco® (barra= 10 µm). Or = orifício; Ad= adesivo.

c. Crescimento das vitroplantas

O tipo de vedação dos frascos influenciou significativamente ($p < 0,05$) (Figura 4) as trocas gasosas entre o ambiente interno e o externo ao frasco, e conseqüentemente, o crescimento das vitroplantas de *P. glomerata*.

Aos 35 dias de cultivo, foi observado que as vitroplantas de fáfia apresentaram maior altura quando os frascos foram vedados com membranas, quando comparado à testemunha negativa (TR). Entre os sistemas de membranas não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) dos tratamentos em relação ao controle positivo MJ (Figura 4A), as maiores médias foram obtidas nos tratamentos MJ, M2 e M3 (Figura 4A).

Quanto ao número de folhas por vitroplanta, observa-se decréscimo com a presença de membranas permeáveis a gases nas tampas dos frascos de cultivo (Figura 4B), C2 não diferiu do controle negativo. Os tratamentos com membrana não diferiram do controle positivo MJ (Figura 4B). Portanto, o maior número de folhas foi registrado em frascos sem membranas (TR), as vitroplantas cultivadas em frascos com as membranas M3 e M2 apresentaram o menor número médio de folhas.

A massa fresca da parte aérea das vitroplantas de fáfia não apresentou diferenças significativas em resposta aos diferentes tipos de vedação dos frascos de cultivo com membranas em relação ao controle positivo (Figura 4C), porém o controle positivo diferiu de TR. A massa fresca do sistema radicular também não diferiu entre os tratamentos com membrana em relação ao controle MJ ($p > 0,05$) (Figura 4D), porém MJ e M3 diferiram do controle negativo (TR), apresentando o maior acúmulo de MFRA das vitroplantas cultivadas. Nos tratamentos C2, C3 e M2 foram encontrados valores

intermediários de MFRA e não diferiram ($p>0,05$) de RP, apresentou a menor média.

O acúmulo de biomassa seca na parte aérea das vitroplantas de fáfia foi aumentado ($p<0,05$) pela presença de membranas que proporcionam trocas gasosas, diferindo significativamente do controle negativo TR (Figura 4E). As maiores médias foram observadas em M3 e M2, não diferindo de MJ. Em C2 e C3 as médias de acúmulo de biomassa apresentaram-se intermediárias, a menor média foi observada no controle TR. O acúmulo de massa seca no sistema radicular das vitroplantas de fáfia também foi aumentado ($p<0,05$) com a presença de membranas (Figura 4F), sendo as maiores médias observadas em M3 e M2, não diferindo de MJ. Em TR observou-se o menor acúmulo de massa seca, não diferindo dos tratamentos C2 e C3.

A área foliar das vitroplantas de fáfia foi influenciada significativamente ($p<0,05$) pelo tipo de vedação do frasco de cultivo (Figura 4G). A maior área foliar ocorreu em vitroplantas cultivadas nos sistemas de vedação MJ e C3, sendo que os tratamentos C2, M2 e M3 apresentaram valores intermediários, a presença de membrana na vedação aumentou significativamente a área foliar em relação ao controle TR (Figura 4G). A área foliar em vitroplantas cultivadas em frascos com membranas não apresentou diferença significativa em relação à MJ (Figura 4G). O tratamento com TR apresentou a menor média de área foliar por vitroplanta.

Em termos gerais, as vitroplantas de fáfia apresentaram os menores valores das características de crescimento nos tratamentos sem a utilização de tampas com membranas para trocas gasosas (Figura 4), à exceção do número de folhas e MFPA. Enquanto que em frascos com maiores trocas gasosas e

maior taxa de perda de vapor d'água observou-se as maiores médias de crescimento para as características avaliadas, exceto a área foliar (Figura 4).

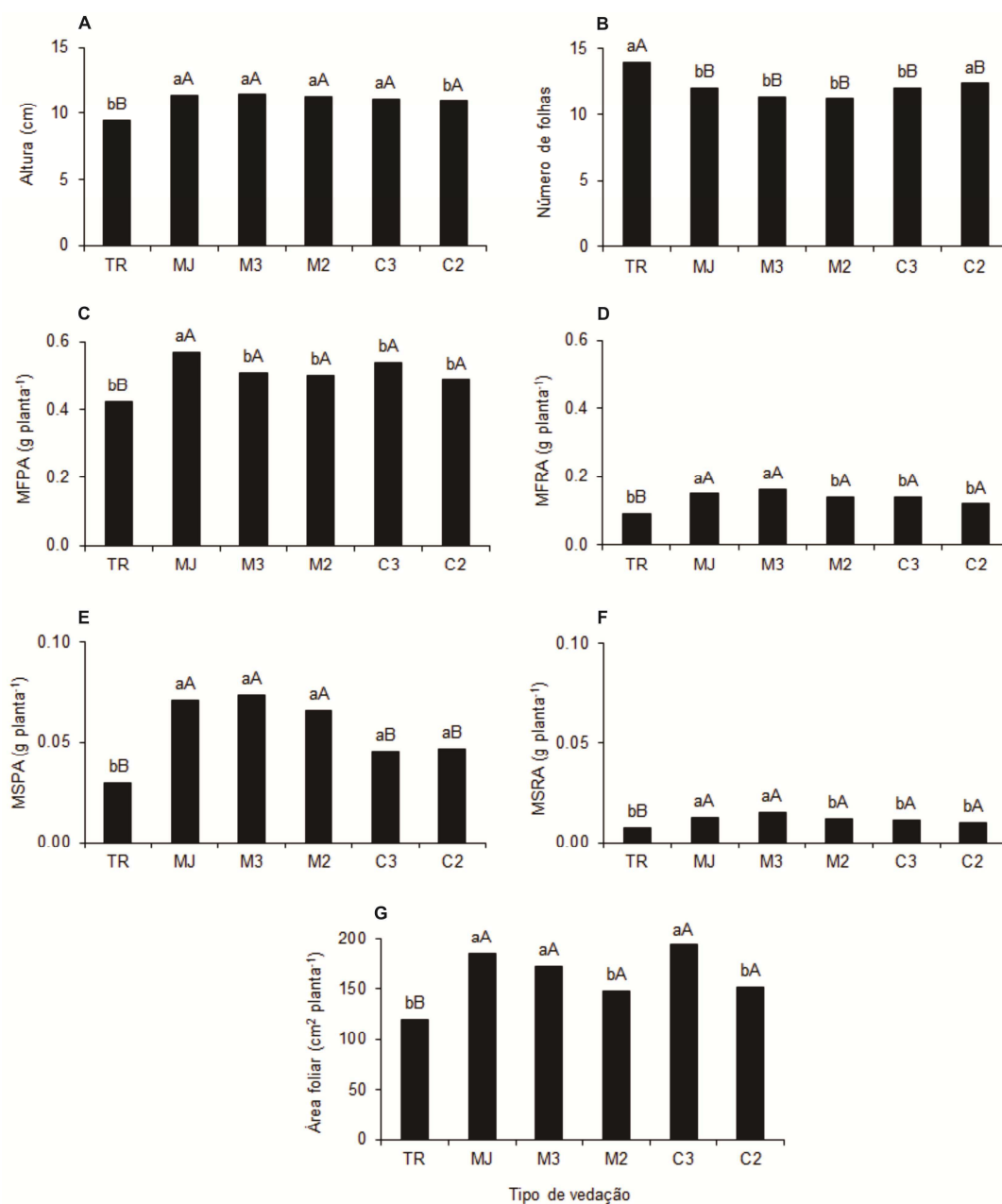


Figura 4. Características de crescimento de vitroplantas de *Pfaffia glomerata* propagadas em diferentes condições de vedação, aos 35 dias. **A:** Altura. **B:** Número de folhas. **C:** Massa fresca da parte aérea. **D:** Massa fresca do sistema radicular. **E:** Massa seca da parte aérea. **F:** Massa seca do sistema radicular. **G:** Área foliar. Letras diferentes representam diferença estatística pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade, letras minúsculas comparam as médias com o controle negativo (TR) e maiúsculas com o positivo (MJ). **TR:** tampa rígida de polipropileno. **MJ:** TR com dois orifícios cobertos com membranas MilliSeal®; **C2 e M2:** TR com dois orifícios cobertos com duas camadas de fita microporosa C (Cremer®) ou M (Missner & Missner®) e uma de PTFE Amanco®; **C3 e M3:** TR com dois orifícios cobertos com três camadas de fita microporosa C ou M e uma de PTFE Amanco®.

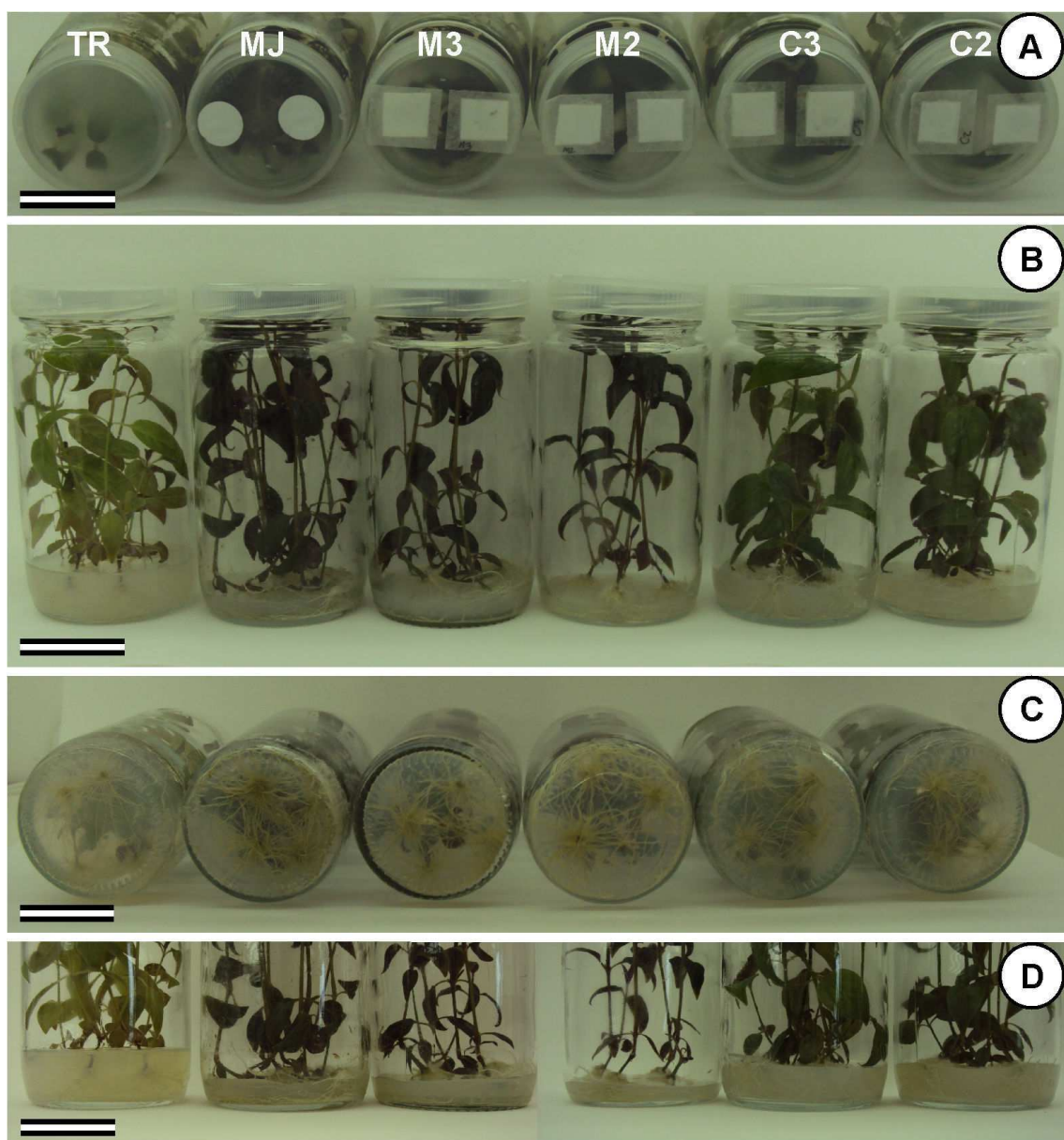


Figura 5. Aspecto das vitroplantas de *Pfaffia glomerata* propagadas em diferentes condições de vedação, aos 35 dias. **A:** Detalhe dos diferentes tipos de vedação. **B:** Aspecto das vitroplantas de fáfia nos diferentes tratamentos. **C:** Sistema radicular das vitroplantas de fáfia nos diferentes tratamentos. **D:** Detalhe do esgotamento do meio de cultura nos diferentes tratamentos. Barra = 3 cm.

d. Teores de pigmentos fotossintéticos

Os teores de pigmentos fotossintéticos das folhas de fáfia variaram significativamente ($p < 0,05$) entre os diferentes tipos de vedação em relação aos controles positivo e negativo, aos 35 dias de cultura *in vitro*. O teor de clorofila *a* oscilou entre os tratamentos de 14 a 50 $\mu\text{g cm}^{-2}$, clorofila *b* de 5 a 17 $\mu\text{g cm}^{-2}$, clorofila total de 19 a 66 $\mu\text{g cm}^{-2}$ e de carotenoides de 3 a 9 $\mu\text{g cm}^{-2}$ (Figura 6). Os melhores desempenhos em relação aos pigmentos fotossintéticos foram atribuídos aos sistemas de vedação MJ, M2 e M3, os quais não diferem estatisticamente ($p > 0,05$). As vitroplantas de fáfia cultivadas em frascos vedados com membranas MJ e M3 produziram três vezes mais clorofila total do que o tratamento TR (controle negativo).

Os sistemas C2 e C3 apresentaram desempenho intermediário, diferindo estatisticamente do controle negativo e do positivo (Figura 6). As vitroplantas cultivadas em frascos vedados com TR apresentaram os menores valores para essas características. A estimativa do teor total de clorofila pelo SPAD apresentou comportamento similar àquele estimado pelo método de extração com DMSO (Figura 6C, 6E).

As vitroplantas de fáfia cultivadas sob diferentes tipos de vedação e transferidas para condições *ex vitro*, apresentaram 100% de sobrevivência. No transplântio para substrato no início da aclimatização foi observado maior desidratação das vitroplantas oriundas do tratamento TR. Após 30 dias do início da aclimatização não foram observadas diferenças morfológicas entre as vitroplantas oriundas dos diferentes tratamentos.

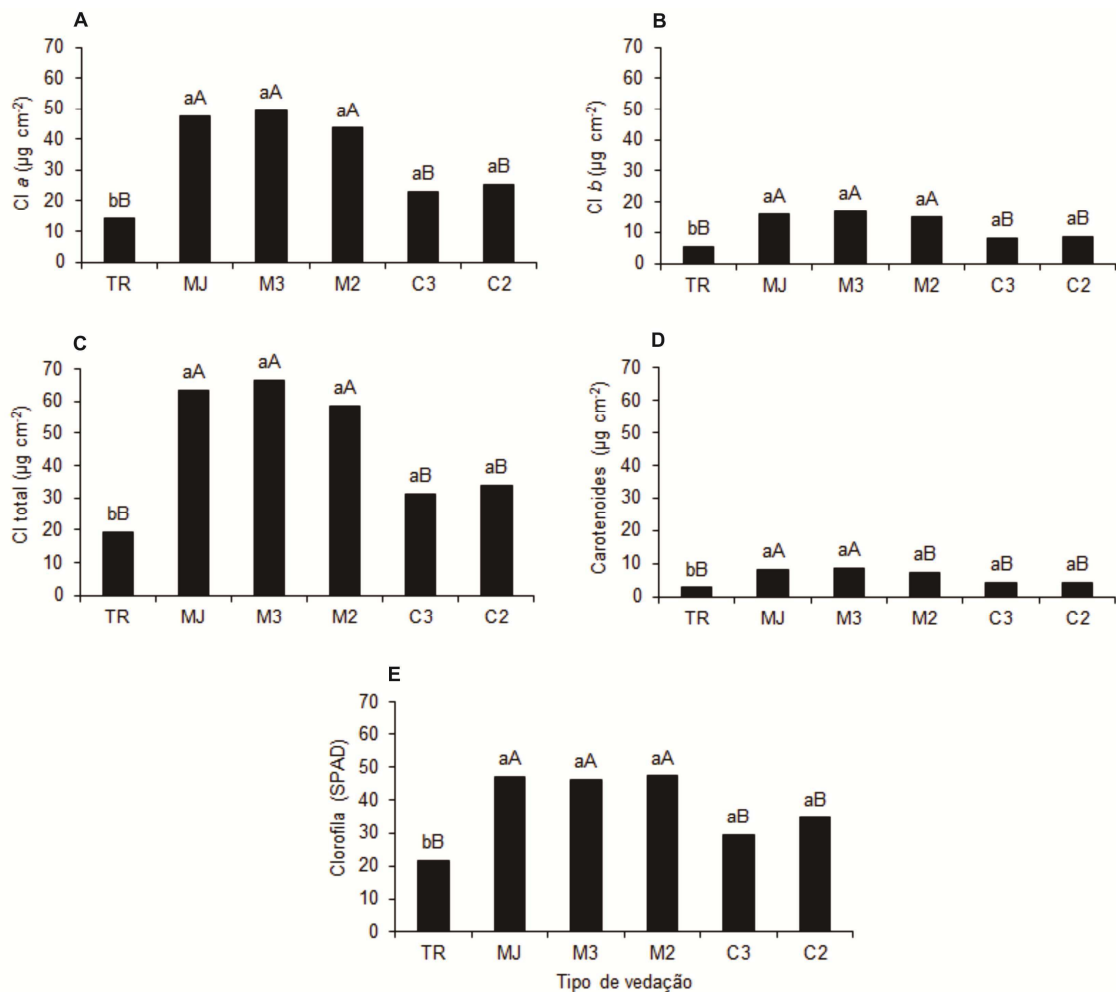


Figura 6. Pigmentos fotossintéticos de folhas de vitroplantas de *Pfaffia glomerata* propagadas *in vitro* em diferentes condições de trocas gasosas, aos 35 dias de cultivo. **A:** Clorofila a. **B:** Clorofila b. **C:** Clorofila total. **D:** Carotenoides. **E:** Teor de clorofila em SPAD. Letras diferentes representam diferença estatística pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade, letras minúsculas comparam as médias com o controle negativo (TR) e maiúsculas com o positivo (MJ). **MJ:** TR com dois orifícios cobertos com membranas MilliSeal[®]; **C2 e M2:** TR com dois orifícios cobertos com duas camadas de fita microporosa C (Cremer[®]) ou M (Missner & Missner[®]) e uma de PTFE Amanco[®]; **C3 e M3:** TR com dois orifícios cobertos com três camadas de fita microporosa C ou M e uma de PTFE Amanco[®].

4. DISCUSSÃO

No presente estudo foi observado que o tipo de vedação influenciou o crescimento de vitroplantas de *P. glomerata*, vedações que apresentaram maiores trocas gasosas possibilitaram aumento do crescimento. Resultados de Iarema (2008) mostram que a aeração dos frascos de cultura com membranas comerciais de PTFE (MilliSeal[®] Air Vent, Tóquio, Japão) favoreceu o crescimento de vitroplantas de fáfia tanto em condições fotomixotróficas como fotoautotróficas. O estímulo de trocas gasosas entre o ambiente interno e o externo ao frasco favorece a absorção pelas plantas dos nutrientes do meio de cultura, aumentando o crescimento dos explantes (Arigita et al., 2010). O presente estudo mostra que em tratamentos em que ocorreu maior perda de vapor de água as vitroplantas de fáfia apresentaram maior crescimento (Figuras 4 e 5). Além disso, o aumento das trocas gasosas entre o ambiente interno ao frasco de cultura e o meio externo, pode reduzir a hiperhidricidade dos explantes cultivados *in vitro* (Ivanova & Van Staden, 2010). As vitroplantas de fáfia cultivadas nas diferentes condições de vedação não apresentaram sintomas de hiperhidricidade.

Em sistemas de propagação *in vitro*, o uso de membranas que permitem trocas gasosas entre o ambiente externo e o interno ao frasco aumenta a ventilação natural, proporcionando uma concentração de CO₂ adequada, resultando no aumento da fotossíntese e taxa de crescimento (Kozai, 2010). Em nosso trabalho, as vitroplantas de fáfia cultivadas em frascos contendo membranas apresentaram maior acúmulo de massa seca na parte aérea e sistema radicular (Figuras 4 e 5), evidenciando a importância das trocas gasosas na morfogênese *in vitro*. Diversos estudos relatam que o aumento das

trocas gasosas nos frascos utilizados na propagação *in vitro* de plantas favorece o desenvolvimento dos explantes (Rodrigues et al., 2011; Ribeiro et al., 2009; Iarema, 2008; Valero-Aracama et al., 2007; Couceiro et al., 2006; Zobayed et al., 2006; ShaValli Khan et al., 2002).

No sistema tradicional de propagação *in vitro* a elevada umidade relativa no interior dos frascos reduz a transpiração e como consequência pode diminuir o transporte de íons dependentes do fluxo de massa. Observou-se que vitroplantas de fáfia crescidas em frascos com vedação MJ ou M3 apresentaram aumento nos valores das características de crescimento em relação aos demais tratamentos, nesses dois tipos de vedações foram observadas maior perda de água do sistema (Figura 2). O estímulo ao crescimento pode estar relacionado à melhor nutrição das vitroplantas, relacionada com o maior transporte de íons absorvidos do meio de cultura através do fluxo da seiva do xilema, fluxo este estimulado pela diminuição da umidade relativa *in vitro* devido à perda de água do sistema através da transpiração. Acredita-se que a elevação da transpiração nas folhas de plantas é requerida para o transporte em longas distâncias dos nutrientes na seiva do xilema (Tanner & Beevers, 2001). Em *P. glomerata* foi observado que o aumento das trocas gasosas no frasco de cultivo proporciona maior absorção de nutrientes (Iarema, 2008).

Em relação ao teor de pigmentos fotossintéticos, o aumento das trocas gasosas acarretou aumento da biossíntese de pigmentos nas folhas das vitroplantas de fáfia. Resultados similares foram relatados para outras espécies (Mohamed & Alsadon, 2010; Ivanova & Van Staden, 2010; Iarema, 2008). A diminuição no teor de clorofila em explantes cultivados em frascos com

reduzidas trocas gasosas pode estar relacionada ao alto acúmulo de etileno, fato esse foi demonstrado em *Brassica oleracea* pelo aumento do teor de clorofila em condições de inibição da ação do etileno com nitrato de prata (10 μ M) e pelo aumento das trocas gasosas no frasco de cultivo (Zobayed et al., 1999). O menor teor de pigmentos fotossintéticos nas vitroplantas de fáfia esteve associado a sistemas de vedação que proporcionaram menores perdas de umidade do frasco de cultivo (Figura 2). Sugerindo assim que em frascos com menor perda de água, ocorreu maior saturação de umidade no microambiente do frasco, diminuindo o teor de pigmentos fotossintéticos. Estudos com outras espécies de plantas sustentam essa hipótese, em que o aumento da umidade relativa *in vitro* pode reduzir o teor de pigmentos fotossintéticos (Cha-umet et al., 2010; Chanemougasoundharam et al., 2004).

A aclimatização de vitroplantas com teor reduzido de pigmentos fotossintéticos pode comprometer a aclimatização das mesmas para condições *ex vitro* (Chanemougasoundharam et al., 2004). O acúmulo de clorofila total nas vitroplantas de fáfia cultivadas em frascos com as membranas M3 ou MJ foi semelhante. Os resultados de aclimatização mostram que houve 100% de sobrevivência das vitroplantas de fáfia em todos os tratamentos, entretanto, plântulas com maior crescimento *in vitro* podem apresentar maior vigor durante a aclimatização devido a características morfo-fisiológicas.

Os resultados obtidos no presente estudo com vitroplantas de fáfia reforçam os relatos que existem na literatura sobre os efeitos das trocas gasosas na morfogênese *in vitro* (Rodrigues et al., 2011; Ribeiro et al., 2009; Iarema, 2008; Valero-Aracama et al., 2007; Couceiro et al., 2006; Zobayed et al., 2006; ShaValli Khan et al., 2002).

Dentre as membranas testadas, a M3 apresentou semelhança com a MJ em relação às características avaliadas nas vitroplantas de fáfia cultivadas *in vitro*. Entretanto, a membrana M3 possui um custo de produção de R\$ 0,10 (dez centavos) por unidade, enquanto que a membrana comercial MJ possui um custo aproximado de R\$ 1,20 (um real e vinte centavos) por unidade. Assim, a utilização da membrana M3 para a promoção de trocas gasosas em frascos de cultivo *in vitro* de plantas torna-se atrativa, pois apresenta custo reduzido, constituindo uma perspectiva de utilização na propagação *in vitro* comercial em larga escala em sistemas de propagação fotomixotrófica e fotoautotrófica.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

CHANDRA, S.; BANDOPADHYAY, R.; KUMAR, V.; CHANDRA, R. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. **Biotechnology Letters**, 32:1199-1205, 2010.

CHA-UM, S.; ULZIIBAT, B.; KIRDMANEE, C. Effects of temperature and relative humidity during *in vitro* acclimatization, on physiological changes and growth characters of *Phalaenopsis* adapted to *in vivo*. **Australian Journal of Crop Science**, 4: 750-756, 2010.

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

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.

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.

IAREMA, L. **Enxertia e propagação *in vitro* de fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]**. Tese (Doutorado em Botânica). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 191p., 2008.

IVANOVA, M.; VAN STADEN, J. Natural ventilation effectively reduces hyperhydricity in shoot cultures of *Aloe polyphylla* Schönland ex Pillans. **Plant Growth Regulation**, 60: 143-150, 2010.

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.; KUBOTA, C.; JEONG, B.R. Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 51:49-56,1997.

MOHAMED, M.A.H.; ALSADON, A.A. Influence of ventilation and sucrose on growth and leaf anatomy of micropropagated potato plantlets. **Scientia Horticulturae**, 123: 295-300, 2010.

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

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.

RIBEIRO, A.P.O.; PICOLI, E.A.T.; LANI, E.R.G.; VENDRAME, W.A.; OTONI, W.C. The influence of flask sealing on *in vitro* morphogenesis of eggplant (*Solanum melongena* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 45: 421-428, 2009.

RODRIGUES, M.; COSTA, T.H.F.; FESTUCCI-BUSELLI, R.A.; SILVA, L.C.; OTONI, W.C. Effects of flask sealing and growth regulators on *in vitro* propagation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, p.1-6, 2011. *Online First*. Doi:10.1007/s11627-011-9398-8.

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.

SAS Institute Inc. **Statistical Analysis System user's guide**. Version 9.1 ed. Cary, 2003.

SHA VALLI KHAN, P.S.; KOZAI, T.; NGUYEN, Q.T.; KUBOTA, C.; DHAWAN, V. Growth and net photosynthetic rates of *Eucalyptus tereticornis* Smith under photomixotrophic and various photoautotrophic micropropagation conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 71: 141-146, 2002.

TANNER, W.; BEEVERS, H. Transpiration, a prerequisite for long-distance transport of minerals in plants? **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 98: 9443-9447, 2001.

VALERO-ARACAMA, C.; WILSON, S.B.; KANE, M.E.; PHILMAN, N.L. Influence of *in vitro* growth conditions on *in vitro* and *ex vitro* photosynthetic rates of easy- and difficult-to-acclimatize sea oats (*Uniola paniculata* L.) genotypes. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, 43: 237-246, 2007.

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.

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

ZOBAYED, S.M.A. Ventilation in micropropagation. In.: KOZAI, T.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S.M.A. (Eds.) **Photoautotrophic (sugar-free medium) Micropropagation as a New Micropropagation and Transplant Production System**. Springer: Netherlands, p.147-186, 2005

ZOBAYED, S.M.A. Aeration In Plant Tissue Culture. In.: GUPTA, S.D.; IBARAKI, Y. (Eds.) **Plant Tissue Culture Engineering**. Springer: Netherlands, p.313-327, 2006.

ZOBAYED, S.M.A.; ARMSTRONG, J.; ARMSTRONG, W. Evaluation of a closed system, diffusive and humidity-induced convective throughflow ventilation on the growth and physiology of cauliflower *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 59: 113-123, 1999.

ZOBAYED, S.M.A.; MURCH, S.J.; EL-DEMERDASH, M.A.; SAXENA, P.K. NaCl enhances growth and morphogenesis potential of *Alhagigraecorum*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, 42: 607-613, 2006.

CAPITULO III

O enriquecimento com CO₂ e o tipo de suporte dos explantes promovem o crescimento e o acúmulo de β-ecdisona em vitroplantas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen em condições fotoautotróficas

1. INTRODUÇÃO

Na propagação *in vitro* de plantas é usado tradicionalmente ágar como agente geleificante do meio de cultura para fornecer suporte aos explantes (Thorpe et al., 2008). Entretanto, diferentes tipos de substratos porosos têm sido usados como suporte dos explantes na propagação *in vitro* de plantas, como vermiculita (Tibola et al., 2004; Xiao & Kozai, 2006; Cha-um et al., 2011), combinação de vermiculita e fibra de celulose (Florialite[®]) (Zobayed et al., 1999; Afreen-Zobayed et al., 2000; Xiao & Kozai, 2006; Marriott & Sarasan, 2010), bagaço de cana (Mohan et al., 2004), perlita (Lucchesini et al., 2006) e 'rockwool' (Norikane et al., 2010). O uso de substratos porosos na propagação *in vitro* de plantas aumenta a condutividade hidráulica em relação ao meio de cultura geleificado com ágar, favorecendo a absorção dos nutrientes do meio de cultura (Kozai, 2010). Em consequência do favorecimento da nutrição, o material de suporte desempenha papel fundamental na propagação *in vitro* de plantas, podendo elevar o vigor das vitroplantas e, conseqüentemente, aumentar a porcentagem de sobrevivência durante a aclimatização (Afreen-Zobayed et al., 1999).

O enriquecimento da atmosfera *in vitro* com CO₂ tem sido outro fator essencial para o aumento do crescimento e produção de vitroplantas de qualidade capazes de aclimatizar com sucesso (Kozai, 2010; Xiao et al., 2011). Em condições fotoautotróficas *in vitro*, o CO₂ e a luz são os fatores que afetam diretamente o crescimento e a capacidade fotossintética das vitroplantas (Kozai, 2010; Norikane et al., 2010). Existem vários relatos na literatura mostrando que na propagação *in vitro* de plantas e a elevação na concentração de CO₂ na atmosfera aumenta o crescimento dos explantes (Kozai, 2010;

Norikane et al., 2010; Badr et al., 2011; Cha-um et al., 2011; Xiao et al., 2011). A variação na concentração de CO₂ na atmosfera leva a mudanças no metabolismo da planta, podendo diminuir (Norikane et al., 2010) ou aumentar (Possell & Hewitt, 2009; Yang et al., 2010) a atividade da Rubisco, causar mudanças ultraestruturais (Lucchesini et al., 2006), influenciar o perfil metabólico (Badr et al., 2011) e o acúmulo de metabólitos secundários (Zobayed et al., 2003; Mosaleeyanon et al., 2005; Schonhof et al., 2007; Yang et al., 2010).

A *Pfaffia glomerata* é uma planta medicinal, a qual ocorre naturalmente no Brasil (Pott & Pott, 1994), com grande importância econômica devido à produção de metabólitos secundários como a β-ecdisona (20E) (Festucci-Buselli et al., 2008a). Em *P. glomerata* (fáfia, ginseng brasileiro) a propagação *in vitro* tem sido estabelecida através do método tradicional com o uso de ágar e em condições heterotróficas através da proliferação de gemas axilares (Russowski & Nicoloso, 2003; Nicoloso et al., 2008; Maldaner et al., 2006; Skrebsky et al., 2006; Flores et al., 2010). Entretanto, estudos apontam para o sucesso da propagação *in vitro* de *P. glomerata* em condições fotoautotróficas (Iarema, 2008) e em condições de enriquecimento de CO₂ (Capítulo 1), ambos os estudos usando ágar como suporte dos explantes.

Assim, o presente estudo tem como objetivo maximizar as condições de crescimento de *in vitro* através do uso de substrato poroso combinado com o enriquecimento da atmosfera com CO₂, visando à aplicação em sistemas de propagação *in vitro* em larga escala. A descrição das modificações ultraestruturais que ocorrem em resposta ao enriquecimento da atmosfera com CO₂ pode gerar informações que levem ao entendimento de mudanças que

ocorrem na planta num sistema fotoautotrófico com elevação da concentração de CO₂ na atmosfera. Além disso, o acúmulo de metabólitos e atividade da Rubisco pode estar associado a mudanças das condições de cultivo *in vitro*. O presente estudo descreve como a influência do tipo de substrato (suporte do explante) combinado com o enriquecimento da atmosfera com CO₂ afeta o desenvolvimento de vitroplantas de *P. glomerata*. Características de crescimento, acúmulo de metabólitos, atividade da Rubisco e mudanças na ultraestrutura das folhas das vitroplantas de fáfia são relatados e discutidos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e condições de cultura

Segmentos nodais (2 cm de comprimento), sem folhas e com dois meristemas axilares pré-existentes, foram retirados de vitroplantas de fáfia mantidas sob condições fotomixotróficas e inoculados em meio de cultura constituído pelos sais MS (Murashige & Skoog, 1962), vitaminas MS (0,5 mg L⁻¹ de ácido nicotínico, 0,5 mg L⁻¹ de piridoxina.HCl, 0,1 mg L⁻¹ de tiamina.HCl e 2 mg L⁻¹ de glicina) e 100 mg L⁻¹ de mio-inositol. O meio de cultura teve o pH ajustado para 5,7 e esterilizado por autoclavagem a 121°C e 1,5 atm durante 15 minutos. Os sais do meio MS foram incorporados ao meio de cultura na forma de pó (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA; Cat. n.º M5519). As culturas foram mantidas em meio de cultura sem sacarose e sala de crescimento a 28 ± 2° C, sob irradiância de 150 µmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 h.

As trocas gasosas entre o microambiente do frasco e o ambiente da sala de crescimento 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 conforme Fujiwara & Kozai (1995) em 0,36 trocas por hora, sendo que no frasco sem membrana as trocas foram consideradas como zero. Durante o período de cultivo de 35 dias não foram realizados subcultivos.

Para a obtenção da atmosfera enriquecida com CO₂ ou com a concentração ambiente, os frascos de cultivo foram colocados dentro de uma

câmara de acrílico (41 cm de largura x 26 de altura x 50 cm comprimento). O ar enriquecido com CO₂ (mistura do ar ambiente com CO₂ comercial) foi injetado na câmara com fluxo de 1 L min⁻¹, e a umidade relativa no interior da mesma foi mantida em 50 ± 10%. A concentração de CO₂ do ar utilizado no tratamento de 1000 µmol mol⁻¹ de CO₂ foi ajustada com auxílio de um analisador de gás no infravermelho modelo S153 CO₂ Analyzer da Quibit System.

O delineamento experimental utilizado foi em delineamento inteiramente casualizado com 10 repetições. Cada repetição foi constituída por um frasco de 750 mL formado pela união de duas Magentas[®] (Sigma Chemical Company, EUA) de polipropileno invertidas e unidas por acopladores (Sigma Chemical Company, EUA), contendo cinco segmentos nodais e aproximadamente 100 mL de meio de cultura.

Os tratamentos foram estabelecidos em esquema bifatorial, constituídos pela combinação de dois ambientes (380±20 ou 1000±100 µmol mol⁻¹ de CO₂) combinados com dois tipos de suporte do explante [Florialite[®] (mistura de vermiculita e celulose, Nisshinbo Industries, Japão) ou ágar Merck[®]], totalizando quatro tratamentos.

2.2 Medidas de crescimento

Foram avaliadas as seguintes características de crescimento nas plântulas de fáfia: altura, massa seca da parte aérea (MSPA) e sistema radicular (MSRA) e massa seca total (MStotal). Todas as avaliações foram realizadas aos 35 dias de crescimento *in vitro*. As amostras para a determinação da massa seca foram secas a 60 °C em estufa com circulação forçada de ar, durante três dias.

2.3 Determinação dos pigmentos fotossintéticos

Quatro discos foliares com 7 mm de diâmetro foram retirados do terceiro par de folhas expandidas a partir do meristema apical e incubados em 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) durante 48 h em tubos mantidos no escuro, à temperatura ambiente (Santos et al., 2008). Posteriormente, a absorvância das amostras foi determinada nos comprimentos de onda de 665, 645 e 480 nm (Wellburn, 1994), usando 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 carotenoides foi baseado em metodologia descrita por Wellburn (1994).

2.4 Avaliação da atividade da Rubisco

A extração da Rubisco (EC 4.1.1.39) foi realizada conforme metodologia proposta por Geigenberger & Stitt (1993). O preparo dos meios de reação para a atividade da Rubisco basearam-se em Geigenberger & Stitt (1993) e Sharkey et al. (1991). Foram usados dois meios de reação, nos quais avaliou-se a atividade da Rubisco em velocidades inicial e total. Após a adição de RuBP (ribulose 1,5 bisfosfato) aos meios de reação, observou-se a oxidação do NADH por 30 minutos, em leitura espectrofotométrica efetuada a 340 nm. Os resultados foram expressos em $\text{nmol g massa fresca}^{-1} \text{ s}^{-1}$, a ativação em porcentagem.

2.5 Determinação de fenóis, açúcares e amido

Para a determinação de amido (%), fenóis solúveis totais (FEN) (%) e açúcares solúveis totais (AST) (%) foi utilizada uma amostra de aproximadamente 25 mg de massa seca de folhas para cada repetição. Para isso, a cada amostra foram adicionados uma mistura de metanol/clorofórmio (1:1) (Bligh & Dyer, 1959), mantidas sob agitação durante 30 min, seguida de centrifugação a 4000 g por 5 min. O sobrenadante foi coletado e, após a adição de água, sob agitação, a mistura foi centrifugada (4000 g, 5 min), separando-se a fase clorofórmio da fase metanol/água.

A concentração de FEN foi determinada colorimetricamente (725 nm) no extrato da fase metanol/água, utilizando-se do reagente de Folin-Ciocalteu (1:1) e ácido tânico como padrão. No *pellet* resultante da extração metanol/clorofórmio determinou-se a concentração de amido; para tal, aos tubos contendo o *pellet* foi adicionado HCl 3%, permanecendo por 3 h a 100°C, com a finalidade de quebrar o amido e, após centrifugação a 4000 g por 5 min, o sobrenadante foi coletado e os açúcares resultantes da hidrólise ácida, assim como os açúcares solúveis presentes no sobrenadante da fase metanol/água, foram determinados colorimetricamente (620 nm) usando-se o reagente de antrona (Fales, 1951).

2.6 Determinação do teor de β -ecdisona

O teor de β -ecdisona (20E) foi determinado nas folhas e caule das vitroplantas de fáfia pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), analisando-se amostras obtidas por extrato metanólico (Kamada et al.,

2009). O teor de 20E não foi determinado nas raízes devido à baixa produção de massa seca.

2.7 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para análise ultraestrutural, amostras foliares das vitroplantas de fáfia foram fixadas em solução de Karnovsky [solução de glutaraldeído (2,5%) e paraformaldeído (4%), em tampão cacodilato de sódio (pH 7,2), acrescido de cloreto de cálcio 5 mM] (Karnovsky, 1965). Posteriormente, foram submetidas a pós-fixação com tetróxido de ósmio a 1%, desidratadas em série de concentração crescente de acetona, infiltradas e polimerizadas em resina epóxica de baixa viscosidade Spurr. Os blocos foram preparados para ultramicrotomia em um desbastador (EM Trim, Leica Microsystems Inc., USA). Secções com 70 nm de espessura foram obtidas em um ultramicrótomo (Leica UC6, Leica Microsystems Inc., USA) e contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo (Reynolds, 1963). As análises foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão, em 80 kV, com câmera digital acoplada (EM900, Zeiss, Alemenha) do NAP/MEPA (ESALQ/USP).

2.8 Análise estatística

Todas as características avaliadas foram submetidas ao teste de Bartlett para verificar a homogeneidade das variâncias. Para as análises estatísticas foram transformadas, usando-se \sqrt{x} , para as seguintes características: altura, massa seca da parte aérea, radicular e total. Todas as análises estatísticas foram efetuadas usando o software SAS 9.0 (SAS Institute, 2003).

3. RESULTADOS

3.1 O crescimento das vitroplantas de fáfia é aumentado em função do tipo de suporte e da concentração de CO₂ no ambiente

Houve incremento em todas as características de crescimento das vitroplantas de fáfia cultivadas em atmosfera enriquecida com CO₂ (1000 µmol mol⁻¹) (Figuras 1 e 2) em relação a concentração controle de CO₂.

A altura não variou significativamente em relação ao tipo de suporte (ágar ou Florialite[®]), porém o aumento na concentração de CO₂ no ambiente de 360 para 1000 µmol mol⁻¹ acarretou no aumento da altura das vitroplantas de fáfia (Figura 1), não havendo interação significativa entre os fatores ($p > 0,05$). O cultivo em Florialite[®], sob 1000 µmol mol⁻¹ de CO₂, acarretou em aumento significativo ($p < 0,05$) da MSPA, MSRA e MStotal em relação àquele em ágar e no mesmo ambiente (Figura 1). O ganho de massa seca na parte aérea das vitroplantas cultivadas em Florialite[®], e em ambiente com 1000 µmol mol⁻¹ de CO₂ foi de 3,2 vezes em relação ao ambiente controle. No ambiente com 360 µmol mol⁻¹ de CO₂ foram observadas as menores médias das características de crescimento (Figura 1), sendo que não ocorreu diferença significativa entre o crescimento em ágar ou Florialite[®]. Em MSPA, MSRA e MStotal ocorreu interação significativa entre os fatores ($p > 0,05$) tipo de suporte e concentração de CO₂ no ambiente (Figura 1). Na condição de enriquecimento com CO₂, ocorreu aumento nestas características (MSPA, MSRA e MStotal) em relação ao tipo de suporte ágar.

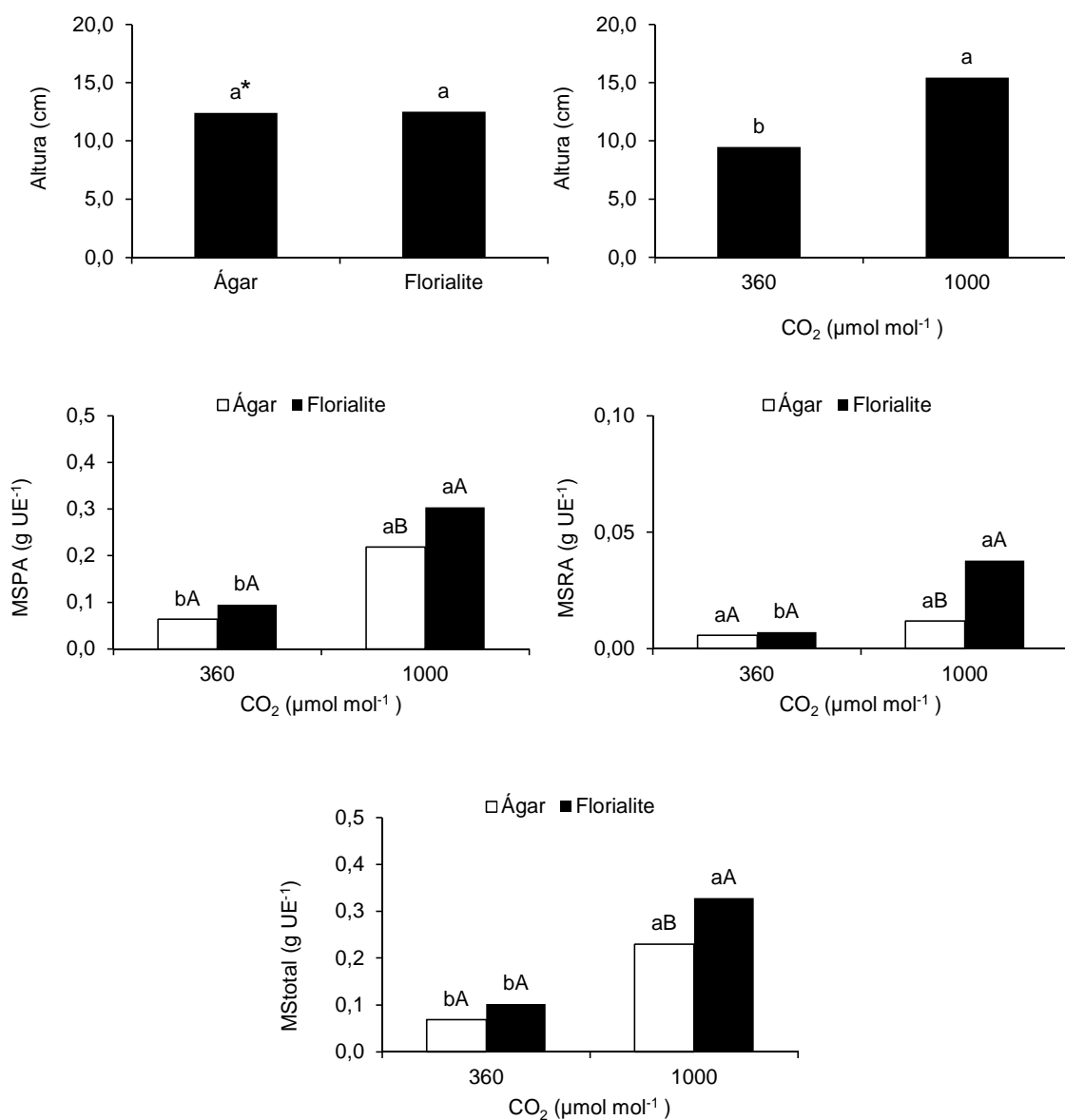


Figura 1. Variáveis de crescimento de vitroplantas de *Pfaffia glomerata* propagadas *in vitro* em diferentes suportes e concentrações de CO₂, aos 35 dias de cultivo. Letras minúsculas comparam médias ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey entre tratamentos na variável altura. Nas demais características letras minúsculas comparam médias ($p < 0,05$) dentro de cada ambiente e maiúsculas comparam médias do tipo de suporte entre ambientes.

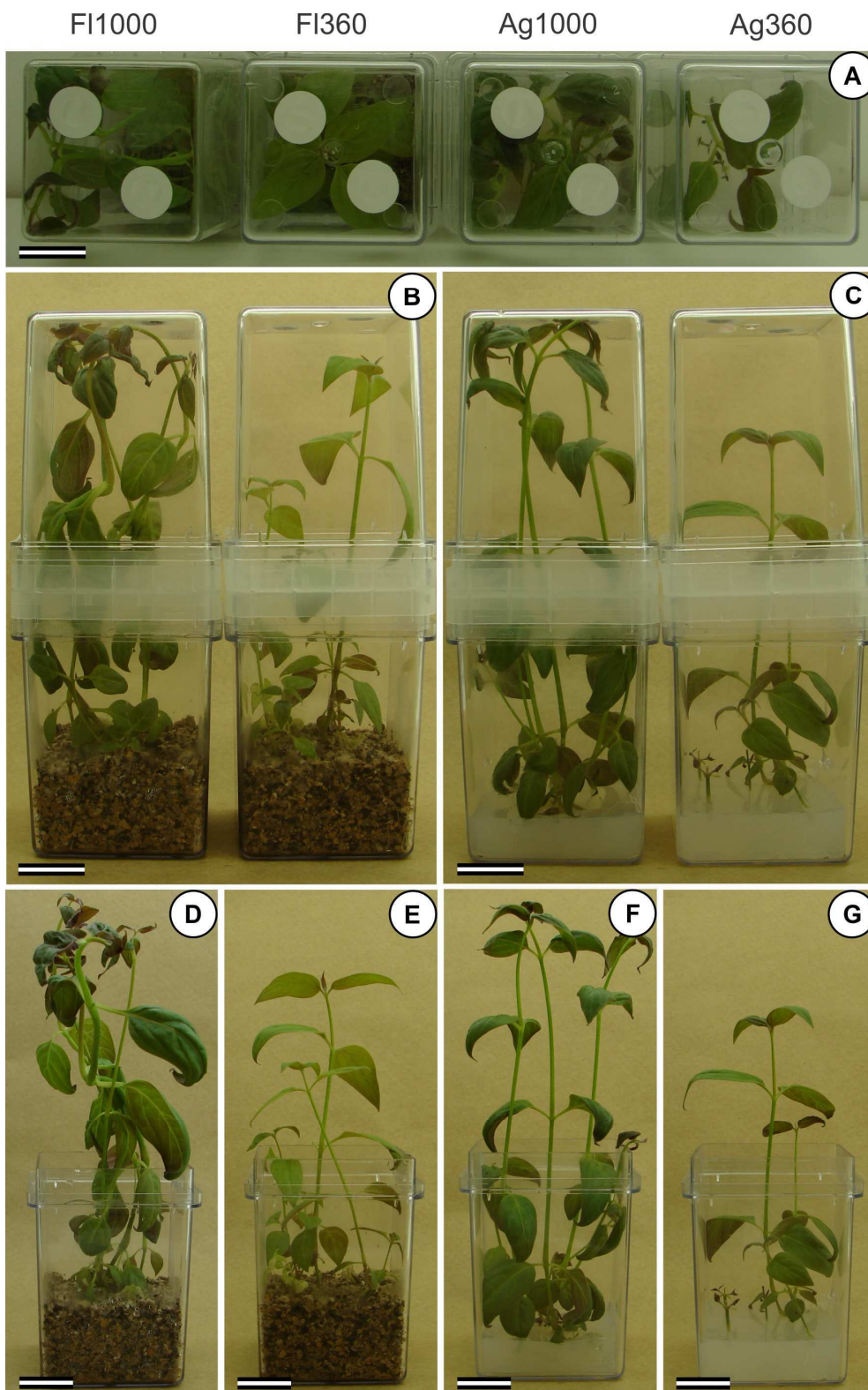


Figura 2. Aspecto geral da cultura *in vitro* de *Pfaffia glomerata*. **A:** Detalhe da vedação usada nos frascos. **B, D, E:** Vitroplantas crescidas em Florialite® em 1000 ou 360 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂. **C, F, G:** Vitroplantas crescidas em ágar em 1000 ou 360 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂. Barra = 2 cm.

3.2 Os pigmentos fotossintéticos aumentam com a elevação de CO₂ e em resposta ao tipo de suporte em baixa concentração de CO₂

O tipo de suporte (ágar ou Florialite[®]) e a concentração de CO₂ no ambiente (360 ou 1000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) influenciaram significativamente o teor de clorofilas *a*, *b*, total e carotenoides nas folhas (Figura 3). Vitroplantas de fáfia cultivadas em meio com ágar ou Florialite[®] e em 1000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂ apresentaram aumento no teor de todos os pigmentos fotossintéticos (Figura 3).

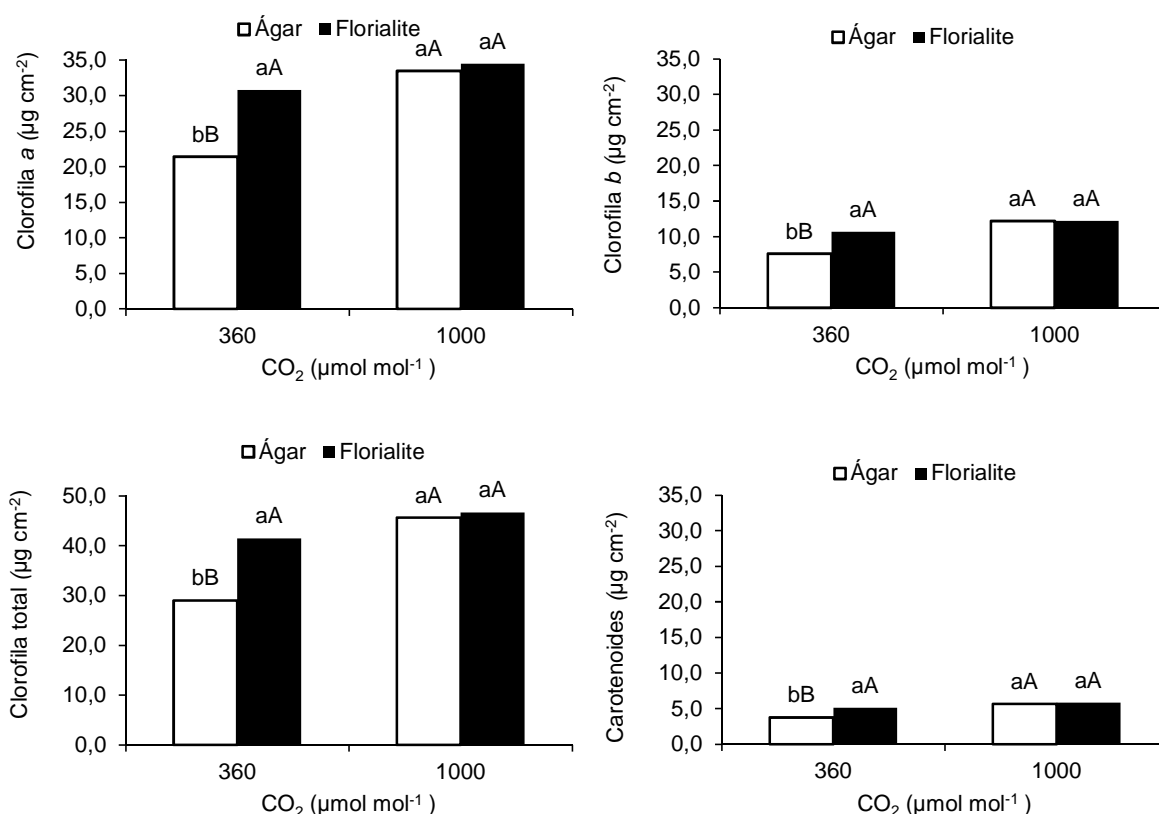


Figura 3. Pigmentos fotossintéticos de folhas de vitroplantas de *Pfaffia glomerata*, aos 35 dias de cultivo. Letras minúsculas comparam médias ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey dentro de cada ambiente. Letras maiúsculas comparam médias do tipo de suporte entre ambientes.

Em ambiente com $360 \mu\text{mol mol}^{-1}$ em Florialite[®] ocorreu aumento significativo ($p < 0,05$) no teor de clorofilas *a*, *b*, total e carotenoides de vitroplantas em relação ao cultivo em ágar e nesse mesmo ambiente (Figura 3). No ambiente com $1000 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 o teor de pigmentos não variou significativamente em relação ao tipo de suporte do explante, ágar ou Florialite[®], não ocorrendo interação significativa entre os fatores.

3.3 A atividade da Rubisco não foi influenciada pelos tratamentos

A atividade da Rubisco não diferiu ($p > 0,05$) entre os tratamentos, tanto na atividade inicial, final e no estado de ativação (Figura 4). Entretanto, foram observadas maiores médias de atividade inicial e final em vitroplantas cultivadas em meio de cultura com ágar e em ambiente com $1000 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 . O estado de ativação da Rubisco das vitroplantas apresentou maiores médias no ambiente com $1000 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 , independentemente do tipo de suporte (Figura 4).

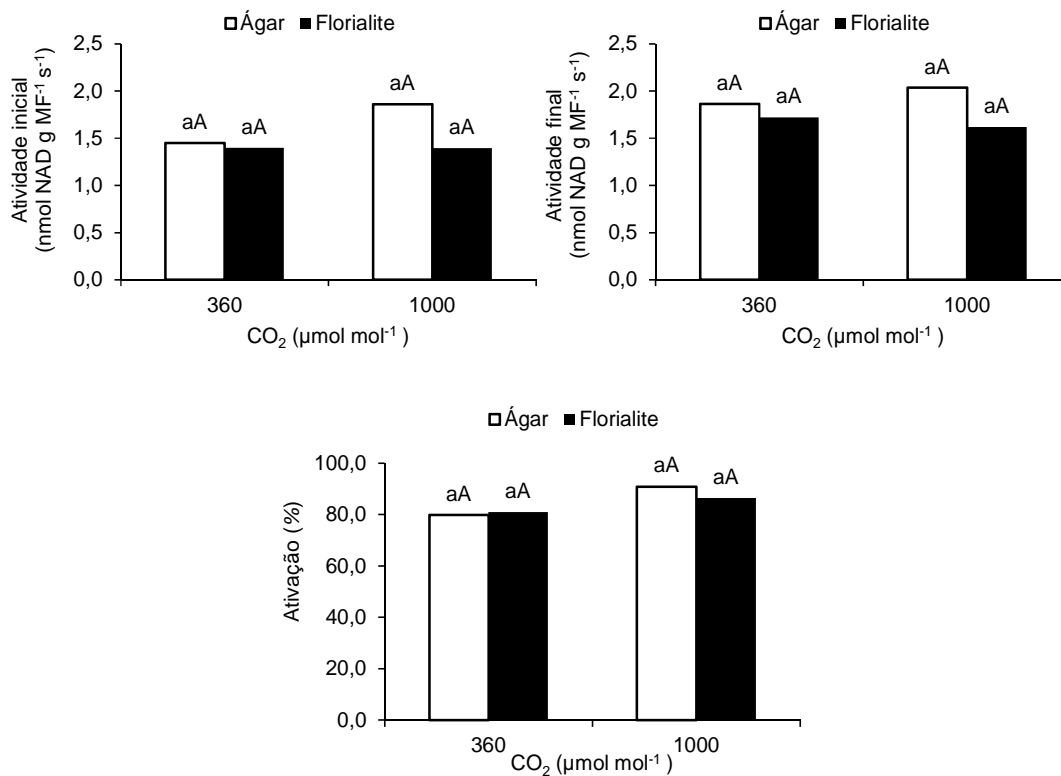


Figura 4. Atividade da Rubisco em folhas de vitroplantas de *Pfaffia glomerata*. MF= massa fresca. Letras minúsculas comparam médias ($p < 0,05$) dentro de cada ambiente, com o teste de Tukey.

3.4 O teor de amido, FST e AST variou em função das concentrações de CO₂ e com o tipo de suporte

As vitroplantas de fáfia cultivadas em 360 ou 1000 μmol mol⁻¹ de CO₂ não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) quanto ao acúmulo de amido (Figura 5) nas folhas. Porém, vitroplantas cultivadas em ágar apresentaram maior acúmulo de amido em relação às cultivadas em Florialite® (Figura 5), não ocorrendo interação entre os fatores tipo de suporte e concentração de CO₂ para o acúmulo de amido.

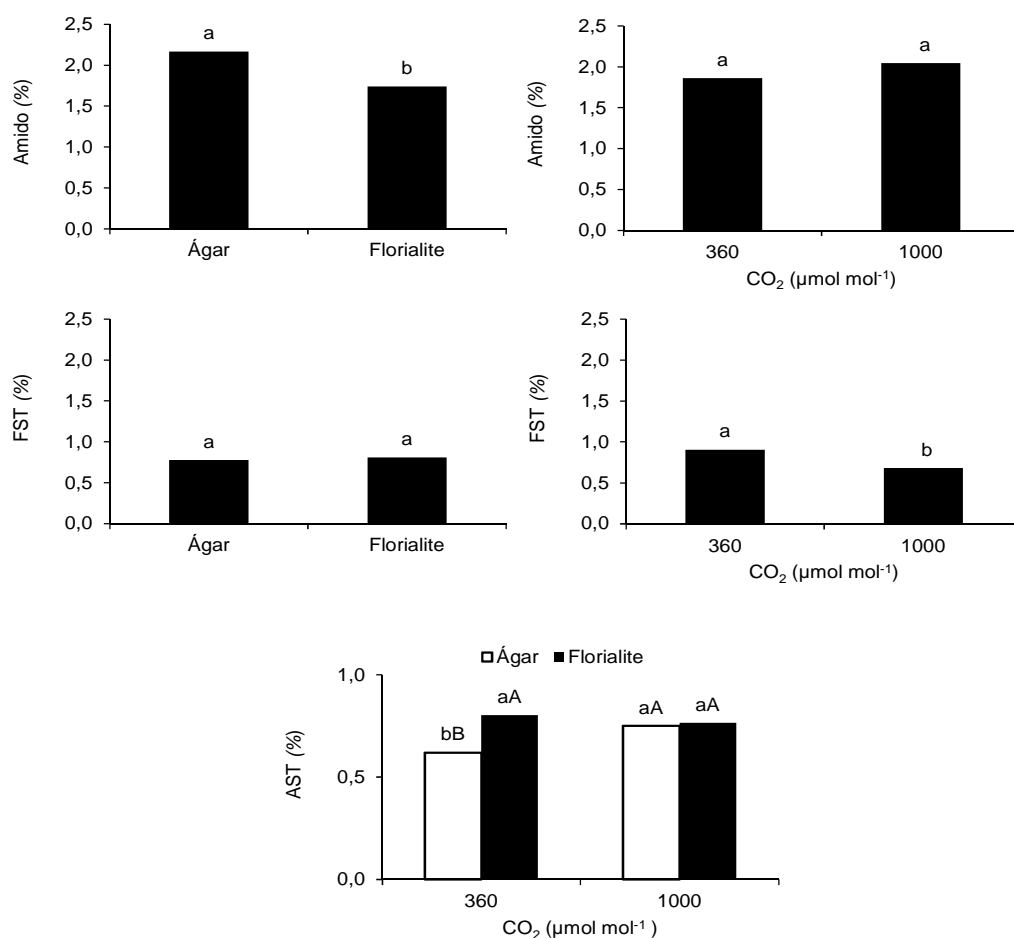


Figura 5. Teor de amido, fenóis solúveis totais (FST) e açúcares solúveis totais em folhas de vitroplantas de *Pfaffia glomerata*. Letras minúsculas comparam médias ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey entre tratamentos no teor de amido e FST. Em AST letras minúsculas comparam médias ($p < 0,05$) dentro de cada ambiente e maiúsculas comparam médias do tipo de suporte entre ambientes.

O acúmulo de FST em folhas de vitroplantas cultivadas em ágar ou Florialite[®] não diferiu significativamente ($p > 0,05$), entretanto, ocorreu diferença significativa em resposta a concentração de CO₂ no ambiente (Figura 5). O maior acúmulo de FST ocorreu em vitroplantas cultivadas em ambiente com 360 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂.

Diferentemente do teor de amido e de FST, o teor de AST nas folhas apresentou interação entre o tipo de suporte e a concentração de CO₂ no

ambiente (Figura 5). O teor máximo de AST foi observado em folhas de vitroplantas cultivadas em ágar ou Florialite[®] em ambiente com 1000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 , ou naquelas cultivadas em Florialite[®] em 360 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 . Quando compara-se o tipo de suporte dentro de 1000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 nota-se que não há diferença significativa para o teor de AST (Figura 5). Entretanto, no ambiente com 360 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 , maior média de AST foi observada em folhas de vitroplantas cultivadas em Florialite[®] (Figura 5).

3.5 O teor de β -ecdisona (20E) é aumentado em função do tipo de suporte e da concentração de CO_2 no ambiente

O acúmulo de 20E nas folhas e caule de fáfia variou significativamente ($p < 0,05$) em função da concentração de CO_2 no ambiente e do tipo de suporte (Figura 6), havendo interação significativa entre os fatores. O acúmulo 20E nas folhas das vitroplantas cultivadas em Florialite[®] em ambiente com 1000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 aumentou em relação às cultivadas em ágar nesse mesmo ambiente (Figura 6). O teor de 20E em folhas de vitroplantas cultivadas em atmosfera com 360 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 não diferiu em relação ao tipo de suporte (ágar ou Florialite[®]) (Figura 6). Ocorreu menor acúmulo de 20E nos caules em relação às folhas (Figura 6A e 6B). No ambiente controle o teor de 20-E em vitroplantas cultivadas em ágar ou Florialite[®] foi semelhante (Figura 6B), porém em 1000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 o teor de 20E no caule de vitroplantas cultivadas em ágar aumentou significativamente em relação às cultivadas em Florialite[®] (Figura 6B).

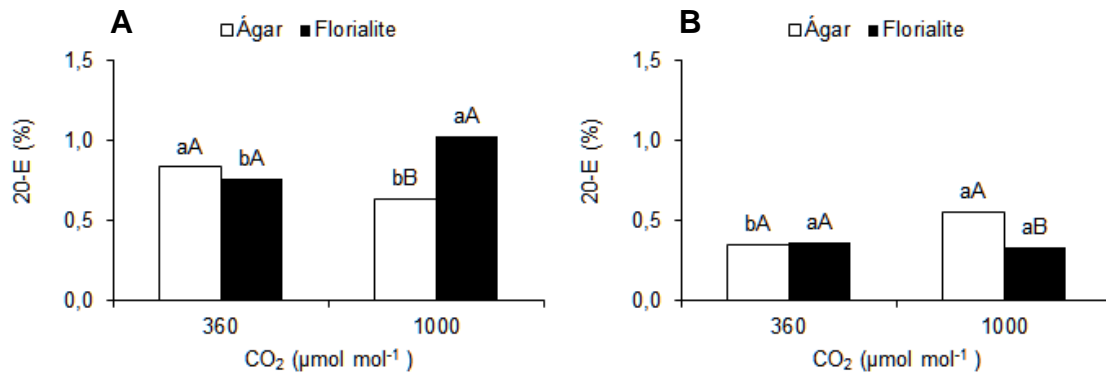


Figura 6. Produção de β-ecdisona (20E) na parte aérea e caule em vitroplantas de *Pfaffia glomerata* cultivadas *in vitro* em diferentes condições de cultivo e concentrações de CO₂, aos 35 dias de cultivo. **A)** Folha. **B)** Caule. Letras maiúsculas comparam médias com o teste de Tukey ($p < 0,05$) dentro de cada ambiente, e letras minúsculas comparam médias do tipo de suporte entre ambientes.

Foi observado que em condições de enriquecimento de CO₂ (1000 μmol mol⁻¹) o acúmulo de 20E entre caule e folha foi diferenciado em resposta ao tipo de suporte. Nas folhas das vitroplantas de fáfia, o Florialite® favoreceu o acúmulo de 20E em relação ao ágar, o qual favoreceu o acúmulo de 20E no caule em relação ao Florialite® (Figura 6).

3.6 O enriquecimento da atmosfera com CO₂ causa mudanças ultraestruturais nos cloroplastos de vitroplantas de fáfia

Alterações ultraestruturais foram observadas nos cloroplastos de vitroplantas cultivadas em atmosfera enriquecida com CO₂ (1000 μmol mol⁻¹), não apresentando diferenças em relação ao tipo de suporte utilizado (ágar ou Florialite®).

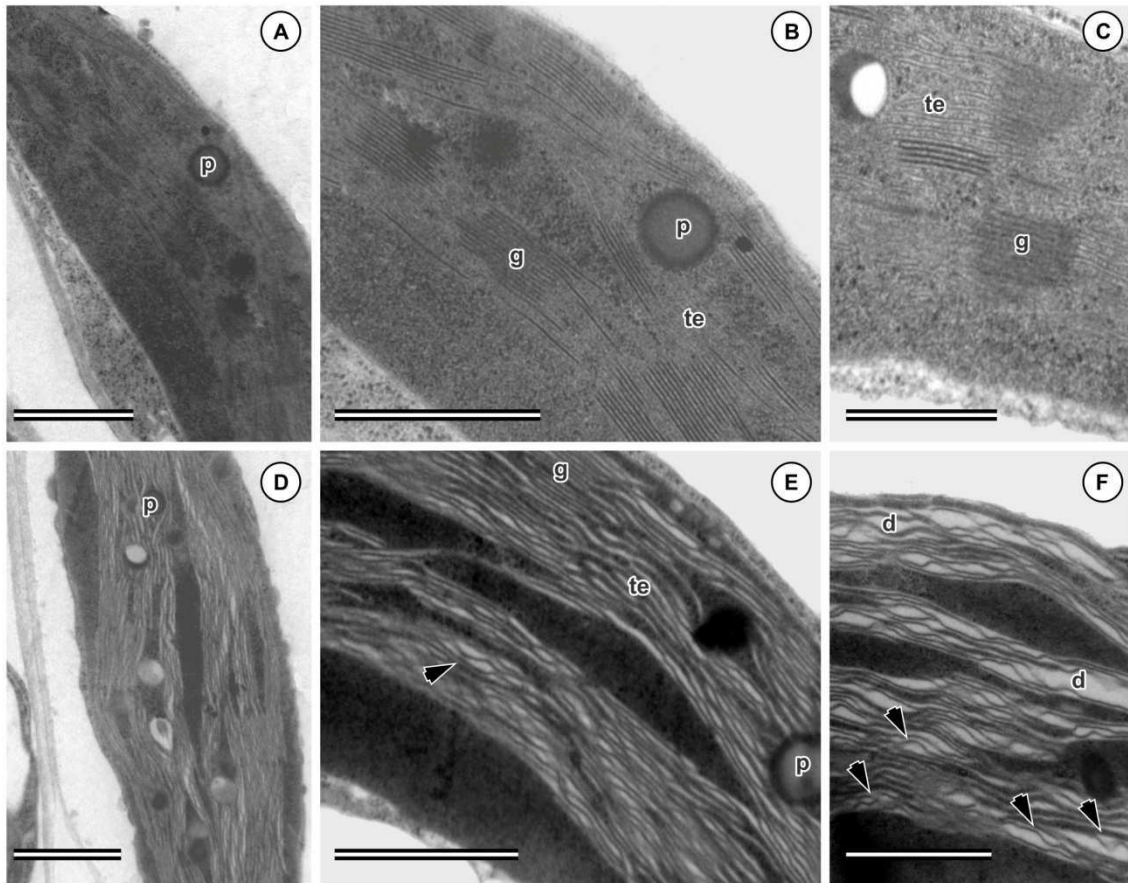


Figura 7. Ultraestrutura dos cloroplastos de vitroplantas de *Pfaffia glomerata*. Microscopia eletrônica de transmissão. (A-C) Vitroplantas cultivadas em atmosfera com concentração ambiente de CO₂ (360 μmol mol⁻¹) (Barras = 1 μm; 1 μm; 0,5 μm, respectivamente). (D-F) Vitroplantas cultivadas em atmosfera enriquecida com CO₂ (1000 μmol mol⁻¹) (Barras = 1 μm). **Abreviaturas:** d, dilatação dos tilacóides; g, grana; p, plastoglobulos; Te, Tilacóide do estroma; (▶), ondulações nas membranas internas dos cloroplastos.

Nos tratamentos controle (360 μmol mol⁻¹ de CO₂), os cloroplastos das folhas de fáfia apresentaram formato oval típico (Figura 7A) e suas membranas dos tilacóides foram claramente diferenciadas em pilhas de grana e tilacóides do estroma (Figuras 7B e 7C). Em condições de atmosfera enriquecida com CO₂, um aumento do padrão de lamelação foi observado nessa organela (Figuras 7 D-F). Contudo, as membranas dos tilacóides mostraram uma organização frouxa, com áreas onduladas e intensas dilatações entre as

mesmas (Figuras 7 E-F). O número de pilhas de grana foi consideravelmente menor. Grãos de amido não foram observados nos cloroplastos de vitroplantas de fáfia, em nenhuma das condições de cultivo avaliadas (Figura 7).

4. DISCUSSÃO

O crescimento de plantas é modulado por diversos fatores como o fluxo fotossintético de fótons, concentração de CO₂, temperatura do ar, disponibilidade de água, nutrição, dentre outros. O presente estudo mostra que o aumento da concentração de CO₂ no ambiente *in vitro* resultou em aumento significativo do crescimento das vitroplantas de fáfia (Figura 1). Pela primeira vez na literatura é relatado o efeito do enriquecimento com CO₂ e do tipo de suporte dos explantes no crescimento *in vitro*, atividade da Rubisco e no teor de metabólitos secundários em *P. glomerata*.

Comparando as vitroplantas de *P. glomerata* crescidas em ambiente enriquecido com CO₂ e as crescidas em ambiente controle (360 µmol mol⁻¹ de CO₂), foi verificado aumento de características como altura, massa seca da parte aérea e do sistema radicular e massa seca total (Figura 1), resultando em vitroplantas mais vigorosas.

No presente estudo verificou-se que o cultivo em ambiente com 1000 µmol mol⁻¹ de CO₂ proporcionou condições para maior acúmulo de massa seca total das vitroplantas, sugerindo que essa condição de enriquecimento não inibiu a capacidade fotossintética durante o período de cultivo.

Muitas vezes a limitação da fotossíntese pode ocorrer devido à baixa atividade da Rubisco e pelo acúmulo de carboidratos durante a assimilação de carbono (Reddy et al., 2010). No presente estudo não houve diferença estatística entre a atividade da Rubisco das vitroplantas de fáfia em resposta aos diferentes tratamentos, porém, foi observado que sua atividade máxima ocorreu em resposta ao cultivo em ambiente com 1000 µmol mol⁻¹ de CO₂ e ágar como suporte; já em Florialite[®] observou-se pequena diferença na

atividade da Rubisco em resposta a diferença na concentração de CO₂ no ambiente (Figura 4). Entretanto, sugere-se que pode estar ocorrendo uma limitação da atividade da Rubisco no tratamento que apresentou maior acúmulo de massa seca total (Figura 1) das vitroplantas (Florialite® + 1000 µmol mol⁻¹ de CO₂) devido ao esgotamento das fontes de nitrogênio do meio de cultura. Em condições de enriquecimento de CO₂ pode ocorrer a diminuição da capacidade fotossintética quando há falta de suprimento de nitrogênio (Harmens et al., 2000). Essa inibição traz como consequência a redução da taxa máxima de carboxilação da Rubisco (Sholtis et al., 2004). Em condições de elevação do CO₂ o crescimento da planta pode ser favorecido pelo aumento da eficiência de carboxilação da Rubisco, visto que em atmosfera enriquecida com CO₂ diminui o nível de oxigenação desta enzima (Possell & Hewitt, 2009). A atividade da Rubisco nas reações de assimilação de CO₂ na fotossíntese devido a carboxilação da RuBP possui relação direta com os mecanismos fisiológicos e bioquímicos do sistema fonte-dreno (Stitt & Schulze, 1994). A manutenção de drenos ativos em plantas é necessária para efetivo estímulo e manutenção da fotossíntese em condições de enriquecimento de CO₂. O acúmulo de carboidratos pode levar à redução na transcrição gênica e produção da Rubisco, reduzindo a atividade do ciclo de Calvin e, conseqüentemente, a produção de açúcar (Sholtis et al., 2004).

Os resultados de ultraestrutura reforçam a ideia que em atmosfera com 1000 µmol mol⁻¹ de CO₂ é estimulada a fotossíntese, pois, alterações ultraestruturais foram observadas nos cloroplastos de vitroplantas cultivadas em atmosfera enriquecida com CO₂. As mudanças ultraestruturais que ocorrem nos cloroplastos de plantas submetidas a altas concentrações de CO₂ podem

ser atribuídas a alta demanda energética requerida para o crescimento rápido (Griffin et al., 2001).

Em plantas, o crescimento em condições de elevação do CO₂ pode levar ao acúmulo de carboidratos nas folhas, o que pode ocorrer quando a taxa fotossintética excede à capacidade de dreno (Ainsworth et al., 2004). No presente estudo ocorreu menor acúmulo de amido nas folhas das vitroplantas de fáfia cultivadas em Florialite[®] (Figura 5), as quais apresentaram maior crescimento em relação às cultivadas em ágar e em atmosfera com enriquecimento de CO₂ (Figura 1), sugerindo que as vitroplantas de fáfia cultivadas em Florialite[®] apresentaram maior força de dreno. Em condições em que plantas apresentem potencial de dreno para a translocação e acúmulo de carboidratos geralmente não se observa inibição da capacidade fotossintética, estimulando o crescimento das mesmas em atmosfera enriquecida com CO₂ (Reddy et al., 2010). No presente estudo foi observado maior acúmulo de açúcares solúveis totais em folhas de vitroplantas de fáfia expostas à atmosfera enriquecida com CO₂ e em atmosfera controle e em Florialite[®] (Figura 5). De acordo com Reddy et al. (2010), o aumento de açúcares solúveis em folhas de plantas submetidas a atmosfera enriquecida com CO₂ está associado com o aumento da atividade da hexocinase (EC 2.7.1.1). Portanto, sugerimos que deve-se examinar a atividade dessa enzima em estudos futuros.

Em relação ao teor de fenóis solúveis totais, foi observado aumento nas folhas das vitroplantas cultivadas em 360 µmol mol⁻¹ de CO₂ em relação às cultivadas em ambiente com 1000 µmol mol⁻¹ de CO₂. O acúmulo de fenóis em plantas em resposta ao enriquecimento da atmosfera com CO₂ pode ser variado. Em *Dactylis glomerata* e *Bromus erectus* o teor de fenóis em

condições de enriquecimento de CO₂ pode aumentar, inalterar e é genótipo dependente (Castells et al., 2002). Porém, em *Cecropia longipes* ocorre diminuição no teor de compostos fenólicos nas folhas de plantas submetidas a atmosfera enriquecida com CO₂ (Coley et al., 2002). Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que há uma relação inversa entre o acúmulo de biomassa e o teor de fenóis nas vitroplantas de fáfia.

O acúmulo de metabólitos secundários pode estar relacionado à capacidade fotossintética das plantas. Existem evidências que o enriquecimento da atmosfera com CO₂ pode aumentar (Castells et al., 2002; Mosaleeyanon et al., 2005; Schonhof et al., 2007), manter-se inalterado (Castells et al., 2002; Zobayed & Saxena, 2004) ou diminuir o acúmulo (Coley et al., 2002; Zobayed et al., 2003) de metabólitos secundários, dependendo do estágio e da cinética de crescimento da planta (Neumann et al., 2009). Nas condições do presente estudo foi verificado que o teor de 20-E nas vitroplantas de fáfia aumentou (Figura 6) em resposta ao enriquecimento da atmosfera com CO₂, com diferenciação no teor de 20E entre caule e folha, sendo que as folhas apresentaram maior acúmulo. A *P. glomerata* apresenta distribuição diferenciada do teor de 20-E nos órgãos, sendo que em condições *ex vitro* o maior acúmulo ocorre nas raízes (Festucci-Buselli et al., 2008b). Os teores de 20-E encontrados no presente estudo nas folhas das vitroplantas de fáfia, são semelhantes aos encontrados em raízes de *P. glomerata* por Festucci-Buselli et al. (2008b) em condições *ex vitro*, após 120 dias de cultivo. Em *Hypericum perforatum* foi observado aumento no teor de hipericina em condições de elevação de CO₂ no ambiente, composto que apresenta grande interesse farmacêutico (Zobayed & Saxena, 2004). O aumento de 20-E nas folhas das

vitroplantas de fáfia (Figura 6) em resposta ao suporte Florialite[®] em condições de enriquecimento da atmosfera com CO₂, pode estar relacionado com a maior aeração do substrato que o Florialite[®] proporciona em relação ao ágar, favorecendo o metabolismo primário e secundário. No cultivo de suspensão celular de *Morinda citrifolia* o aumento no acúmulo de metabólitos secundários é regulado pela aeração do meio de cultura (Ahmed et al., 2008).

O efeito do cultivo de vitroplantas de *P. glomerata* em diferentes suportes para o explante e em duas concentrações de CO₂ na atmosfera foi relatado no presente estudo. Todas as características de crescimento das vitroplantas cultivadas em condições de elevação de CO₂ e em Florialite[®] aumentaram. Em atmosfera enriquecida com CO₂ foram produzidas vitroplantas de *P. glomerata* com alto acúmulo de biomassa e de 20E. O presente estudo mostra 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 β -ecdisona.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, S.; HAHN, E.J.; PAEK, K. Aeration volume and photosynthetic photon flux affect cell growth and secondary metabolite contents in bioreactor cultures of *Morinda citrifolia*. **Journal of Plant Biology**, 51: 209-212, 2008.

AINSWORTH, E.A.; ROGERS, A.; NELSON, R.; LONG, S.P. Testing the 'source-sink' hypothesis of down-regulation of photosynthesis in elevated CO₂ in the field with single gene substitutions in *Glycine max*. **Agricultural and Forest Meteorology**, 122: 85-94, 2004.

AFREEN-ZOBAYED, F.; ZOBAYED, S.M.A.; KUBOTA, C.; KOZAI, T.; HASEGAWA, O. Supporting material affects the growth and development of *in vitro* sweet potato plantlets cultured photoautotrophically. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 35: 470-474, 1999.

AFREEN-ZOBAYED, F.; ZOBAYED, S.M.; KUBOTA, C.; KOZAI, T.; HASEGAWA, O. A combination of vermiculite and paper pulp supporting material for the photoautotrophic micropropagation of sweet potato. **Plant Science**, 157: 225-231, 2000.

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.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, 37: 911-917, 1959.

CASTELLS, E.; ROUMET, C.; PEÑUELAS, J.; ROY, J. Intraspecific variability of phenolic concentrations and their responses to elevated CO₂ in two mediterranean perennial grasses. **Environmental and Experimental Botany**, 47: 205-216, 2002.

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**, p.1-10, 2011. Online First. Doi: 10.1007/s11240-011-9940-8.

COLEY, P.D.; MASSA, M.; LOVELOCK, C.E.; WINTER, K. Effects of elevated CO₂ on foliar chemistry of saplings of nine species of tropical tree. **Oecologia**, 133: 62-69, 2002.

FALES, F.W. The assimilation and degradation of carbohydrates by yeast cells. **Journal of Biological Chemistry**, 193: 113-124, 1951.

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, 2008a.

FESTUCCI-BUSELLI, R.A.; CONTIM, L.A.S.; BARBOSA, L.C.A.; STUART, J.J.; VIEIRA, R.F.; OTONI, W.C. Level and distribution of 20-hydroxyecdysone during *Pfaffia glomerata* development. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 20: 305-311, 2008b.

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.

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.

GEIGENBERGER, P.; STITT, M. Sucrose synthase catalyses a readily reversible reaction in vivo in developing potato tubers and other plant tissues. **Planta**, 189: 329-339, 1993.

GRIFFIN, K.L.; ANDERSON, O.R.; GASTRICH, M.D.; LEWIS, J.D.; LIN, G.; SCHUSTER, W.; TISSUE, D.T.; TURNBULL, M.H.; WHITEHEAD, D. Plant growth in elevated CO₂ alters mitochondrial number and chloroplast fine structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 98: 2473-2478, 2001.

HARMENS, H.; STIRLING, C.M.; MARSHALL, C.; FARRAR, J.F. Does down-regulation of photosynthetic capacity by elevated CO₂ depend on N supply in *Dactylis glomerata*? **Physiologia Plantarum**, 108: 43-50, 2000.

IAREMA, L. **Enxertia e propagação in vitro de fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]**. Tese (Doutorado em Botânica). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 191p., 2008.

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.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, 27: 137-138, 1965.

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

LUCCHESINI, M.; MONTEFORTI, G.; MENSUALI-SODI, A.; SERRA, G. Leaf ultrastructure, photosynthetic rate and growth of myrtle plantlets under different *in vitro* culture conditions. **Biologia Plantarum**, 50: 161-168, 2006.

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.

MARRIOTT, P.; SARASAN, V. Novel micropropagation and weaning methods for the integrated conservation of a critically endangered tree species, *Medusagyne oppositifolia*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 46: 516-523, 2010.

MOHAN, R.; SOCCOL, C.R.; QUOIRIN, M.; PANDEY, A. Use of sugarcane bagasse as an alternative low-cost support material during the rooting stage of apple micropropagation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 40: 408-411, 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.

NEUMANN, K.H.; KUMAR, A.; IMANI, J. **Plant Cell and Tissue Culture - A Tool in Biotechnology**. Springer: Berlin-Heidelberg, 331p. 2009.

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: 273-383, 2010.

POSSELL, M.; HEWITT, N. Gas exchange and photosynthetic performance of the tropical tree *Acacia nigrescens* when grown in different CO₂ concentrations. **Planta**, 229: 837-846, 2009.

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

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.

REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, 17: 208-212, 1963.

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.

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.

SAS Institute Inc. **Statistical Analysis System user's guide**. Version 9.1 ed. Cary, 2003.

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.

SHARKEY, T.D.; SAVITCH, L.V.; BUTZ, N.D. Photometric method for routine determination of kcat and carboxylation of Rubisco. **Photosynthesis Research**, 28: 41-48, 1991.

SHOLTIS, J.D.; GUNDERSON, C.A.; NORBY, R.J.; TISSUE, D.T. Persistent stimulation of photosynthesis by elevated CO₂ in a sweetgum (*Liquidambar styraciflua*) forest stand. **New Phytologist**, 162: 343-354, 2004.

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.

STITT, M.; SCHULZE, D. Does Rubisco control the rate of photosynthesis and plant growth? an exercise in molecular ecophysiology. **Plant, Cell and Environment**, 17: 465-487, 1994.

THORPE, T.; STASOLLA, C.; YEUNG, E.C.; KLERK, G.J.; ROBERTS, A.; GEORGE, E.F. The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. In.: GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; DE KLERK, G.J. (eds). **Plant propagation by tissue culture**. Volume 1. The background. 3rd edn. Springer, Dordrecht, p.115- 173, 2008.

TIBOLA, C.S.; RADMANN, E.B.; RODRIGUES, A.C.; FORTES, G.R.L.; FACHINELLO, J.C. Diferentes meios de cultivo no enraizamento *in vitro* de portaenxertos. **Revista Brasileira de Agrociência**, 10: 191-195, 2004.

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.

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

XIAO, Y.; KOZAI, T. Photoautotrophic growth and net photosynthetic rate of sweet potato plantlets *in vitro* as affected by the number of air exchanges of the vessel and type of supporting material. **Tsinghua Science & Technology**, 11: 481-489, 2006.

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.

ZOBAYED, S.M.A.; AFREEN-ZOBAYED, F.; KUBOTA, C.; KOZAI, T. Stomatal characteristics and leaf anatomy of potato plantlets cultured *in vitro* under photoautotrophic and photomixotrophic conditions. **Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 35: 183-188, 1999.

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.; SAXENA, P.K. Production of St. John's Wort plants under controlled environment for maximizing biomass and secondary metabolites. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 40: 108-114, 2004.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo mostrou a influência das trocas gasosas e do enriquecimento com CO₂ na propagação *in vitro* de *P. glomerata*. Na literatura não há relatos sobre o cultivo *in vitro* da *P. glomerata* em condições de enriquecimento da atmosfera com CO₂. No primeiro capítulo, foi verificado que a espécie apresenta elevado potencial para a propagação *in vitro* em atmosfera enriquecida com CO₂ devido ao aumento das características de crescimento. Além disso, verificou-se que a perda de água das folhas destacadas das vitroplantas em condições *ex vitro* é reduzida em função de serem cultivadas em ambiente com enriquecimento com CO₂. Devido à produção de vitroplantas com características morfo-fisiológicas desejáveis para produção clonal massal, essa modalidade de propagação pode ser uma alternativa para as indústrias que necessitem a produção em larga escala de matéria-prima uniforme (quanto ao aspecto fitoquímico) e de qualidade.

No segundo capítulo foram apresentadas várias membranas que mostraram características desejáveis em um sistema de propagação *in vitro* de plantas em larga escala, pois incrementou o crescimento das vitroplantas de fáfia e apresenta custo unitário reduzido em comparação com membranas comercializadas atualmente. Dentre as membranas testadas, a M3 apresentou semelhança com a MJ (comercial) em relação às características avaliadas nas vitroplantas de fáfia. Desta maneira, o resultado do presente estudo constitui-se na perspectiva de utilização desta membrana de baixo custo na propagação *in vitro* comercial em larga escala em sistemas de propagação fotomixotrófica e fotoautotrófica.

O capítulo 3 apresentou o efeito do cultivo de vitroplantas de *P. glomerata* em diferentes suportes para o explante e em duas concentrações de CO₂ na atmosfera. Todas as características de crescimento das vitroplantas cultivadas em condições de elevação de CO₂ e em Florialite[®] aumentaram. Foi verificado que a atmosfera enriquecida com CO₂ contribuiu para alto acúmulo de biomassa e de 20E. Notadamente, nas condições experimentais, o enriquecimento com CO₂ mediante a ventilação forçada resultou em obtenção de teores de 20E em folhas compatíveis aqueles relatados em raízes tuberiformes de fáfia sob condição de campo.

O presente estudo mostra 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 β-ecdisona. Além disso, pode ser um sistema atrativo para estudos relacionados à regulação da via de biossíntese de β-ecdisona. Estudos relacionados ao enriquecimento com CO₂ em biorreatores também são uma possibilidade para a espécie estudada, visto que apresenta alto potencial de crescimento em sistema fotoautotrófico. Outro aspecto a ser investigado é o comportamento da fáfia em relação à produção de 20E em condições de indução estresse abiótico em atmosfera enriquecida com CO₂.

O sistema de enriquecimento da atmosfera com CO₂ apresentado no presente estudo pode ser aplicado em outras espécies de plantas para estudos relacionados à propagação fotoautotrófica.