

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**CULTURA DE TECIDOS E PRODUÇÃO DE
 β -ECDISONA EM *Pfaffia glomerata* E *Pfaffia tuberosa*
(AMARANTHACEAE)**

TESE DE DOUTORADO

Rejane Flores

Santa Maria, RS, Brasil

2006

**CULTURA DE TECIDOS E PRODUÇÃO DE β -ECDISONA EM
Pfaffia glomerata E *Pfaffia tuberosa* (AMARANTHACEAE)**

por

Rejane Flores

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Agronomia.**

Orientador: Prof. Fernando Teixeira Nicoloso

Santa Maria, RS, Brasil

2006

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Agronomia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**CULTURA DE TECIDOS E PRODUÇÃO DE β -ECDISONA EM *Pfaffia
glomerata* E *Pfaffia tuberosa* (AMARANTHACEAE)**

elaborada por
Rejane Flores

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Agronomia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Fernando Teixeira Nicoloso, Dr.
(Presidente/Orientador)

Arthur Germano Fett Neto, Dr. (UFRGS)

Sandro Rogério Giacomelli, Dr. (URI)

Lia Rejane Silveira Reiniger, Dr. (UFSM)

Maisa Pimentel Martins Corder, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 06 de outubro de 2006.

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Agronomia
Universidade Federal de Santa Maria

CULTURA DE TECIDOS E PRODUÇÃO DE β -ECDISONA EM *Pfaffia glomerata* E *Pfaffia tuberosa* (AMARANTHACEAE)

AUTORA: REJANE FLORES

ORIENTADOR: FERNANDO TEIXEIRA NICOLOSO

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 06 de outubro de 2006.

Diversas técnicas biotecnológicas têm se constituído em novas ferramentas para o estudo de plantas medicinais, bem como para a produção de biomassa homogênea e produtiva. Em função disso, este estudo teve como objetivo estudar aspectos da morfogênese e a calogênese de *Pfaffia glomerata* e *Pfaffia tuberosa* e avaliar a produção de β -ecdisona em plantas micropropagadas, clones e calos *in vitro*. A micropropagação de acessos (BRA e JB-UFSM) de *P. glomerata* foi conduzida a partir de segmentos nodais em meio nutritivo Murashige e Skoog (MS). Em *P. tuberosa*, estudou-se o processo de desinfestação, multiplicação e aclimatização das plantas. Estudos referentes à indução de calos, organogênese e embriogênese foram conduzidos em meio MS suplementado com auxinas e citocininas. Raízes e as partes aéreas das plantas micropropagadas, plantas (clones) regeneradas via organogênese indireta e calos cultivados *in vitro* foram analisados em relação ao conteúdo de β -ecdisona em cromatografia líquida de alta eficiência. A micropropagação mostrou ser um método adequado para a produção de mudas de *P. glomerata*, em escala comercial. O acesso BRA apresentou uma maior taxa de propagação em meio MS e um maior teor de β -ecdisona quando comparado ao acesso JB-UFSM. Segmentos nodais de *P. tuberosa* apresentaram ausência de microrganismos e uma alta taxa de sobrevivência após lavagens com várias soluções desinfestantes. Melhores resultados em relação à micropropagação nesta espécie foram registrados em meio MS acrescido de 1 μ M de TDZ, seguido do subcultivo dos brotos em meio MS isento de fitoreguladores, no qual as plantas apresentaram excelente desenvolvimento e uma ótima adaptação às condições *ex vitro*. Após cultivo no solo, o teor de β -ecdisona encontrado nessas plantas foi similar ao encontrado em plantas nativas *in vivo*. Constatou-se que, em ambas as espécies estudadas, as partes aéreas das plantas acumularam um maior teor de β -ecdisona quando comparado ao sistema radicular. Calos de *P. glomerata* apresentaram diferenças quanto à consistência, potencial morfogênico e produção de β -ecdisona dependendo das concentrações dos fitoreguladores adicionados ao meio nutritivo. Em geral, a produção desse metabólito nos calos parece estar associada à consistência friável e a regeneração de brotos. Em *P. tuberosa*, o teor de β -ecdisona variou entre os calos friáveis organogênicos dependendo da concentração de auxina adicionada ao meio nutritivo; além disso, a presença de β -ecdisona nos calos parece ser dependente da regeneração de parte aérea. Os calos de *P. glomerata* apresentaram uma baixa frequência de regeneração de brotos; as plantas (clones) regeneradas a partir dos calos apresentaram morfologia normal, mas diferiram quanto ao conteúdo de β -ecdisona. Em *P. tuberosa*, vários clones foram regenerados a partir de calos friáveis formados em meio MS com auxina ou auxina e citocinina. Por outro lado, explantes radiculares formaram calos embriogênicos apenas quando cultivados em meio com citocinina e auxina. Estas estratégias biotecnológicas envolvendo técnicas de cultivo *in vitro* juntamente com o doseamento de β -ecdisona são pioneiras para o gênero e poderão ser úteis para a propagação e o melhoramento dessas espécies de ginseng brasileiro.

Palavras-chaves: ginseng brasileiro, cultivo *in vitro*, ecdisteróides, HPLC

ABSTRACT

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Agronomia
Universidade Federal de Santa Maria

TISSUE CULTURE AND β -ECDYSONE PRODUCTION OF *Pfaffia glomerata* AND *Pfaffia tuberosa* (AMARANTHACEAE)

AUTORA: REJANE FLORES

ORIENTADOR: FERNANDO TEIXEIRA NICOLOSO

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 06 de outubro de 2006.

Many biotechnological techniques have been formed by new tools to the study of medicinal plants and for the production of homogenous and productive biomass. This work aimed to examine aspects of morphogenesis and callogenesis in *Pfaffia glomerata* and *Pfaffia tuberosa* as well as to evaluate the production of β -ecdysone in micropropagated plants, clones and calli *in vitro*. Nodal segments of two accessions (BRA and JB-UFSM) of *P. glomerata* were cultivated on Murashige and Skoog (MS) medium. In relation to *P. tuberosa* the process of disinfection, multiplication and acclimatization of the plants was studied. Studies referring to the induction of callus, organogenesis and embryogenesis were conducted using medium supplemented with auxins and cytokinins. Roots and aerial parts of the micropropagated plants, clones regenerated by indirect organogenesis and calli *in vitro* were analysed in relation to production of β -ecdysone by high efficiency liquid chromatography. Micropropagation proved to be a viable method for the production of *P. glomerata* plants on a commercial scale. The BRA accessions presented higher multiplication rate and β -ecdysone content when compared to JB-UFSM. Nodal segments of *P. tuberosa* showed an absence of microorganisms and a high survival rate after being washed with various disinfecting solutions. Better results in relation to micropropagation in this species were registered in medium with 1 μ M of thidiazuron, followed by subcultivation of shoots in medium without thidiazuron, where the plants showed excellent development and good adaptation to *ex vitro* conditions. After cultivation in the field, the β -ecdysone content found in these plants was similar to that found in wild plants *in vivo*. It was found that, in both studied species, the aerial parts of the plants accumulated a greater β -ecdysone content when compared to roots. Calli from nodal segments of *P. glomerata* showed differences in consistency, morphogenic potential and β -ecdysone content, depending on plant growth regulators concentrations added to the nutritive medium. In general, the production of this metabolite in the calli appear to be associated with the friable consistency and regeneration of shoots. In *P. tuberosa* the β -ecdysone content varied among the friable calli depending on the concentration of auxin and appear to be dependent on the regeneration of shoots. The *P. glomerata* calli presented a low plant regeneration frequency; the plants (clones) regenerated from calli presented normal morphology, but differed in relation to β -ecdysone content. In *P. tuberosa* several clones were regenerated from friable calli in medium MS with auxin or auxin and cytokinin. On the other hand, root explants formed embryogenic calli in medium MS with auxin and cytokinin. These biotechnological strategies involving cultivation techniques *in vitro* together with the dosage of β -ecdysone are pioneer studies for the genus and could be useful for the propagation and genetic breeding of these species of Brazilian ginseng.

Key-words – Brazilian ginseng, *in vitro* culture, ecdysteroids, HPLC

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	7
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
1 Considerações gerais sobre o gênero <i>Pfaffia</i> (Amaranthaceae)	11
2 Aspectos gerais da cultura de tecidos vegetais	14
2.1 Fitoreguladores.....	15
2.2 Morfogênese e calogênese	18
2.2.1 Morfogênese.....	18
2.2.1.1 Organogênese.....	19
2.2.1.1.1 Organogênese direta e propagação clonal	20
2.2.1.1.2 Organogênese indireta e variação somaclonal.....	21
2.2.1.2 Embriogênese somática.....	23
2.2.2 Calogênese.....	27
3 Considerações gerais sobre metabolismo secundário.....	29
3.1 Fitoecdisteróides.....	30
3.1.1 Marcador químico do ginseng brasileiro: ecdisteróide β -ecdisona.....	34
4 Aspectos gerais sobre a produção de metabólitos secundários através da cultura de tecidos.....	35
4.1 Produção de fitoecdisteróides <i>in vitro</i>	38
CAPÍTULO 1 – Micropropagação e produção de β-ecdisona em <i>Pfaffia tuberosa</i> e <i>Pfaffia glomerata</i>	40
1.1 Otimização da micropropagação de <i>Pfaffia tuberosa</i> (Spreng.) Hicken	41
1.2 Propagação clonal rápida de <i>Pfaffia tuberosa</i> (Spreng.) Hicken utilizando thidiazuron.....	52
1.3 Micropropagação e produção de β -ecdisona em <i>Pfaffia glomerata</i> e <i>Pfaffia tuberosa</i>	64
CAPÍTULO 2 – Calogênese, morfogênese e produção de β-ecdisona em <i>Pfaffia tuberosa</i> e <i>Pfaffia glomerata</i>	76
2.1 Indução de calos e aspectos morfogênicos de <i>Pfaffia tuberosa</i>	77
2.2 Efeito do 2,4-D e BAP no estabelecimento de calos e na produção de β -ecdisona em <i>Pfaffia tuberosa</i>	89
2.3 Calogênese, morfogênese e produção de β -ecdisona em <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng.) Pedersen, acesso BRA.....	104
CAPÍTULO 3 – Regeneração de plantas a partir de calos de <i>Pfaffia tuberosa</i> e <i>Pfaffia glomerata</i>	117
3.1 Aspectos morfogênicos de plantas de <i>Pfaffia tuberosa</i> (Spreng.) Hicken regeneradas por organogênese indireta	118
3.2 Regeneração de plantas a partir de calos e produção de β -ecdisona em <i>Pfaffia glomerata</i>	128

CAPÍTULO 4 – Embriogênese somática em <i>Pfaffia tuberosa</i>	137
4.1 Embriogênese somática em <i>Pfaffia tuberosa</i> (Spreng.) Hichen.....	138
CONSIDERAÇÕES FINAIS	149
REFERÊNCIAS	151
APÊNDICE A - Artigos elaborados.....	165
APÊNDICE B – Co-cromatografia	166
APÊNDICE C – Curva analítica.....	167
APÊNDICE D – Produtos e Fabricantes.....	168

INTRODUÇÃO GERAL

Desde o início da civilização, as plantas vêm sendo utilizadas pelo homem como fonte de alimento e com propósitos terapêuticos. Nos dias atuais, as plantas representam uma valiosa fonte de metabólitos secundários, os quais são utilizados principalmente pelas indústrias farmacêutica e alimentícia (Rao & Ravishankar, 2002).

Estima-se que cerca de 25% dos fármacos empregados, atualmente, nos países industrializados foram desenvolvidos, direta ou indiretamente, a partir de produtos naturais, especialmente de plantas (Yunes & Calixto, 2001). Além disso, nas últimas décadas, observou-se um aumento expressivo no mercado de medicamentos fitoterápicos em todo o mundo, especialmente nos países industrializados. Em 2000, na Europa e nos Estados Unidos, o mercado de medicamentos fitoterápicos alcançou valores de 8,5 e 6,6 bilhões de dólares por ano, respectivamente, com um crescimento de 12% ao ano. No mercado brasileiro, este segmento responde por 5% do mercado farmacêutico, movimentando cerca de US\$ 400 milhões por ano (Hostettman et al., 2003). Apesar das empresas farmacêuticas investirem cada vez mais no desenvolvimento de fitoterápicos, o panorama do Brasil nesta área mostra que a grande maioria dos fármacos é importado ou produzido por empresas multinacionais. Além disso, apesar do Brasil ser rico em biodiversidade, a exploração predatória das plantas medicinais e o desconhecimento das práticas de cultivo têm levado a reduções drásticas das populações naturais, culminando na perda de muitos metabólitos ainda não estudados pela química e pela farmacologia. Neste sentido, pesquisas multidisciplinares têm permitido a obtenção de progressos significativos na produção de matéria-prima de qualidade para a indústria farmacêutica (Hostettman et al., 2003).

Atualmente, o estresse e a depressão estão entre os principais fatores que afetam a saúde humana. As raízes do ginseng coreano, *Panax ginseng* (Araliaceae), ricas em saponinas triterpênicas e esteróis, são utilizadas mundialmente devido ao seu poderoso efeito adaptógeno e antiestresse (Lee et al., 2004). Contudo, devido ao alto valor das raízes do ginseng coreano, há uma busca constante por outros compostos tônicos, que melhorem a adaptação do organismo frente ao estresse físico e mental.

No Brasil, a busca por espécies afins à coreana levou ao descobrimento de diversas espécies de *Pfaffia* (Amaranthaceae), conhecidas como ginseng brasileiro, cujas raízes são utilizadas como adaptógenas e antiestresse (Magalhães, 2000). Apesar da *Pfaffia* ser

utilizada durante séculos pelos nativos brasileiros, somente nas últimas décadas a química e a farmacologia deste gênero começou a ser estudada, principalmente por pesquisadores japoneses.

A espécie de ginseng brasileiro de maior importância é a *Pfaffia glomerata* (Zimmer et al., 2006), cujo habitat principal são as matas ciliares da região centro-oeste do Brasil e bacia do rio Paraná. Atualmente, toneladas de raízes de *Pfaffia glomerata* são mensalmente destinadas ao mercado nacional e internacional, onde são utilizadas para a fabricação de fitoterápicos e suplementos alimentares. Porém, a conversão dessas plantas em fármacos está limitada pela dificuldade de se obter matéria-prima, na quantidade e qualidade necessária, para suprir a demanda requerida pela indústria farmacêutica (Magalhães, 2000). Além disso, grande parte das plantas são coletadas por extrativismo, sendo o material vegetal heterogêneo e de baixa qualidade (Figueiredo et al., 2004). Assim, considerando-se as dificuldades para garantir a padronização e o controle de qualidade das raízes para a produção de fitoterápicos, a tendência vigente é o cultivo em larga escala de plantas homogêneas e produtivas (Gil et al., 2005).

Quimicamente, as raízes de *Pfaffia glomerata* são ricas em saponinas triterpênicas e ecdisteróides (Shiobara et al., 1993a), cujo teor varia de acordo com o acesso (Figueiredo et al., 2004). O efeito adaptógeno desta espécie é atribuído ao ecdisteróide β -ecdisona, que inclusive é o composto utilizado como marcador químico da qualidade das raízes (Zimmer et al., 2006).

Pfaffia tuberosa é uma espécie herbácea nativa dos campos de vários Estados do Brasil e países vizinhos, onde é utilizada popularmente para o tratamento da infertilidade (Nishimoto et al., 1986). Entretanto, as propriedades químicas e farmacológicas de *Pfaffia tuberosa* foram até o momento pouco investigadas. Apesar de apresentar um bom potencial reprodutivo em condições naturais, as populações de *Pfaffia tuberosa* estão restritas às áreas não utilizadas para o plantio de lavouras e pastoreio.

Tendo em vista a conservação do germoplasma existente, bem como o fornecimento de matéria-prima homogênea e de qualidade para a indústria de fitoterápicos, torna-se fundamental o desenvolvimento de técnicas de propagação dessas espécies. Neste sentido, clones e acessos de *Pfaffia glomerata* vêm sendo propagados através de estacas, entretanto este tipo de propagação produz um baixo número de mudas (Nicoloso et al., 1999). Por outro lado, *Pfaffia tuberosa* apresenta caules frágeis e entrenós muito curtos, o que dificulta a propagação por estaquia. Outra estratégia para a produção de mudas é através de sementes, porém este tipo de reprodução deve originar plantas muito heterogêneas (Magalhães, 2000), visto que ambas as espécies apresentam grande variabilidade morfológica e genética (Taschetto & Pagliarini, 2003). A heterogeneidade das

plantas é um dos fatores que afetam negativamente a padronização da matéria-prima vegetal utilizada na produção de fitoterápicos (Gil et al., 2005). Desta forma, o método utilizado para a obtenção de matéria-prima de *Pfaffia glomerata* está limitado à propagação vegetativa de acessos selecionados em função do teor de β -ecdisona.

Considerando-se as dificuldades de propagação vegetativa e reprodutiva de *Pfaffia glomerata* e *Pfaffia tuberosa*, torna-se fundamental o desenvolvimento de estratégias alternativas, que tenham como propósito a produção de mudas homogêneas, gerando biomassa para estudos químicos e farmacológicos, além de servir para proteger o germoplasma existente. Neste contexto, diversas estratégias biotecnológicas têm se constituído em novas ferramentas para a produção de biomassa e metabólitos de interesse medicinal, incluindo a cultura de células e tecidos vegetais e, mais recentemente, a engenharia genética (Oksman-Caldentey et al., 2004). Dentre as técnicas de cultivo *in vitro*, destacam-se a micropropagação, a embriogênese somática, a produção de calos e a indução de variação somaclonal, nas quais é possível estudar os fatores que afetam a regeneração de plantas e a produção de metabólitos secundários (Rao & Ravishankar, 2002).

A micropropagação e a embriogênese somática são métodos de cultivo que possibilitam a propagação clonal em larga escala de genótipos superiores quanto às qualidades agrônomicas e composição química. A aplicação dessas técnicas depende de fatores associados à indução e ao controle da morfogênese em suas duas rotas de regeneração: organogênese (regeneração de brotos e raízes) e embriogênese (regeneração de plantas a partir de embriões somáticos).

O sucesso na propagação clonal de *Pfaffia glomerata* e *Pfaffia tuberosa* abre perspectivas para a produção de mudas uniformes e de alta qualidade, as quais poderão ser fontes de matéria-prima para o mercado de fitoterápicos. Atualmente, acessos de *Pfaffia glomerata* vêm sendo conservados em bancos de germoplasma e propagados com sucesso pelas técnicas *in vitro*. Por outro lado, a metodologia de micropropagação proposta para *Pfaffia tuberosa* necessita ser otimizada, uma vez que se mostrou inviável comercialmente devido ao alto índice de contaminação dos explantes na fase inicial de cultivo e à baixa sobrevivência das plantas na fase de aclimatização (Martins & Nicoloso, 2004). Todavia, em ambas as espécies não há investigações em relação à produção do ecdisteróide β -ecdisona a partir de plantas micropropagadas.

Em geral, os ecdisteróides estão presentes em vários órgãos das plantas, contudo a distribuição desses metabólitos, em geral, não é uniforme (Dinan, 2001). Em *Pfaffia glomerata* e em *Pfaffia tuberosa*, o acúmulo de β -ecdisona foi estudado apenas no sistema radicular da planta (Nishimoto et al., 1986; Shiobara et al., 1993a). Estudos referentes à

distribuição órgão específica de β -ecdisona em plantas nativas de *Pfaffia tuberosa* e em acessos de *Pfaffia glomerata* fornecerão novas informações à indústria farmacêutica, além de contribuir para um melhor entendimento do papel fisiológico destes metabólitos nas plantas.

Outra estratégia utilizada para estudar a produção de ecdisteróides é o cultivo de calos (Camps et al., 1990; Anufrieva et al., 1998). Em geral, os calos organogênicos, com tecidos mais diferenciados, produzem uma maior quantidade de metabólitos devido à maior diferenciação dos tecidos de interesse (Rao & Ravishankar, 2002; Oksman-Caldentey et al., 2004). Com base nisso, muitas pesquisas com plantas medicinais têm como propósito comparar a produção de substâncias bioativas em cultivos apresentando diferentes níveis de diferenciação. Adicionalmente, a regeneração de brotos a partir dos calos pode possibilitar o desenvolvimento de plantas com características genéticas e/ou fisiológicas diferentes em relação à planta matriz, fornecendo perspectivas para a seleção de somaclones mais produtivos (Rotgé, 1991).

As várias estratégias biotecnológicas empregadas com o intuito de estudar aspectos fisiológicos da calogênese/morfogênese e estimular a biossíntese de compostos secundários dependem de diversos fatores, dentre os quais destacam-se o genótipo da planta, os explantes utilizados e as combinações dos fitoreguladores adicionados ao meio nutritivo (Dinan, 2001; Tomás et al., 1993).

Assim, tendo em vista a carência de dados em relação às técnicas de propagação e o desconhecimento dos fatores que modulam as respostas *in vitro* de *Pfaffia glomerata* e *Pfaffia tuberosa*, o objetivo deste trabalho foi estudar os fatores que induzem e controlam a morfogênese e a calogênese nestas espécies e avaliar a produção de β -ecdisona em plantas oriundas da micropropagação, em plantas regeneradas por organogênese indireta e em calos cultivados *in vitro*.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 Considerações gerais sobre o gênero *Pfaffia* (Amaranthaceae)

A família Amaranthaceae consiste de cerca de 65 gêneros e 900 espécies distribuídas principalmente nas regiões tropical e subtropical. Alguns membros da família destacam-se pelo uso medicinal, como os gêneros *Pfaffia* (Montanari et al., 1999), *Gomphrena* (Mercier et al., 1992) e *Hebanthe* (Vigo et al., 2004a). O gênero *Amaranthus* destaca-se pelas sementes, as quais possuem alto valor nutritivo (Bennici et al., 1997) e pelo uso como ornamental (Cronquist, 1981; Mercier et al., 1992). Recentemente, espécies de *Amaranthus*, *Gomphrena* e *Celosia* vêm sendo exploradas como fonte de betalaína, um pigmento vermelho-violeta utilizado como corante e antioxidante (Cronquist, 1981; Cai et al., 2005).

O gênero *Pfaffia* engloba cerca de 90 espécies naturais da América Central e América do Sul, incluindo vários Estados do Brasil, onde 27 espécies foram descritas (Zimmer et al., 2006). Várias espécies como *P. glomerata*, *P. iresinoides* e *Hebanthe paniculata* (sinonímia *Pfaffia paniculata*) são conhecidas como ginseng brasileiro e têm sido utilizadas como tônico e afrodisíaco, para o tratamento do diabetes, reumatismo (Magalhães, 2000), esgotamento físico e mental, falta de memória e estresse (Rates & Gosmann, 2002).

Devido aos efeitos adaptógenos, raízes de várias espécies de *Pfaffia*, oriundas de diferentes regiões do Brasil, vêm sendo comercializadas em substituição ao ginseng coreano (*Panax ginseng*), utilizado pela medicina chinesa há mais de três mil anos como elixir da longa vida. Adaptógeno é um termo que define substâncias que aumentam a resistência inespecífica, permitindo ao organismo uma maior adaptação aos esforços físicos e mentais (Simões et al., 2001; Magalhães, 2000).

Dentre os compostos químicos presentes nas raízes de diferentes espécies de *Pfaffia* destacam-se as saponinas triterpênicas e os ecdisteróides (Shiobara et al., 1992a; 1992b; 1993a; 1993b). Vários compostos foram isolados e identificados em *Pfaffia glomerata*, como o ácido glomérico, ácido oleanólico, ácido famérico, além de ecdisterona e rubrosterona (Shiobara et al., 1993a). Um trabalho conduzido por Nishimoto et al. (1986) descreve a presença de ácido oleanólico e ecdisterona nas raízes de *P. tuberosa*.

Pfaffia glomerata é a espécie de ginseng brasileiro de maior importância medicinal e comercial (Vigo et al., 2004a; Figueiredo et al., 2004; Zimmer et al., 2006). Caracteriza-se

por ser uma erva perene relativamente alta (atingindo até dois metros de altura), apresenta caules retos, delgados e ocos quando adultos, raiz fusiforme e inflorescência muito ramificada composta por flores polígamo-monóicas (Vigo et al., 2004a). É uma espécie higrófila e heliófila, bastante distribuída pelo território brasileiro, em especial em locais ensolarados de matas ciliares (Smith & Downs, 1972; Vigo et al., 2004a), sendo mais rara no Rio Grande do Sul (Magalhães, 2000; Figueiredo et al., 2004). Caracteriza-se pela grande adaptabilidade, alta variabilidade genética e pelo rápido crescimento (Magalhães, 2000; Vigo et al., 2004a). *P. glomerata* apresenta melhor desenvolvimento em regiões com temperaturas mais elevadas, mostrando-se sensível às geadas (Magalhães, 2000). É conhecida popularmente como corango sempre-viva ou paratudo, sendo suas raízes utilizadas com fins medicinais há séculos pelos nativos da região amazônica e regiões vizinhas (Vigo et al., 2004a).

A ação adaptógena de *Pfaffia glomerata* é atribuída à presença dos fitoecdisteróides, em especial ao composto β -ecdisona (Vigo et al., 2003; Figueiredo et al., 2004), que é utilizado como marcador químico da qualidade da matéria-prima (raízes) desta espécie (Montanari et al., 1999; Magalhães, 2000; Zimmer et al., 2006).

Poucos estudos têm sido conduzidos em relação às atividades biológicas do gênero *Pfaffia* (Neto et al., 2004), os quais se resumem a dados obtidos com as raízes da planta na forma de pó, como extrato bruto ou semi-purificado. A maior parte dos ensaios biológicos, pré-clínicos e clínicos vem sendo conduzido com *Pfaffia glomerata*. Extratos de raízes desta espécie favoreceram a aprendizagem e a memória de cobaias (Marques et al., 2004) e apresentaram efeitos antiinflamatórios, analgésicos (Neto et al., 2005) e antioxidantes (Daniel et al., 2005). Neto et al. (2004) verificaram que extratos hidroalcoólicos de *Pfaffia glomerata* mostraram-se ativos contra alguns protozoários, como *Leishmania braziliensis*. Em humanos, Marques (1998) apresentou dados sobre o efeito benéfico da droga na memória de curto prazo e no desempenho de idosos em testes psicométricos. Ackel et al. (1999) constataram que o tratamento com a planta aumentou a capacidade aeróbica de homens com idade entre 50 e 75 anos.

Além disso, na medicina popular, as raízes do ginseng brasileiro são utilizadas para tratar distúrbios gástricos e como antidiabético (Magalhães, 2000). Pesquisas conduzidas com extratos fracionados de raízes de *Pfaffia glomerata* confirmaram a atividade anti-hiperglicemiante de extratos butanólicos; em adição, os pesquisadores constataram que a β -ecdisona não está relacionada com o efeito antidiabético (Sanches et al., 2001). Freitas et al. (2003) constataram que extratos hidroalcoólicos das raízes de *Pfaffia* protegeram a mucosa gástrica de cobaias, confirmando o uso popular da planta.

As saponinas e fitoecdisteróides do gênero não estão ainda totalmente caracterizadas sob o ponto de vista da atividade biológica. Em relação ao efeito dos ecdisteróides, foi

constatado que a β -ecdisona não é o composto responsável pelo efeito anti-hiperglicemiante (Sanchez et al., 2001) e antiinflamatório (Taniguchi et al., 1998) descrito para a *Pfaffia iredesinoides* e *Pfaffia glomerata* respectivamente.

Em virtude das propriedades medicinais, tem havido uma intensa exploração das reservas naturais de *Pfaffia glomerata*, cujas raízes são utilizadas para a produção de medicamentos fitoterápicos e suplementos alimentares. Conforme dados de Magalhães (2000), cerca de 30 toneladas de raízes de *P. glomerata* são exportadas mensalmente do Brasil para o Japão e Estados Unidos, pondo em risco a variabilidade genética das populações naturais, uma vez que existem poucas áreas de cultivo comercial. Conforme Figueiredo et al. (2004), as ameaças às populações de *P. glomerata* são decorrentes, principalmente, do uso das raízes da planta e do extrativismo, sendo necessário estudos urgentes visando o cultivo comercial da espécie.

Atualmente, muitos trabalhos vêm sendo conduzidos com a *P. glomerata*, visando a obtenção de informações sobre parâmetros farmacognósticos, como caracterização botânica, época de colheita, métodos de secagem das raízes, teor de cinzas e extrativos, índice de espuma, quantificação de saponinas (Vigo et al., 2003, 2004a, 2004b) e teor de β -ecdisona (Magalhães, 2000; Figueiredo et al., 2004; Zimmer et al., 2006). Outras pesquisas incluem estudos sobre variabilidade genética (Taschetto & Pagliarini, 2003), propagação vegetativa (Nicoloso et al., 1999), tratos culturais, produtividade e seleção de genótipos, visando a obtenção de matrizes para o cultivo comercial (Montanari et al., 1999; Magalhães, 2000; Figueiredo et al., 2004). Tendo em vista os critérios de eficácia, segurança e qualidade exigidos para a obtenção do registro de medicamentos fitoterápicos no Ministério da Saúde (Brasil, 2004), diversos ensaios farmacológicos foram conduzidos com *P. glomerata*, além do desenvolvimento e validação de técnicas necessárias para o controle da qualidade da matéria-prima (Vigo et al., 2003; Zimmer et al., 2006).

Pfaffia tuberosa é uma espécie freqüentemente encontrada nos campos do Rio Grande do Sul. Ao contrário de *Pfaffia glomerata*, esta espécie é ainda pouco conhecida sob o ponto de vista químico, biológico e farmacológico. Diferencia-se morfológicamente da *P. glomerata* pelo menor porte, inflorescência pouco ramificada, sistema radicular tuberoso e por habitar áreas de campo (Vigo et al., 2004a). *P. tuberosa* é uma planta herbácea, com cerca de 50 cm de altura, folhas opostas, caules retos pilosos ou quase glabros e inflorescência cimosa paleácea formada por flores pequenas e hermafroditas. Devido ao fato de sua raiz ser tuberosa, é conhecida popularmente como corango-de-batata. É uma planta perene, xerófita, heliófita e encontra-se distribuída uniformemente em áreas de campo desde Goiás, Minas Gerais até o Rio Grande do Sul e países vizinhos (Smith & Downs, 1972). Adaptada às condições climáticas do sul do Brasil, esta espécie tolera bem o frio e a

geada, porém se mantém bem desenvolvida e em florescimento durante a primavera e verão.

Semelhante a outras espécies do gênero, estudos químicos revelaram a presença de saponinas e ecdisteróides nas raízes de *P. tuberosa*, destacando-se o ácido oleanólico e a ecdisterona respectivamente. Popularmente, as raízes desta planta são indicadas para o tratamento da infertilidade (Nishimoto et al., 1986), no entanto os estudos biológicos e químicos são ainda incipientes.

Pfaffia tuberosa vem sendo coletada por extrativismo, sendo o material vegetal colhido heterogêneo e de baixa qualidade. Apesar disso, no momento atual, não há dados disponíveis quanto às técnicas de cultivo utilizadas para a produção de mudas nesta espécie. Em outras espécies de *Pfaffia*, a multiplicação através de estacas é viável (Nicoloso et al., 1999), contudo em condições naturais, *P. tuberosa* apresenta caules frágeis com entrenós muito curtos, o que dificulta este tipo de propagação. Assim como observado em *P. glomerata* (Magalhães, 2000), a propagação de *P. tuberosa* através de sementes deve originar plantas muito heterogêneas, visto que ambas as espécies apresentam grande variabilidade morfológica e genética (Taschetto & Pagliarini, 2003).

Tendo em vista a necessidade de ampliar o conhecimento sobre o gênero *Pfaffia*, aliada à crescente demanda de matéria-prima de qualidade para a indústria de fitoterápicos, ressalta-se a importância das técnicas da cultura de tecidos vegetais na produção de plantas homogêneas, bem como na produção de biomassa produtiva *in vitro*.

2 Aspectos Gerais da Cultura de Tecidos Vegetais

Esta técnica consiste no cultivo de células ou tecidos vegetais sob condições químicas e físicas apropriadas, representando uma das áreas de maior êxito da biotecnologia (Giacometti, 1990). A regeneração de plantas através da cultura de tecidos baseia-se no princípio da totipotência, proposto pelo fisiologista Haberlandt, que em 1902, enunciou que cada célula vegetal possuía o potencial genético para regenerar uma planta inteira. Além disso, os vegetais são capazes de produzir um grande número de metabólitos *in vitro* (Rao & Ravishankar, 2002).

Em plantas medicinais, a cultura de tecidos tem auxiliado na propagação clonal de diversos genótipos, permitindo a conservação do germoplasma; a obtenção de novas fontes de variabilidade através do cultivo de calos e células; na engenharia genética e na otimização da produção de metabólitos (Pletsch, 1998; Botta et al., 2001; Rao & Ravishankar, 2002; Arikat et al., 2004).

A seleção e o desenvolvimento de um meio de cultura é essencial para qualquer trabalho em cultura de tecidos de plantas. Dentre os componentes essenciais de meio de

cultivo estão a água, sais inorgânicos, vitaminas, fonte de carbono e os fitoreguladores (Cohen, 1995). Há numerosos meios de cultura citados na literatura para a indução de calogênese e morfogênese, porém o meio de Murashige & Skoog (MS) (1962) é o mais utilizado. O meio MS vem sendo utilizado na micropropagação de *P. tuberosa* (Martins & Nicoloso, 2004; Flores et al., 2006) e *P. glomerata* (Nicoloso et al., 2001).

Devido ao fato de poucos tecidos serem autotróficos *in vitro*, faz-se necessário adicionar ao meio de cultivo uma fonte de carbono. A sacarose é o açúcar mais utilizado (Cohen, 1995) na propagação *in vitro* de plantas, inclusive de *P. glomerata* (Nicoloso et al., 2003) e *P. tuberosa* (Martins & Nicoloso, 2004; Flores et al., 2006). Além disso, Kagiki et al. (2004) relatam que a sacarose é a fonte de carbono mais efetiva na produção de metabólitos secundários, sendo indicada para a produção de saponinas totais em calos de *P. glomerata*.

Em geral, os meios nutritivos ainda contêm mio-inositol, importante para o crescimento de plantas e diferenciação de calos (Mroginski & Roca, 1991), e inúmeras vitaminas, sendo a tiamina (vitamina B1), o ácido nicotínico (niacina) e a piridoxina (vitamina B6), as mais utilizadas (Caldas et al., 1998). Os meios nutritivos são, em geral, solidificados com ágar, um polissacarídeo extraído de algas marinhas. O pH da maioria dos meios semi-sólidos são ajustados entre 5,5 e 5,9 (Caldas et al., 1998).

De modo geral, o cultivo *in vitro* de plantas é influenciado pelo meio nutritivo, tipos e condições fisiológicas dos explantes, genótipos, condições de cultivo e pelos fitoreguladores. A escolha do explante é de fundamental importância para a indução de calogênese e morfogênese, devido às diferentes respostas dos tecidos frente às combinações hormonais e condições de cultivo *in vitro*. Em geral, durante o desenvolvimento de protocolos de regeneração e/ou estabelecimento de calos, vários ensaios são conduzidos inicialmente no sentido de determinar a melhor fonte de explante e combinações hormonais (Tiwari et al., 2001; Magioli et al., 1998; Venkataiah et al., 2003; Khawar et al., 2004).

2.1 Fitoreguladores

Em alguns casos, é possível obter respostas *in vitro* sem o uso de fitoreguladores (Mroginski & Roca, 1991), como em *Pfaffia glomerata* (Nicoloso et al., 2001; 2002; 2003; Skrebsky et al., 2004) e *Pfaffia tuberosa* (Martins & Nicoloso, 2004; Flores et al., 2006), as quais podem ser propagadas *in vitro* em meio MS, a partir de segmentos nodais. As gemas presentes nos segmentos nodais possuem tecidos meristemáticos aptos a formarem brotações via organogênese direta, não sendo necessária a dediferenciação dos tecidos. Neste caso, as gemas possuem teores endógenos de hormônios adequados para a regeneração da planta *in vitro*. No entanto, na maioria das vezes, quando se utiliza

explantes formados por tecidos diferenciados, como segmentos de folhas, raízes e entrenós, é necessário adicionar fitoreguladores no meio de cultura para que a morfogênese e/ou calogênese seja induzida.

O crescimento e a morfogênese são regulados pela interação e balanço entre os fitoreguladores adicionados no meio e pelos níveis endógenos produzidos nas células cultivadas *in vitro* (George & Sherrington, 1984, Fakhai & Fakhai, 1990). A concentração ideal dos fitoreguladores depende dos padrões de absorção, translocação e metabolismo na planta. Devido a isto, as concentrações efetivas de cada fitoregulador podem variar e necessitam ser ajustadas de acordo com o tipo de tecido ou órgão, do método de cultivo e do estágio da cultura. De acordo com Trewavas (1982, 1991), as respostas induzidas pelos hormônios vegetais são atribuídas a alterações na sensibilidade dos tecidos. Isto decorre do fato de que, muitas vezes, não existe correlação entre a concentração de um determinado hormônio e a resposta do tecido. A sensibilidade das células a um determinado hormônio vegetal depende do número de receptores, do grau de afinidade do hormônio com os receptores e da capacidade de resposta (rota de transdução). Além disso, a sensibilidade é influenciada pela atuação de um hormônio sobre outro, estágio de desenvolvimento, tipo de explante e condições fisiológicas do mesmo (Barendse & Peeters, 1995).

O desenvolvimento vegetal é regulado por vários tipos de hormônios vegetais: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico, etileno, poliaminas e brassinoesteróides (Davies, 1990; Kende & Zeevaart, 1997). Entretanto, várias outras moléculas sinalizadoras também têm sido identificadas em plantas, como ácido jasmônico, o ácido salicílico e a sistemina (Taiz & Zeiger, 2004), as quais participam dos processos de resistência à patógenos e de defesa contra herbívoros.

Para o cultivo *in vitro*, os hormônios vegetais mais importantes são as auxinas e citocininas, seguido pelo ácido giberélico e ácido abscísico. As auxinas juntamente com as citocininas regulam o crescimento e a morfogênese (George & Sherrington, 1984; Davies, 1990; Coenen & Lomax, 1997; Taiz & Zeiger, 2004).

As auxinas sintéticas são largamente utilizadas com o objetivo de induzir embriões somáticos e raízes, promover o crescimento de calos, bem como de órgãos como meristemas e brotos (Davies, 1990; Kuhlemeier & Reinhardt, 2001; Leyser, 2003).

As várias auxinas promovem respostas diferentes *in vitro*, o que segundo Caldas et al. (1998) pode ser devido a diferenças no metabolismo e estabilidade das mesmas. O ácido 2,4-diclorofenóxiacético (2,4-D) é uma auxina que estimula a formação de calos (Davies, 1990) mesmo em baixas concentrações. O ácido naftalenoacético (ANA) é a auxina mais utilizada nos meios de multiplicação com o intuito de estimular o crescimento das brotações (Hu & Wang, 1983). Porém, altas concentrações desta auxina podem induzir a calogênese. Raemakers et al. (1995) e Hirai et al. (1997), relataram que o 2,4-D seguido pelo ANA são

as auxinas mais utilizadas na indução de embriogênese somática, cuja eficiência depende da concentração utilizada, tipo de explante, condições de cultivo e genótipo (Parrot et al., 1991; Emons et al., 1994). Segundo Litz & Gray (1992), há um sinergismo entre o ANA e as citocininas na regeneração. Em outras espécies pertencentes à família Amaranthaceae, o ANA e o BAP têm sido utilizados na indução de calos e regeneração de plantas *in vitro* (Mercier et al., 1992; Vieira et al., 1995; Bennici et al., 1997). O ácido indolbutírico (AIB) é uma auxina natural, muito utilizada para a estimular o enraizamento de brotações (Davies, 1990; Arikat et al., 2004; Beruto et al., 2004; Elangomathavan et al., 2003; Martinussen et al., 2004), bem como a formação de calos (Mondal et al., 1998; Kollávorá et al., 2004) e embriões somáticos (Raemakers et al., 1995).

As citocininas são muito importantes na regulação do crescimento e da morfogênese (Haberer & Kieber, 2002) em cultura de tecidos, pois estimulam a divisão das células, a indução e a proliferação de brotações (Bhojwani & Radzan, 1983; Howell et al., 2003); contudo, inibem a formação de raízes e reduzem o crescimento das brotações (Davies, 1990). Segundo Mok et al. (1987), de acordo com a estrutura química, as citocininas são classificadas em dois grupos: as derivadas da adenina (como a 6-benzilaminopurina – BAP) e as derivadas das feniluréias (como o N-phenyl-N'-1,2,3-thidiazol-5-ylurea - Thidiazuron, TDZ).

Entre as inúmeras citocininas disponíveis, a BAP é provavelmente uma das mais utilizadas para a propagação *in vitro* de plantas medicinais, devido a sua alta eficiência na proliferação de brotações (Echeverrigaray et al., 2001). De acordo com Zaerr & Mapes (1985), a BAP é a citocinina mais eficaz para promover a indução e multiplicação de partes aéreas da maioria das espécies. Recentemente, a BAP foi utilizada para a micropropagação de *Palonia* (Beruto et al., 2004), *Hibiscus* (Herarth et al., 2004), *Orthosiphon* (Elangomathavan et al., 2003), *Rubus* (Martinuseen et al., 2004) e *Curcuma zedoaria* (Loe et al., 2005).

Em geral, meios acrescidos com auxina e BAP têm sido utilizados com sucesso no cultivo de calos de várias espécies de amarantáceas (Mansur et al., 1994; Vieira et al., 1995; Bennici et al., 1997). A BAP induziu calos em explantes foliares e entrenós de *Pfaffia glomerata*, mesmo em meios isentos de auxina (Flores et al., 2004) e foi essencial para a formação de calos em segmentos nodais de *Gomphrena officinallis* (Mercier et al., 1992). Entretanto, Araújo (2001) estudando o efeito de citocininas na micropropagação de *Pfaffia glomerata*, observou que a BAP não favoreceu de forma significativa a produção de plantas *in vitro*. Esta espécie mostrou-se muito sensível à citocinina exógena, apresentando sintomas de toxidez (redução no crescimento, número e tamanho das folhas, alterações na pigmentação e no enraizamento) em concentrações superiores a 0,2 mg.L⁻¹.

As citocininas também são importantes para a indução de embriões somáticos. Raemakers et al. (1995) ressaltaram que, em várias espécies, a combinação entre auxina e citocinina é favorável para indução de células embriogênicas e embriões somáticos, sendo a BAP a citocinina mais utilizada na maioria das espécies.

O Thidiazuron (TDZ) apresenta propriedades biológicas similares às das citocininas (Mok et al., 1982) quando adicionado ao meio nutritivo. Os efeitos biológicos do TDZ foram descobertos em calos de *Phaseolus lunatus*, onde mostrou ser mais ativo que zeatina (Mok & Mok, 1985). Posteriormente, descobriu-se que o TDZ pode substituir com vantagens as citocininas isopentenil adenina (2-iP) e a BAP na multiplicação *in vitro* de várias espécies lenhosas (Mok et al., 1982; Einset & Alexander, 1984; Van Niewkerk et al., 1986). Atualmente, o efeito benéfico do TDZ na frequência de regeneração, bem como no número de brotos tem sido relatado em várias espécies herbáceas (Hosokawa et al., 1996; Tiwari et al., 2001; Venkataiah et al., 2003; Malabadi et al., 2004) e lenhosas (Theiler-Hedtrich & Theiler-Hedtrich, 1990; Mondal et al., 1998; Hammatt & Grant, 1998). O TDZ promove a regeneração em concentrações mais baixas quando comparado com outras citocininas derivadas da adenina (Mok et al., 1987; Theiler-Hedtrich & Theiler-Hedtrich, 1990; Sanago et al., 1996; Sarwar & Skirvin, 1997; Mondal et al., 1998). A alta atividade do TDZ deve-se, provavelmente, à estabilidade do composto e a resistência à citocinina oxidase (Mok et al., 1987). Em altas concentrações, o TDZ induz o crescimento de calos (Mok et al., 1987), reduz o crescimento (Huetteman & Preece, 1993) e o enraizamento (Salgado et al., 2001) dos brotos, além da possibilidade de induzir folhas com crescimento anormal e vitrificação (Mok et al., 1987; Morales et al., 1999).

Em plantas medicinais, o TDZ tem sido utilizado para a indução de calos friáveis em *Cordia verbenaceae* (Lameira et al., 1997) e *Salvia fruticulosa* (Karam et al., 2003), na micropropagação e produção de óleos essenciais em *Salvia fruticulosa* (Arikat el al., 2004), para aumentar a regeneração de plantas a partir de discos foliares de *Mentha x spicata* e *Mentha x piperita* (Faure et al., 1998) e na propagação clonal de *Bacopa monniera* (Tiwari et al., 2001) e *Lavandula* (Jose Nobre, 1996). Os efeitos da BAP e do TDZ foram estudados na micropropagação de *Camellia sinensis* (Mondal et al., 1998), *Bacopa monniera* (Tiwari et al., 2001) e *Malus domestica* (Sarwar & Skirvin, 1997).

2.2 Morfogênese e calogênese

2.2.1 Morfogênese

O processo de desenvolvimento de uma planta refere-se ao crescimento integrado das várias partes do corpo vegetal, envolvendo basicamente os processos de divisão, expansão e diferenciação celular que culminam na formação de tecidos e órgãos. Segundo

Christianson & Warnick (1983), a formação de novos órgãos *in vitro* (morfogênese) resulta da interação dos processos de competência celular, indução, determinação e diferenciação celular, os quais são influenciados e determinados principalmente pela presença dos hormônios vegetais. Estes compostos, principalmente as auxinas e citocininas, de ocorrência natural ou sintética, agem como sinais químicos para regular os processos de crescimento e morfogênese (Coenen & Lomax, 1997).

A competência celular refere-se à habilidade das células para responder a um sinal específico de desenvolvimento (Hicks, 1994). Esta habilidade das células pode se dar por: a) *Ativação*: mudança na competência envolvendo a rediferenciação de determinadas células (modelo direto) ou b) *Indução*: iniciação de uma resposta particular de diferenciação a partir de células indiferenciadas (modelo indireto). Este modelo depende da desdiferenciação, que envolve a capacidade de divisão celular e retorno à estrutura citológica de célula meristemática.

O processo de indução refere-se à percepção de um sinal (ambiental, químico ou físico), causando a ativação seletiva e diferencial de genes – epigênese (Guerra et al., 1999). De acordo com Lyndon (1990), a determinação pode ser o resultado da estabilização da expressão dos genes através da ação de genes reguladores. A determinação é estável e transferida para outras células durante a divisão celular, de modo que as células vão seguir uma rota específica de desenvolvimento, a menos que elas sejam estimuladas a se dividir, promovendo o crescimento desdiferenciado (George, 1993).

A diferenciação celular resulta de uma sequência de alterações estruturais e funcionais, altamente coordenadas e determinadas geneticamente (Mantell et al., 1994), que culminam no aparecimento de novos órgãos. Assim, tecidos, órgãos ou células podem adquirir novas competências através da ação de determinados sinais químicos (em geral, fitoreguladores) que desreprimem seletivamente determinados genes (epigênese) levando a uma determinada resposta morfogenética. As respostas morfogenéticas podem ocorrer através de duas rotas de regeneração: organogênese ou embriogênese, as quais são influenciadas e determinadas pelos fitoreguladores, tipo de explante, genótipo, meio de cultura e condições de cultivo (Hou & Jia, 2004; Wu et al., 2004; Paramageetham et al., 2004; Park et al., 2005).

2.2.1.1 Organogênese

A organogênese refere-se à formação de estruturas monopolares como raízes, brotos e flores a partir de explantes ou de calos cultivados *in vitro* (Litz & Jarret, 1991). Estudos pioneiros sobre a expressão organogenética foram conduzidos por Skoog & Miller (1957). Esses autores constataram que a direção da organogênese, ou seja, a indução de raízes ou brotos, é determinada pela relação auxina/citocinina. Em geral, explantes cultivados em

meio contendo uma alta relação auxina/citocinina são induzidos a formar calos (Litz & Jarret, 1991). O meio de cultura utilizado para a indução de calos pode, ao mesmo tempo, induzir a regeneração de brotações e/ou raízes. Porém, em muitos casos, os calos precisam ser transferidos para outro meio com diferentes combinações e/ou concentrações de fitoreguladores para que ocorra a regeneração (George & Sherrington, 1984). Na maioria das culturas, uma alta relação citocinina/auxina é requerida para a indução de brotações a partir dos tecidos do calo ou diretamente do explante. Para a diferenciação de raízes, há necessidade de meios com uma razão citocinina/auxina baixa (Litz & Jarret, 1991).

2.2.1.1.1 Organogênese direta e propagação clonal

A organogênese é dita direta quando a regeneração dos órgãos ocorre sobre o explante original, sem a formação intermediária de um calo (Hammerschlag & Litz, 1992), sendo o principal método de regeneração da propagação clonal *in vitro* ou micropropagação.

A micropropagação de plantas medicinais apresenta várias vantagens, destacando-se: a) maior rapidez na propagação clonal em larga escala; b) a produção de plantas independente da época do ano, do clima e do solo; c) a elevada qualidade sanitária do material; d) a propagação de plantas homogêneas, evitando-se a heterogeneidade da propagação por sementes; e) a inexistência de contaminações com metais pesados ou outros produtos tóxicos; f) conservação de germoplasma; g) melhoramento genético utilizando-se técnicas da cultura de tecidos; h) propagação de espécies medicinais ameaçadas de extinção; i) pré-requisito para a transformação genética (De Klerk, 1990; Sorvari et al., 1993; Echeverrigaray et al., 2001).

A propagação clonal inclui o estabelecimento de explantes assépticos *in vitro*, a multiplicação e o alongamento dos brotos, o enraizamento das plantas e a fase de aclimatização (Ziv, 1986). Dentre os fatores biológicos que afetam a propagação clonal *in vitro*, destacam-se o genótipo, o tipo de explante e as condições fisiológicas e sanitárias dos mesmos, a manutenção da totipotência e a estabilidade genética (Hussey, 1986; Litz & Jarret, 1991). Tendo em vista a propagação de plantas homogêneas e geneticamente estáveis, os explantes ideais para a regeneração são aqueles contendo gemas pré-existentes, como os segmentos nodais e apicais (Hussey, 1986; Debergh & Read, 1991), uma vez que, não sendo necessária a desdiferenciação celular, há uma menor probabilidade de regeneração de plantas com variação somaclonal.

Em geral, sob condições ideais, esses explantes regeneram plantas por longos períodos de tempo, porém em algumas espécies, há uma redução na organogênese ao longo dos subcultivos (Hussey, 1986; Mantell et al., 1994). Além disso, a determinação da duração da cultura e do intervalo entre os subcultivos são aspectos essenciais para evitar a

regeneração de plantas com alterações genéticas e/ou epigenéticas (Cassels & Morrish, 1987; De Klerk, 1990).

Um eficiente protocolo de micropropagação de *Pfaffia glomerata* foi desenvolvido por Nicoloso et al. (2001; 2002; 2003) e Skrebsky et al. (2004) cultivando-se segmentos nodais em meio MS não suplementado com fitoreguladores. Contudo, um reduzido número de ensaios foram conduzidos com *Pfaffia tuberosa*, os quais demonstraram uma elevada contaminação na fase de estabelecimento *in vitro*, um bom desenvolvimento de segmentos nodais em meio MS isento de fitoreguladores e uma baixa sobrevivência na fase de aclimatização (Martins & Nicoloso, 2004). O sucesso na micropropagação de *Pfaffia glomerata* e *Pfaffia tuberosa* abre perspectivas para estudos fitoquímicos e para a propagação clonal de mudas, visando plantios uniformes e de alta produtividade.

Na maioria das espécies, a presença de citocininas no meio nutritivo potencializa a formação de brotações (Bhojwani & Radzan, 1983, Thorpe et al., 1991), contudo não há relatos sobre o efeito dos fitoreguladores na produção de plantas *in vitro* de *P. tuberosa*. Meios suplementados com citocinina foram essenciais para a propagação em massa da maioria das plantas medicinais, como em *Bacopa monniera* (Tiwari et al., 2001), *Orthosiphon* (Elangomathavan et al., 2003) e *Maytenus ilicifolia* (Stefanello et al., 2003). Arikat et al. (2004) estudaram o efeito do meio nutritivo, tipo de explante e concentrações de BAP ou TDZ na micropropagação de *Salvia fruticulosa*. Os autores constataram que o conteúdo de óleo essencial das plantas *in vitro* foi superior ao produzido pelas plantas em casa de vegetação.

2.2.1.1.2 Organogênese indireta e variação somaclonal

A indução de meristemas adventícios é um padrão de organogênese indireta quando a diferenciação ocorre a partir de um calo. Está comprovado que a regeneração de brotações adventícias a partir de calos, protoplastos e suspensões celulares pode resultar em plantas com variações genéticas. Variação somaclonal foi o termo introduzido por Larkin & Scowcroft (1981) para descrever as variações observadas entre os tecidos propagados através da cultura de tecidos. Essas envolvem alterações ao acaso no material genético, cuja taxa varia de 0 a 100% (Skirvin et al., 1993), de acordo com o genótipo e os procedimentos de cultivo.

Um dos maiores benefícios da variação somaclonal é a obtenção de novas fontes de variabilidade genética (Tabares et al., 1991; Bouharmont, 1994). Estes pesquisadores salientaram que os mecanismos que dão origem à variação somaclonal são de grande importância, cujo conhecimento permitirá aumentar o nível de variabilidade e manipular eficientemente as características que se deseja modificar. Vários fatores podem afetar a natureza e a frequência da variação somaclonal, como: fatores biológicos - genótipo, tipo de

explante (De Klerk, 1990; Anu et al., 2004), nível de ploidia e grau de diferenciação do explante (Karp, 1995); meio de cultura - principalmente os fitoreguladores; condições físicas - duração da cultura (De Klerk, 1990) e intervalo entre os subcultivos (Cassells & Morrish, 1987).

Várias evidências indicam que a variação somaclonal é influenciada pelo tipo e concentrações dos fitoreguladores (Karp, 1992), em especial as auxinas. Kumar & Mathur (2004) constataram que o aumento na concentração de ANA aumentou a frequência de alterações tanto no número quanto na estrutura dos cromossomos de *Pisum sativum*. Segundo Mishiba et al. (2001), concentrações superiores a 10 mgL^{-1} de 2,4-D ou ANA causaram um aumento no nível de ploidia em *Doritaenopsis*, enquanto que o BAP e o TDZ favoreceram a manutenção do número de cromossomos. Há evidências de que o 2,4-D seja o responsável pela perda da capacidade regenerativa de algumas culturas de calo (Brown & Charwood, 1990) e pela regeneração de brotos anormais (Varga et al., 1998). No entanto, o 2,4-D pode agir como mutagênico indiretamente por induzir um crescimento desorganizado. O efeito das auxinas nas alterações genéticas pode decorrer do fato das mesmas acelerarem a divisão celular, aumentando a taxa de mutações. Como afirma Skirvin et al. (1993), a quantidade de variações encontradas está correlacionada com a taxa de multiplicação *in vitro*, de forma que calos friáveis, que possuem uma alta taxa de divisão celular, são mais instáveis geneticamente que os calos compactos. Desta forma, é difícil definir os tipos e concentrações de fitoreguladores que possibilitem aumentar ou diminuir o índice de variação somaclonal. Esta dificuldade decorre do fato de que os explantes podem variar em sua sensibilidade para os fitoreguladores utilizados e/ou devido a diferenças no teor de hormônios endógenos (Karp, 1995).

Muitos tipos de variações têm sido observadas em plantas regeneradas *in vitro*, entre as quais: alterações na sequência do DNA - mutações pontuais e ativação de transposons; alterações na estrutura dos cromossomos – duplicações, deleções, inversões e translocações; e no número de cromossomos - levando à poliploidia e aneuploidia (De Klerk, 1990). Alterações no cariótipo parecem ser um importante fator na perda da morfogênese. Há uma correlação inversa entre incidência de aneuploidia e capacidade organogênica, havendo uma tendência à seleção de células com genótipos normais para regenerar novas plantas (Kumar & Mathur, 2004). Alterações genéticas podem ocorrer no genoma nuclear, mitocondrial ou do cloroplasto dos somaclones (Karp, 1995).

Variações epigenéticas também são frequentes, mas ao contrário da variação somaclonal, estas são transientes e não herdáveis geneticamente (Skirvin et al., 1993).

Devido ao fato de ser imprevisível, a variação somaclonal permite incorporar novas características que podem ser desejáveis ou não a um determinado genótipo, além da possibilidade de alterações epigenéticas. Por isto, faz-se necessário uma minuciosa seleção

para as características de interesse e avaliação das plantas regeneradas e suas progênes. Botta et al. (2001) relataram que a regeneração de brotos via calos pode ser uma alternativa para a seleção de plantas de *Papaver* com maiores teores de vismiona A, cuja produção está relacionada à diferenciação e desenvolvimento do tecido foliar.

Em espécies de *Pfaffia*, estudos fisiológicos conduzidos com plantas regeneradas a partir de calos são inexistentes até o momento.

2.2.1.2 Embriogênese somática

A rota embriogênica refere-se ao processo de formação e desenvolvimento de estruturas embrionárias bipolares a partir de uma célula ou aglomerados de células, as quais não são resultantes da fusão de gametas, porém se desenvolvem por meio de estádios ontogenéticos característicos da embriogênese zigótica (Williams & Maheswaran, 1986; Zimmerman, 1993; Thorpe, 1995). Embriogênese somática foi relatada pela primeira vez nos trabalhos clássicos de Steward et al (1958) e Reinert (1958) em calos de cenoura. Embora sejam formados a partir de células do explante, os embriões somáticos possuem características semelhantes aos embriões zigóticos. Ambos apresentam bipolaridade e passam por estádios de desenvolvimento (globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar) até formarem uma planta completa (Parrot et al., 1991; Thorpe, 1995). Uma particularidade dos embriões somáticos é a presença de um sistema vascular fechado, sem conexão com os tecidos do explante. Esta característica, juntamente com presença da bipolaridade tornam esse modelo morfogenético distinto dos processos de regeneração via organogênese (Grey & Purohit, 1991; Guerra et al., 1999).

Entre as potencialidades da embriogênese somática destacam-se a propagação clonal em larga escala, pois um único explante pode produzir um número ilimitado de embriões que podem ser convertidos em plantas (Parrot et al., 1991). Além disso, este método garante a fidelidade genética da planta matriz, pois em geral, os embriões somáticos originam-se de células únicas, enquanto que, na maioria das plantas, a regeneração pela via organogenética envolve um grupo de células, o meristemóide. Jiménez (2001; 2005) complementa que os genes expressos durante a embriogênese são menos tolerantes às mutações. Em função disso, Parrot et al. (1991) salientaram que as chances de obtenção de plantas variantes são menores em plantas regeneradas através da embriogênese em relação àquelas regeneradas pela rota organogenética. Estas características fazem da embriogênese somática o procedimento ideal para a transformação genética (Parrot et al., 1991) e para a produção de sementes sintéticas (Grey & Purohit, 1991). Além disso, a embriogênese somática *in vitro* contribui para estudos fisiológicos, genéticos e bioquímicos que norteiam o desenvolvimento embrionário (Zimmerman, 1993) ou o metabolismo

secundário (Park et al., 2005), além de ser um método apropriado quando se deseja estabilidade genética (Parrot et al., 1991).

A expressão da embriogênese somática segue dois padrões (Parrot et al., 1991; Jiménez, 2001; 2005). O primeiro padrão corresponde à embriogênese somática direta na qual os embriões originam-se diretamente do tecido do explante. Neste caso, o explante possui células pré-embriogênicas determinadas (PEDC-Pre-Embryogenic Determined Cell), ou seja, células com alta competência para formar embriões somáticos. Este padrão é muito comum em explantes provenientes de órgãos reprodutivos como embriões zigóticos imaturos, nucelo, inflorescência, cotilédones e outros. Os autores comentam que nos tecidos reprodutivos, os genes responsáveis pelo desenvolvimento embrionário estão mais ativos que nos demais tecidos da planta. O segundo padrão corresponde à embriogênese somática indireta, onde as células do explante não possuem competência para formar embriões; desta forma, vários ciclos celulares antecedem a indução das células embriogênicas. Neste caso, as células do explante são chamadas de células induzidas à determinação embriogênica (IEDC- Induced Embryogenic Determined Cell), uma vez que a cultura adquire potencial embriogênico devido às condições *in vitro*. Os vários ciclos celulares são, em geral, induzidos por altas concentrações de auxinas, que resultam na formação de um calo. Guerra et al. (1999) adicionam que a embriogênese indireta é característica de explantes provenientes de tecidos mais diferenciados, os quais precisam sofrer desdiferenciação antes de adquirirem competência para a rota embriogênica.

Uma vez formadas, as células PEDC e IEDC são funcionalmente equivalentes e passam a ser descritas como células embriogênicas (Parrot et al., 1991). As células embriogênicas apresentam características que as distinguem das demais células vegetais não embriogênicas. Morfologicamente, aquelas células caracterizam-se pelo pequeno tamanho, parede celular delgada, forma isodiamétrica, citoplasma denso, núcleo grande e nucléolos visíveis (Thorpe, 1995; Guerra et al., 1999; Ribas, 1999). Emons (1994) relatou ainda que células embriogênicas de cenoura apresentam-se aderidas e conectadas por grande número de plasmodesmos. Estas características sugerem uma intensa atividade metabólica e síntese de RNA (Vasil, 1982; Williams & Maheswaran, 1986). A presença de proteínas de reserva, grãos de amido e lipídios são outras características das células com competência embriogênica (Merkle et al., 1995; Carrier et al., 1997; Ribas, 1999; Cangahuala-Inocente, 2002). Estas macromoléculas fornecem energia para a intensa atividade mitótica e metabólica observada durante o desenvolvimento dos embriões somáticos. Ao contrário, as células não embriogênicas são maiores, apresentam formas variadas, espaços intercelulares e menor quantidade de substâncias de reserva (Emons, 1994; Ribas, 1999).

Além das características morfológicas, as células embriogênicas reagem fortemente ao corante carmim acético. Em estudos citoquímicos, o carmim acético e a reação Feulgen são utilizados para detectar glicoproteínas, cromatina e DNA (Gupta & Durzan, 1987), macromoléculas abundantes nas células embriogênicas. Neste sentido, avaliações histológicas são úteis para caracterizar a ontogenia dos embriões, verificar a origem dos mesmos, a presença de embriogênese repetitiva e as possíveis causas da falta de conversão dos embriões em plântulas. Análises histológicas têm sido descritas para muitas espécies, como em *Pinus* (Häggman et al., 1999), *Feijoa* (Cangahuala-Inocente, 2002), *Prunus* (Garin et al., 1997), *Medicago* (Monteiro et al., 2003), *Carthamus* (Mandal et al., 1995), *Glehnia* (Hirai et al., 1997) e *Aspidosperma* (Ribas, 1999).

A embriogênese somática é influenciada pelo genótipo, tipo de explante, tipo e consistência do meio nutritivo, tipos e concentrações de fitoreguladores, carboidratos, osmorreguladores e condições ambientais (Parrot et al., 1991; Thorpe, 1995; Guerra et al., 1999; Jiménez, 2001; 2005).

A capacidade de induzir embriões somáticos está sob controle genético, de forma que genótipos de uma determinada espécie podem diferir no seu potencial embriogênico (Lamb et al., 2002; May & Trigiano, 1991; Van Der Valk et al., 1992; Bered et al., 1996; Sun et al., 2003).

Em geral, os explantes jovens oriundos de estruturas reprodutivas, como embriões imaturos (Lamb et al., 2002), cotilédones (Rout & Das, 1994; Cangahuala-Inocente, 2002), inflorescências (Teixeira & Marbach, 2003) e hipocótilos (Sun et al., 2003) são os mais responsivos. No entanto, outros tecidos também podem ser utilizados como explantes na embriogênese, como ápices caulinares (Chee & Cantliffe, 1992), folhas (Ruffoni et al., 1990), pecíolos (Castillo & Smith, 1997) e raízes (Chang & Hsiang, 1980; Wu et al., 2004; Iancheva et al., 2005; Park et al., 2005). É importante ressaltar que o estágio de desenvolvimento e o estado fisiológico dos tecidos presentes nos explantes são aspectos importantes. Dentro de um determinado genótipo, a sensibilidade das células dos explantes aos fitoreguladores explicam porque alguns explantes são competentes para a embriogênese e outros não (Guerra et al., 1999; Jiménez, 2001; 2005).

Meios de cultura contendo altas concentrações de sais, como o MS, são os mais indicados para a formação de embriões somáticos (Grey & Purohit, 1991; Thorpe, 1995). O carboidrato mais utilizado é a sacarose em concentrações entre 2-12% (Guerra et al., 1999).

A formação de embriões somáticos varia de acordo com o tipo, concentração e tempo de exposição aos fitoreguladores. Dentre os fitoreguladores, as auxinas desempenham o papel mais importante na indução da embriogênese somática (Zimmerman, 1993), pois são indicadas como responsáveis pelo estabelecimento da polaridade celular, essencial para a formação dos embriões (Parrot et al., 1991; Thorpe, 1995). A auxina mais utilizada na

indução de embriões somáticos é o 2,4-D seguido pelo ANA e AIB (Raemakers et al., 1995, Hirai et al., 1997). Neste sentido, o 2,4-D tem sido utilizado em *Avena* (Lamb et al., 2002; Bered et al., 1996), *Euterpe* (Guerra et al., 2000), *Gossypium* (Sun et al., 2003) e *Allium* (Van Der Valk et al., 1992), enquanto que o ANA foi efetivo na indução de embriões somáticos de *Simarouba* (Rout & Das, 1994), *Psophocarpus* (Dutta Gupta et al., 1997), *Picea abies* (Ramarosandrana & Van Staden, 2003) e *Carthamus* (Mandal et al., 1995).

Na maioria das espécies, a presença das auxinas ativam genes necessários para alcançar o estágio globular dos embriões, inibindo o subsequente desenvolvimento dos mesmos (Parrot et al., 1991; Zimmerman, 1993). Ao mesmo tempo, as auxinas estimulam a formação contínua de novos embriões, os quais permanecem em fase inicial de desenvolvimento, cujo processo é descrito como embriogênese repetitiva ou secundária. A maior vantagem da embriogênese somática secundária é a produção de massas embriogênicas ou embriões somáticos em larga escala (Baker & Werzstein, 1995). Porém, é necessário determinar as condições ideais para a manutenção dos ciclos repetitivos e, ao mesmo tempo, evitar a formação de embriões em diferentes estádios de desenvolvimento (Grey & Purohit, 1991). Conforme Parrot et al. (1991) e Thorpe (1995), os ciclos repetitivos são quebrados pela remoção ou redução dos níveis de auxina no meio, permitindo que os embriões somáticos passem por todos os estádios de desenvolvimento até formarem uma planta completa. Conforme Zimmerman (1993), a remoção das auxinas do meio resulta em uma reprogramação gênica que favorece a maturação e a germinação dos embriões.

Em várias culturas, as citocininas também são importantes para a indução da embriogênese somática (Merkle et al., 1995), sendo utilizadas na presença ou não de auxina. A BAP é a citocinina utilizada com maior frequência, seguida pela cinetina e thidiazuron (Raemakers et al., 1995). A BAP foi essencial para a indução de embriões somáticos em folhas de *Coffea arabica* (Maciel et al., 2003). Combinações de BAP e 2,4-D (May & Trigiano, 1991; Häggman et al., 1999; Bered et al., 1996) ou BAP e ANA (Dutta Gupta et al., 1997; Rout & Das, 1994; Mandal et al., 1995; Ramarosandrana & Vanstanden, 2003) têm sido efetivas na indução de embriões somáticos em várias espécies. As citocininas, juntamente com o ácido giberélico (GA₃), também são muito utilizadas para favorecer o desenvolvimento e a germinação dos embriões somáticos (Litz & Jarret, 1991; Guerra et al., 1999).

O ácido abscísico (ABA) favorece a maturação (armazenamento de reservas), o desenvolvimento e a produção de embriões somáticos normais, evitando a germinação precoce (Grey & Purohit, 1991, Parrot et al., 1991; Van Der Vak et al., 1992; Sun et al., 2003). Da mesma forma, o aumento da concentração osmótica do meio evita a germinação precoce e desenvolvimento de embriões anormais, aumentando a taxa de conversão dos embriões em plantas (Guerra et al., 1999; Cangahuala-Inocente, 2002).

O processo de indução e modulação da embriogênese somática consiste em dois ciclos (Guerra et al. 1999). No ciclo A, explantes jovens com competência embriogenética são cultivados em meio contendo auxina ou auxina e citocinina. A cultura, em geral mantida no escuro, forma células embriogenéticas que podem ou não evoluir para embriões somáticos globulares. Nesta fase, biorreatores podem ser utilizados para a produção contínua de embriões somáticos, através da embriogênese repetitiva (Baker & Werzstein, 1995). No ciclo B, os ciclos repetidos são interrompidos, tendo em vista o desenvolvimento, a maturação e a germinação dos embriões. Para isso, os embriões juvenis são estimulados a prosseguir seu desenvolvimento através da transferência dos mesmos para um novo meio nutritivo isento ou contendo baixas concentrações de auxinas. Na maioria dos genótipos, o desenvolvimento e a conversão dos embriões em plantas são favorecidos em meio desprovido de fitoreguladores (May & Trigiano, 1991; Castillo & Smith, 1997; Guerra et al., 2000), com baixas concentrações de auxinas (Mandal et al., 1995) e/ou citocininas (Van Der Valk et al., 1992; Dutta Gupta et al., 1997; Lamb et al., 2002;) e/ou suplementado com GA₃ (Cangahuala-Inocente, 2002). Além disso, a presença de ABA (Van Der Valk et al., 1992, Rout & Das, 1994; Dutta Gupta et al., 1997; Carrier et al., 1997) e/ou substâncias que promovam estresse osmótico (Cangahuala-Inocente, 2002), como o polietilenoglicol (PEG), manitol, sacarose, sorbitol, mio-inositol e outros são importantes para prevenir a germinação precoce e aumentar a frequência de plantas normais. Tanto o ABA quanto os agentes osmorreguladores estimulam a síntese e a acumulação de substâncias de reserva, semelhante ao que ocorre na embriogênese zigótica (Häggman et al., 1999). Em geral, este ciclo é conduzido sob condições de luminosidade (Guerra et al., 1999).

Problemas durante as etapas de desenvolvimento, maturação, germinação e conversão dos embriões são comuns. Em geral, as falhas na formação de plantas ocorrem devido à presença de anormalidades nos embriões, como por exemplo a falta de desenvolvimento completo dos meristemas (Ribas, 1999), variações no número de cotilédones (Vasil, 1982), falta de reservas (Alemanno et al., 1997), dormência (Carrier et al., 1997) e efeito residual das auxinas (Parrot et al., 1991).

2.2.2 Calogênese

O calo é um aglomerado de células e tecidos formado pela intensa divisão das células do explante (George & Sherrington, 1984; Brown & Charlwood, 1990). O tipo de calo formado em um determinado genótipo, seu grau de diferenciação celular e potencial morfogenético dependem sobretudo do explante, meio de cultura e fitoreguladores (George & Sherrington, 1984; Rech et al., 1998). Os calos também diferem em textura, consistência e coloração. Diferentes texturas podem ser observadas nos calos: lisa, irregular, nodular ou farinácea. Alguns calos são compactos e crescem vagarosamente, outros são friáveis e

desintegram-se facilmente quando manipulados. A friabilidade é importante para cultivos de células em suspensão (Barrueto Cid, 1992), pois as células se dividem rapidamente e se dispersam facilmente no meio de cultura. Outros tipos de consistência incluem o calo esponjoso e o pulverulento. Entre os fatores que interferem na consistência dos calos, destacam-se o meio de cultivo, subcultivos (Rech et al., 1998) e fitoreguladores (Flores et al., 2003).

No que diz respeito à coloração, os calos podem apresentar diferentes padrões de coloração. Em geral, os compactos são verdes ou pigmentados com antocianina (Faria, 1996) ou betalaína (Vieira et al., 1995). Os calos friáveis típicos são albinos ou com coloração amarelo claro (Barrueto Cid, 1992), sendo compostos por células de variados tipos, tamanhos e formas. Já os compactos são, em geral, parcialmente diferenciados, o que segundo George & Sherrington (1984), parece estar correlacionado com o desenvolvimento de órgãos, nos quais a expressão de genes que governam a morfogênese são necessários. Os órgãos são formados a partir de grupos de células pequenas, com citoplasma denso e núcleo grande chamados de meristemóides que se formam geralmente na superfície dos calos (George & Sherrington, 1984).

Diversos protocolos de calogênese e morfogênese foram propostos para amarantáceas (Mercier et al., 1992; Vieira et al., 1995; Bennici et al., 1997). Mansur et al. (1994), trabalhando com calogênese a partir de diversos explantes de *Pfaffia paniculata*, verificaram a formação de calos friáveis a partir de segmentos de folhas na presença do 2,4-D e cinetina. Estudos conduzidos por Kagiki et al. (2004) objetivaram a indução de calos e a produção de saponinas em *P. glomerata* em meio suplementado com 2,4-D e cinetina. Por outro lado, em *Pfaffia tuberosa* não há dados publicados sobre calogênese e morfogênese. Em outras espécies, como *Gomphrena macrocephala* (Vieira et al., 1995), *G. officinalis* (Mercier et al., 1992) e *Amaranthus* (Bennici et al., 1997) calos têm sido induzidos a partir de vários explantes, utilizando-se diferentes concentrações de ANA e BAP.

Recentemente, o cultivo de calos têm sido uma alternativa viável para o estudo e a produção de metabólitos secundários (Stojakowska & Kisiel, 1999; Krishnaveni & Rao, 2000; Toker et al., 2003; Kollávorá et al., 2004; Arikat et al., 2004; Yu et al., 2005). Calos com diferentes taxas de crescimento e níveis de diferenciação (friáveis, compactos, apresentando brotos e/ou raízes) podem diferir na capacidade de sintetizar compostos bioativos (Rech et al., 1998; Vieira et al., 1995; Kusakari et al., 2000; Luczkiewicz et al., 2002).

Dependendo do objetivo do trabalho, a cultura de tecidos de plantas medicinais pode ser realizada através da organogênese, embriogênese, a partir de calos ou suspensões celulares (Echeverrigaray et al., 2001). Investigações fitoquímicas dos diferentes cultivos são

necessárias para verificar a produção e o teor de metabólitos de interesse e servirem de subsídios para estudos posteriores.

3 Considerações gerais sobre metabolismo secundário

As plantas constituem uma importante fonte de alimentos para os animais e seu valor nutritivo vem sendo estudado durante décadas. Além dos metabólitos primários, as plantas são capazes de produzir, transformar e acumular vários outros compostos não diretamente relacionados à manutenção da vida, mas que garantem vantagens adaptativas – são os metabólitos secundários (Santos, 2001; Oksman-Caldentey & Inzé, 2004).

O metabolismo secundário é resultado da evolução das plantas, resultando em um maior valor adaptativo (Taiz & Zeiger, 2004; Oksman-Caldentey & Inzé, 2004). Já foram reconhecidas muitas funções das várias classes de metabólitos, como efeitos alelopáticos, defesa contra herbívoros, insetos e microrganismos, proteção contra raios ultra violeta, atração de polinizadores e dispersão de sementes (Santos, 2001; Taiz & Zeiger, 2004; Oksman-Caldentey & Inzé, 2004).

Os metabólitos secundários são derivados biossinteticamente de intermediários do metabolismo primário, portanto estas rotas apresentam uma estreita relação. Segundo Taiz & Zeiger (2004), os compostos secundários são divididos em três grupos gerais: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados. A produção desses compostos é, em geral, baixa (menos que 1% da biomassa seca) (Oksman-Caldentey & Inzé, 2004), sendo resultado dos processos de biossíntese, transporte, degradação e armazenamento, os quais são afetados pelo genótipo, estágio ontogenético e por fatores ambientais (Taiz & Zeiger, 2004). A maioria dos compostos é armazenada nos vacúolos de células que fazem parte de tecidos específicos da planta (Oksman-Caldentey & Inzé, 2004).

Cerca de cem mil compostos oriundos do metabolismo secundário já foram descobertos (Oksman-Caldentey & Inzé, 2004), porém apenas um pequeno número dessas substâncias são conhecidas sob ponto de vista biológico e farmacológico (Echeverrigaray et al., 2001). Os metabólitos secundários caracterizam-se por uma enorme diversidade química, sendo muitos deles quimicamente complexos (Oksman-Caldentey & Inzé, 2004). Atualmente, as técnicas cromatográficas e espectroscópicas têm permitido um avanço na separação e elucidação estrutural de diferentes compostos nos mais diversos grupos de plantas (Gil et al., 2005)

Como são elementos de interação entre os organismos, muitos metabólitos apresentam atividade biológica (Taiz & Zeiger, 2004), sendo utilizados principalmente nas indústrias farmacêutica e alimentícia, bem como nas áreas de cosméticos, perfumaria, agrônômica entre outras (Mantell et al., 1994).

3.1 Fitoecdisteróides

Os fitoecdisteróides compreendem uma família de cerca de 200 esteróides de plantas, cuja estrutura está relacionada com os hormônios esteroidais de artrópodes (Marion-Poll & Descoins, 2002). Estes hormônios, chamados de ecdisteróides, estão presentes em todas as fases de desenvolvimento dos insetos, sendo responsáveis pelo controle de vários aspectos do desenvolvimento, como metamorfose e reprodução (Savchenko et al., 1998; Dinan, 2001; Marion-Poll & Descoins, 2002).

Diversas espécies de plantas apresentam compostos semelhantes ou idênticos aos ecdisteróides, sendo denominados de fitoecdisteróides, cuja função ainda não foi completamente esclarecida, mas parecem exercer um papel importante na defesa das plantas contra insetos não adaptados e a nematóides (Savchenko et al., 1998; Dinan, 2001). Insetos não adaptados que ingerem plantas que contêm fitoecdisteróides podem apresentar sérios distúrbios no desenvolvimento, como redução no peso, alterações na ecdise e/ou mortalidade (Klein, 2004).

A descoberta dos fitoecdisteróides em plantas ocorreu, independentemente, em folhas de *Podocarpus* (Nakanishi et al., 1966) e em raízes de *Achyranthes* (Amaranthaceae) (Takemoto et al., 1967). Subsequentemente, muitos estudos químicos foram conduzidos com diferentes espécies, os quais evidenciaram que este grupo de substâncias é bastante comum nos vegetais. De acordo com Dinan (2001), cerca de 100 famílias de plantas apresentam estes compostos, embora estime-se que apenas 2% da flora mundial tenha sido estudada quanto à presença dos fitoecdisteróides. Os ecdisteróides têm sido encontrados em quantidades consideráveis em várias espécies de amarantáceas (Savchenko et al., 1998), sendo mais estudados nas raízes de *P. glomerata* (Shiobara et al., 1993a), *P. tuberosa* (Nishimoto et al., 1986) e *P. iresinoides* (Nishimoto et al., 1987). A maioria destes compostos ocorre em concentrações baixas, inferiores a 0,1% do peso seco, contudo o tipo e o teor dos ecdisteróides variam de acordo com a parte da planta e estágio de desenvolvimento, bem como com fatores ambientais (Reixach et al., 1996; Dinan, 2001).

Nas últimas décadas, várias espécies de plantas vêm sendo estudadas e cerca de 200 estruturas já foram elucidadas. O composto mais freqüente e abundante nos vegetais é o composto 20-hidroxiecdisona (Reixach et al., 1996; Savchenko et al., 1998; Dinan, 2001), o qual é considerado o principal agente indutor de metamorfose nos insetos (Dinan, 2001).

A estrutura básica dos fitoecdisteróides compreende um esqueleto esteroidal formado por um sistema de anéis, onde se liga uma cadeia lateral alifática. Apresentam várias hidroxilas, cujo número, posição e orientação diferenciam os fitoecdisteróides (Lafont, 1998; Dinan, 2001). Em espécies de *Pfaffia*, o ecdisteróide mais freqüentemente encontrado é a β -ecdisona (C₂₇H₄₄O₇) (Figura 1).

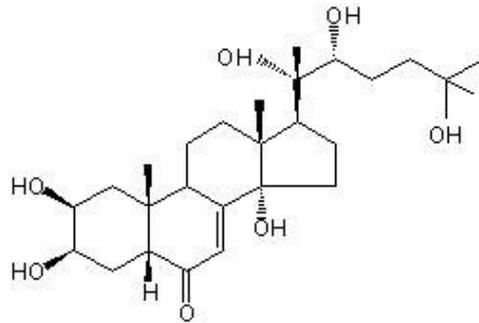


Figura 1 - Estrutura do ecdisteróide β -ecdisona

Em geral, tecidos/órgãos importantes para a sobrevivência da planta contêm uma maior concentração de fitoecdisteróides, o que provavelmente seja devido ao efeito protetor desses compostos contra insetos (Savchenko et al., 2001; Dinan, 2001; Marion-Poll & Descoins, 2002). Em função disso, o doseamento dos fitoecdisteróides vem sendo realizado em diferentes órgãos das plantas (Tomás et al., 1992; 1993; Savchenko et al., 1998).

A biossíntese dos fitoecdisteróides envolve a rota acetato-mevalonato (rota do ácido mevalônico) que ocorre no citosol e, provavelmente, a rota do metileritritolfosfato (rota do MEP), que ocorre nos cloroplastos (Croteau et al., 2000; Taiz & Zeiger, 2004; Klein, 2004). A rota do ácido mevalônico e do MEP levam à formação do isopentenildifosfato (IPP) e do dimetilalildifosfato (DMAPP), respectivamente. Estes compostos são isômeros e se unem para formar intermediários de vários terpenóides. A união de duas moléculas de farnesildifosfato (FPP), catalisada pela esqualeno sintase, resulta na formação do esqualeno, um composto formado por 30 carbonos, precursor dos fitoesteróis e triterpenos. O esqualeno é oxidado para formar o oxidoesqualeno. Existem várias formas alternativas de ciclização do oxidoesqualeno, levando à formação de diferentes esqueletos cíclicos. Este processo é catalisado por um grupo de enzimas, chamadas oxidoesqualeno ciclases, dentre as quais destacam-se a cicloartenol sintase, responsável pela síntese do cicloartenol, o precursor dos fitoesteróis e ecdisteróides e da β -amirina sintase, que catalisa a formação da β -amirina, o composto precursor de saponinas pentacíclicas, como o ácido oleanólico (Croteau et al., 2000; Lee et al., 2004; Taiz & Zeiger, 2004). Fitoesteróis, como o latosterol, são precursores de vários ecdisteróides em *Spinacia* (Grebenok et al., 1994). Recentemente, Okuzumi et al. (2003) constataram que os ecdisteróides produzidos em raízes transformadas de *Ajuga*, são sintetizados a partir do clerosterol produzido a partir do cicloartenol. Estudos conduzidos em *Polypodium* demonstraram que o ecdisteróide ecdisona (E) é o precursor de vários outros ecdisteróides com 27 carbonos, como a 20-

hidroxiecdisona (20-E, polipodine A, ecdisterona ou β -ecdisona) (Reixach et al., 1996). Estudos biossintéticos conduzidos durante o cultivo *in vitro* de *Polypodium vulgare*, mostraram que o mevalonato, o colesterol e a ecdisona radiomarcados foram incorporados nos vários fitoecdisteróides estudados (Reixach et al., 1996). A produção da 20-E a partir da E envolve a adição de um átomo de oxigênio no carbono 20, reação catalisada pela ecdisona 20-monoxigenase (Grebenok et al., 1996). Além disso, em *Zea mays* (Devarenne et al., 1995) e em *Spinacia oleracea* (Grebenok et al., 1994), a E conjugada com o fosfato parece ter um importante papel no transporte dos ecdisteróides, bem como na regulação do metabolismo destes compostos. Segundo Grebenok et al. (1994), em espinafre, a ecdisona-P inibe a biossíntese dos fitoesteróis e dos fitoecdisteróides (Figura 2).

Além dos ecdisteróides, a partir da rota do ácido mevalônico e do MEP são produzidos outros compostos com importantes atividades farmacológicas, as quais são encontrados em espécies de *Pfaffia*, como as saponinas pentacíclicas e os fitoesteróis (Croteau et al., 2000; Klein, 2004).

O papel biológico dos fitoecdisteróides ainda não foi completamente elucidado. Sabe-se que estes compostos atuam na defesa das plantas contra insetos fitófagos não adaptados, pois plantas que contêm altos teores de fitoecdisteróides são menos atacadas por pragas quando comparadas a plantas que não sintetizam estes compostos. Esta hipótese também tem como suporte o fato da 20-hidroxiecdisona ser o ecdisteróide encontrado em maior concentração tanto nas plantas como nos insetos (Dinan, 2001; Savchenko et al., 1998).

Poucos estudos foram conduzidos em relação aos fatores que induzem uma maior produção de fitoecdisteróides. Em espinafre, foi observado que a produção dos fitoecdisteróides é incrementada por danos mecânicos, injúrias causadas por insetos, bem como pela presença de jasmonato (Dinan, 2001), um composto indutor do metabolismo secundário (Taiz & Zieger, 2004).

Nas últimas décadas, as pesquisas com os fitoecdisteróides têm recebido muita atenção devido aos seus efeitos no desenvolvimento de insetos, sendo importantes para diversas áreas agronômicas. Dentre as aplicações dos fitoecdisteróides na agricultura, destacam-se o melhoramento na produção da seda pelo *Bombix mori*, o desenvolvimento de agentes de controle de pragas mais específicos e o melhoramento de plantas cultivadas através do aumento da produção de fitoecdisteróides (Dinan, 2001; Dinan et al., 2001).

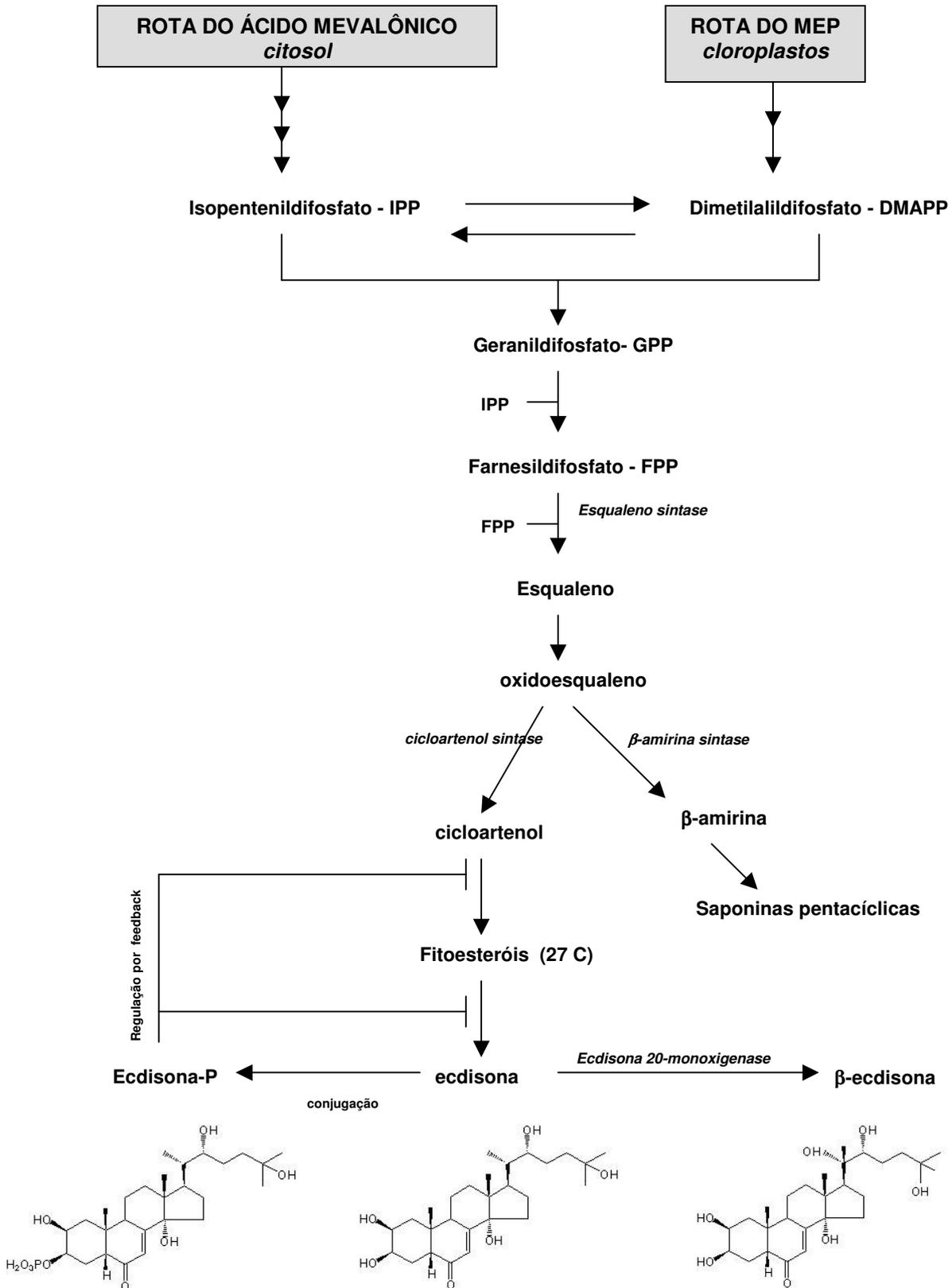


Figura 2 – Esquema simplificado da rota biossintética dos fitoesteróis e fitoecdisteróides com 27 carbonos e das saponinas pentacíclicas com estrutura do tipo oleanano.

Além de aplicações na área agrônômica, os fitoecdisteróides também são alvos de estudos farmacológicos. Apesar dos poucos estudos conduzidos com compostos isolados, a presença destes compostos nos vegetais parece ser benéfica à saúde. Segundo Sláma et al. (1996), os fitoecdisteróides são moderadamente anabólicos sendo utilizados por atletas, desde a década de 80, para melhorar a performance física. Estudos conduzidos com *Leuzea cathamoides*, mostraram que os ecdisteróides presentes na planta atuam como fortificantes, adaptógenos e antidepressivos (Sláma & Lafont, 1995). Várias pesquisas conduzidas com diferentes espécies de plantas medicinais mostraram que os efeitos adaptógenos estão relacionados à presença de fitoecdisteróides (Klein, 2004). Alguns ecdisteróides de *Ajuga* apresentaram efeitos anti-cancerígenos (Takasaki et al., 1999). Outros relatos destacam que estes compostos são efetivos no controle do diabetes (Najmutdinova & Saatov, 1999) e apresentam efeitos antimicrobianos (Ahamad et al., 1996).

Em outras espécies medicinais de grande importância, como o *Panax ginseng*, pesquisas vem sendo realizadas com o objetivo de aumentar a produção de triterpenos e fitoesteróis, através da superexpressão da rota do mevalonato (Lee et al., 2004). Tanto no ginseng coreano (*Panax ginseng*) (Lee et al., 2004) como no ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*) (Figueiredo et al., 2004), a produção de fitoesteróis e de triterpenos está diretamente relacionada à qualidade farmacológica das plantas. Neste contexto, grande parte das pesquisas conduzidas com o ginseng brasileiro vem avaliando a produtividade de raízes, bem como os teores de fitoecdisteróides (Montanari et al., 1999; Magalhães, 2000; Figueiredo et al., 2004; Kagiki et al., 2004; Zimmer et al., 2006) ou de saponinas presentes nestes órgãos (Vigo et al., 2004b).

3.1.1 Marcador químico do ginseng brasileiro: o ecdisteróide β -ecdisona

Atualmente, medicamentos fitoterápicos vem sendo produzidos à base de extratos secos de raízes de *Pfaffia glomerata*, os quais são comercializados na forma de cápsulas (Brasil, 2004). A matéria-prima utilizada pela indústria farmacêutica é obtida de fornecedores nacionais ou de forma extrativista (Figueiredo et al., 2004).

No Brasil, para que seja realizado o registro no Ministério da Saúde, os produtos fitoterápicos passam por um rígido controle de qualidade à semelhança dos medicamentos alopáticos, procedimentos que garantem a eficácia e a segurança desses produtos (Gil et al., 2005). Considerando a Legislação de fitoterápicos vigente no Brasil, o controle da qualidade da matéria-prima e do produto final de *P. glomerata* é feito através de ensaios físico-químicos e microbiológicos, conforme exigência da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Brasil, 2004). Atualmente, o método analítico utilizado na análise química da matéria-prima (raízes) de *P. glomerata* é a determinação do teor de β -ecdisona através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE/HPLC) (Brasil, 2004). Desta

forma, nos dias atuais, o ecdisteróide β -ecdisona é utilizado como marcador químico da qualidade das raízes de *P. glomerata*. Segundo Gil et al. (2005), o uso de marcadores químicos é muito comum quando os princípios ativos da planta não estão determinados ou disponíveis na forma de padrões, como é o caso da *P. glomerata*. Em adição, o HPLC, uma das técnicas mais empregadas nos laboratórios de pesquisa e de controle de qualidade no mundo, vem sendo importante na realização de análises de cunho qualitativo e quantitativo (Gil et al., 2005) em várias espécies de interesse medicinal.

Análises feitas em raízes de diferentes acessos de *P. glomerata* mostraram teores de β -ecdisona variando de 0,15 a 0,75%, mostrando que a espécie apresenta uma grande variabilidade em relação ao acúmulo deste metabólito (Montanari et al., 1999; Figueiredo et al., 2004; Freitas et al., 2004; Zimmer et al., 2006). Segundo Figueiredo et al. (2004), estas variações no conteúdo de β -ecdisona podem ser devido a diferenças na metodologia de análise, nas condições ambientais de cultivo, bem como no material genético utilizado na pesquisa.

4 Aspectos gerais sobre a produção de metabólitos secundários através da cultura de tecidos

Várias estratégias vêm sendo empregadas com o intuito de maximizar os valores de produtividade de compostos secundários em cultura de tecidos vegetais, incluindo a seleção de material vegetal produtivo, a manipulação dos componentes do meio de cultura e das condições de cultivo *in vitro*, o efeito da citodiferenciação, o uso de biotransformações e a eliciação (Rao & Ravishankar, 2002). Estes fatores são referidos por Verpoorte & Maraschin (2001) como manipulação epigenética.

A produção de metabólitos através de plantas cultivadas *in vitro* apresenta inúmeras vantagens como:

- a) a independência de fatores ambientais como clima, temperatura, luminosidade, solo, espaço, etc.;
- b) o controle e a otimização das condições de crescimento *in vitro*;
- c) a seleção e a produção de genótipos homogêneos em larga escala;
- d) a possibilidade de produzir compostos normalmente não encontrados na planta mãe;
- e) a maior facilidade para o estudo sobre o metabolismo dos compostos;
- f) um maior controle na produção, na estabilidade e qualidade dos produtos, sendo os fatores tempo, custos e preços bem mais previsíveis quando comparado com os métodos

tradicionais (Mantell et al., 1994; Fowler, 1997; Echeverrigaray et al., 2001; Rao & Ravishankar, 2002; Oksman-Caldentey & Inzé, 2004).

Contudo, a produção de compostos secundários *in vitro*, em escala industrial, é limitada por vários fatores, destacando-se a baixa produtividade, a instabilidade da produção e a falta de conhecimento sobre o metabolismo dos compostos (Oksman-Caldentey & Inzé, 2004). Desta forma, existem poucos exemplos de utilização da cultura de tecidos vegetais para a produção de metabólitos em escala comercial. Porém, existem algumas substâncias de alto valor produzidas com sucesso *in vitro*, como a chiconina extraída de *Lithospermum erythrorhizon*, a berberina de *Coptis japonica*, a sanguinarina produzida por *Papaver somniferum* e o ácido rosmarínico extraído a partir de células de *Coleus blumei* (Rao & Ravishankar, 2002; Oksman-Caldentey & Inzé, 2004).

Um grande número de pesquisas tem sido feitas no sentido de monitorar e comparar a produção de metabólitos em órgãos, calos, células em suspensão, raízes transformadas e/ou plantas transgênicas cultivadas *in vitro* (Botta et al., 2001; Verpoote & Maraschin, 2001; Rao & Ravishankar, 2002; Oksman-Caldentey & Inzé, 2004).

Em geral, o método mais utilizado para o estudo da produção de metabólitos é cultivo de células em suspensão (Botta et al., 2001). Para isso, faz-se necessário a determinação prévia de protocolos eficientes para a indução e manutenção de calos friáveis. Vários grupos de produtos naturais importantes para as indústrias farmacêuticas e de alimentos já foram isolados a partir de células em suspensão (Rao & Ravishankar, 2002).

A constatação de que ocorrem modificações no teor de compostos de acordo com o grau de diferenciação dos tecidos levou ao desenvolvimento de um grande número de pesquisas com o intuito de estudar a viabilidade de produção de compostos em calos com diferentes características, principalmente no que diz respeito à consistência e potencial morfogênico. Em *Rauwolfia sellowii*, uma maior produção de alcalóides indólicos foi observada nos calos quando comparada ao cultivo em suspensão, o que pode ser devido a maior diferenciação das células calosas (Rech et al., 1998). Calos de *Gomphrena* (Amaranthaceae), possuem potencial para a produção de vários metabólitos *in vitro*, inclusive compostos não observados na planta mãe (Vieira et al. 1995; Andre et al., 2003). Kusakari et al. (2000) complementaram que não foram encontradas saponinas em calos de *Bupleurum falcatum*, mas nas raízes adventícias formadas nos calos, o que sugere que a diferenciação celular foi necessária para a biossíntese desses compostos.

O cultivo de órgãos diferenciados, os quais são mais estáveis, têm sido uma alternativa para aumentar a produção de compostos de interesse (Rao & Ravishankar, 2002; Oksman-Caldentey et al., 2004). França (2001) relatou que quando alguma diferenciação morfológica é induzida nas culturas, como a formação de brotos, raízes ou embriões, o teor de metabólitos bioativos pode aumentar significativamente. Furuya et al.

(1986), ao estudar o efeito da diferenciação de culturas de *Panax ginseng* (Araliaceae) sobre a produção de saponinas, observaram que as raízes *in vitro* produziram mais saponinas quando comparada aos calos e às raízes da planta matriz.

Neste contexto, a micropropagação de plantas medicinais torna-se um método vantajoso, tanto para a produção clonal como para a produção de compostos ativos. Arikat et al. (2004) verificaram que o conteúdo de óleo essencial de plantas de *Salvia fruticulosa* micropropagadas *in vitro* foi superior ao produzido pelas plantas em casa de vegetação. Rao & Ravishankar (2002) adicionaram, ainda, a importância do cultivo de brotos na produção de atropina por *Atropa belladonna* e do cultivo de raízes na produção de betalaína em *Beta vulgaris*. Karam et al. (2003) constataram que em *Salvia fruticulosa*, independente do tipo de cultivo (calos, cultura de células em suspensão e cultivo de raízes), a produção de ácido rosmarínico foi maior quando comparada a plantas mantidas em casa de vegetação.

Há pouco tempo, a produção de raízes transformadas por *Agrobacterium rhizogenes* vêm avançando rapidamente e, hoje em dia, representa um grande progresso na viabilização da produção de metabólitos (Bensaddek et al., 2001; Królicka et al., 2001; Luczkiewicz et al., 2002; Kuzovkina et al., 2004; Yu et al., 2005). As raízes transformadas apresentam vantagens sobre os demais cultivos como a alta taxa de crescimento e proliferação em meio isento de reguladores de crescimento, a maior estabilidade na produção e a capacidade de sintetizar compostos encontrados nas raízes ou em outras regiões da planta (Królicka et al., 2001; Rao & Ravishankar, 2002; Oksman-Caldentey et al., 2004; Yu et al., 2005).

Em outro contexto, a organogênese indireta pode levar à regeneração de plantas com novas características. A seleção das plantas baseia-se na identificação de variantes somaclonais com maior capacidade de produzir metabólitos secundários (Rotgé, 1991). A seleção dos somaclones é facilitada quando se trata de metabólitos que podem ser detectados visualmente, como os corantes utilizados na indústria alimentícia (carotenóide, antocianina, betalaína), no entanto, em outros casos, torna-se necessária a realização de análises fitoquímicas para compostos de interesse, a fim de selecionar as plantas mais produtivas. Karam et al. (2003) afirmaram que o teor de ácido rosmarínico em *Salvia fruticulosa* variou em diferentes plantas regeneradas *in vitro*.

É importante salientar que é muito difícil comparar o teor de um determinado metabólito produzido a partir de células e/ou tecidos *in vitro* com teores produzidos nos tecidos de plantas completas. Conforme Mantell et al. (1994) e Pletsch (1998), a produtividade de metabólitos *in vitro* pode ser inferior ou superior quando comparada a plantas inteiras. A redução na produção de um composto pode ser explicada pela perda da diferenciação dos tecidos e órgãos em culturas de calos friáveis ou células. Outro fator

decorre do fato de que muitos metabólitos são produzidos em um tecido, sendo posteriormente transportados e armazenados em outros tecidos e, muitas vezes, a planta *in vitro* não possui tecidos suficientemente diferenciados para que estes processos de síntese, transporte e armazenamento ocorram. A falta de enzimas específicas necessárias para a síntese e armazenamento em tecidos parcial ou totalmente indiferenciados também pode levar a uma redução na produtividade de metabólitos em culturas *in vitro*.

Deve ser levado em consideração que a produção de metabólitos é o resultado da interação entre os processos de síntese, degradação, transporte e armazenamento, processos que dependem de enzimas específicas que atuam em tecidos/órgãos especializados da planta. Apesar da grande complexidade do processo, a manipulação de diferentes fatores que interferem no cultivo *in vitro* mostra que é possível aumentar a produção de determinados metabólitos secundários.

No momento atual, resultados promissores vêm sendo obtidos na produção de metabólitos secundários utilizando a engenharia metabólica. Esta tecnologia busca manipular as rotas bioquímicas de modo a aumentar a produção e o acúmulo de compostos de interesse, visando à otimização das atividades celulares pela manipulação das funções enzimáticas e regulatórias das células, através da tecnologia do DNA-recombinante (Verpoorte & Maraschin, 2001; Zhang et al., 2002; Rao & Ravishankar, 2002; Oksman-Caldentey & Inzé, 2004).

4.1 Produção de fitoecdisteróides *in vitro*

Os métodos tradicionais utilizados para otimizar o conteúdo de ecdisteróides na *Pfaffia glomerata* estão baseados na exploração da variabilidade genética natural das espécies (Figueiredo et al., 2004). No entanto, a produção de ecdisteróides mostra-se muito variável, possivelmente devido aos diferentes genótipos (Figueiredo et al., 2004), estágio ontogenético e fatores ambientais (Montanari et al., 1999; Magalhães, 2000).

Em adição, as coletas indiscriminadas das raízes dificultam a propagação do ginseng brasileiro em seu ambiente natural, levando à perda de muitas populações ainda não estudadas (Figueiredo et al., 2004). A cultura de tecidos vegetais é uma alternativa aos métodos convencionais de produção de biomassa e metabólitos secundários (Verpoorte & Maraschin, 2001) e várias pesquisas indicam a possibilidade de produção dos fitoecdisteróides a partir de tecidos cultivados *in vitro* (Tomás et al., 1992; 1993). Além disso, a cultura de células, calos, órgãos e plantas *in vitro*, bem como de raízes transformadas geneticamente, representam uma valiosa ferramenta para estudos biossintéticos (Delbecque et al., 1995; Reixach et al., 1996; Okuzumi et al., 2003).

Os primeiros relatos sobre a ocorrência de ecdisteróides *in vitro* foram feitos em calos de *Achyranthes* (Amaranthaceae) (Hikino et al., 1971) e *Trianthema* (Ravishankar & Metha,

1979). Posteriormente, estes compostos foram detectados em diversas espécies e diferentes sistemas de cultivo *in vitro*, como em células, calos e plantas micropropagadas. A produção de fitoecdisteróides em células em suspensão de *Pteridium* foi superior à encontrada na planta matriz (Vanek, 1990; Svatos & Macek, 1994). Em *Polypodium vulgare*, Reixach et al. (1996) constataram que todos os fitoecdisteróides detectados na planta intacta estavam presentes nas plantas cultivadas *in vitro*. Além disso, diferentes tecidos de *P. vulgare* cultivados *in vitro* diferiram no teor e composição de fitoecdisteróides, sendo a síntese *in vitro* comparável ou superior àquela da planta matriz. Estudos conduzidos em raízes e parte aérea de plantas micropropagadas de *Ajuga* evidenciaram que a síntese dos ecdisteróides ocorre nas raízes da planta, as quais apresentaram um alto teor destes compostos (Tomás et al., 1992; 1993). Após constatar que determinados tecidos de *Polipodium* produzem teores mais elevados de ecdisteróides em relação à planta *in vivo*, Reixach et al. (1997) vêm estudando condições para otimizar a produção desses compostos *in vitro*. O cultivo de calos e raízes de *Ajuga* produziram duas a seis vezes mais 20-hidroxiecdisona (superior a 0,5%) em relação à parte aérea e raízes da planta silvestre (Camps et al., 1990). Em *Serratula*, a produção de fitoecdisteróides em calos foi superior à das plantas cultivadas *in vitro*, mas inferior à encontrada na planta silvestre (Anufrieva et al., 1998). De acordo com Dinan (2001), a produção de fitoecdisteróides *in vitro* é influenciada pelo tipo de explante, pela adição de fitoreguladores no meio de cultura, bem como pelo tempo de cultivo. A produção de ecdisteróides em *Ajuga* aumentou com a adição de fitoreguladores ao meio nutritivo, bem como com o período de cultivo *in vitro* (Tomás et al., 1993).

Apesar do fitoecdisteróide β -ecdisona ser utilizado como marcador químico da qualidade das raízes de *Pfaffia glomerata*, não há pesquisas referentes à produção deste composto a partir de plantas oriundas da propagação clonal ou de calos produzidos *in vitro*. Por outro lado, *P. tuberosa* é uma espécie pouco conhecida sob o ponto de vista químico e biológico, cuja produção β -ecdisona foi estudada apenas no sistema radicular de plantas *in vivo* (Nishimoto et al., 1986). Assim, estudos referentes à produção de ecdisteróides *in vivo* e *in vitro* nessas espécies de *Pfaffia* fornecerão novas informações à indústria de fitoterápicos, além de contribuir para um melhor entendimento do metabolismo desses compostos na planta.

CAPÍTULO 1

Micropropagação e produção de β -ecdisona em

Pfaffia tuberosa e Pfaffia glomerata

1.1 Otimização da micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken

RESUMO: Este trabalho objetivou otimizar o protocolo de micropropagação de *Pfaffia tuberosa*, uma espécie medicinal encontrada em várias regiões do Brasil. O tratamento da planta matriz com Benomyl (0,1%) e o uso sucessivo de soluções com detergente comercial (duas gotas/100mL de água, durante dois minutos), etanol (70%, por 10 segundos), Hipoclorito de sódio (1%) + detergente comercial (duas gotas/100mL de água, por 10 minutos) e HgCl₂ (0,1%, por 5 minutos) na etapa de desinfestação dos explantes foram eficazes para a limpeza e regeneração de plantas. As plantas foram subcultivadas para meio MS a cada 30 dias. Explantes provenientes de segmentos nodais apresentaram uma maior taxa de multiplicação quando comparados aos apicais. Não foi observado declínio na taxa de propagação no decorrer de cinco subcultivos. As mudas apresentaram um índice elevado de sobrevivência durante a fase de aclimatização.

Palavras-chave: planta medicinal, cultura de tecidos, Amaranthaceae, ginseng brasileiro, desinfestação

Optimization of the micropropagation of *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken

ABSTRACT: This work aimed at optimizing the micropropagation protocol of *Pfaffia tuberosa*, a medicinal species found in several regions of Brazil. The treatment of donor plants with benomyl (1%), successively followed with solutions of commercial detergent (2 drops/100mL water; for 2 min), ethanol (70%; for 10 seconds), sodium hypochloride (1%) + commercial detergent (2 drops/100mL water; for 10 minutes) and HgCl₂ (0.1%; for 5 min) on the disinfection step of explants were suitable for disinfection and plant regeneration. *In vitro* plantlets were subcultured to a new MS medium at 30 days intervals. Explants from nodal segments showed a higher multiplication rate when compared to apical segments. A decline was not observed on the propagation rate during five successive subcultives *in vitro*. Plantlets showed an elevated index of survival in the acclimatization step.

Key words: medicinal plant, tissue culture, Amaranthaceae, brazilian ginseng, disinfection

INTRODUÇÃO

Pfaffia tuberosa (Amaranthaceae) é uma espécie medicinal conhecida como corango-de-batata ou ginseng brasileiro, utilizada popularmente para o tratamento da infertilidade. Em estudo fitoquímico com esta espécie, Nishimoto et al. (1986) relataram a presença de compostos medicinais com efeitos adaptógenos (aumento da resistência frente ao estresse) nas raízes de *P. tuberosa*, indicando o potencial desta planta para a indústria farmacêutica.

Assim como a maior parte das espécies nativas, *P. tuberosa* vem sendo coletada por processos extrativos, sendo o material vegetal heterogêneo e de baixa qualidade. Apesar disso, no momento atual, não há dados disponíveis quanto às técnicas de cultivo utilizadas para a produção de mudas nesta espécie. Em outras espécies de *Pfaffia*, a propagação através de estacas mostrou-se viável (Nicoloso et al., 1999), contudo, em condições naturais, *P. tuberosa* apresenta caules frágeis com entrenós muito curtos, o que dificulta este tipo de propagação. Semelhante ao observado em *P. glomerata* (Magalhães, 2000), a

propagação de *P. tuberosa* através de sementes deve originar plantas muito heterogêneas, visto que ambas as espécies apresentam grande variabilidade morfológica e genética (Taschetto & Pagliarini, 2003). Tendo em vista a necessidade de plantas para estudos químicos e a crescente demanda de matéria-prima para a indústria de fitoterápicos, torna-se fundamental o desenvolvimento de técnicas que tenham como propósito a produção de mudas de qualidade de *P. tuberosa*.

A micropropagação de plantas medicinais tem se difundido devido à possibilidade de produzir um grande número de plantas homogêneas e com elevada qualidade sanitária, a possibilidade de conservar o germoplasma, garantindo a manutenção da biodiversidade, além de auxiliar no melhoramento genético. Dentre os fatores biológicos que afetam a propagação clonal *in vitro*, destacam-se o genótipo, o tipo de explante e as condições fisiológicas e sanitárias dos mesmos, a manutenção da totipotência e a estabilidade genética (Hussey, 1986). Tendo em vista a propagação de plantas homogêneas e geneticamente estáveis, os explantes ideais para a regeneração são aqueles contendo gemas pré-existentes, como os segmentos nodais e apicais (Debergh & Read, 1991), uma vez que, não sendo necessária a desdiferenciação celular, há uma menor probabilidade de regeneração de plantas com variação somaclonal. Em geral, sob condições ideais, esses explantes regeneram plantas por longos períodos de tempo; porém, em algumas espécies, há uma redução na organogênese ao longo dos subcultivos (Hussey, 1986; Mantell et al., 1994). Além disso, a determinação da duração da cultura e do intervalo entre os subcultivos são aspectos essenciais para evitar a regeneração de plantas com alterações genéticas e/ou epigenéticas (Klerk, 1990).

Recentemente, estudos referentes à propagação clonal *in vitro* de *P. tuberosa* foram conduzidos por Martins & Nicoloso (2004), os quais demonstraram uma elevada contaminação (60%) na fase de inicial de cultivo, um bom desenvolvimento de segmentos nodais em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) e uma baixa sobrevivência (10%) na fase de aclimatização. Dessa forma, o elevado índice de contaminação e a dificuldade de estabelecimento *ex vitro* das plantas micropropagadas inviabilizam o uso dessa metodologia para a produção de *P. tuberosa* em escala comercial. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi otimizar a micropropagação de *P. tuberosa*.

MATERIAL E MÉTODOS

Plantas jovens de *P. tuberosa*, existentes no campus da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), foram transplantadas para recipientes contendo solo e mantidas no Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Biologia da UFSM, RS. Uma exsicata da planta foi depositada no Herbário do Departamento de Biologia, sob o número SMDB 9840.

Os brotos de uma mesma planta foram tratados com Benomyl (0,1%) antes da desinfestação dos explantes. O processo de desinfestação dos brotos consistiu de seis etapas realizadas sucessivamente, como segue: 1) lavagem em água com detergente comercial neutro (2 gotas/100 mL) durante 2 minutos; 2) imersão em solução de álcool 70% por 10 segundos; 3) imersão dos segmentos caulinares em solução de Hipoclorito de sódio a 1% acrescido de detergente (2 gotas/100 mL) por 10 minutos; 4) três lavagens em água; 5) imersão em solução de Cloreto de mercúrio (HgCl_2) a 0,1%, durante um período de cinco minutos; 6) seis lavagens consecutivas em água destilada e autoclavada. Todas as etapas foram feitas sob agitação constante. Todos os explantes foram submetidos ao mesmo processo de desinfestação.

Segmentos nodais (1 cm) foram cultivados em meio MS acrescido de 30 g L^{-1} de sacarose, 100 mg L^{-1} de mio-inositol e 6 g L^{-1} de ágar, conforme metodologia estabelecida por Martins & Nicoloso (2004). O pH foi ajustado para 5,9. O material foi mantido em sala de crescimento sob temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade luminosa de $35 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas-frias.

Os brotos desenvolvidos *in vitro* foram subcultivados (1^o subcultivo) em novo meio nutritivo de igual composição, quinze dias após a desinfestação, devido aos sintomas de toxidez observados na base dos explantes. Subseqüentemente, as plantas foram subcultivadas a cada 30 dias, totalizando cinco subcultivos.

As avaliações foram realizadas ao final de cada subcultivo mediante as seguintes variáveis: presença de contaminação microbiana (fúngica e bacteriana), percentagem de explantes com sintomas de toxidez devido às soluções utilizadas na desinfestação, percentagem de regeneração e sobrevivência dos explantes, número médio de brotações, número médio de segmentos nodais por planta, comprimento médio dos brotos (cm), comprimento médio da maior brotação, percentagem de enraizamento, número médio de raízes por planta. Adicionalmente, avaliou-se o potencial morfogênico de segmentos nodais e segmentos apicais ao longo de 32 dias de cultivo, tendo em vista o estabelecimento do tempo de permanência *in vitro* para esta espécie. Os explantes foram cultivados nas mesmas condições descritas anteriormente, sendo avaliados a cada quatro dias mediante a percentagem de regeneração e enraizamento, número médio de brotos, número médio de segmentos nodais, tamanho médio dos brotos e número médio de raízes.

Plantas completas, com 30 dias, pertencentes ao quinto subcultivo, foram transferidas para recipientes plásticos (2000 cm^3) contendo 1000 cm^3 de substrato comercial Plantmax[®] Hortaliças e mantidas em casa de vegetação sob condições de luminosidade parcial (sombra), temperatura e fotoperíodo naturais. A umidade do substrato foi mantida entre 45 e 60% da capacidade de campo, através de irrigações com água destilada, conforme recomendações de Skrebsky et al. (2004). Cada recipiente de cultivo foi coberto com

plástico transparente. Sete dias após o plantio, a cobertura de plástico começou a ser retirada durante um período de duas horas por dia⁻¹, aumentando-se gradativamente uma hora por dia⁻¹ até completar doze horas, quando as plantas foram mantidas cobertas apenas durante a noite. Subseqüentemente, aos 25 dias após o plantio, a cobertura foi inteiramente retirada. As folhas das plantas foram mantidas úmidas com o auxílio de um aspersor contendo água destilada e autoclavada, principalmente nos primeiros vinte dias. A percentagem de sobrevivência das plantas foi avaliada após 30 dias do transplante para o substrato.

O delineamento experimental foi o inteiramente ao acaso com cinco repetições, sendo cada repetição formada por cinco a dez plantas. Os dados foram submetidos à análise de variância e analisados pelo teste de Duncan em nível de 1% de probabilidade de erro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A metodologia de desinfestação adotada foi considerada muito eficiente devido à ausência de contaminações fúngicas ou bacterianas no decorrer do período de incubação. Após a desinfestação, verificou-se que a maioria das plantas (62%) desenvolveu brotos normalmente; porém, 23,1% mostraram sintomas de toxidez na porção basal do explante e 15% na parte aérea. Na base dos explantes, os sintomas mais freqüentes foram necrose, engrossamento e curvatura. Na parte aérea, foram observadas folhas mal formadas, pouco desenvolvidas ou apresentando curvatura anormal.

Contudo, como pode ser observado na Figura 1, apesar de 39% dos explantes demonstrarem sensibilidade aos tratamentos utilizados na desinfestação, constatou-se 100% de sobrevivência e regeneração nos primeiros quinze dias do primeiro subcultivo. No segundo subcultivo, verificou-se que, exceto pela ausência de raízes em 22% das plantas (Figura 2D), os sintomas de sensibilidade ao processo de desinfestação observados anteriormente mostraram-se insignificantes (7%) e não foram constatados nos cultivos subsequentes (Figura 1). Os danos observados nos explantes de *P. tuberosa* ocorreram, possivelmente, devido ao uso seguido de várias soluções desinfestantes e a presença do HgCl₂. Contudo, de uma maneira geral, estas anomalias não comprometeram o desenvolvimento das plantas.

Apesar de o cloreto de mercúrio ser muito utilizado na desinfestação de espécies com problemas de contaminação, George (1993) relatou que este produto é tóxico e deve ser utilizado com muita cautela. Um outro estudo realizado por Martins & Nicoloso (2004) em *Pfaffia tuberosa* concluiu que apenas o uso de HgCl₂ (0,1%), durante cinco minutos, não foi eficiente para a limpeza dos explantes, sendo necessária a realização de várias limpezas sucessivas para a obtenção de 40% dos explantes desinfestados. Neste trabalho, os fatores que podem ter contribuído para o sucesso na limpeza e regeneração dos explantes foram o

uso sucessivo de várias soluções desinfestantes, a época de retirada dos explantes e a qualidade fisiológica e sanitária da planta matriz. O início da fase ativa de crescimento de *P. tuberosa* ocorre preferencialmente na primavera, época em que os brotos, neste estudo, foram estabelecidos com sucesso *in vitro*.

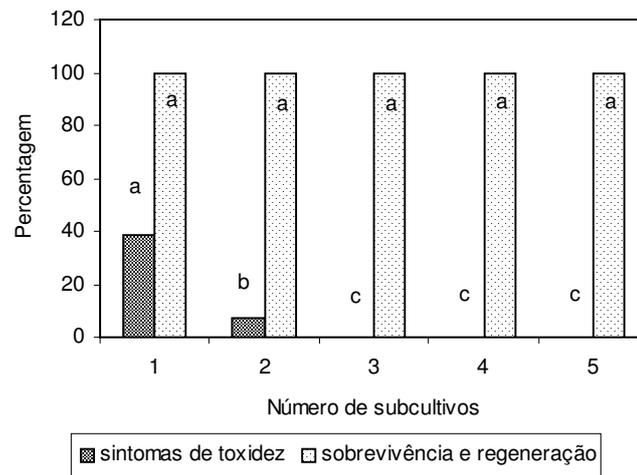


Figura 1 - Percentagem de explantes com sintomas de toxidez em relação às soluções utilizadas durante a desinfestação e percentagem de explantes vivos e regenerados de *P. tuberosa*, no decorrer de cinco subcultivos *in vitro*. Média seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Duncan em nível de 1% de probabilidade de erro.

O início do desenvolvimento dos brotos a partir das gemas axilares ocorreu cerca de cinco dias após a desinfestação dos explantes. Ao contrário dos resultados obtidos neste trabalho, segmentos nodais de *P. tuberosa* (Martins & Nicoloso, 2004) e de *P. glomerata* (Nicoloso et al., 2001) desinfestados somente com $HgCl_2$ (0,1%), durante cinco minutos, apresentaram desenvolvimento aparente após duas semanas de cultivo.

No início do cultivo, observou-se uma taxa de proliferação de segmentos nodais na razão de 1:2 (Figura 2A), sendo que todos os explantes desenvolveram dois brotos (Figura 2B), em geral, uma brotação mais desenvolvida e outra menor (Figura 2C). A partir do início do cultivo, houve um declínio no número de brotos regenerados por explantes; porém, este parâmetro permaneceu estável ao longo dos subcultivos (Figura 2B). Por outro lado, houve um aumento no número de segmentos nodais por planta, os quais mantiveram uma taxa de multiplicação na razão de 1:4 no decorrer dos subcultivos (Figura 2A). O número de subcultivos afetou o crescimento das brotações, observando-se uma redução no tamanho dos brotos a partir do terceiro subcultivo (Figura 2C).

Observou-se que, apesar de haver uma redução no crescimento dos brotos, os sucessivos subcultivos não prejudicaram a taxa de propagação de plantas de *P. tuberosa*. De acordo com Mantell et al. (1994), as taxas de multiplicação, em geral, de 5-10x, variam de acordo com o genótipo e tipo de explante e refletem a capacidade de produção de novos segmentos nodais a cada subcultivo.

No início do cultivo, a formação de raízes ocorreu após a formação dos brotos em apenas 7,7% dos explantes (Figura 2D), os quais apresentaram uma média de 0,1 raízes por planta (Figura 2E). Provavelmente, esta baixa taxa de enraizamento seja devido aos efeitos nocivos das soluções utilizadas durante a desinfestação, as quais certamente afetaram a regeneração das raízes. Nicoloso et al. (2001) verificaram que a desinfestação de explantes de *P. glomerata* com solução de HgCl_2 pode interferir no crescimento de brotos e raízes.

Além disso, constatou-se que a maioria das plantas apresentou um pequeno calo mucilaginoso (1-3 mm) na porção basal dos explantes, o qual precedeu a formação das raízes. As raízes formaram-se na região do calo e/ou na porção do explante situada acima desta estrutura; contudo a presença do calo não foi um fator determinante na formação do sistema radicular.

No segundo subcultivo, a percentagem de enraizamento aumentou significativamente (77,8%), sendo que cada planta formou uma média de 3,3 raízes (Figura 2D e 2E). A presença do calo na base precedeu a formação das raízes na maioria das plantas (77,8%), sendo que apenas 7,4% das plantas formaram raízes na ausência desta estrutura. Verificou-se ainda que o desenvolvimento do sistema radicular foi favorecido ao longo dos cultivos, sendo observado um incremento na percentagem e no número de raízes por planta (Figura 2D e 2E).

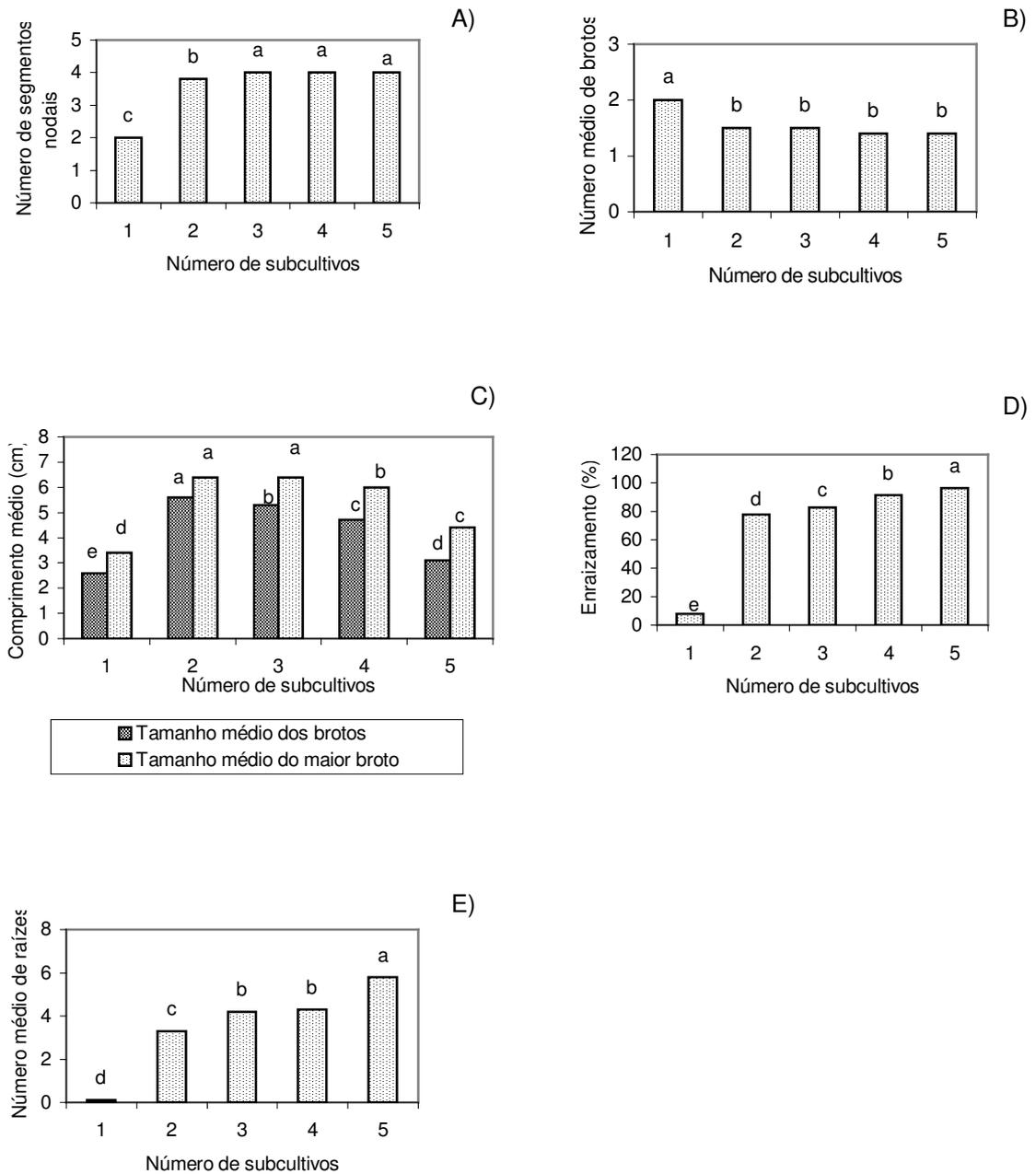


Figura 2 - Aspectos morfológicos de *P. tuberosa* no decorrer de cinco subcultivos *in vitro*. a) Efeito do subcultivo no número médio de segmentos nodais/explante; b) Efeito do subcultivo no número médio de brotações/explante; c) Comprimento médio dos brotos e comprimento médio do maior broto (cm) em função dos subcultivos; d) Percentagem média de explantes enraizados ao longo de cinco subcultivos; e) Efeito do subcultivo no número médio de raízes/explante. Média seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Duncan em nível de 1% de probabilidade de erro.

O potencial morfogênico dos segmentos nodais e apicais foi avaliado no decorrer de 32 dias de cultivo *in vitro*, tendo em vista o estabelecimento do melhor explante para a propagação e o tempo médio de permanência *in vitro*. Em ambos os explantes, verificou-se que a indução de brotos iniciou 3-4 dias após a inoculação, seguido pela formação das raízes adventícias (Figura 3A e 3B). A indução das brotações e das raízes ocorreu primeiramente nos explantes apicais, contudo após 32 dias, estes parâmetros não diferiram entre os explantes (Figura 3A e 3B). A maior velocidade de crescimento das gemas apicais em relação às axilares ocorre pelo fato de as primeiras estarem sob efeito da dominância apical, enquanto que, nos segmentos nodais, uma alteração no balanço auxina/citocinina faz-se necessária para estimular o desenvolvimento das gemas (Davies, 1995). Desta forma, em *P. tuberosa*, o crescimento das gemas axilares presentes nos segmentos nodais deve-se, provavelmente, ao aumento na relação citocinina/auxina.

Os explantes não diferiram entre si no que diz respeito ao tamanho médio dos brotos (média de 4,1 cm) e quanto ao número de raízes (média de 5,6 raízes por planta). Contudo, os segmentos nodais mostraram-se superiores aos apicais quanto ao número de brotos e número de segmentos nodais produzidos (Figura 3C), o que certamente ocorreu devido o desenvolvimento de ambas as gemas presentes naqueles explantes. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Nicoloso & Erig (2002) em *P. glomerata*.

Observou-se um bom desenvolvimento das plantas até 30 dias de cultivo *in vitro*. Após este período, algumas plantas apresentaram folhas senescentes, murchamento dos brotos, mudanças de coloração nas folhas e escurecimento do sistema radicular. Dentre os fatores que favorecem a senescência das plantas *in vitro*, destacam-se a redução dos nutrientes e de água no meio nutritivo e o acúmulo de gases. Conforme Grattapaglia & Machado (1998), o ideal é que um novo subcultivo seja realizado antes do início da fase de senescência. Em função disso, 30 dias foi determinado como sendo o tempo médio ideal de intervalo entre os subcultivos.

Plantas completas, pertencentes ao quinto subcultivo, foram utilizadas para a fase de aclimatização. Durante o período de avaliação, verificou-se que as mudas apresentaram uma intensa sensibilidade às novas condições ambientais, principalmente no que diz respeito às variações na umidade do ar. Conforme Ziv (1986) e Campostrini & Otoni (1996), o estresse hídrico é geralmente o maior problema observado durante os procedimentos de transplantio e aclimatização. Contudo, após 30 dias do transplantio, registrou-se que 80% das plantas encontravam-se bem adaptadas às novas condições ambientais, iniciando o desenvolvimento de novas brotações. Não foram observadas alterações morfológicas nas plantas. Estes resultados mostraram-se superiores aos da metodologia proposta por Martins & Nicoloso (2004), os quais obtiveram apenas 10% de sucesso na aclimatização de *P. tuberosa*.

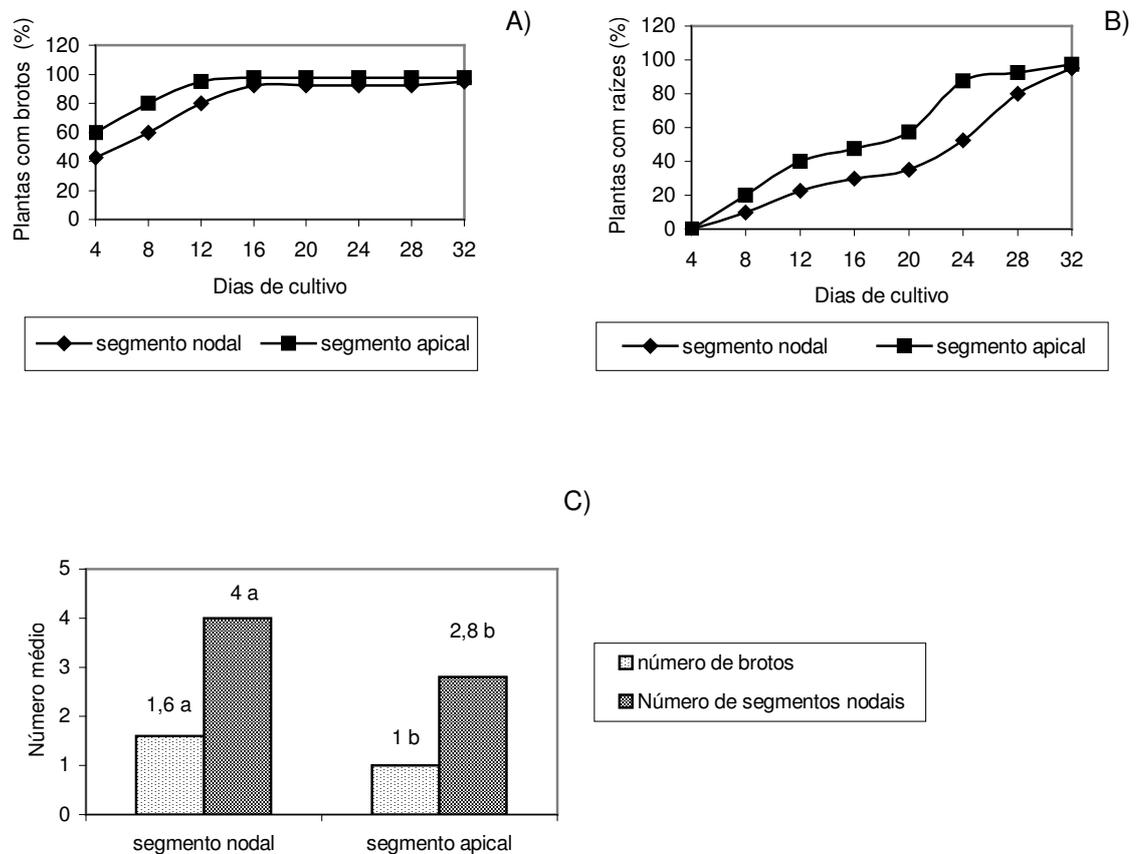


Figura 3 - Aspectos morfogênicos de segmentos nodais e segmentos apicais de *P. tuberosa*. a) Percentagem de regeneração de brotações em segmentos nodais e apicais ao longo de 32 dias de cultivo *in vitro*; b) Percentagem de regeneração de raízes em segmentos nodais e apicais ao longo de 32 dias de cultivo *in vitro*; c) Número médio de brotos e de segmentos nodais produzidos *in vitro* em função do tipo de explante, após 30 dias de cultivo. Média seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Duncan em nível de 1% de probabilidade de erro.

De forma geral, a composição do meio e o ambiente *in vitro* alteram o desenvolvimento anatômico e fisiológico das plantas, levando a uma alta taxa de transpiração após o plantio. Estudos conduzidos por Fabbri et al. (1986) relataram que o crescimento vigoroso após o plantio depende do desenvolvimento de novas folhas mais adaptadas às condições *ex vitro*. De fato, o processo de adaptação de *P. tuberosa* foi intensificado à medida que novas brotações foram se desenvolvendo a partir da segunda semana após o transplantio.

A metodologia desenvolvida é pioneira para a espécie e viabilizou com sucesso a propagação clonal. O protocolo de desinfestação descrito foi eficiente no estabelecimento de explantes assépticos e regenerativos. Segmentos apicais e nodais apresentaram excelente regeneração e desenvolvimento em meio MS. Considerando que, cada segmento nodal apresenta uma taxa de multiplicação de 4, dentro de um período de cinco meses de cultivo, o sistema utilizado produziria 1024 plantas completas. Os resultados demonstraram ainda que o processo de aclimatização de *P. tuberosa* deve ser conduzido em ambientes com alta umidade relativa, devido às plantas serem muito suscetíveis à desidratação. O desenvolvimento das gemas apicais e laterais, bem como das raízes adventícias, ocorreu sem a necessidade de adição de fitoreguladores no meio de cultura, indicando que os explantes utilizados apresentaram um balanço hormonal adequado à organogênese.

CONCLUSÕES

Soluções do fungicida Benomyl, álcool, Hipoclorito de sódio e Cloreto de mercúrio foram eficazes para a desinfestação e regeneração de plantas a partir de segmentos nodais, os quais apresentaram uma maior taxa de multiplicação *in vitro* quando comparada à dos explantes apicais. A taxa de multiplicação não foi afetada no decorrer dos subcultivos, os quais devem ser feitos a cada 30 dias.

Na etapa de aclimatização, as mudas de *P. tuberosa* apresentaram um elevado índice de sobrevivência.

REFERÊNCIAS

- CAMPOSTRINI, E.; OTONI, W. C. Aclimatação de plantas: abordagens recentes. **ABCTP Notícias**, n. 25, p. 2-10, 1996.
- DAVIES, P. J. **Plant hormones: and their role in plant growth and development**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. 679p.
- DEBERGH, P. C.; READ, P. E. Micropropagation. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation: technology and application**. London: Kluwer Academic, 1991. p. 1-13.
- FABBRI, A. et al. Anatomical changes in persistent leaves of tissue-cultured strawberry plants after removal from culture. **Scientia Horticulturae**, v. 28, p. 331-337, 1986.
- GEORGE, E. **Plant propagation by tissue culture – the technology**. Eversley: Exegetics Limited, 1993. v. 1.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C. et al. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI, 1998. p.183-260.
- HUSSEY, G. Problems and prospects in the *in vitro* propagation of herbaceous plants. In: WITHERS, L. A.; ALDERSON, P. G. **Plant tissue culture and its agriculture applications**. London: Butterwoths, 1986. p.69-84.

- KLERK, G. J. How to measure somaclonal variation. **Acta Botanica Neerlandica**, v. 38, n.2, p.129-144, 1990.
- MAGALHÃES, P. M. de. Agrotecnologia para el cultivo de fáfia o ginseng brasileiro. In: MARTINEZ, J.V. et al. **Fundamentos de agrotecnología de cultivo de plantas medicinales iberoamericanas**. Santafé de Bogotá: Convênio Andrés Bello/CYTED, 2000. p. 323-332.
- MANTELL, S.H. et al. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto: SBG, 1994. 344p.
- MARTINS, C.F; NICOLOSO, F.T. Micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, n. 3, p. 53-61, 2004.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NICOLOSO, F. T. et al. Influência da posição da estaca no ramo sobre o enraizamento de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen em dois substratos. **Ciência Rural**, v. 29, n. 2, p. 277-283, 1999.
- NICOLOSO, F. T. et al. Micropropagação do Ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen), **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 3, n. 2, p. 11-18, 2001.
- NICOLOSO, F. T.; ERIG, A. C. Efeito do tipo de segmento nodal e tamanho do recipiente no crescimento de plantas de *Pfaffia glomerata in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Edição especial, p. 1499-1506, 2002.
- NISHIMOTO, N. et al. Ecdisterone from *Pfaffia tuberosa* (Spreng,) Hicken. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.1, n. 2, p. 188-191, 1986.
- SKREBSKY, E. C. et al. Sacarose e período de cultivo *in vitro* na aclimatização *ex vitro* de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen). **Ciência Rural**, v. 34, n. 5, p. 1471-1477, 2004.
- TASCETTO, O. M.; PAGLIARINI, M. S. Occurence of 2n and jumbo pollen in the brasilian ginseng (*Paffia glomerata* e *P. tuberosa*). **Euphytica**, v. 133, p. 139-145, 2003.
- ZIV, M. *In vitro* hardening and acclimatization of tissue culture plants. In: WITHERS, L. A.; ALDERSON, P. G. **Plant tissue culture and its agriculture applications**. London: Butterwoths, 1986. p.167-196.

1.2 Propagação clonal rápida de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken utilizando thidiazuron

RESUMO: *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken conhecida como corango-de-batata ou ginseng brasileiro é uma espécie medicinal nativa do Brasil e países vizinhos. Tendo em vista as dificuldades de propagação desta espécie, este trabalho teve como intuito avaliar o efeito de concentrações (0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 μM) de thidiazuron (TDZ) na micropropagação a partir de segmentos caulinares. O cultivo de segmentos nodais em meio suplementado com 1 μM de TDZ, seguido do subcultivo dos brotos em meio isento de TDZ mostrou-se uma metodologia viável para a micropropagação de *P. tuberosa*, devido à alta taxa de multiplicação, bom desenvolvimento da parte aérea e raízes e alta taxa de adaptação às condições *ex vitro*.

Palavras-chave: Amaranthaceae, citocinina, plantas medicinais

Rapid clonal micropropagation of *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken using thidiazuron

ABSTRACT: Rapid clonal micropropagation of *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken, known as corango-de-batata or Brazilian ginseng is a wild medicinal species from Brazil and neighbor countries. Considering the difficulties for vegetative propagation of this species, the present work aimed at evaluating the effect of thidiazuron (TDZ) concentrations (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1 μM) on micropropagation from nodal stem segments. The cultivation of nodal segments in medium supplemented with 1.0 μM TDZ, followed by subcultivation of shoots in medium without TDZ proved to be a viable methodology to micropropagate *P. tuberosa*, due to the high multiplication rate, good development of shoots and roots, and high rate of adaptation to *ex vitro* conditions.

Key words: Amaranthaceae, cytokinin, medicinal plants

INTRODUÇÃO

Atualmente, diversas pesquisas têm sido feitas com o intuito de estudar estratégias para a propagação de plantas medicinais, tendo em vista a viabilização de plantios comerciais e a otimização da produção de metabólitos secundários (Oksman-Caldentey & Inzé, 2004). Várias espécies do gênero *Pfaffia*, pertencentes a família Amaranthaceae, são conhecidas como ginseng brasileiro devido as suas propriedades tônicas, afrodisíacas, antidiabetes e antitumorais (Montanari et al., 1999).

A ação adaptógena característica dessas plantas deve-se a presença de saponinas triterpênicas em suas raízes (Vigo et al., 2003). Em função disso, tem havido uma intensa exploração das reservas naturais de *Pfaffia*, cujas raízes são utilizadas para a produção de medicamentos e suplementos alimentares. Algumas substâncias com propriedades medicinais foram isoladas nas raízes de *P. tuberosa*, destacando-se o ácido oleanólico e a ecdisterona (Nishimoto et al., 1986), compostos também presentes em outras espécies de *Pfaffia* comumente utilizadas pela indústria farmacêutica.

A micropropagação de plantas medicinais vem crescendo, principalmente, em decorrência das dificuldades de propagação de algumas espécies, como é o caso da *P.*

tuberosa. O sucesso na micropropagação desta espécie, abre perspectivas para a produção de mudas de genótipos superiores, visando plantios uniformes e de alta produtividade. Porém, a propagação em larga escala depende do desenvolvimento de um protocolo eficiente de clonagem *in vitro* e adaptação das plantas às condições *ex vitro*. Martins & Nicoloso (2004) desenvolveram uma metodologia para a micropropagação de *P. tuberosa*, através do cultivo de segmentos caulinares em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) isento de reguladores vegetais; entretanto, foram observados altos índices de contaminação e uma baixa eficiência na produção de plantas.

Na maioria das espécies, a presença de citocininas no meio nutritivo potencializa a formação de brotações (Thorpe, 1993). O thidiazuron (TDZ), um composto derivado das feniluréias, apresenta propriedades biológicas similares àquelas das citocininas (Mok et al., 1982) quando adicionado ao meio nutritivo. O efeito benéfico do TDZ na propagação clonal *in vitro* tem sido relatado em várias espécies herbáceas, onde se mostrou mais ativo em relação a outras citocininas (Venkataiah et al., 2003; Malabadi et al., 2004).

Considerando que estudos sobre os efeitos morfogenéticos das citocininas são inexistentes em *P. tuberosa*, este trabalho teve como propósito estudar o potencial do TDZ na otimização da micropropagação desta espécie. Foi estudado o efeito de concentrações do TDZ durante a multiplicação dos brotos, alongamento, enraizamento e aclimatização das plantas.

MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, pertencente ao Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS. Utilizaram-se plantas de *Pfaffia tuberosa* coletadas no Campus da UFSM, sendo uma exsiccata depositada no Herbário do Departamento de Biologia sob o número de SMDB 7818.

O material vegetal consistiu de plantas estabelecidas *in vitro*, com 30 dias de idade, as quais foram multiplicadas, a partir de segmentos caulinares, em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com sacarose (30 g L⁻¹), mio-inositol (100 mg L⁻¹) e ágar (6 g L⁻¹). O pH foi ajustado para 5,9. O meio nutritivo não foi suplementado com reguladores vegetais, conforme metodologia proposta por Martins & Nicoloso (2004). As plantas foram cultivadas em sala de crescimento com temperatura de 25±2°C, 16 horas de fotoperíodo e 35 µM m⁻² s⁻¹ de luminosidade.

Segmentos nodais (1 cm e com duas gemas axilares) de plantas homogêneas foram cultivados em meio MS suplementado com seis concentrações (0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1 µM) de TDZ. Os explantes foram inoculados verticalmente em frascos de 100 mL, contendo 20 mL de meio nutritivo. As plantas foram avaliadas após 30 dias mediante a percentagem de

regeneração de brotos, número médio de brotos e de segmentos nodais regenerados por explante, comprimento médio dos brotos (cm) e percentagem de enraizamento. Os tratamentos foram repetidos cinco vezes, sendo que cada repetição constou de um frasco contendo cinco explantes.

Visando favorecer o alongamento e o enraizamento, após trinta dias de cultivo nas diferentes concentrações de TDZ, os segmentos nodais dos brotos regenerados foram seccionados e transferidos para frascos erlenmeyer (250 mL) contendo 50 mL de meio MS não suplementado com TDZ. O material foi avaliado após 25 dias de cultivo através da percentagem de regeneração de brotos, número médio de brotos e segmentos nodais regenerados por explante, comprimento dos brotos (cm), percentagem de enraizamento, número médio de raízes por planta e quociente entre massa seca das raízes e massa seca da parte aérea. Utilizaram-se cinco repetições, sendo cada repetição formada por um frasco com dez explantes. Para a avaliação da massa seca, cinco plantas foram retiradas ao acaso de cada repetição e mantidas em estufa a 60°C, onde permaneceram até obter peso constante. As pesagens foram feitas em balança analítica.

Plantas completas regeneradas após 25 dias de cultivo em meio MS não suplementado com TDZ foram transferidas para recipientes plásticos (2000 mL) contendo 1000 cm³ de substrato comercial Plantmax[®] Hortaliças e mantidas em casa de vegetação sob condições de luminosidade parcial (sombra), temperatura e fotoperíodo naturais. A umidade do substrato foi mantida entre 45 e 60% da capacidade de campo, através de irrigações com água destilada, conforme recomendações de Skrebsky et al. (2004). Cada recipiente de cultivo foi coberto com plástico transparente. Quinze dias após o plantio, a cobertura com plástico começou a ser retirada durante um período de duas horas/dia, aumentando-se gradativamente uma hora/dia até completar doze horas, quando as plantas foram mantidas cobertas apenas durante a noite. Aos 25 dias após o plantio, a cobertura foi retirada por completo.

As folhas das plantas foram mantidas úmidas com o auxílio de um aspersor contendo água destilada e autoclavada, principalmente nos primeiros vinte dias. A percentagem de sobrevivência das plantas foi avaliada após 30 dias do transplante para o substrato. Foram utilizadas cinco repetições, sendo cada repetição formada por um recipiente com cinco mudas.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente ao acaso. Os dados foram submetidos a análise de variância e analisados através de regressão polinomial, ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F. Os dados expressos em percentagem foram transformados segundo arco seno raiz quadrada de (X/100), onde X significa o valor percentual obtido. Para as variáveis número de brotações e número de segmentos nodais,

os dados foram transformadas segundo a raiz quadrada de $(X+1)$, onde X é o valor obtido por contagem.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se o desenvolvimento das gemas laterais, via organogênese direta, cerca de três dias após a inoculação dos explantes (dados não mostrados). Após 30 dias de cultivo, o número de brotações, o número de segmentos nodais e o tamanho dos brotos foram influenciados pelas concentrações de TDZ (Figura 1A, 1B, 1C). Houve um acréscimo no número médio de brotos e segmentos nodais com o aumento da concentração do TDZ no meio de cultura, sendo os melhores resultados obtidos com 1 μ M, onde se obteve uma média de 10 brotos e 18 segmentos nodais por planta (Figura 1A, 1B, 3A). Estes valores mostraram-se superiores aos da metodologia de multiplicação proposta por Martins & Nicoloso (2004), os quais obtiveram 1,6 brotos e 4 novos segmentos nodais por planta. O efeito benéfico do TDZ na proliferação de brotos *P. tuberosa* está de acordo com os resultados descritos por Huetteman & Preece (1993) e Lu (1993).

Ao contrário dos efeitos positivos do TDZ no número de brotos e segmentos nodais, o comprimento médio das brotações apresentou uma resposta linear decrescente com o aumento da concentração de TDZ. Desta forma, brotos mais alongados (média de 2,7 cm) foram registrados em meio não suplementado com essa citocinina (Figura 1C). O TDZ também induziu brotos pouco alongados em *Lens culinaris* Medick. (Khawar et al., 2004), *Camellia sinensis* L. O. Kuntze (Mondal et al., 1998) e *Cajanus cajan* L. (Eapen et al., 2004). De acordo com Huetteman & Preece (1993) e Venkataiah et al. (2003), o efeito do TDZ no alongamento dos brotos é muito freqüente e está relacionado com sua alta atividade e estabilidade nos tecidos.

Independente da concentração, o TDZ inibiu a formação de raízes adventícias e induziu a formação de calo na base das microestacas, sendo que apenas aqueles explantes cultivados na ausência do TDZ desenvolveram sistema radicular, os quais apresentaram uma média de 5,2 raízes por planta (dados não mostrados). Em geral, as concentrações ideais para a indução de organogênese ou calo variam de acordo com o genótipo e tipo de explante (Khawar et al., 2004). Os resultados mostraram que, em *P. tuberosa*, concentrações de até 1 μ M de TDZ foram eficazes para a proliferação *in vitro*, contudo os efeitos negativos do TDZ no alongamento dos brotos, na formação das raízes e na proliferação de calos na base do explante já foram evidentes. Huetteman & Preece (1993) indicam o uso de concentrações reduzidas de TDZ (<1 μ M) na micropropagação de dicotiledôneas, pois, em geral, concentrações superiores a esta favorecem o crescimento de calos, induzem um grande número de brotos pouco alongados e inibem o enraizamento.

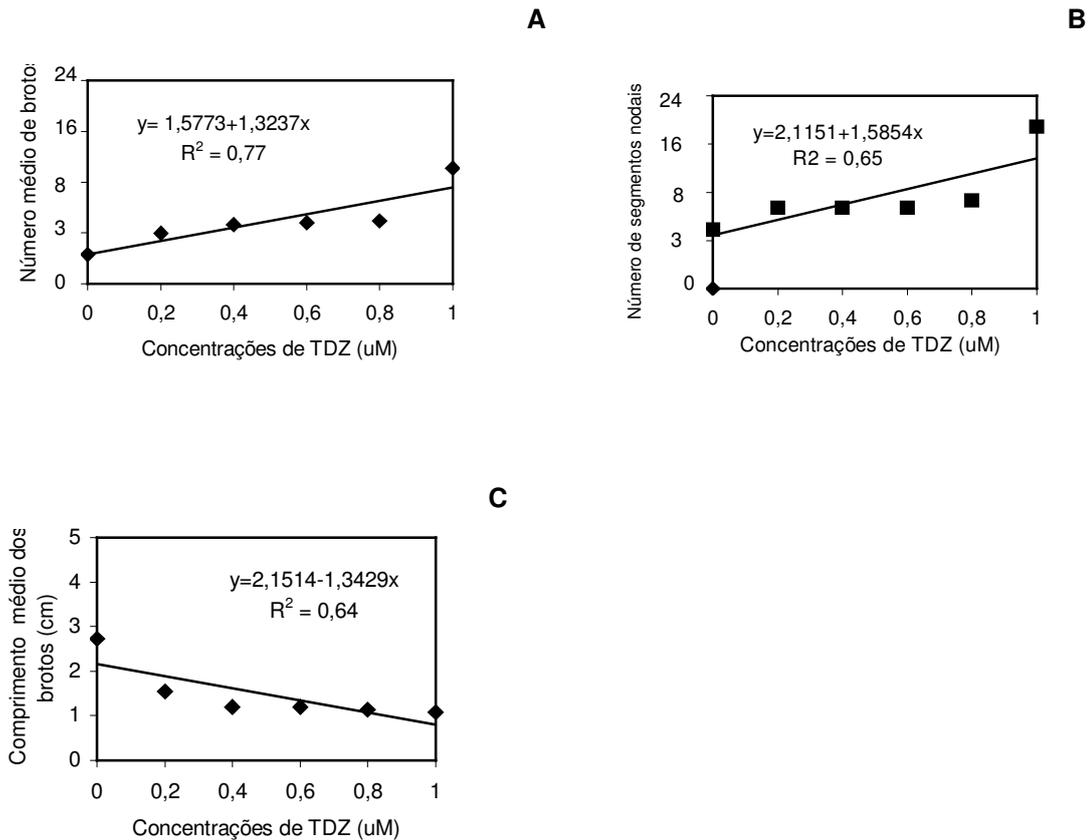


Figura 1 – Aspectos morfológicos de brotações de *P. tuberosa* induzidas em meio MS suplementado com concentrações de TDZ, após 30 dias de cultivo. A) Efeito de concentrações de TDZ no número médio de brotos; B) Efeito de concentrações de TDZ no número médio de segmentos nodais; C) Efeito de concentrações de TDZ no comprimento médio de brotos (cm).

O efeito inibitório das citocininas e, em especial, do TDZ na redução da regeneração de raízes, bem como no alongamento de brotações é relatado em várias espécies (Lu, 1993). Conforme Mok et al. (1987), o efeito do TDZ na redução do crescimento dos brotos e na inibição do enraizamento podem ser explicados pelo fato deste alterar o metabolismo de citocininas naturais, culminando em um aumento no teor endógeno de citocinina.

Houve um declínio na produção de brotos e segmentos nodais quando os explantes foram transferidos para meio não suplementado com TDZ, embora os resultados tenham sido superiores em relação àquele obtido na ausência desse fitoregulador na fase inicial de proliferação (Figura 2A, 2B). Em função disso, os dados sugerem que os efeitos benéficos das concentrações de TDZ na organogênese persistiram após o subcultivo do material, o que segundo Mok & Mok (1985), pode ser explicado pelo fato do TDZ ser um composto estável e persistente nos tecidos.

Os resultados mostraram que o cultivo dos brotos em meio isento de TDZ favoreceu o crescimento das plantas (Figura 1C, 2C). Contudo, ao contrário do observado anteriormente, o alongamento dos brotos mostrou-se mais acentuado à medida que a concentração de TDZ foi aumentada na fase de proliferação (Figura 2C). Os melhores resultados foram obtidos nos brotos induzidos com 1 μ M de TDZ e subcultivados na ausência desta citocinina, os quais mostraram-se vigorosos, ou seja, com folhas grandes e bem expandidas e com crescimento mais rápido quando comparado com as plantas regeneradas nas demais concentrações de TDZ. Estes resultados corroboram os de Mondal et al. (1998), onde brotos de *Camellia sinensis* regenerados na presença do TDZ tornaram-se vigorosos e alongados após transferência para meio isento desta citocinina. Devido ao rápido crescimento das plantas após a transferência para o meio sem TDZ, as avaliações foram realizadas aos 25 dias ao invés de 30 dias de cultivo. De fato, neste período de cultivo, as plantas apresentavam-se demasiadamente alongadas (Figura 3B) quando comparadas com as cultivadas na ausência do TDZ (Figura 3C).

O subcultivo dos brotos em meio isento de TDZ também foi essencial para o desenvolvimento do sistema radicular. Porém, de maneira específica, os brotos regenerados em meio suplementado com 0,2 μ M de TDZ apresentaram menores índices de enraizamento (81%) quando comparado com os demais tratamentos (100%). Adicionalmente, as concentrações de TDZ influenciaram o número de raízes por planta. O maior número médio de raízes (16) foi registrado nos brotos induzidos em meio contendo 0,6 μ M de TDZ (Figura 2D). Na maioria das espécies, o TDZ parece não afetar o desenvolvimento das raízes, desde que os brotos sejam subcultivados em meio isento desta citocinina (Huetteman & Preece, 1993; Khawar et al., 2004). Um aumento na proliferação de raízes adventícias em detrimento da parte aérea foi observado nas concentrações de 0,4 e 0,6 μ M de TDZ, o que possivelmente, elevou o quociente entre massa seca das raízes e da parte aérea (Figura 2E).

Após 30 dias do plantio em substrato, a maior percentagem de sobrevivência (100%) foi registrada nas plantas regeneradas em meio suplementado com a concentração 1 μ M, seguidas pelas plantas oriundas do meio isento de TDZ (80%) (Figura 2F). Além disso, estas últimas mostraram-se mais suscetíveis à desidratação, apresentando uma adaptação mais lenta quando comparada com aquelas provenientes do meio suplementado com TDZ (1 μ M), as quais encontravam-se bem adaptadas às condições *ex vitro*. Adicionalmente, ao longo de um período de 4 (quatro) meses, as plantas apresentaram bom desenvolvimento (40-50 cm de altura) em casa de vegetação, não sendo detectada a presença de plantas com alterações fenotípicas (Figura 3D). As plantas floresceram durante a primavera e verão,

períodos nos quais esta espécie floresce em condições naturais na região de Santa Maria e São Pedro do Sul, RS.

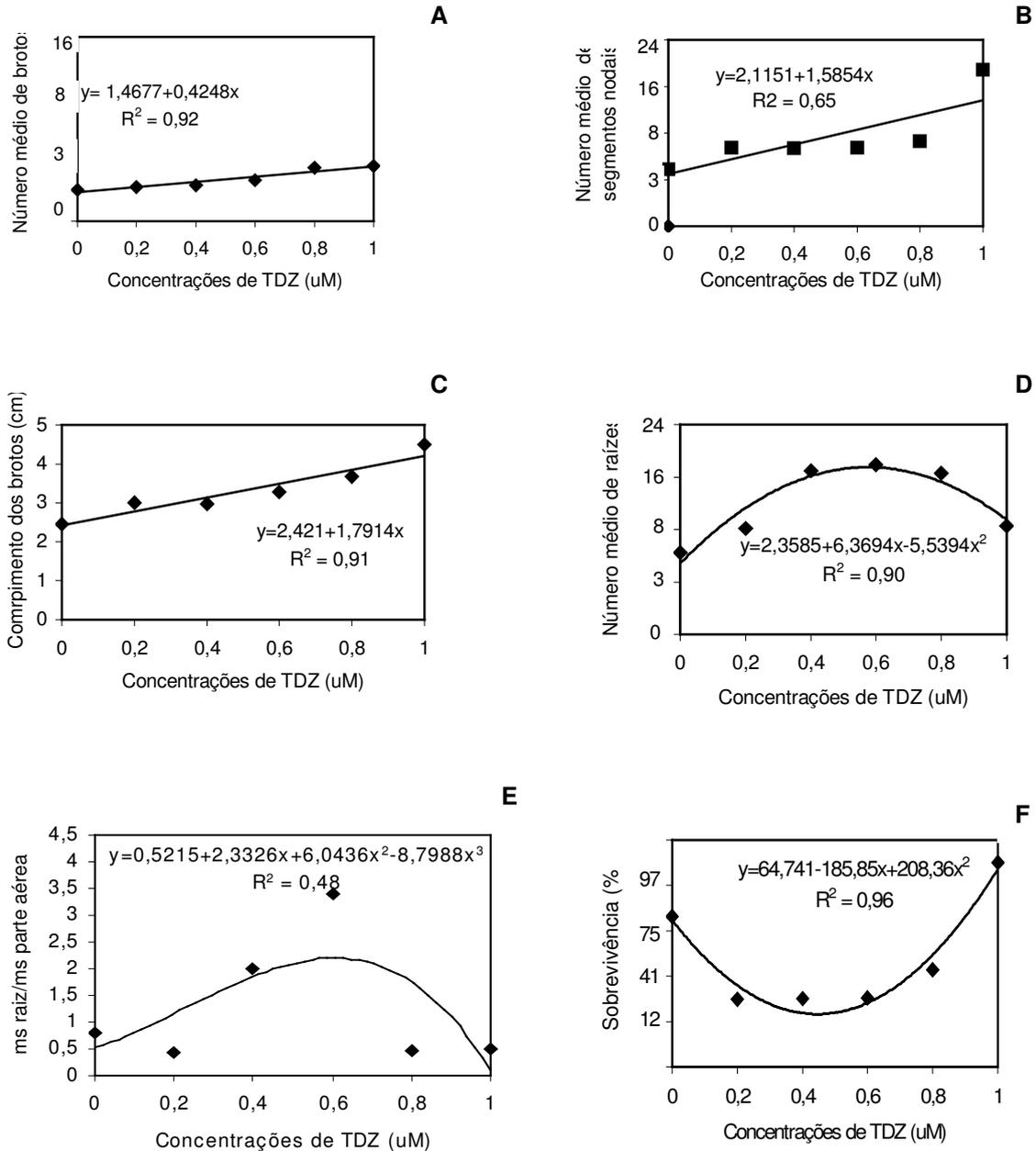


Figura 2 – Aspectos morfogênicos de brotações de *P. tuberosa* induzidas em meio suplementado com TDZ e subcultivadas em meio MS não acrescido de fitoreguladores. A) Efeito de concentrações de TDZ no número médio de brotos/planta; B) Efeito de concentrações de TDZ no número de segmentos nodais/planta; C) Comprimento médio de brotações (cm) em função das concentrações de TDZ; D) Efeito de concentrações de TDZ no número médio de raízes/planta; E) Efeito do concentrações de TDZ no quociente entre massa seca da raiz e parte aérea; F) Efeito do concentrações de TDZ na percentagem de plantas sobreviventes após 30 dias do transplante para o substrato.

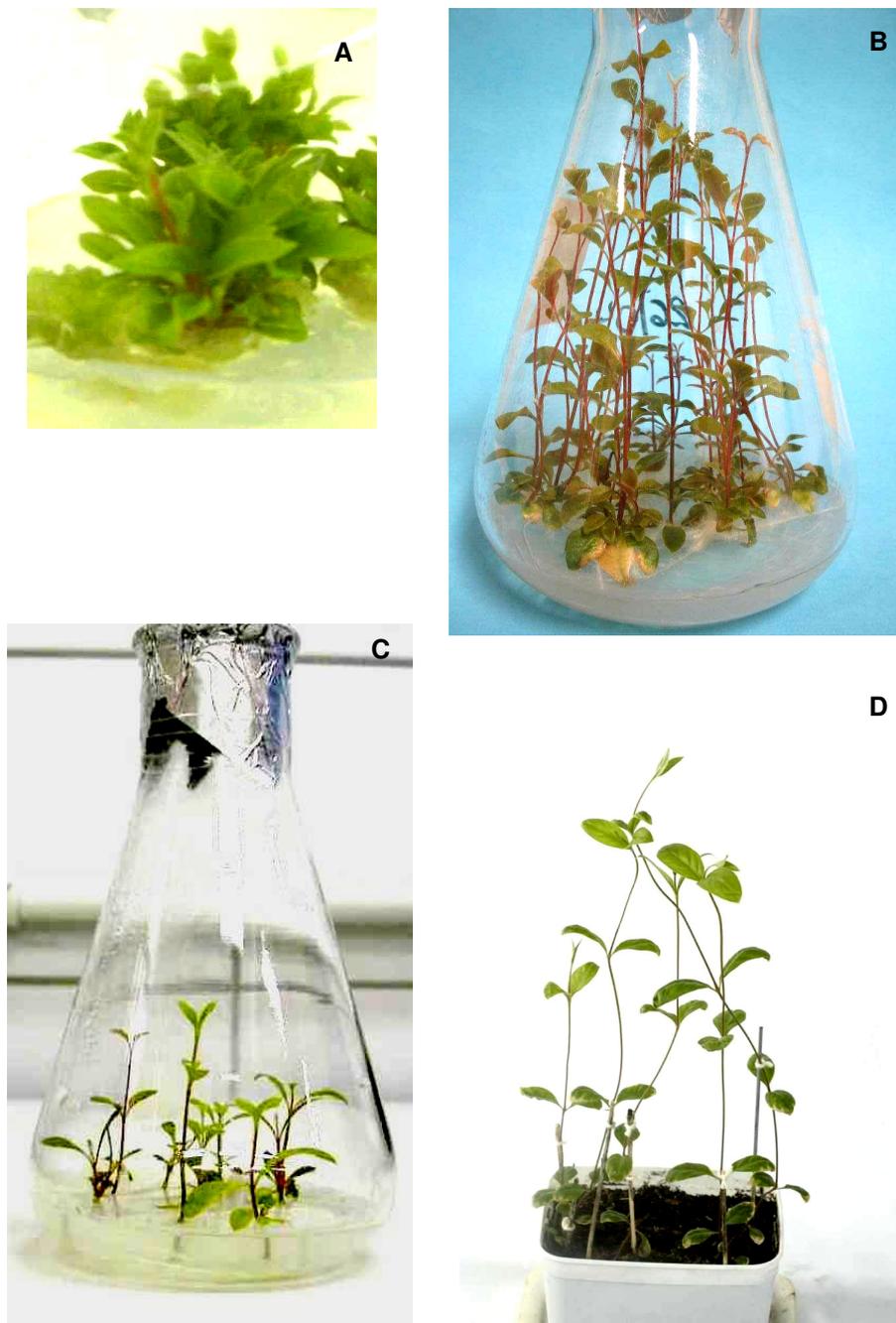


Figura 3 - Aspectos morfogênicos de plantas de *P. tuberosa* em função das concentrações de TDZ. A) Aspecto geral de brotos induzidos a partir de segmentos nodais de *P. tuberosa* cultivados em meio contendo $1 \mu\text{M}$ de TDZ, após 30 dias de cultivo (2,5X); B) Aspecto geral de plantas regeneradas a partir de segmentos nodais de *P. tuberosa* em meio suplementado com $1 \mu\text{M}$ de TDZ e subcultivadas em meio não suplementado com TDZ, após 30 dias de cultivo (1:1,5); C) Plantas regeneradas a partir de segmentos nodais de *P. tuberosa* em meio MS não suplementado com TDZ aos 30 dias após a inoculação (1:1,5); D) Plantas aclimatizadas provenientes do meio contendo $1 \mu\text{M}$ de TDZ, após 4 meses do plantio (1:6).

Os resultados comprovaram que a presença de TDZ no meio nutritivo favoreceu a propagação *in vitro* de *P. tuberosa*. Contudo, os brotos apresentaram diminuição no alongamento e enraizamento, sendo necessário o subcultivo do material em meio isento de reguladores vegetais para o desenvolvimento de plantas completas. De forma semelhante, em *Lens culinaris* Medick. (Khawar et al., 2004) e *Cajanus cajan* L. (Eapen et al., 2004), o TDZ têm sido utilizado apenas na fase de multiplicação, sendo o alongamento e o enraizamento dos brotos conduzidos em meio isento dessa citocinina.

Embora o número de raízes regeneradas *in vitro* exerça uma grande influência na sobrevivência das plantas na fase de aclimatização (Araújo et al., 2002), esta relação não foi observada na *P. tuberosa*. Nesta espécie, apesar do elevado número de raízes presente nas plantas induzidas com concentrações de 0,2 a 0,8 μM de TDZ, houve redução da percentagem de sobrevivência após transplântio. Desta forma, ressalta-se a importância de uma relação adequada entre sistema radicular e parte aérea, de forma que haja um equilíbrio entre a absorção e transpiração em condições *ex vitro*. Daniel et al. (1997) relataram que o sucesso do pegamento de mudas florestais depende do quociente entre massa seca das raízes e massa seca da parte aérea, sendo que as maiores taxas de sobrevivência ocorrem quando esse quociente apresenta valores em torno de 0,5. De forma semelhante, em *P. tuberosa*, as maiores percentagens de sobrevivência após o transplântio (Figura 2F) foram obtidas nos tratamentos cujo quociente entre massa seca das raízes e da parte aérea ficaram em torno de 0,5 (Figura 2E). A redução nos índices de sobrevivência nas plantas oriundas do meio suplementado com concentrações de 0,2 e 0,8 μM de TDZ deve-se, possivelmente, à presença de brotos vitrificados. Este distúrbio morfofisiológico também foi observado na maioria dos brotos regenerados com 0,4 e 0,6 μM de TDZ, o que provavelmente culminou em uma redução na massa seca da parte aérea (Figura 2E). Verificou-se também que após o transplântio, algumas folhas das plantas regeneradas com concentrações entre 0,2 a 0,8 μM de TDZ tornaram-se translúcidas, quebradiças e sofriram abscisão com facilidade, sintomas característicos da vitrificação. Para Bonga & Durzan (1987), a baixa sobrevivência de brotos vitrificados está associada a uma série de deficiências anatômicas, principalmente nas folhas e sistema vascular. Um aumento na incidência de vitrificação tem sido observado em algumas espécies propagadas na presença do TDZ (Huetteman & Preece, 1993; Andrade et al., 1999; Morales et al., 1999).

Por outro lado, plantas provenientes do meio isento de TDZ ou suplementado com 1 μM apresentaram sistema radicular e parte aérea bem desenvolvidos. Adicionalmente, as plantas regeneradas em meio com 1 μM de TDZ demonstraram vigor superior em relação às cultivadas em meio sem TDZ, apresentando maior taxa de multiplicação, crescimento e

melhor adaptação às condições *ex vitro* (Figuras 2B, 2C, 2F). Este protocolo é passível de otimização, porém mostrou-se superior à metodologia proposta por Martins & Nicoloso (2004), os quais obtiveram uma taxa de propagação de 1:4 e apenas 10% de sucesso no transplante, utilizando-se o meio MS isento de fitoreguladores em todos os estágios da micropropagação.

Neste contexto, o cultivo de segmentos nodais em meio MS acrescido de 1 μ M de TDZ viabilizou a micropropagação de *P. tuberosa*, produzindo um grande número de plantas em curto período de tempo. Porém, o subcultivo dos brotos em meio isento de fitoreguladores foi essencial para o desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular, provavelmente pela redução dos níveis de citocininas (Huetteman & Preece, 1993). Este aspecto é importante pois permite a obtenção de mudas completas sem a necessidade de formulação de meios específicos para o alongamento e enraizamento. Lu (1993) ressalta que o TDZ mostra-se muito eficaz para a propagação clonal rápida, uma vez que, cultivos prolongados com esta citocinina podem prejudicar o desenvolvimento das plantas. Considerando que são produzidos, em média, 18 novos segmentos nodais por planta na fase de multiplicação com 1 μ M de TDZ e nove segmentos nodais após subcultivo em meio isento de fitoreguladores, cerca de 162 plantas completas *in vitro* poderão ser obtidas de uma única microestaca dentro de um período de dois meses. Mais um período de 30 dias faz-se necessário para a aclimatização das plantas em casa de vegetação. Contudo, novos ensaios devem ser conduzidos a fim de estudar condições para a transferência das plantas para o campo, tendo em vista a viabilização dessa metodologia para plantios comerciais.

CONCLUSÕES

Os resultados indicam que o cultivo de segmentos nodais de *P. tuberosa* em meio suplementado com 1 μ M de TDZ seguido do subcultivo dos brotos em meio MS isento de reguladores vegetais é uma metodologia viável para a micropropagação de *P. tuberosa*. As plantas apresentam uma alta taxa de sobrevivência durante a aclimatização.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, L. B. et al. The effect of growth regulators on shoot propagation and rooting of common lavender (*Lavandula vera* L.) **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 56, p. 79-83, 1999.
- ARAÚJO, P. S.; SILVA, J. M. O. D.; NECKEL, C. A. Micropropagação de babosa (*Aloe vera*-Liliaceae). **Biotecnologia**, n. 25, p. 54-57, 2002.
- BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987. 422 p.
- DANIEL, O. et al. Aplicação de fósforo em mudas de *Acacia magnum* Willd. **Revista Árvore**, v. 21, n. 2, p. 163-168, 1997.

- EAPEN, S.; TIVAREKAR, S.; GEORGE, L. Thidiazuron-induced shoot regeneration in pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 53, p. 217-220, 1998
- HUETTEMAN, C. A.; PREECE, J. E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 33, n. 2, p. 105-119, 1993.
- KHAWAR, K. M. et al. Effect of thidiazuron on shoot regeneration from different explants of lentil (*Lens culinaris* Medik.) via organogenesis. **Turk Journal Botany**, v. 28, p. 421-426, 2004.
- LU, C. Y. The use of thidiazuron in tissue culture. **In vitro Cellular Developmental Biology**, v. 29, p. 92-96, 1993.
- MALABADI, R. B.; MULGUND, G. S.; NATARAJA, K. Efficient regeneration of *Vanda coerulea*, an endangered orchid using thidiazuron. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 76, p.289-293, 2004.
- MARTINS, C. F.; NICOLOSO, F. T. Micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, n. 3, p. 53-61, 2004.
- MOK, M C.; MOK, D. W. S. The metabolism of (¹⁴C) thidiazuron in callus tissue of *Phaseolus lunatus*. **Physiologia Plantarum**, v. 65, p. 427-432, 1985.
- MOK, M C. et al. Cytokinin activity of N-phenyl-N'-1,2,3,-thiadiazol-5-ylurea (thidiazuron). **Phytochemistry**, v. 21, p. 1509-1511, 1982.
- MOK, M. C.; MOK, D. W. S.; TURNER, J. E.; MUJER, C. V. Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems. **HortScience**, v. 22, n. 6, p. 1194-1197, 1987.
- MONDAL, T. K. et al. Micropropagation of tea (*Camellia sinensis* L. O. Kuntze) using thidiazuron. **Plant growth Regulation**, v. 26, p. 57-61, 1998.
- MONTANARI, J., I.; MAGALHÃES, P. M.; QUEIROGA, C. L. Influence of plantation density and cultivation cycle in root productivity and tenors of beta ecdisone in *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Acta horticulturae**, v. 3, n. 502, p. 125-129, 1999.
- MORALES, C. F. G.; LOMBARDI, S. R. B. et al. Efeito do BAP e TDZ na calogênese e organogênese em internódios de macieira cv. Gala RW1. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 5, n. 3, p. 174-177, 1999.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NISHIMOTO, N. et al. Ecdisterone from *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.1, n. 2, p. 188-191, 1986.
- OKSMAN-CALDENTEY, K.; INZÉ, D. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 9, p. 433-440, 2004.
- SKREBSKY, E. C.; NICOLOSO, F. T.; FERRÃO, G. da E. Sacarose e período de cultivo *in vitro* na aclimatização *ex vitro* de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen). **Ciência Rural**, v. 34, n. 5, p. 1471-1477, 2004.
- THORPE, T. A. In vitro organogenesis and somatic embryogenesis: physiological and biochemical aspects. In: ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K. A.; TRAN THANK VAN, K. (Eds.) **Morphogenesis in plant**. New York: Plenum Press, 1993. p.19-38.

VENKATAIAH, P.; CHRISTOPHER, T.; SUBHASH, K. Thidiazuron induced high frequency adventitious shoot formation and plant regeneration in *Capsicum annuum* L. **Journal of Plant Biotechnology**, v. 5, n. 4, p.245-250, 2003

VIGO, C. L.S; NARITA, E.; MARQUES, L.C. Validação da metodologia de quantificação espectrofotométrica das saponinas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen - Amaranthaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 2, p. 46-49, 2003.

1.3 Micropropagação e produção de β -ecdisona em *Pfaffia glomerata* e *Pfaffia tuberosa*

RESUMO: Segmentos nodais de dois acessos (BRA e JB-UFSM) de *Pfaffia glomerata* foram cultivados em meio MS isento de fitoreguladores. Em *P. tuberosa*, os segmentos nodais foram cultivados em meio MS suplementado com 1 μ M de thidiazuron (TDZ) para a proliferação de brotos. O alongamento e enraizamento das plantas foi conduzido em meio MS isento de TDZ. Plantas completas de ambas as espécies foram aclimatizadas e transferidas para o solo. O conteúdo de β -ecdisona nas raízes e partes aéreas das plantas foi determinado por HPLC. Após cultivo no solo, as plantas do acesso BRA apresentaram uma maior taxa de multiplicação *in vitro* e um maior teor de β -ecdisona quando comparadas ao acesso JB-UFSM. Em *P. tuberosa*, as plantas micropropagadas com TDZ apresentaram teores de β -ecdisona similares aos encontrados nas plantas nativas não submetidas ao cultivo *in vitro*. Em ambas as espécies estudadas, constatou-se que as partes aéreas das plantas apresentaram uma maior concentração de β -ecdisona em relação ao sistema radicular. A metodologia utilizada mostrou-se adequada para a propagação de plantas homogêneas e produtivas em larga escala.

Key words: Amaranthaceae, ginseng brasileiro, propagação clonal, ecdisteróides, HPLC

Micropropagation and β -ecdysone production of *Pfaffia glomerata* and *Pfaffia tuberosa*

ABSTRACT: A mass *in vitro* propagation system for *Pfaffia glomerata* and *Pfaffia tuberosa*, two medicinal species known as Brazilian ginseng, was employed. Nodal segments of two accessions (BRA and JB-UFSM) of *P. glomerata* were cultured in growth regulator-free MS medium. In *P. tuberosa*, the nodal segments were cultured in MS medium supplemented with 1.0 μ M TDZ for proliferation of shoots. The elongation and rooting of these plants were carried out in medium without TDZ. The plants of both species were acclimatized and transferred to the field. The β -ecdysone content from roots and aerial parts of the plants was determined by HPLC. The BRA accessions showed a higher *in vitro* multiplication rate and β -ecdysone content in relation to JB-UFSM accessions. The β -ecdysone content of micropropagated *P. tuberosa* was similar to that found in wild plants. It was found that, in both species studied, the aerial parts to the plants accumulated higher β -ecdysone content in comparison with the yields obtained from roots. Micropropagation could be useful to provide homogeneous and productive plants of these species of Brazilian ginseng.

Key words: Amaranthaceae, Brazilian ginseng, clonal propagation, ecdysteroids, HPLC

INTRODUÇÃO

As raízes de várias espécies de *Pfaffia*, conhecidas como ginseng brasileiro, vêm sendo comercializadas em substituição ao *Panax ginseng* (ginseng coreano - Araliaceae) devido suas propriedades adaptógenas e antiestresse (Magalhães, 2000). A espécie de maior importância medicinal e comercial é a *P. glomerata* (Zimmer et al., 2006), cujas raízes contêm vários produtos naturais, como os ecdisteróides e as saponinas triterpênicas (Shiobara et al., 1993). O controle da qualidade das raízes de *P. glomerata*, as quais são

utilizadas como matéria-prima para a indústria de fitoterápicos é feito através do doseamento do ecdisteróide β -ecdisona (Brasil, 2004).

Atualmente, a demanda de raízes de *P. glomerata* para a indústria nacional e internacional é maior que a capacidade produtiva, sendo que a maior parte das raízes destinadas ao mercado farmacêutico é coletada por extrativismo, ameaçando as populações naturais. Além disso, raízes de diferentes acessos de *P. glomerata* apresentam uma grande variabilidade em relação à produção de β -ecdisona (Figueiredo et al., 2004), comprometendo a padronização da matéria-prima. Nas poucas áreas de cultivo comercial de *P. glomerata*, a produção de plantas homogêneas é feita através de estacas, porém este tipo de propagação fornece um baixo número de mudas. Por outro lado, a propagação por sementes produz plantas heterogêneas, visto que esta espécie apresenta grande variabilidade genética (Taschetto & Pagliarini, 2003).

P. tuberosa é uma espécie encontrada em várias regiões do Brasil e países vizinhos, onde é utilizada para tratar problemas de infertilidade. A partir de um estudo químico conduzido com as raízes dessa espécie foram isolados o ácido oleanólico e a ecdisterona (Nishimoto et al., 1986), evidenciando o potencial medicinal da espécie. As populações de *Pfaffia tuberosa* estão restritas às áreas não utilizadas para o plantio de lavouras e pastoreio e não há informações a respeito de métodos de propagação nesta espécie.

A propagação clonal *in vitro* de plantas medicinais é uma alternativa para a produção de mudas homogêneas e produtivas para a indústria farmacêutica. Plantas de *P. glomerata* (Nicoloso et al., 2001; Skrebsky et al., 2004) e *P. tuberosa* (Flores et al., 2006a) vêm sendo propagadas *in vitro*, contudo não há dados na literatura em relação à produção de β -ecdisona pelas plantas micropropagadas. Além disso, os estudos químicos conduzidos com essas espécies estão limitados ao sistema radicular das plantas (Nishimoto et al., 1986; Shiobara et al., 1993; Figueiredo et al., 2004; Zimmer et al., 2006). Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de β -ecdisona nas raízes e partes aéreas de plantas de *P. glomerata* e *P. tuberosa* produzidas *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Utilizaram-se dois acessos de *Pfaffia glomerata*, identificados como BRA e JB-UFSM. O acesso BRA foi coletado no município de Querência do Norte (PR) e faz parte do Banco de Germoplasma da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília, DF. O acesso BRA foi cedido *in vitro* pelo Cenargen para a realização deste trabalho. O acesso JB-UFSM faz parte do acervo do Jardim Botânico da UFSM, Santa Maria, RS. Uma

exsicata desta espécie encontra-se depositada no Herbário do Departamento de Biologia da UFSM (SMDB 7606).

As plantas de *P. tuberosa* utilizadas neste estudo foram oriundas de populações naturais existentes no município de São Pedro do Sul, RS. Uma exsicata da planta foi depositada no Herbário do Departamento de Biologia da UFSM (SMDB 9840).

Micropropagação

Micropropagação de dois acessos de *P. glomerata* – A micropropagação foi conduzida de acordo com a metodologia previamente descrita por Nicoloso et al. (2001) e Skrebsky et al. (2004). Os segmentos nodais (1 cm de comprimento) dos acessos BRA e JB-UFSM foram desinfestados e cultivados em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 10 mL de meio MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com sacarose (30 g L⁻¹), mio-inositol (100 mg L⁻¹) e ágar (6 g L⁻¹). O pH foi ajustado para 5,9. As plantas foram cultivadas em sala de crescimento com temperatura de 25±2°C, 16 horas de fotoperíodo e 35 µM m⁻² s⁻¹ de luminosidade.

As avaliações foram realizadas 30 dias após o início do cultivo, através do número médio de brotos por planta, número médio de segmentos nodais por planta, comprimento médio das brotações (cm) e percentagem de enraizamento.

As plantas cultivadas *in vitro*, com 30 dias, foram aclimatizadas conforme metodologia proposta por Skrebsky et al. (2004). As plantas ficaram expostas ao ambiente, em câmara climatizada, através da abertura dos tubos de ensaio durante um período de três dias. Após esse período, as plantas foram transferidas para recipientes contendo o substrato comercial Plantmax[®] Hortaliças e mantidas em câmara climatizada, sob condições de luminosidade, temperatura e fotoperíodo idênticos aos utilizados durante o cultivo *in vitro*. A percentagem de sobrevivência das plantas foi avaliada após 30 dias do transplante para o substrato.

Após 60 dias do plantio em substrato, as plantas foram transferidas para condições de cultivo em solo, no município de São Pedro do Sul, RS, utilizando-se um espaçamento de 0,60 m entre plantas (Montanari et al., 1999; Magalhães, 2000). No primeiro mês após o plantio, as plantas foram irrigadas diariamente.

Micropropagação de *Pfaffia tuberosa* – Segmentos caulinares, provenientes de plantas jovens coletadas no município de São Pedro do Sul (RS), foram desinfestados e estabelecidos *in vitro* em meio MS suplementado com sacarose (30 g L⁻¹), mio-inositol (100 mg L⁻¹) e ágar (6 g L⁻¹), conforme metodologia proposta por Flores et al. (2006a). Segmentos nodais de plantas assépticas e homogêneas, com 30 dias de idade, foram utilizados como explantes para a micropropagação das plantas, segundo metodologia de Flores et al.

(2006b). Os segmentos nodais (1 cm) foram cultivados em meio MS acrescido de 1 μ M de thidiazuron (TDZ), durante 30 dias, para a proliferação de brotações. Após, os segmentos nodais dos brotos induzidos com o TDZ foram subcultivados em meio MS para o alongamento e enraizamento das plantas. Após 25 dias, plantas completas foram transferidas para recipientes com o substrato comercial Plantmax[®] Hortaliças e mantidas em casa de vegetação sob condições de luminosidade parcial (sombra), temperatura e fotoperíodo naturais. Cada recipiente de cultivo foi coberto com plástico transparente de forma que as plantas se mantivessem em ambiente com alta umidade relativa, principalmente nos primeiros quinze dias após o plantio. Após 60 dias, as plantas foram transferidas para recipientes com solo e mantidas sob condições de luminosidade, temperatura e fotoperíodo naturais.

Análise do conteúdo de β -ecdisona

Material vegetal - Dois anos após o plantio no solo, as plantas provenientes dos acessos BRA e JB-UFSM de *P. glomerata* foram coletadas para a determinação do teor de β -ecdisona. A análise do teor de β -ecdisona nas plantas micropropagadas de *P. tuberosa* foi realizado após um ano e seis meses do plantio no solo. O doseamento de β -ecdisona também foi realizado em plantas nativas de *P. tuberosa*, coletadas no município de São Pedro do Sul, RS, Brasil.

Preparo das amostras - As raízes e as partes aéreas das plantas de *P. tuberosa* e de ambos os acessos (BRA e JB-UFSM) de *P. glomerata* foram separadas, cortadas em pequenos pedaços e secas em estufa a 50°C, durante o período de uma semana (Figueiredo et al., 2004). Após, os órgãos vegetativos foram triturados em liquidificador industrial e peneirados de forma a obter uma amostra com tamanho de partícula inferior a 300 μ m.

Extração das amostras - As amostras (1,0 g) foram submetidas ao processo de extração com 125 mL de metanol, grau HPLC, em Soxhlet, durante o período de 4 horas (Magalhães, 2000). Os extratos foram concentrados até 100 mL e uma alíquota (10 mL) de cada amostra foi tratada com carvão ativo (20 mg) durante cerca de três horas e após filtrada duas vezes em holder com membrana de 14 μ m. Posteriormente, as soluções foram novamente filtradas empregando-se uma membrana de 0,45 μ m (Millipore, Bedford, USA) e injetadas no sistema cromatográfico.

Reagentes e solventes utilizados no sistema cromatográfico - O padrão β -ecdisona foi adquirido da ChromaDex Inc. (Califórnia, USA). O metanol, grau HPLC, foi obtido da Vetec (São Paulo, Brasil). O metanol foi degaseificado em banho de ultra-som antes de ser utilizado no sistema cromatográfico.

Condições cromatográficas - As condições cromatográficas utilizadas neste estudo foram adaptadas da metodologia proposta por Magalhães (2000) e Figueiredo et al. (2004). As análises foram realizadas em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/HPLC) (Perkin-Elmer, Série 200) acoplado com detector UV-vis e coluna analítica Spheri 5 RP 18 (Perkin-Elmer, 220 x 4,6 mm, partículas de 5 μ m) protegida por uma pré-coluna Spheri 5 RP18.

A fase móvel empregada consistiu de metanol (100%), grau HPLC, sendo a eluição conduzida de forma isocrática, utilizando fluxo constante de 1 mL min⁻¹, a temperatura ambiente (25 \pm 2°C). A injeção das amostras (20 μ L) foi efetuada manualmente e a detecção dos picos ocorreu a 245 nm.

Preparo do padrão de β -ecdisona - Soluções do padrão de β -ecdisona foram preparadas a partir da diluição da amostra original (1 mg em 10 mL de metanol, grau HPLC), obtendo-se uma solução estoque com concentração inicial de 100 μ g mL⁻¹. A partir desta solução foram realizadas diluições sucessivas para a obtenção de soluções de trabalho contendo 5, 10, 15, 20 e 25 μ g mL⁻¹ de β -ecdisona, conforme proposto por Ribani et al. (2004) e Zimmer et al. (2006).

Curva analítica e quantificação - A curva analítica foi construída através de um gráfico de regressão que relaciona a área dos picos com as concentrações do padrão de β -ecdisona (Ribani et al., 2004; Magalhães, 2000; Figueiredo et al., 2004; Zimmer et al., 2006). A linearidade do método foi verificada através do coeficiente de determinação (R^2) da curva obtida na análise de regressão (Ribani et al., 2004). Considerou-se a média de três injeções em cada concentração (Zimmer et al., 2006). A quantificação foi realizada pelo método do padrão externo, onde a área do pico correspondente à β -ecdisona presente na amostra é calculada a partir da equação da reta da curva analítica construída com concentrações conhecidas do padrão (Ribani et al., 2004). A identificação do analito nas amostras foi baseada no tempo de retenção e na co-cromatografia das amostras com padrão de β -ecdisona.

Análise dos dados

Os dados foram submetidos à análise da variância, seguido pelo teste de Duncan, em nível de 1% de probabilidade de erro. Os tratamentos da cultura de tecidos foram repetidos cinco vezes, sendo cada repetição formada por dez plantas. Na análise do conteúdo de β -ecdisona, os resultados representaram a média de três extrações e três injeções. O teor de β -ecdisona foi determinado em relação à 100 g de massa seca (%).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Micropropagação

Após 30 dias do cultivo *in vitro* dos segmentos nodais de *P. glomerata* em meio MS, observou-se que todos os explantes formaram plantas completas, com brotações e raízes desenvolvidas. Os acessos JB-UFSM e BRA diferiram significativamente em relação ao número médio de brotos e número médio de segmentos nodais produzido por planta (Tabela 1). Os explantes oriundos do acesso BRA formaram um maior número de brotos e segmentos nodais (média de 1,7 brotos e 6,3 segmentos nodais) quando comparado ao JB-UFSM (média de 1,4 brotos e 5,1 segmentos nodais) (Tabela 1). Por outro lado, os parâmetros comprimento médio dos brotos e porcentagem de plantas enraizadas não diferiram entre os acessos (Tabela 1). De modo geral, as plantas desenvolveram um sistema radicular formado por um grande número de raízes (superior a 20 raízes por planta) alongadas (cerca 3,0 cm). As plantas de ambos os acessos de *P. glomerata* apresentaram uma alta taxa de sobrevivência durante a fase de aclimatização (Tabela 1) e uma boa adaptação às condições ambientais.

Tabela 1 – Aspectos morfogênicos de plantas de dois acessos de *Pfaffia glomerata* após 30 dias de cultivo *in vitro* no meio MS e sobrevivência durante a aclimatização. Santa Maria – RS, 2006.

Acesso	Nº médio de brotos/planta	Nº médio de Segmentos nodais/planta	Comprimento médio das brotações (cm)	Enraizamento das plantas (%)	Sobrevivência na aclimatização (%)
BRA	1,7 a*	6,3 a	6,7 a	100 a	100 a
JB-UFSM	1,4 b	5,1 b	6,2 a	100 a	100 a

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan, em nível de 1% de probabilidade de erro.

As plantas regeneradas dos acessos BRA e JB-UFSM desenvolveram brotações vigorosas e raízes bem desenvolvidas em meio MS dentro de 30 dias de cultivo. De fato, várias pesquisas conduzidas com *P. glomerata* relataram a viabilidade de produzir plantas homogêneas e de qualidade através da micropropagação de segmentos nodais em meio MS (Nicoloso et al., 2001; Skrebsky et al., 2004).

Contudo, verificou-se que a morfogênese *in vitro* em *P. glomerata* é genótipo dependente. Neste estudo, as diferenças entre os acessos mostraram-se evidentes principalmente no que diz respeito à produção de brotos e segmentos nodais *in vitro*. Diferenças morfológicas entre genótipos são muito freqüentes e já foram observadas em várias espécies propagadas *in vitro* (Bennici et al., 1997; Venkataiah et al., 2003). O acesso BRA apresentou um maior potencial para a multiplicação *in vitro* que o JB-UFSM (Tabela 1). A formação de gemas é um parâmetro importante em espécies como a *Pfaffia*, cuja propagação *in vitro* é realizada através do subcultivo de segmentos nodais (Nicoloso et al., 2001; Skrebsky et al., 2004, Flores et al., 2006a).

As plantas de ambos os acessos de *P. glomerata* apresentaram bom desenvolvimento durante o processo de aclimatização, bem como após a transferência para condições a campo, demonstrando que a propagação clonal *in vitro* é uma metodologia adequada para a produção de mudas nesta espécie.

Em *P. tuberosa*, os segmentos nodais formaram um grande número de brotações (média de 10 brotos por explante) e segmentos nodais (média de 18 segmentos nodais por explante) quando cultivadas em meio MS acrescido de 1 μ M de TDZ. Após o subcultivo em meio MS isento de TDZ, os segmentos nodais formaram brotações alongadas (média de 4,5 cm de comprimento) e com sistema radicular bem desenvolvido (média de 8 raízes por planta). Após 30 dias do plantio, as plantas apresentaram uma alta percentagem de sobrevivência (100%). Desta forma, a metodologia de micropropagação de *P. tuberosa* proposta por Flores et al. (2006b) mostrou-se adequada para a produção de mudas nesta espécie, devido à alta taxa de multiplicação e crescimento *in vitro*, bem como a boa adaptação às condições *ex vitro*. Após transferência para o solo, as plantas apresentaram bom desenvolvimento, não sendo detectada a presença de plantas com alterações fenotípicas .

Análise do conteúdo de β -ecdisona

Os fitoecdisteróides vêm sendo encontrados em teores consideráveis em muitas plantas pertencentes à família Amaranthaceae (Savchenko et al., 1998), inclusive em várias espécies de *Pfaffia*, como *P. iresinoides* (Nishimoto et al., 1987), *P. glomerata* (Shiobara et al., 1993) e *P. tuberosa* (Nishimoto et al., 1986). Apesar do fato de diferentes órgãos da planta diferirem na capacidade de acumular ecdisteróides (Tomás et al., 1992; Tomás et al.,

1993; Savchenko et al., 1998), em espécies de *Pfaffia*, o doseamento de β -ecdisona vem sendo feito quase que exclusivamente nas raízes das plantas, uma vez que apenas o sistema radicular é utilizado pela indústria de fitoterápicos e na medicina popular.

Entretanto, a análise dos extratos de *P. glomerata* e *P. tuberosa* mostrou que tanto as raízes como as partes aéreas das plantas acumularam β -ecdisona. Em adição, a metodologia utilizada para o doseamento de β -ecdisona por HPLC mostrou-se adequada para ambas as espécies estudadas dada a boa resolução do pico de interesse (tempo de retenção de 2,7 min.) e a presença de poucos interferentes na amostra (Figura 1).

Em *P. glomerata*, os acessos diferiram entre si em relação à quantidade de β -ecdisona, sendo que o acesso BRA apresentou um maior teor do metabólito quando comparado ao acesso JB-UFSM (Tabela 2). As variações no conteúdo de β -ecdisona presente nas raízes de diferentes acessos de *P. glomerata* são atribuídas, principalmente, à a variabilidade genética das plantas, bem como devido a fatores ambientais, uma vez que esta espécie é largamente distribuída pelo território brasileiro (Magalhães, 2000; Figueiredo et al., 2004). A produção de β -ecdisona encontrada nas raízes do acesso BRA (0,42%) e JB-UFSM (0,28%) ficou próxima dos valores encontrados em amostras comerciais de *P. glomerata*, que apresentam em torno de 0,3-0,5% de β -ecdisona (Figueiredo et al., 2004). Teores semelhantes foram encontrados nas raízes de 23 acessos oriundos de diferentes Estados do Brasil, cujo teor de β -ecdisona apresentou variação entre 0,15 e 0,47%, comprovando a existência de uma grande variabilidade entre acessos (Figueiredo et al., 2004). Outros estudos conduzidos com as raízes da espécie relataram concentrações de β -ecdisona de 0,65-0,75% (Montanari et al., 1999), 0,37% (Freitas et al., 2004) e 0,35% (Zimmer et al., 2006). Em ambos os acessos de *P. glomerata*, a parte aérea apresentou cerca de duas vezes mais β -ecdisona quando comparada às raízes (Tabela 2).

Tabela 2 - Teor de β -ecdisona (% por massa seca) nas raízes e parte aérea de plantas provenientes de dois acessos de *Pfaffia glomerata*, após dois anos do plantio. Santa Maria – RS, 2006.

Acesso	β -ecdisona (%)	
	Raízes	Partes aéreas
BRA	0,42 \pm 0,03 aB*	0,88 \pm 0,03 aA
JB-UFSM	0,28 \pm 0,006 bB	0,55 \pm 0,006 bA

*Médias seguidas de mesma letras minúscula não diferem entre si em relação ao acesso e letras maiúsculas quanto à parte da planta, pelo teste de Duncan, em nível de 1% de probabilidade de erro.

A produção de β -ecdisona em plantas selvagens de *P. tuberosa* e naquelas oriundas do processo de micropropagação foi similar, não diferindo estatisticamente entre si (Tabela 3). Neste estudo, os teores de β -ecdisona encontrados nas raízes de *P. tuberosa*

mostraram-se inferiores aos obtidos por Nishimoto et al. (1986) nesta espécie (0,23%). Contudo, semelhante ao observado em *P. glomerata*, as partes aéreas das plantas de *P. tuberosa* apresentaram uma maior concentração de β -ecdisona em relação às raízes (Tabela 3).

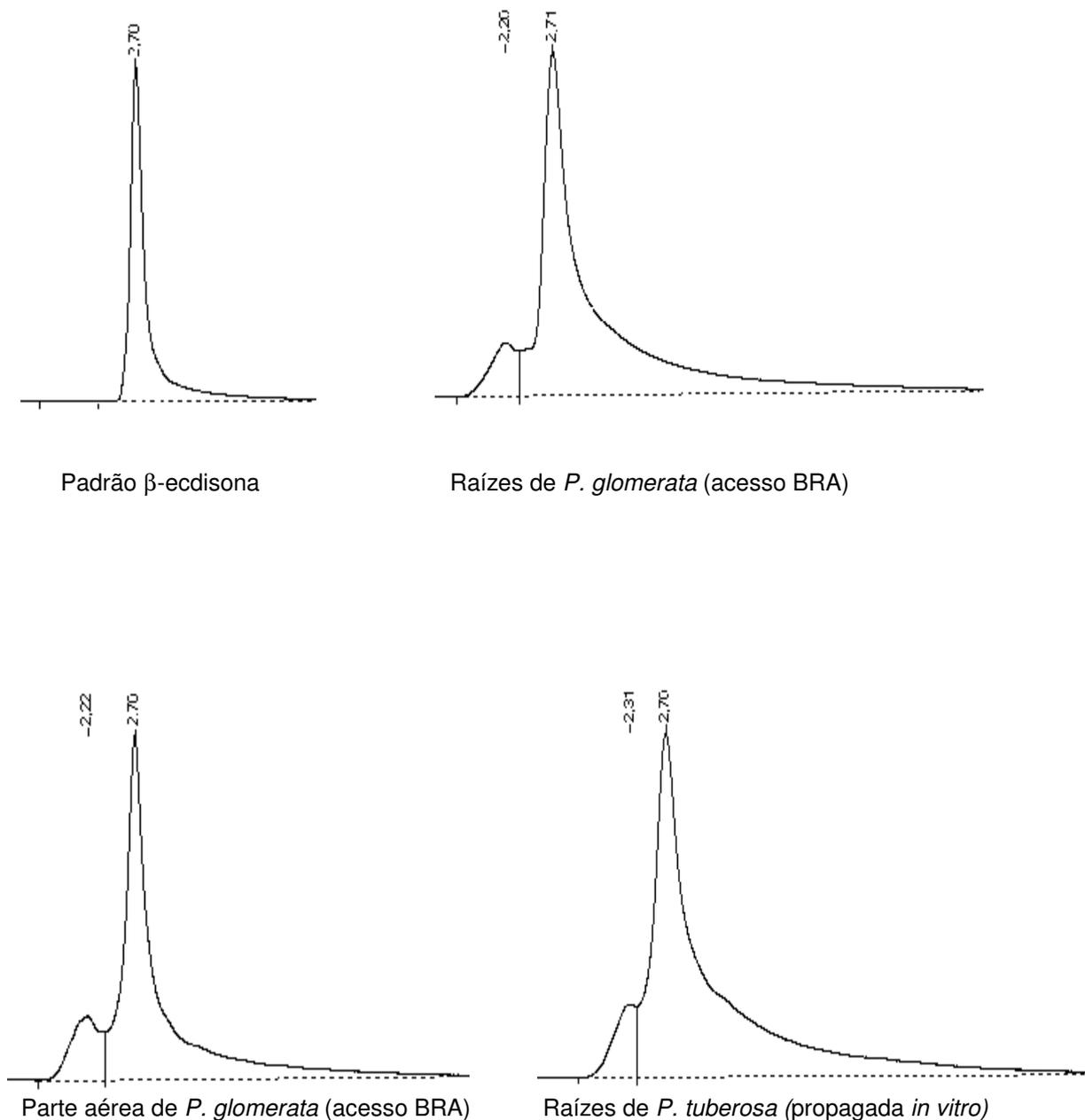


Figura 1 – Cromatogramas do padrão de β -ecdisona ($R_t = 2,7$ min.) e de extratos metanólicos de raízes e partes aéreas de *Pfaffia glomerata* e *Pfaffia tuberosa* analisados por HPLC. Condições cromatográficas: coluna Spheri 5 RP 18, 220 x 4,6 mm, partículas de 5 μm , a temperatura ambiente; fase móvel: metanol (100%), taxa de fluxo de 1 mL min^{-1} ; detecção a 245 nm.

Apesar das raízes de *P. tuberosa* apresentarem uma menor concentração de β -ecdisona quando comparadas às raízes de *P. glomerata*, a relação do teor de β -ecdisona entre raiz:parte aérea foi cerca de 1:2 em *P. glomerata* e 1:5 em *P. tuberosa* (Tabela 2 e 3).

Tabela 3 - Teor de β -ecdisona (% por massa seca) nas raízes e parte aérea de plantas de *Pfaffia tuberosa* coletadas a campo e plantas micropropagadas em meio MS com 1 μ M de TDZ, após um ano e seis meses do plantio, em casa de vegetação. Santa Maria – RS, 2006.

Origem da planta	β -ecdisona (%)	
	Raízes	Partes aéreas
Coletada a campo	0,14 \pm 0,006 aB*	0,63 \pm 0,007 aA
Propagada <i>in vitro</i>	0,09 \pm 0,002 aB	0,52 \pm 0,006 aA

*Médias seguidas de mesmas letras minúsculas não diferem entre si em relação à origem da planta e letras maiúsculas quanto à parte da planta, pelo teste de Duncan, em nível de 1% de probabilidade de erro.

Atualmente, devido à grande demanda de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*) para a produção de medicamentos, buscam-se alternativas para a produção de matéria-prima homogênea e de qualidade, um dos parâmetros exigidos no controle de qualidade dos fitoterápicos (Gil et al., 2005). Neste sentido, a micropropagação mostrou ser um método adequado para produção de plantas em ambas as espécies estudadas, devido à produção de mudas homogêneas e de qualidade em curto período de tempo. Em adição, os acessos de *P. glomerata* apresentaram teores de β -ecdisona similares aos encontrados em plantas não submetidas ao cultivo *in vitro* (Figueiredo et al., 2004). Da mesma forma, em *P. tuberosa*, os valores de β -ecdisona encontrados nas plantas micropropagadas foram similares aos observados nas plantas coletadas a campo, demonstrando que a metodologia de propagação clonal utilizada não afetou o metabolismo do composto de interesse.

Em ambas as espécies de *Pfaffia* estudadas, o teor de β -ecdisona foi maior na parte aérea quando comparado com o sistema radicular (Tabelas 2 e 3). Estudos referentes à produção órgão-específica de ecdisteróides em *P. iresinoides* revelaram uma alta produção de ecdisterona nas folhas (0,92%) quando comparada às raízes (0,62%) da planta (Nishimoto et al., 1987), o que corrobora os resultados obtidos com *P. glomerata* e *P. tuberosa* neste estudo. Estes resultados refletem o papel ecológico dos fitoecdisteróides em proteger os órgãos da planta mais suscetíveis ao ataque de insetos (Lafont, 1998; Savchenko et al., 1998; Savchenko et al., 2001). Em geral, tecidos/órgãos importantes para a sobrevivência da planta contêm uma maior concentração de fitoecdisteróides, o que provavelmente seja devido ao efeito protetor desses compostos contra insetos (Dinan, 2001; Marion-Poll & Descoins, 2002). No entanto, o tipo, o teor e a distribuição dos

fitoecdisteróides nas plantas variam de acordo com o genótipo, estágio de desenvolvimento e condições ambientais (Reixach et al., 1996; Dinan, 2001).

Os resultados obtidos em relação à presença e conteúdo de β -ecdisona nas partes aéreas de *P. glomerata* e *P. tuberosa* são pioneiros para estas espécies e refletem a necessidade de ampliar os estudos químicos, biológicos e farmacológicos utilizando-se como matéria-prima a parte aérea das plantas.

CONCLUSÕES

A micropropagação é um método adequado para a produção de plantas homogêneas e fitoquimicamente produtivas de *Pfaffia glomerata* e *Pfaffia tuberosa*. Em ambas as espécies, a parte aérea das plantas apresentam um maior teor de β -ecdisona quando comparada às raízes.

REFERÊNCIAS

- BENNICI, A. et al. Studies on callus growth and morphogenesis in several species and lines of *Amaranthus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 49, p. 29-33, 1997.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 48 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Ministério da Saúde, Brasil, 2004. [Http://www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)
- DINAN, L. Phytoecdysteroids: biological aspects. **Phytochemistry**, v. 57, p. 325-339, 2001.
- FIGUEIREDO, L. S. et al. Comportamento de acessos de *Pfaffia glomerata* nas condições de campos de Goytacazez-RJ. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 7, n.1, p. 67-72, 2004.
- FLORES, R.; MALDANER, J.; NICOLOSO, F. T. I. Otimização da micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Ciência Rural**, v. 36, n. 3, p. 845-851, 2006a.
- FLORES, R.; NICOLOSO, F.T.; MALDANER, J. Propagação clonal rápida de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken utilizando Thidiazuron. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n.3, 2006b.
- FREITAS, C.S.; BAGGIO, C. H.; SILVA-SANTOS, J. E. Involvement of nitric oxide in the gastroprotective effects of na aqueous extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, Amaranthaceae, in rats. **Life Sciences**, v. 74, p. 1167-1179, 2004.
- GIL, E. S. et al. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**. 1. ed. Campo Grande: UNIDERP, 2005. 438 p.
- LAFONT, R. Phytoecdysteroids in world flora: diversity, distribution, biosynthesis and evolution. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 45, n. 3, p. 276-295, 1998.
- MAGALHÃES, P. M. de. Agrotecnologia para el cultivo de fáfia o ginseng brasileiro. In: MARTINEZ, J.V. et al. **Fundamentos de agrotecnología de cultivo de plantas medicinales iberoamericanas**. Santafé de Bogotá: Convênio Andrés Bello/CYTED, 2000. p. 323-332.
- MARION-POLL, F. DESCOINS, C. Taste detection of phytoecdysteroids in larvae of *Bombyx mori*, *Spodoptera littoralis* and *Ostrinia nubilalis*. **Journal of Insect Physiology**, v. 48, p. 467-476, 2002.

- MONTANARI, I. Jr.; MAGALHÃES, P. M.; QUEIROGA, C. L. Influence of plantation density and cultivation cycle in root productivity and tenors of beta ecdisone in *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Acta horticulturae**, v. 3, n. 502, p. 125-129, 1999.
- MURASHIGUE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 5, p. 473-497, 1962.
- NICOLOSO, F. T. et al. Micropropagação do Ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 3, n. 2, p. 11-18, 2001.
- NISHIMOTO, N. et al. Ecdysteroids from *Pfaffia iresinoides* and reassignment of some ¹³CNMR chemical shifts. **Phytochemistry**, v. 26, n. 9, p. 2505-2507, 1987.
- NISHIMOTO, N., SHOIBARA Y, INOUE S. S. Ecdisterone from *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.1, n. 2, p. 188-191, 1986.
- REIXACH, N. et al. Biosynthesis of ecdysteroids *in vitro* prothalli cultures of *Polypodium vulgare*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 3, p. 597-602, 1996.
- RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- SAVCHENKO, T. et al. Distribution and identity of phytoecdysteroids in *Gomphrena* spp. (Amaranthaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 26, p. 337-346, 1998.
- SAVCHENKO, T. et al. Phytoecdysteroids from *Lamium* spp: identification and distribution within plants. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, p. 891-900, 2001.
- SHIOBARA, Y.; INOUE, S.; KATO, K. A norriterpenoid, triterpenoid and ecdysteroids from *Pfaffia glomerata*. **Phytochemistry**, v. 32, n. 6, p. 1527-1530, 1993.
- SKREBSKY, E. C.; NICOLOSO, F. T.; FERRÃO, G. da E. Sacarose e período de cultivo *in vitro* na aclimatização *ex vitro* de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Ciência Rural**, v. 34, n. 5, p. 1471-1477, 2004.
- TASCETTO, O. M.; PAGLIARINI, M. S. Occurrence of 2n and jumbo pollen in the brasilian ginseng (*Paffia glomerata* e *P. tuberosa*). **Euphytica**, v. 133, p. 139-145, 2003.
- TOMÁS, J. et al. Composition and location of phytoecdysteroids in *Ajuga reptans* *in vivo* and *in vitro* cultures **Phytochemistry**, v. 31, n. 5, p. 1585-1591, 1992.
- TOMÁS, J. et al. Phytoecdisteroid production by *Ajuga reptans* tissue culture. **Phytochemistry**, v. 32, n. 2, p. 317-324, 1993.
- VENKATAIAH, P.; CHRISTOPHER, T.; SUBHASH, K. Thidiazuron induced high frequency adventitious shoot formation and plant regeneration in *Capsicum annum* L. **Journal of Plant Biotechnology**, v. 5, n. 4, p.245-250, 2003
- ZIMMER, A. R. et al. HPLC method for the determination of ecdysterone in extractive solution from *Pfaffia glomerata*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, n. 2, p. 450-453, 2006.

CAPÍTULO 2

**Calogênese, morfogênese e produção de β -ecdisona em
Pfaffia tuberosa e *Pfaffia glomerata***

2.1 Indução de calos e aspectos morfogênicos de *Pfaffia tuberosa*

RESUMO: Diferentes explantes de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken foram cultivados em meio Murashige e Skoog (MS) suplementado com benzilaminopurina (BAP) (1 μM) juntamente com 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) ou ácido naftalenoacético (ANA) (1 ou 10 μM) objetivando o estudo do potencial morfogenético de calos. Após 40 dias de cultivo, verificou-se que a formação dos calos, bem como a indução da rota organogenética e embriogenética foram fortemente dependentes do tipo de explante e das combinações hormonais testadas. Melhores resultados quanto à formação de calos friáveis e à regeneração de brotos via organogênese indireta foram obtidos a partir de segmentos nodais cultivados em meio suplementado com 10 e 1 μM de 2,4-D respectivamente. Explantes provenientes de raízes formaram calos embriogênicos na presença de 1 ou 10 μM de 2,4-D ou 10 μM de ANA. O presente estudo demonstrou os melhores explantes e combinações hormonais para estudos que tenham como propósito o estabelecimento de calos friáveis e a regeneração de plantas via organogênese ou embriogênese somática.

Palavras-chave: organogênese, embriogênese somática, fitoreguladores, Amaranthaceae

Callus induction and morphogenetic aspects of *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken.

ABSTRACT: Different explants of *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken were cultivated on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 6-benzylaminopurine (BA) (1.0 μM) combined with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) or α -naphthaleneacetic acid (NAA) (1.0 or 10.0 μM) aiming at evaluating the morphogenetic potential of calli. Forty days after inoculation, both calli formation as well as the organogenetic and embryogenetic induction routes were dramatically dependent on the explant type and on the phytohormone combination used. The best results for the production of friable calli and regeneration of shoots using indirect organogenesis were obtained from nodal segments cultivated on media supplemented with 10.0 and 1.0 μM 2,4-D, respectively. Explants from roots formed embryogenetic calli in the presence of 1.0 or 10.0 μM 2,4-D or 10.0 μM NAA. The actual study defined the best explant and combination of phytohormones for studies that aim at obtaining friable calli and the regeneration of plants using organogenesis or somatic embryogenesis.

Key words: Brazilian ginseng, organogenesis, somatic embryogenesis, phytohormones, Amaranthaceae

INTRODUÇÃO

Pfaffia tuberosa (Amaranthaceae) é uma espécie medicinal conhecida popularmente como corango-de-batata, sendo distribuída de forma uniforme desde Goiás até o Rio Grande do Sul (Smith & Downs, 1972). Atualmente, o gênero *Pfaffia* compreende algumas espécies conhecidas como ginseng brasileiro devido ao uso popular de suas raízes como tônico, afrodisíaco e estimulante (Magalhães, 2000); além do fato de suas raízes serem morfológicamente semelhantes às do ginseng coreano (*Panax ginseng* C.A. Meyer). Estudos fitoquímicos têm revelado a presença de diversos compostos com efeitos adaptógenos nas raízes de várias espécies de *Pfaffia* (Nishimoto et al., 1986; Shiobara et al., 1993).

Ao contrário de outras espécies, a propagação de *P. tuberosa* não é viável através de estacas e o cultivo via sementes, provavelmente origina plantas muito heterogêneas, haja vista a alta variabilidade genética presente nesta espécie (Taschetto et al., 2003). Neste sentido, a aplicação de técnicas biotecnológicas como a cultura de tecidos tem auxiliado na propagação clonal de genótipos de plantas medicinais, bem como na obtenção de novas fontes de variabilidade através do cultivo de calos e células e na engenharia genética (Pletsch, 1998). A morfogênese *in vitro* resulta da interação entre os processos de indução, competência celular, determinação e diferenciação celular (Christianson & Warnick, 1983), que culminam na obtenção de órgãos ou embriões somáticos. A indução da rota embriogênica ou organogênica é influenciada e determinada pelo tipo de explante, genótipo, fitoreguladores, meio de cultura e condições de cultivo (Hou & Jia, 2004; Paramageetham et al., 2004). A embriogênese somática *in vitro* contribui para estudos fisiológicos, genéticos e bioquímicos que norteiam o desenvolvimento embrionário (Zimmerman, 1993), além de ser um método apropriado quando se deseja manter a estabilidade genética, o que é importante para a propagação clonal e transformação genética (Parrot et al., 1991). Em outro contexto, a organogênese indireta desperta o interesse dos melhoristas como uma nova fonte de variabilidade genética, fornecendo perspectivas de seleção *in vitro* ou *ex vitro* de plantas superiores (Tabares et al., 1991). Adicionalmente, o cultivo de calos e células têm facilitado a elucidação dos fatores que interferem no metabolismo secundário, tendo em vista a produção de compostos de importância medicinal *in vitro* (Oksman-Caldentey & Inzé, 2004).

Recentemente, Martins & Nicoloso (2004) estudaram a propagação clonal de *P. tuberosa in vitro* através do cultivo de segmentos nodais em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), no entanto, não há relatos sobre indução de calos e regeneração de plantas via organogênese ou por embriogênese somática nesta espécie. Em função disso, este estudo teve como propósito verificar a melhor fonte de explante e tipo de auxina no estabelecimento de calos e na expressão morfogenética de *P. tuberosa*.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, pertencente ao Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS. O material vegetal utilizado constou de plantas de *Pfaffia tuberosa* coletadas no Campus da UFSM, sendo uma exsicata depositada no Herbário do Departamento de Biologia sob o número de SMDB 7818.

Utilizaram-se plantas de *Pfaffia tuberosa* estabelecidas *in vitro* e com 30 dias de idade. O meio de cultura básico para a multiplicação do material vegetal e condução do ensaio foi o MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado de 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-

inositol e 6 g L^{-1} de ágar, conforme metodologia proposta por Martins & Nicoloso (2004). O pH foi ajustado para 5,9 antes da adição do ágar e da autoclavagem. A esterilização do meio foi realizada em autoclave por 20 minutos a 120°C e 1,0 atm de pressão.

Para o ensaio de calogênese e morfogênese, o meio de cultura foi suplementado com ácido naftalenoacético (ANA) ou 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) em duas concentrações (1 ou $10 \mu\text{M}$). Testaram-se quatro fontes de explantes (folha, segmento nodal, entrenó e raiz), conforme esquema fatorial $2 \times 2 \times 4$. Em todos os tratamentos, o meio de cultura foi suplementado com $1 \mu\text{M}$ de 6-benzilaminopurina (BAP). O material foi cultivado em frascos (100 ml) contendo 20 mL de meio, onde foram inoculados cinco explantes, com cerca de 1 cm, na posição horizontal. Os explantes foliares foram cultivados com a porção adaxial em contato com o meio de cultura. Utilizou-se a região mediana das folhas.

Após, o material foi mantido no escuro, em sala de crescimento, com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, durante o período de uma semana. Posteriormente, foram expostos a uma intensidade luminosa de $35 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas.

As avaliações foram feitas após 40 dias de cultivo, considerando-se as seguintes variáveis:

- 1) **Indução de calos:** intensidade de calo formado, intensidade de oxidação e características dos calos (consistência, textura e coloração). Para a variável intensidade de calo, utilizou-se uma escala de 1 à 4, onde: 1= ausência de calo; 2= calo com pequeno tamanho ($<1 \text{ cm}$); 3= tamanho médio (1-1,5 cm) e 4= tamanho grande ($> 1,5 \text{ cm}$). Para a variável intensidade de oxidação, utilizou-se uma escala de 1 à 5, onde: 1= ausência de oxidação; 3= calos parcialmente oxidados e 5= calos totalmente oxidados (Flores et al., 2000).
- 2) **Morfogênese:** percentagem de calos embriogênicos, percentagem de calos com brotos e percentagem de calos com raízes adventícias.

O delineamento experimental foi o inteiramente ao acaso com quatro repetições, sendo cada repetição formada por um frasco com cinco explantes. Os dados foram submetidos à análise da variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan, com $\alpha=0,01$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Indução de calos

Houve formação de calos em todos os tratamentos, os quais variaram em tamanho, textura e potencial morfogênico de acordo com as combinações hormonais e explantes utilizados. As diferenças observadas na proliferação dos calos ocorrem porque os explantes

podem variar em sua sensibilidade para os fitoreguladores e/ou devido a diferenças no teor endógeno de hormônios (Karp, 1995).

O crescimento dos calos foi influenciado significativamente pela interação entre tipo de explante, concentrações de auxina e tipo de auxina. A Figuras 1A e 1B mostram o efeito da interação entre os explantes e concentrações de 2,4-D e ANA, respectivamente, na intensidade de calo. Os dados demonstraram que os explantes foliares seguido pelos entrenós produziram calos mais desenvolvidos quando cultivados em meio contendo 1 μM de 2,4-D. Em meio contendo 10 μM de 2,4-D os segmentos foliares e nodais formaram calos com maior intensidade em relação aos demais explantes (Figura 1A).

Os melhores resultados no que diz respeito a intensidade de calo com o uso do ANA foram registrados com a concentração 10 μM utilizando-se como explantes os segmentos nodais, entrenós e raízes, os quais não diferiram estatisticamente entre si. Em todos os explantes estudados o uso de 10 μM de ANA mostrou-se superior à concentração 1 μM . Esta concentração mostrou-se ineficiente, não estimulando de forma satisfatória a proliferação celular em todos os explantes testados (Figura 1B). Apesar do ANA ser mais utilizado na indução de calos em outras espécies de amarantáceas (Mercier et al., 1992; Vieira et al., 1995; Bennici et al., 1997), em *P. tuberosa*, a análise do efeito isolado das auxinas, mostrou que o 2,4-D (intensidade = 3,0) foi estatisticamente superior ao ANA (intensidade = 2,4) no que diz respeito à intensidade média de calo.

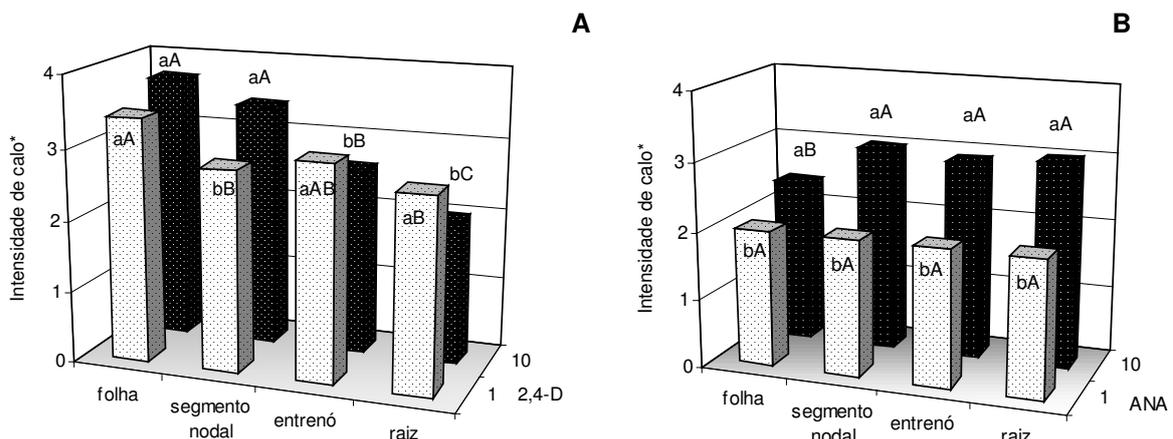


Figura 1 - Intensidade média de calo em *P. tuberosa* após 40 dias de cultivo *in vitro* em meio MS acrescido de BAP e concentrações de 2,4-D ou ANA. A) Intensidade média de calo em explantes cultivados com 1 ou 10 μM de 2,4-D; B) Intensidade média de calo em explantes cultivados com 1 ou 10 μM de ANA. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem quanto as concentrações de auxinas e maiúsculas quanto aos explantes, pelo Teste de Duncan (α 0,01). * Onde: 1= ausência de calo ; 2=calo com tamanho pequeno; 3=calo com tamanho médio e 4= calo com tamanho grande.

Os calos obtidos foram friáveis, de fácil desagregação e coloração predominante albina. Contudo, apesar de o material ter sido cultivado inicialmente no escuro, níveis variados de oxidação foram observados nos calos provenientes de diferentes explantes. Uma maior intensidade de oxidação foi observada nos calos oriundos de explantes foliares seguido por aqueles formados a partir de raízes (Figura 2).

Entretanto, nas raízes, a presença de oxidação foi restrita apenas às áreas do explante não substituídas pelo calo. Além do tipo de explante, a oxidação é influenciada pelo genótipo, componentes do meio nutritivo e condições de cultivo *in vitro* (Grattapaglia & Machado, 1998).

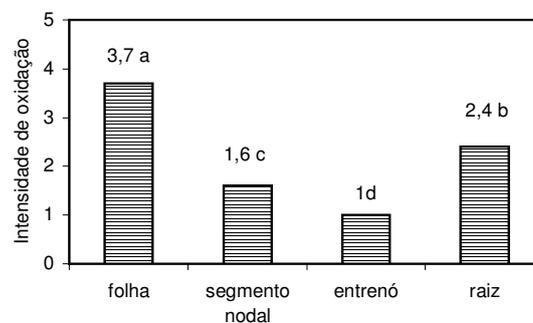


Figura 2 - Intensidade média de oxidação fenólica em calos de *P. tuberosa* em função do tipo de explante. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre os explantes, pelo Teste de Duncan (α 0,01). * Onde: 1= calos não oxidados; 3=calos parcialmente oxidados; 5=calos totalmente oxidados.

Morfogênese

Os calos apresentaram expressões morfogenéticas distintas de acordo com o explante e meio nutritivo, o que concorda com as observações de George & Sherrington (1984), os quais relataram que, de forma geral, o tipo de calo formado em um determinado genótipo, seu grau de diferenciação celular e potencial morfogênico dependem do explante e dos constituintes do meio de cultura. Adicionalmente, Paramageetham et al. (2004) induziram a formação de calos organogênicos ou embriogênicos dependendo dos tipos e concentrações de auxinas e citocininas adicionadas ao meio nutritivo. O efeito da fonte de explantes e combinações hormonais na morfogênese também foi constatado por Hou & Jia (2004).

Embriogênese

A formação de calos nodulares embriogênicos ocorreu como resposta a uma interação entre tipo e concentração de auxina e tipo de explante. Os explantes provenientes de raízes apresentaram alta competência embriogenética (Figura 3A, 3B). Independente da concentração de 2,4-D, esses explantes formaram 100% de calos embriogênicos. Apesar dos órgãos reprodutivos serem os explantes mais utilizados para a indução de embriogênese somática, em algumas espécies, como no ginseng coreano (*Panax ginseng* C.A. Meyer), raízes cultivadas em meio com o 2,4-D também formaram embriões somáticos (Chang & Hsiang, 1980). Recentemente, a indução de embriões somáticos a partir de raízes também foi constatada em *Oncidium* (Wu et al., 2004), *Eleutherococcus koreanum* (Park et al., 2005) e *Medicago truncatula* (Iantcheva et al., 2005). Conforme relata Jimenéz (2001) há uma correlação positiva entre a sensibilidade do explante às auxinas e teor do ácido indolacético (AIA). Assim, quanto maior a concentração endógena do AIA, maior a sensibilidade do explante às auxinas exógenas e, conseqüentemente, mais rápido é o processo de indução de embriogênese somática. Estas afirmações de Jimenéz (2001) podem explicar o fato das raízes de *P. tuberosa* serem altamente competentes para a rota embriogenética.

A rota embriogenética também foi induzida em 27% dos explantes foliares quando cultivados em meio com 1 μM de 2,4-D (Figura 3A). Resultados similares foram observados por Paramageetham et al. (2004), em que explantes foliares de *Centella asiatica* L. formaram embriões somáticos quando cultivados em meio MS acrescido de 2,4-D em combinação com o BAP.

Adicionalmente, calos nodulares embriogênicos foram registrados nas raízes cultivadas com 10 μM de ANA em uma frequência de 100% (Figura 3B, 5A). Essa concentração de ANA também induziu embriogênese nos entrenós, porém em baixa frequência (3,8%). Independente do tipo de explante, não houve formação de calos embriogênicos em meio suplementado com 1 μM de ANA (Figura 3B). O efeito de concentrações de 2,4-D, ANA e BAP foram estudadas na embriogênese de *Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC por Dutta Gupta et al. (1997), sendo os melhores resultados obtidos com 0,2 mgL^{-1} de ANA e 2 mgL^{-1} de BAP. Os autores verificaram que a substituição do ANA pelo 2,4-D não induziu embriogênese. Ao contrário, no presente trabalho, apenas a concentração mais elevada (10 μM) de ANA favoreceu a embriogênese. Além disso, os dados demonstraram o efeito positivo do ANA como do 2,4-D na indução de calos nodulares embriogênicos a partir de explantes radiculares, o que concorda com as observações de Parrot et al. (1991) e Zimmerman (1993), de que o 2,4-D seguido pelo ANA são as auxinas mais efetivas na indução de embriogênese somática.

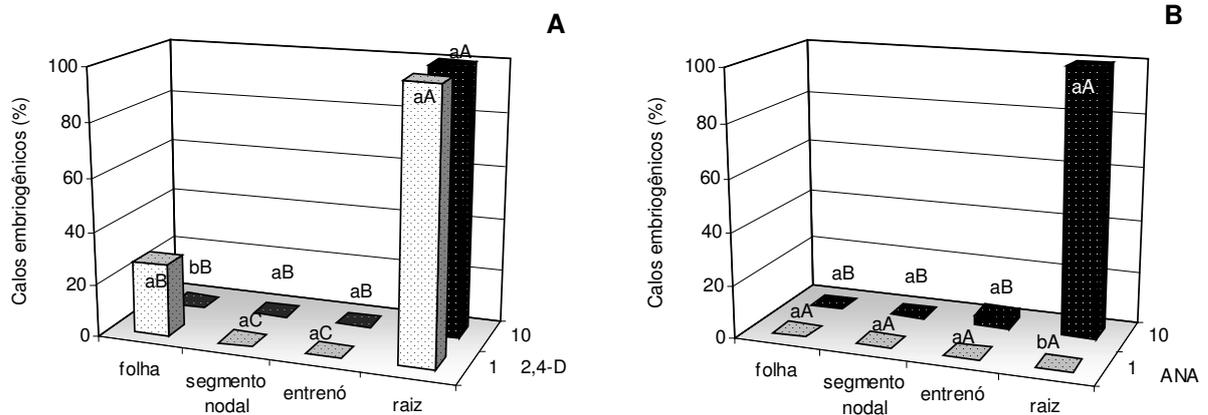


Figura 3 – Percentagem média de calos embriogênicos em *P. tuberosa*, após 40 dias de cultivo *in vitro* em meio MS suplementado com BAP e concentrações de 2,4-D ou ANA. A) Efeito de concentrações de 2,4-D e tipos de explantes na percentagem de calos embriogênicos; B) Efeito de concentrações de ANA e tipos de explantes na percentagem de calos embriogênicos. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem quanto as concentrações de auxinas e maiúsculas quanto aos explantes, pelo Teste de Duncan (α 0,01).

Organogênese

Dependendo do explante, tipo e concentração de auxina, registrou-se a regeneração de raízes e brotos via organogênese indireta. A regeneração de raízes foi influenciada pela interação entre explantes e concentrações de auxinas (Figura 4A, 4B). Em meio suplementado com o 2,4-D, uma maior percentagem de calos rizogênicos foi observada nos explantes foliares, o qual diferiu significativamente dos demais explantes. Não houve diferença estatística entre as concentrações de 2,4-D na regeneração de raízes (Figura 4A). Ao contrário, em meio contendo o ANA, todos os explantes regeneraram raízes, porém em diferentes frequências. Independente da concentração de ANA, os explantes foliares também mostraram-se muito responsivos. Além disso, uma alta percentagem de raízes foi observada nos segmentos nodais cultivados com 1 μ M de ANA seguido pelos entrenós. Em meio contendo 10 μ M desta auxina, os explantes foliares mostraram-se superiores e diferiram significativamente dos demais explantes (Figura 4B). De fato, a análise isolada das auxinas evidenciou que o ANA (60,8%) induziu uma maior regeneração de raízes nos calos em relação ao 2,4-D (7,5%). Gupta et al. (1997) salientaram que explantes foliares de *Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC cultivados em meio contendo altas concentrações de ANA e baixas concentrações de BAP produziram calos com pequeno tamanho e alta

produção de raízes. Da mesma forma, Thao et al. (2003) registraram a regeneração de raízes em calos de *Alocasia* cultivados em meio contendo BAP e ANA.

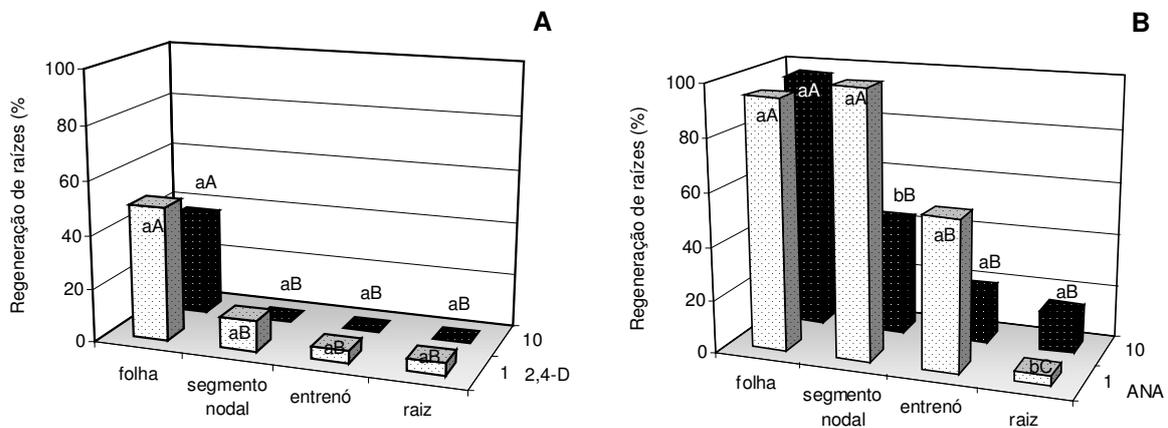


Figura 4 – Percentagem média de regeneração de raízes em calos de *P. tuberosa*, após 40 dias de cultivo *in vitro* em meio acrescido de BAP e concentrações de 2,4-D ou ANA. A) Efeito de concentrações de 2,4-D e tipos de explantes na regeneração de raízes em calos; B) Efeito de concentrações de ANA e tipos de explantes na regeneração de raízes em calos. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem quanto as concentrações de auxinas e maiúsculas quanto aos explantes, pelo Teste de Duncan (α 0,01).

Houve regeneração de brotos a partir de células superficiais dos calos provenientes de segmentos nodais cultivados na presença de 1 μ M de 2,4-D (Figura 5B). A percentagem de calos regenerativos foi 10%, os quais formaram 1 a 2 brotos/calco. O uso de uma combinação hormonal que favorece o crescimento do calo e ao mesmo tempo a regeneração indireta também foi relatado em *Cuminum cyminum* L. (Ebrahimmie et al., 2003). Estes autores verificaram que, nessa espécie, os explantes contendo tecidos meristemáticos produzem calos mais rapidamente e apresentam maior potencial para a regeneração de brotos quando comparados a explantes que não apresentam regiões meristemáticas. Desta forma, em *P. tuberosa*, a maior eficiência na regeneração de brotos via organogênese indireta, a partir de segmentos nodais, quando comparado aos demais explantes (entrenó, folha e raiz) pode ser explicado pelo fato dos primeiros apresentarem gemas. De fato, a região das gemas respondeu mais rapidamente em relação às demais regiões do explante, formando calos friáveis competentes para a rota organogenética. Por outro lado, em outras espécies de amarantáceas, entrenós e segmentos de folhas cultivados em meio MS suplementado com ANA e BAP regeneraram brotos de forma indireta (Mercier et al., 1992; Bennici et al., 1997). Em *P. tuberosa*, não se observou a regeneração de brotos em meio com o ANA, o que pode ser devido ao uso de concentrações muito elevadas deste

fitoregulador, pois em *Gomphrena officinalis* Mart., a presença do ANA em concentrações superiores a $0,5 \mu\text{M}$ inibiu a regeneração (Mercier et al., 1992). Por outro lado, em *Amaranthus cruentus*, Bennici et al. (1997) constataram que a melhor combinação hormonal para estimular a produção de brotos em calo foi $2,7 \mu\text{M}$ de ANA e $4,4 \mu\text{M}$ BAP, onde foram obtidos 54% de calos regenerativos.

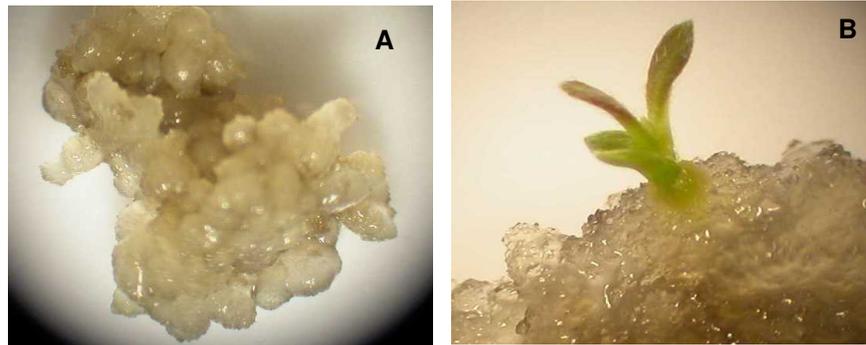


Figura 5 – Características de calos de *P. tuberosa* após 40 dias de cultivo em meio MS suplementado com 2,4-D, ANA e BAP. A) Calo friável com textura nodular e com embriões somáticos, obtido a partir de segmento radicular cultivado em meio acrescido de $10 \mu\text{M}$ de ANA e $1 \mu\text{M}$ de BAP (3,0X). B) Broto regenerado a partir de células superficiais de calo friável induzido a partir de segmento nodal na presença de $1 \mu\text{M}$ de 2,4-D e $1 \mu\text{M}$ de BAP (5,0X).

Os resultados obtidos no presente trabalho relataram importantes fatores que interferem no estabelecimento de calos friáveis, bem como na determinação da rota organogênética ou embriogênética em *P. tuberosa*. Resultados superiores em relação à proliferação de calos friáveis e organogênese indireta foram obtidos a partir de segmentos nodais na presença de 10 e $1 \mu\text{M}$ de 2,4-D respectivamente. Estes calos, juntamente com aqueles formados a partir de entrenós, utilizando $1 \mu\text{M}$ de 2,4-D ou $10 \mu\text{M}$ de ANA podem ser úteis para o cultivo de células de *P. tuberosa*, haja vista a alta friabilidade obtida. Além disso, os resultados obtidos com o uso do 2,4-D são importantes para trabalhos que tenham como objetivo a regeneração indireta de brotações, tendo em vista a obtenção de somaclones. Adicionalmente, o efeito do 2,4-D na regeneração de brotos e do ANA na regeneração de raízes a partir dos calos, fornecem subsídios para estudos fitoquímicos em calos organogênicos, uma vez que, a diferenciação de órgãos a partir dos calos tem sido uma alternativa para aumentar a produção de metabólitos de interesse em plantas medicinais (Oksman-Caldentey et al., 2004). Furuya et al. (1986) verificaram que as raízes de *Panax ginseng* C.A. Meyer, regeneradas *in vitro*, produziram mais saponinas quando comparadas a calos ou às raízes da planta matriz.

Por outro lado, os explantes radiculares mostraram-se ideais para trabalhos que tenham como propósito a indução de embriogênese somática. Apesar da regeneração de plantas ser possível via embriogênese ou organogênese, atualmente os esforços estão concentrados na regeneração de plantas a partir de embriões somáticos, os quais possuem ápices caulinares e radiculares conectados diretamente. Ao contrário, a formação de brotos e raízes a partir dos calos ocorre de forma independente em relação ao tempo e à localização, sendo necessário a formulação de meios específicos para a regeneração indireta, isolamento, multiplicação e enraizamento dos brotos. Até o presente momento, não há registros de outros relatos referentes à organogênese indireta e embriogênese somática em *P. tuberosa*. No entanto, posteriores estudos serão necessários para estudar a origem, a ontogenia e a conversão dos embriões somáticos em plantas completas, bem como testar combinações hormonais que favoreçam a regeneração de brotos a partir de calos.

De modo geral, constatou-se que os segmentos foliares apresentaram resultados inferiores em relação aos demais explantes dado à elevada taxa de oxidação. Desta forma, o uso viável desse explante depende do desenvolvimento de estratégias que minimizem a oxidação fenólica, como a substituição do BAP por outra citocinina e o uso de agentes antioxidantes no meio de cultura (Grattapaglia & Machado, 1998).

CONCLUSÕES

Os segmentos nodais e as raízes apresentaram melhores respostas quanto à proliferação de calos friáveis e morfogênese em relação aos entrenós e segmentos foliares.

Uma maior proliferação de calos friáveis é obtida cultivando-se segmentos nodais com 1 μM de BAP e 10 μM de 2,4-D. A regeneração de brotos via organogênese indireta ocorre quando esses explantes são cultivados com 1 μM de BAP e 1 μM de 2,4-D. Por outro lado, o ANA mostra-se mais efetivo que o 2,4-D na regeneração de raízes adventícias.

Explantes radiculares induzem calos nodulares embriogênicos quando cultivados em meio contendo 1 μM BAP juntamente com 1 ou 10 μM de 2,4-D ou 10 μM de ANA.

REFERÊNCIAS

- BENNICI, A. et al. Studies on callus growth and morphogenesis in several species and lines of *Amaranthus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 49, p. 29-33, 1997.
- CHANG, W. C.; HSIANG, Y. I. Plant regeneration through somatic embryogenesis in root derived callus of ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). **Theoretical and Applied Genetic**, v. 43, p. 133-135, 1980.
- CHRISTIANSON, M. L.; WARNICK, D. A. Competence and determination in the process of *in vitro* shoot organogenesis. **Development Biology**, v. 35, p. 288-293, 1983.

- EBRAHIMIE, E. et al. A rapid and efficient method for regeneration of plantlets from embryo explants of cumin (*Cuminum cyminum*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 75, p. 19-25, 2003.
- FLORES, R. et al. Morfogênese a partir de discos foliares de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) cv. Vila Nova. **Científica Rural**, v. 5, n. 1, p. 08-12, 2000.
- FURUYA, T.; YOSHIKAWA, T.; USHIYAMA, K.; ODA, H. Formation of plantlets from callus cultures of ginseng (*Panax ginseng*). **Experientia**, v. 42, p. 193-194, 1986.
- GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture**. Eversley: Exegetics Limited, 1984.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.) **Cultura de Tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI, 1998. p.183-260.
- GUPTA, S.; AHMED, R.; DE, D. N. Direct somatic embryogenesis and plantlet regeneration from seedling leaves of winged bean, *Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC. **Plant Cell Report**, v. 16, p. 628-631, 1997.
- HOU, S.W.; JIA, J.F. High frequency plant regeneration from *Astragalus melilotoides* hypocotyl and stem explants via somatic embryogenesis and organogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 79, p. 95-100, 2004.
- IANTCHEVA, A.; SLAVOV, S.; PRINSEN, E. Embryo induction and regeneration from root explants of *Medicago truncatula* after osmotic pre-treatment. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 81, p. 37-43, 2005.
- JIMÉNEZ, V. M. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 13, p. 196-223, 2001.
- KARP, A. Somaclonal variation as a tool for crop improvement, **Euphytica**, v. 85, p. 295-302, 1995.
- MAGALHÃES, P. M. de. Agrotecnologia para el cultivo de fáfia o ginseng brasileiro. In: MARTINEZ, J.V. et al. **Fundamentos de agrotecnología de cultivo de plantas medicinales iberoamericanas**. Santafé de Bogotá: Convênio Andrés Bello/CYTED, 2000. p. 323-332.
- MARTINS, C.F.; NICOLOSO, F.T. Micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, n. 3, p. 53-61, 2004.
- MERCIER, H.; VIEIRA, C.C.J.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Tissue culture and plant propagation of *Gomphrena officinalis* - a Brazilian medicinal plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 28, p. 249-254, 1992.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NISHIMOTO, N. et al. Ecdisterone from *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.1, n. 2, p. 188-191, 1986.
- OKSMAN-CALDENTEY, K.; INZÉ, D. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 9, p. 433-440, 2004.
- PARAMAGEETHAM, C.; BABU, G. P.; RAO, J.V.S. Somatic embryogenesis in *Centella asiatica* L. an important medicinal and nutraceutical plant of India. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 79, p. 19-24, 2004.

- PARK, S.Y. et al. Mass production of *Eleutherococcus koreanum* plantlets via somatic embryogenesis from root cultures and accumulation of eleutherosides in regenerants. **Plant Science**, v. 168, n. 5, p. 1221-1225, 2005.
- PARROT, W. A.; MERKLE, S. A.; WILLIAMS, E. G. Somatic embryogenesis: potencial for use in propagation and gene transfer systems. In: MURRAY, D. R. **Advanced methods in plant breeding and biotechnology**. Melkham: Redwood, 1991. p.158-200.
- PLETSCH, M. Compostos naturais biologicamente ativos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 4, ano 1, jan./fev., 1998.
- SHIOBARA, Y. et al. A norriterpenoid, triterpenoid and ecdysteroids from *Pfaffia glomerata*. **Phytochemistry**, v. 32, n. 6, p. 1527-1530, 1993.
- SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. **Flora ilustrada catarinense - Amarantáceas**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1972. 110 p.
- TABARES, E.; PACHÓN, I.; ROCA, W. M. Variación somaclonal y su aplicación al mejoramiento de cultivos. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (Eds.) **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: CIAT, 1991. Cap. 14. p. 339-360.
- TASCHETTO, O. M.; PAGLIARINI, M. S. Occurrence of 2n and jumbo pollen in the brasilian ginseng (*Paffia glomerata* e *P. tuberosa*). **Euphytica**, v. 133, p. 139-145, 2003.
- THAO, N. T. P.; OZAKI, Y.; OKUBO, H. Callus induction and plantlet regeneration in ornamental *Alocasia micholitziana*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 73, p. 285-289, 2003.
- TOKER, G. et al. Callus formation and cucurbitacin B accumulation in *Ecballium elaterium* callus cultures. **Fitoterapia**, v. 74, p. 618-623, 2003.
- VIEIRA, C. C. J.; BRAGA, M. R.; FIGUEREDO-RIBEIRO, R. C. L. Fructans in callus of *Gomphrena macrocephala* St.-Hil. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 42, p. 233-238, 1995.
- WU, I.F.; CHEN, J.T.; CHANG, W.C. Effects of auxins and cytokinins on embryo formation from root-derived callus of *Oncidium* 'Gower Ramsey'. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 77, p. 107-109, 2004.
- ZIMMERMAN, J. L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **Plant Cell**, v. 5, p. 1411-1423, 1993.

2.2 Efeito do 2,4-D e BAP no estabelecimento de calos e na produção de β -ecdisona em *Pfaffia tuberosa*

RESUMO - Segmentos nodais de *Pfaffia tuberosa* foram cultivados em meio Murashige e Skoog (MS) suplementado com 1, 5, 10 e 20 μ M de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) combinados com 0, 1 e 10 μ M de 6-benzilaminopurina (BAP). Calos friáveis e organogênicos foram obtidos a partir dos segmentos nodais cultivados em meio de cultura acrescido apenas com o 2,4-D. A presença do BAP no meio reduziu o crescimento dos calos e inibiu a regeneração de brotos axilares e de raízes adventícias. Brotos foram regenerados a partir dos calos cultivados com 1-20 μ M de 2,4-D, bem como, na presença 1 μ M de 2,4-D e BAP. A produção de β -ecdisona nos calos parece estar associada à regeneração de órgãos. Uma maior quantidade de β -ecdisona foi observada nos calos cultivados na presença de 10 μ M de 2,4-D, cujo teor foi quase duas vezes maior que o encontrado na parte aérea das plantas.

Palavras-chave – Amaranthaceae, calogênese, organogênese, ecdisteróides, HPLC

Effect of 2,4-D and BA on callus induction and β -ecdisona production of *Pfaffia tuberosa*

ABSTRACT - Nodal segments of *Pfaffia tuberosa* were cultivated on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 1, 5, 10 and 20 μ M 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) combined with 0, 1 and 10 μ M 6-benzylaminopurine (BA). Friable and organogenetic calli were obtained from nodal segments grown in medium supplemented with 2,4-D. The presence of BAP in the medium decreased calli growth and impaired the regeneration of axillary shoots and adventitious roots. Shoot regeneration by indirect organogenesis was observed from calli cultivated with 1-20 μ M 2,4-D, and in the presence of 1 μ M BA associated with 1 μ M 2,4-D. The highest β -ecdysone content was detected in calli cultivated in medium containing 10 μ M of 2,4-D, whose production was almost twice as large as that found on the aerial part of the plants.

Key words - Amaranthaceae, callogenesis, organogenesis, ecdysteroids, HPLC

INTRODUÇÃO

Pfaffia (Amaranthaceae) é um gênero que compreende várias espécies conhecidas como ginseng brasileiro, cujas raízes são utilizadas para combater problemas relacionados ao cansaço físico e mental, favorecendo a aprendizagem e a memória (Montanari et al., 1999, Marques et al., 2004). Estudos fitoquímicos conduzidos no gênero revelaram a presença de saponinas triterpênicas e fitoecdisteróides (Nishimoto et al., 1986, Shiobara et al., 1993). Os efeitos adaptógenos e antiestresse do gênero *Pfaffia* são atribuídos aos fitoecdisteróides, em especial ao composto β -ecdisona (Vigo et al., 2003; Figueiredo et al., 2004), o qual é utilizado como marcador químico da qualidade da raízes de *P. glomerata* (Montanari et al., 1999; Magalhães, 2000; Zimmer et al., 2006).

Pfaffia tuberosa (Spreng). Hicken é uma espécie de ginseng brasileiro ainda pouco estudada sob o ponto de vista biológico, químico e farmacológico (Taschetto & Pagliarini,

2003). Desta forma, ressalta-se a importância das técnicas da cultura de tecidos vegetais na manutenção do germoplasma existente, bem como na produção de biomassa e/ou genótipos com potencial para serem estudados e utilizados pela indústria farmacêutica. O estabelecimento de calos e a regeneração de plantas *in vitro* abrem perspectivas para o estudo da produção de metabólitos secundários, além da possibilidade de seleção e clonagem de genótipos mais produtivos (Stojakowska & Kisiel, 1999, Vieira et al., 1995, Krishnaveni & Rao, 2000, Luczkiewicz et al., 2002). Os primeiros relatos sobre a ocorrência de ecdisteróides *in vitro* foram feitos em calos de *Achyranthes* (Amaranthaceae) (Hikino et al., 1971) e *Trianthema* (Ravishankar & Metha, 1979). Subsequentemente, estes compostos foram detectados em diversas espécies e diferentes sistemas de cultivo *in vitro*, como em células, calos e plantas micropropagadas (Vanek, 1990; Svatos & Macek, 1994; Reixach et al., 1996; Tomás et al., 1992; 1993).

Diversos protocolos de calogênese e organogênese foram propostos para espécies de amarantáceas utilizando concentrações de ANA e BAP (Mercier et al., 1992; Vieira et al., 1995; Bennici et al., 1997), contudo, ensaios preliminares conduzidos com vários explantes de *P. tuberosa* mostraram que o ANA não foi eficaz na indução de calos. Nesta espécie, a proliferação de calos friáveis organogênicos foi favorecida cultivando-se segmentos nodais em meio com 2,4-D e BAP (Flores et al., 2006c). Em função disso, este trabalho teve como objetivo verificar os efeitos de diferentes concentrações de 2,4-D e BAP no estabelecimento de calos friáveis a partir de segmentos nodais de *Pfaffia tuberosa*, tendo em vista a possibilidade de regenerar plantas através da organogênese indireta e a produção de biomassa capaz de acumular β -ecdisona *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal utilizado constou de plantas nativas de *Pfaffia tuberosa* coletadas no município de São Pedro do Sul, RS, Brasil. Uma exsicata deste espécie encontra-se depositada no Herbário do Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Santa Maria, sob o número de SMDB 9840.

Indução de calos in vitro

Segmentos caulinares de plantas jovens de *P. tuberosa* coletadas no município de São Pedro do Sul (RS), foram desinfestados e estabelecidos *in vitro* em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com sacarose (30 g L⁻¹), mio-inositol (100 mg L⁻¹) e ágar (6 g L⁻¹), conforme metodologia proposta por Flores et al. (2006a). Para o estabelecimento de calos, segmentos nodais (1 cm de comprimento) de plantas homogêneas e com 30 dias de idade, foram cultivados em meio de cultura suplementado com quatro concentrações (1, 5, 10 e 20 μ M) de 2,4-D combinadas com três concentrações

(0, 1 e 10 μM) de BAP (Flores et al., 2006b), conforme esquema bifatorial 4x3. O pH do meio foi ajustado para 5,9. Os explantes foram inoculados na posição horizontal, em frascos contendo 20 mL de meio nutritivo, onde colocaram-se cinco explantes por frasco. Após, o material foi incubado no escuro, em sala de crescimento, com temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$, durante dez dias. Posteriormente, foram expostos à condições de luminosidade fornecida por lâmpadas brancas-frias, com intensidade de $35 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas.

As avaliações foram realizadas aos 35 dias de cultivo, considerando-se as seguintes variáveis: a) *estabelecimento de calos*: área dos explantes cobertas com calo. Na avaliação da área de calo, considerou-se os explantes que apresentavam 25, 50, 75 e 100% da área coberta com calos, conforme Lameira et al. (1997); b) *morfogênese*: porcentagem de regeneração de brotos axilares, número médio de brotações axilares por explante, comprimento médio das brotações (cm) axilares e porcentagem de regeneração de brotos e raízes adventícias a partir dos calos.

O delineamento experimental utilizado foi o completamente ao acaso com cinco repetições, sendo cada repetição composta de um frasco com cinco explantes. Os dados foram submetidos à análise da variância e as médias comparados pelo teste de Duncan, em nível de 1% de probabilidade de erro.

Doseamento de β -ecdisona

Calos organogênicos induzidos com 1, 5, 10 e 20 μM de 2,4-D, bem como as raízes e a parte aérea de plantas nativas de *Pfaffia tuberosa* foram analisados em relação à produção de β -ecdisona. As plantas silvestres foram coletadas em áreas de campo no município de São Pedro do Sul, RS, Brasil.

Extração das amostras – As amostras (raízes, parte aérea e calos) foram secas em estufa a 50°C e triturados em gral com o auxílio de um pistilo. O procedimento de extração foi realizado conforme metodologia de Tomás et al. (1993), com algumas modificações. As amostras (200 mg) foram extraídas com metanol, grau HPLC (2x, 5 mL) em banho ultrassônico, durante 20 minutos. O sobrenadante foi removido após centrifugação a 1000 g durante 10 minutos e os extratos obtidos das duas extrações foram combinados (10 mL). Os extratos foram tratados com carvão ativo (20 mg) durante cerca de três horas e após filtrados duas vezes em holder com membrana de 14 μm . Posteriormente, as soluções foram novamente filtradas empregando-se uma membrana de 0,45 μm (Millipore, Bedford, USA) e injetadas no sistema cromatográfico.

Reagentes e solventes utilizados no sistema cromatográfico - O padrão β -ecdisona foi adquirido da ChromaDex Inc. (Califórnia, USA). O metanol, grau HPLC (Vetec, São Paulo, Brasil) foi degaseificado em banho de ultra-som antes de ser utilizado como eluente no sistema cromatográfico.

Condições cromatográficas - As condições cromatográficas utilizadas neste estudo foram adaptadas da metodologia proposta por Magalhães (2000) e Figueiredo et al. (2004). As análises foram realizadas em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/HPLC) (Perkin-Elmer, Série 200) acoplado com detector UV-vis e coluna analítica Spheri 5 RP 18 (Perkin-Elmer, 220 x 4,6 mm, partículas de 5 μ m) protegida por uma pré-coluna Spheri 5 RP18. A fase móvel empregada consistiu de metanol (100%), grau HPLC, sendo a eluição conduzida de forma isocrática, utilizando fluxo constante de 1 mL min⁻¹, a temperatura ambiente. A injeção das amostras (20 μ L) foi efetuada manualmente e a detecção dos picos ocorreu a 245 nm.

Preparo do padrão de β -ecdisona - Soluções do padrão de β -ecdisona foram preparadas a partir da diluição da amostra original (1 mg em 10 mL de metanol, grau HPLC), obtendo-se uma solução estoque com concentração inicial de 100 μ g mL⁻¹. A partir desta solução foram realizadas diluições sucessivas para a obtenção de soluções de trabalho contendo 5, 10, 15, 20 e 25 μ g mL⁻¹ de β -ecdisona, conforme proposto por Ribani et al. (2004) e Zimmer et al. (2006).

Curva analítica e quantificação - A curva analítica foi construída através de um gráfico de regressão que relaciona a área dos picos com as concentrações do padrão de β -ecdisona (Ribani et al., 2004; Magalhães, 2000; Figueiredo et al., 2004; Zimmer et al., 2006). A linearidade do método foi verificada através do coeficiente de determinação (R^2) da curva obtida na análise de regressão (Ribani et al., 2004). Considerou-se a média de três injeções em cada concentração (Zimmer et al., 2006). A quantificação foi realizada pelo método do padrão externo, onde a área do pico correspondente à β -ecdisona presente na amostra é calculada a partir da equação da reta da curva analítica construída com concentrações conhecidas do padrão (Ribani et al., 2004). A identificação do analito nas amostras foi baseada no tempo de retenção e na co-cromatografia das amostras com padrão de β -ecdisona.

Análise dos dados - Os resultados representaram a média de três extrações e três injeções. O teor de β -ecdisona foi determinado em relação à 100 g de massa seca (%). Os dados foram submetidos à análise da variância, seguido pelo teste de Duncan, em nível de 1% de probabilidade de erro.

RESULTADOS

Indução de calos in vitro

As concentrações de 2,4-D não influenciaram o crescimento dos calos, enquanto que o BAP afetou negativamente este parâmetro. Conforme mostra a Figura 1, constatou-se uma redução na área de explante coberta com calo conforme o aumento da concentração de BAP no meio nutritivo. Calos bem desenvolvidos foram obtidos a partir dos segmentos nodais cultivados em meio contendo apenas 2,4-D, os quais apresentaram alta friabilidade e ausência de coloração (Figura 2A).

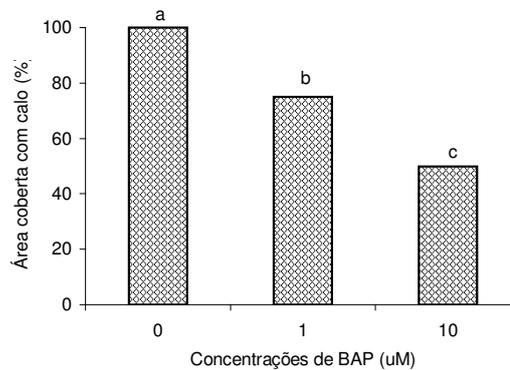


Figura 1 - Efeito de concentrações do BAP no percentual de área coberta com calos em segmentos nodais de *Pfaffia tuberosa* após 35 dias de cultivo *in vitro*. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si, pelo Teste de Duncan, em nível de 1% de probabilidade de erro.

Em todas as combinações hormonais, a proliferação de calos friáveis foi observada desde a primeira semana de cultivo, principalmente nas extremidades basal e apical dos segmentos nodais. Neste período, os segmentos nodais cultivados em meio suplementado com 2,4-D desenvolveram brotos axilares (Tabela 1). Por outro lado, não foi observado regeneração de brotações axilares nos segmentos nodais cultivados na presença do BAP.

Após 35 dias de cultivo, a percentagem de segmentos nodais com brotos axilares, o número e o comprimento dos brotos foram afetados negativamente pelo aumento da

concentração de 2,4-D no meio (Tabela 1). Calos cultivados em meio com 1, 5, 10 e 20 μM de 2,4-D podem ser observados nas Figuras 2A, 2B, 2D e 2E respectivamente. Adicionalmente, verificou-se a regeneração de brotos axilares com folhas morfológicamente anormais em meio suplementado com 5 μM de 2,4-D (Figura 2B, 2C). Estas alterações ocorreram em frequência de 4%, indicando que esta metodologia não é ideal para propagação clonal de *P. tuberosa*.

Tabela 1 - Efeito de concentrações de 2,4-D na percentagem, número e comprimento de brotações axilares formadas em segmentos nodais de *Paffia tuberosa*. Santa Maria – RS, 2006.

2,4-D (μM)	Brotos axilares (%)	Número de brotos axilares/segmento nodal	Comprimento médio dos brotos axilares (cm)
1	75 a*	1,2 a	3,8 a
5	58,4 b	0,9 b	1,9 b
10	18,8 c	0,3 c	0,7 c
20	4 d	0,1 c	0,1 d

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Duncan, em nível de 1% de probabilidade de erro.

A regeneração de brotações via organogênese indireta, ou seja a partir dos tecidos do calo, iniciou após 35 dias de cultivo nos tratamentos suplementados apenas com o 2,4-D (Figura 2F), não havendo diferença estatística significativa entre as concentrações desta auxina na frequência de regeneração (Figura 3A). Adicionalmente, constatou-se que a regeneração de brotações adventícias na presença do 2,4-D foi observada apenas naqueles segmentos nodais que não desenvolveram brotações axilares. Organogênese indireta também foi observada nos calos cultivados na presença de 2,4-D em combinação com 1 μM de BAP, porém houve uma redução na percentagem de regeneração nas concentrações mais elevadas de 2,4-D. O melhor resultado foi obtido em meio contendo 1 μM de 2,4-D e 1 μM de BAP, onde 20% dos calos apresentaram brotações (Figura 2G, 3A). Além disso, nos meios suplementados com 1 μM de BAP, verificou-se que um maior período de tempo de cultivo foi necessário para a regeneração de brotos a partir dos calos (55 dias) quando comparado com os tratamentos contendo apenas o 2,4-D (35 dias). De modo geral, os calos regenerativos formaram 1 a 2 brotações adventícias. Não houve regeneração de brotos adventícios nos calos cultivados em meio suplementado com 10 μM de BAP, independente da concentração de 2,4-D (Figura 3A).

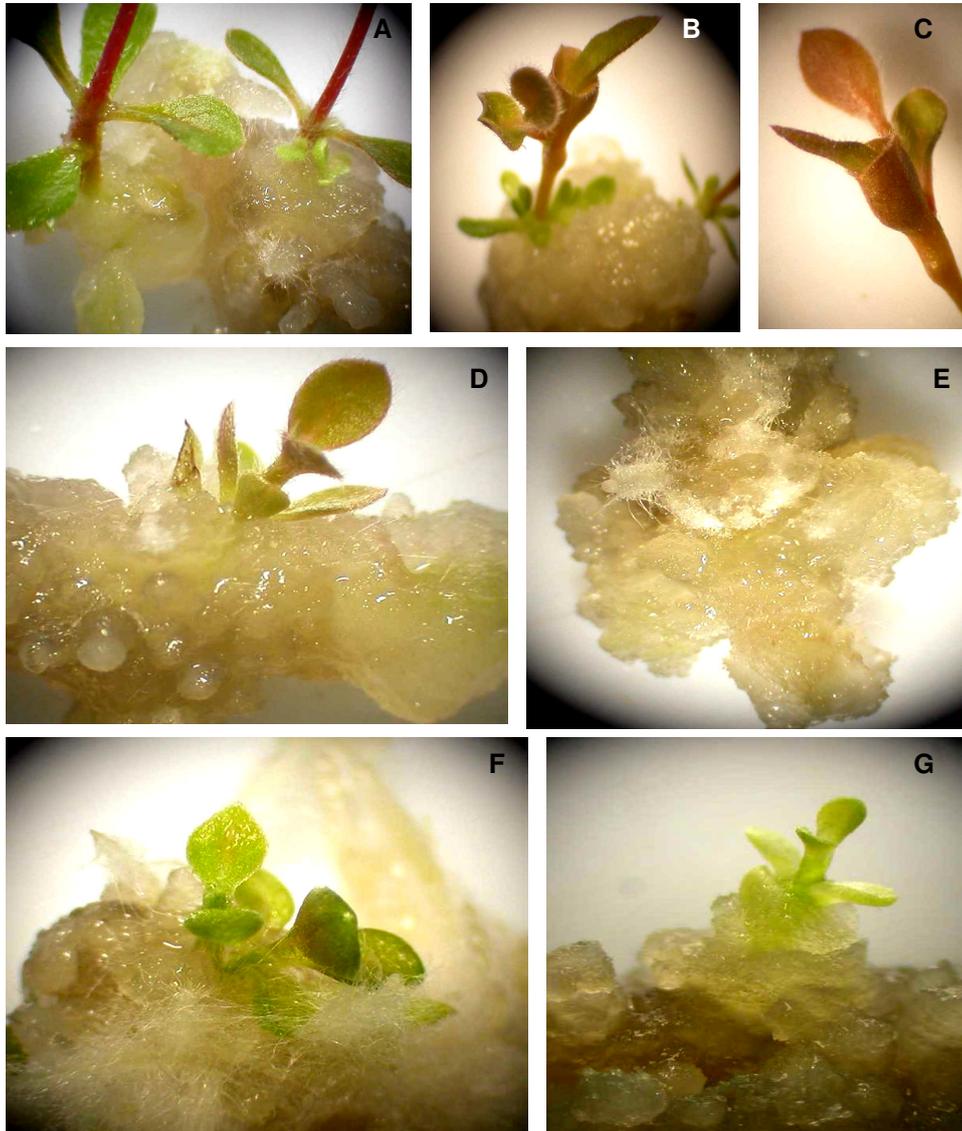


Figura 2 – Efeito de concentrações de 2,4-D e BAP na indução de calos e organogênese a partir de segmentos nodais de *Pfaffia tuberosa*. A) Segmento nodal com brotos axilares e calo friável cultivado em meio contendo com 1 μM de 2,4-D (3,0X); B) Segmento nodal com broto axilar com morfologia anormal desenvolvido em meio acrescido de 5 μM de 2,4-D (2,0X); C) Detalhe do broto observado na Figura C (2,5X); D) Calo friável e broto axilar cultivado em meio acrescido de 10 μM de 2,4-D (4,5X); E) Calo friável formado em meio contendo 20 μM de 2,4-D (3,5X); F) Calo friável com brotos adventícios e raízes, cultivado em meio com 1 μM de 2,4-D, após 35 dias de cultivo *in vitro* (2,5X); G) Calo com broto adventício cultivado em meio acrescido de 1 μM de 2,4-D e 1 μM de BAP, após 55 dias de cultivo (5,0X).

A formação de raízes nos calos foi influenciada pelas concentrações de BAP e 2,4-D, sendo que uma maior percentagem de calos rizogênicos ocorreu em meio não suplementado com o BAP, o qual diferiu significativamente das demais concentrações desta citocinina (Figura 2F, 3B). Observou-se também que houve uma redução na regeneração de raízes nas concentrações mais elevadas de 2,4-D (Figura 3B).

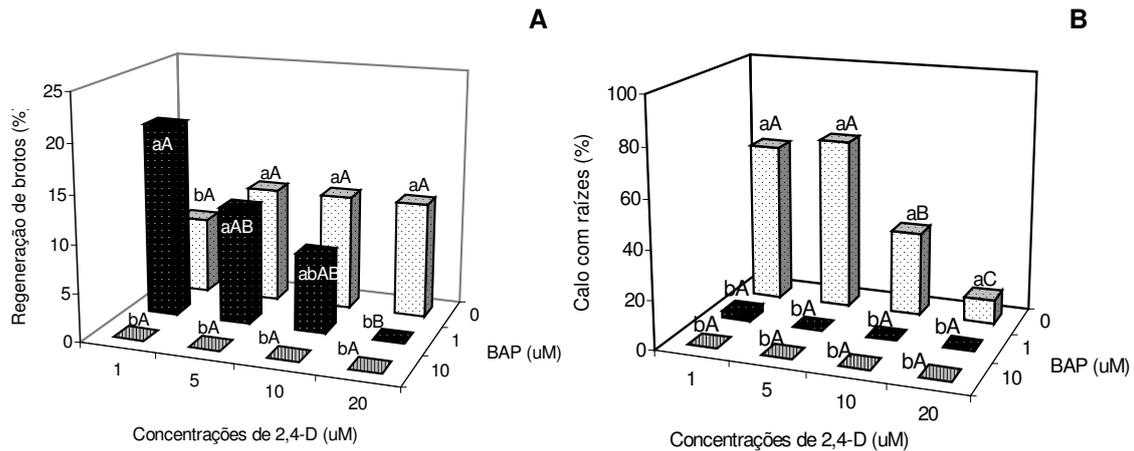


Figura 3 – Efeito de concentrações de 2,4-D e BAP na regeneração de brotos (A) e raízes (B) em calos oriundos de segmentos nodais de *P. tuberosa*. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem quanto as concentrações de BAP e maiúsculas quanto as concentrações de 2,4-D, pelo Teste de Duncan, em nível de 1% de probabilidade erro.

Doseamento de β -ecdisona em plantas e calos

O teor de β -ecdisona detectado na parte aérea e nas raízes das plantas, bem como nos calos cultivados em meio suplementado com o 2,4-D, pode ser observado na Figura 4. As características dos calos que foram estudados quimicamente podem ser observadas na Tabela 2.

Nas plantas coletadas a campo, verificou-se uma maior acumulação de β -ecdisona na parte aérea (0,3%) em relação ao sistema subterrâneo (0,02%) (Figura 4). O analito também foi detectado nos calos friáveis organogênicos cultivados em meio nutritivo acrescido de 1, 5 ou 10 μ M de 2,4-D, porém não foi detectado nos calos cultivados em meio contendo 20 μ M de 2,4-D (Figura 4).

Tabela 2 - Características de calos provenientes de segmentos nodais de *Pfaffia tuberosa* cultivados em meio MS acrescido de concentrações de 2,4-D, os quais foram analisados em relação à produção de β -ecdisona. Santa Maria – RS, 2006.

Características dos calos	2,4-D (μM)			
	1	5	10	20
Consistência	Altamente friável	Friável	Friável	Friável
Brotos axilares (%)	75	58,4	18,8	4
Nº brotos axilares/ segmento nodal	1,2	0,9	0,3	0,1
Comprimento dos brotos axilares (cm)	3,8	1,9	0,7	0,1
Regeneração de raízes (%)	65,5	70,3	34,5	10

Uma maior quantidade de β -ecdisona foi observada nos calos cultivados na presença de 10 μ M de 2,4-D (0,51%), cujo teor foi quase duas vezes maior que o encontrado na parte aérea das plantas (0,3%) cultivadas a campo. Os demais calos, cultivados com 1 e 5 μ M de 2,4-D, acumularam concentrações de β -ecdisona inferiores às encontradas na parte aérea, mas superiores ao detectado nas raízes da planta (Figura 4).

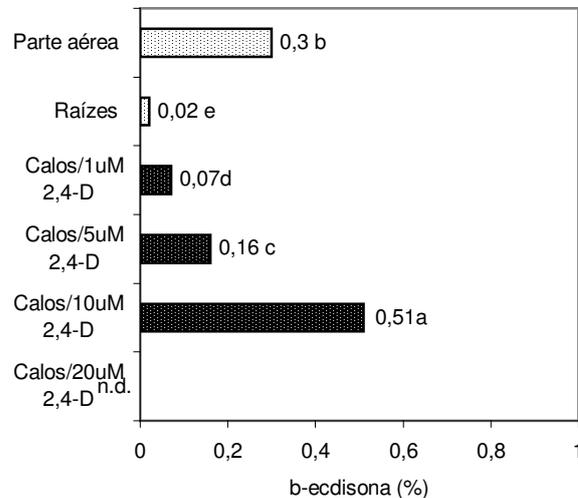


Figura 4 - Teor de β -ecdisona (% por massa seca) nas raízes e partes aéreas de plantas nativas de *Pfaffia tuberosa* e em calos friáveis organogênicos induzidos a partir de segmentos nodais em meio suplementado com 1, 5, 10 e 20 μ M de 2,4-D. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Duncan, em nível de 1% de probabilidade de erro. n.d.: não detectado

DISCUSSÃO

De modo geral, observou-se que o crescimento dos calos e o potencial organogênico dos mesmos foram determinados pelas concentrações de BAP e 2,4-D adicionadas ao meio nutritivo. As observações referentes ao efeito do BAP no crescimento de calos a partir de segmentos nodais de *Pfaffia tuberosa* (Figura 1) contrastam com os resultados obtidos para outras espécies de amarantáceas (Mercier et al., 1992; Vieira et al., 1995; Bennici et al. 1997), nas quais o BAP favoreceu a calogênese. Como relatado por Howell et al. (2003), o BAP é uma citocinina muito eficaz para a indução e proliferação de brotos axilares *in vitro*, contudo, em geral, inibe a regeneração de raízes. No presente estudo, o BAP mostrou-se mais inibitório que o 2,4-D na organogênese, inibindo tanto o desenvolvimento dos brotos axilares quanto a regeneração de raízes adventícias (Tabela 1, Figura 3A). Os resultados negativos do BAP na proliferação de brotos axilares coincidem com os de Araújo (2001), que trabalhando com *P. glomerata*, constatou que o BAP não favoreceu de forma significativa a produção de brotos axilares *in vitro*. Em relação à organogênese indireta, verificou-se que a adição do BAP ao meio nutritivo retardou o processo de formação de brotos nos calos, sendo que apenas a interação entre as menores concentrações de BAP e 2,4-D foram favoráveis à regeneração (Figura 3A). Em espécies de *Gomphrena*, o BAP mostrou-se eficaz na indução de brotações a partir de calos em concentrações que variaram entre 22 a 44 μM (Mercier et al. 1992, Vieira et al. 1995), enquanto que, em espécies de *Amaranthus*, concentrações mais reduzidas de BAP (4,4 μM) foram mais efetivas na regeneração (Bennici et al., 1997), corroborando os resultados obtidos neste estudo.

Por outro lado, as concentrações de 2,4-D foram adequadas para a produção de calos altamente friáveis e organogênicos (Tabela 1, Figura 3A, 3B). O 2,4-D é uma auxina muito eficaz na indução de calos (Thao et al., 2003, Kaur & Kothari, 2004), contudo, em geral, possui efeito inibitório na organogênese direta e indireta, bem como no desenvolvimento da planta (Anzidei et al., 1996; Kaur & Kothari, 2004). No entanto, os resultados demonstraram que, em *P. tuberosa*, a presença do 2,4-D não inibiu a formação dos brotos axilares, porém o aumento na concentração acarretou um decréscimo na porcentagem de explantes com brotos, no tamanho e no número de brotos regenerados (Tabela 1), bem como na formação de raízes (Figura 3B). Segundo Henry & Buyser (1994) e Mishiba et al. (2001), a redução na frequência de regeneração de calos está, possivelmente, associada às alterações genéticas nas células causadas pela presença de altas concentrações de auxinas, como o 2,4-D. Desta forma, a regeneração dos brotos axilares na presença do 2,4-D não descarta a possibilidade de alterações genéticas, epigenéticas e/ou malformações, como de fato foi constatado nas brotações axilares regeneradas na presença de 5 μM de 2,4-D (Figura 2B, 2C). Apesar das alterações morfológicas terem sido observadas em baixa frequência, os resultados indicaram que brotos axilares de *P. tuberosa* formados em meio acrescido de

2,4-D não devem ser utilizados para a propagação clonal. Mishiba et al. (2001) complementam que existem evidências de que o 2,4-D seja o responsável pela regeneração de brotos anormais e variantes somaclonais.

Neste estudo, o 2,4-D mostrou-se eficaz na regeneração rápida de brotos via organogênese indireta mesmo na ausência do BAP. Contudo, cabe ressaltar que a necessidade de um maior tempo de cultivo para a regeneração de brotos adventícios na presença de 1 μM de 2,4-D e 1 μM de BAP foi compensada pela maior frequência de regeneração (20% de calos regenerativos) quando comparada aos resultados obtidos apenas com o 2,4-D (11% de calos regenerativos) (Figura 3A). Desta forma, o uso do 2,4-D mostrou-se adequado para a proliferação de calos friáveis, bem como para a indução rápida de brotos e/ou raízes. Por outro lado, o uso do BAP juntamente com 2,4-D é indicado apenas quando se tem como propósito a regeneração de brotos via organogênese indireta, haja vista a baixa proliferação celular observada na presença dessa citocinina. Uma vez isolados dos calos, os brotos adventícios formados na presença do 2,4-D ou 2,4-D e BAP, desenvolveram-se e regeneraram raízes em meio MS isento de fitoreguladores, demonstrando que esta metodologia poderá ser útil para a produção de somaclones nesta espécie.

A produção órgão específica de β -ecdisona em *P. tuberosa* foi estudada previamente, confirmado os resultados referentes ao maior acúmulo deste metabólito na parte aérea da planta em relação às raízes. Além disso, neste estudo, constatou-se a presença de β -ecdisona a partir de calos oriundos de segmentos nodais nesta espécie. O teor de β -ecdisona nos calos parece ser dependente da presença de órgãos e influenciada pelas concentrações de 2,4-D. A produção de β -ecdisona foi detectada nos calos cultivados com 1 a 10 μM de 2,4-D, os quais apresentaram as maiores frequências de regeneração (Tabela 1, Tabela 2, Figura 3B). Por outro lado, a β -ecdisona não foi detectada nos calos cultivados com 20 μM de 2,4-D, os quais apresentaram uma redução significativa na organogênese (Tabela 1, Tabela 2, Figura 3B). Estes resultados sugerem que o acúmulo de β -ecdisona nos calos pode estar associado com a formação de tecidos/órgãos diferenciados. O cultivo de calos com órgãos diferenciados têm sido uma alternativa para aumentar a produção de compostos de interesse (Oksman-Caldentey et al., 2004). A biossíntese dos ecdisteróides envolve a rota acetato/mevalonato (rota do ácido mevalônico) e, possivelmente, a rota do metileritritolfosfato (rota MEP), cujos mecanismos são altamente conservados e compartimentarizados (Croteau et al., 2000; Taiz & Zeiger, 2004). Desta forma, a formação de células/tecidos mais diferenciados nos calos pode ser importante para a expressão de enzimas que atuam nos processos de biossíntese, transporte e armazenamento dos ecdisteróides. Em *Ajuga*, os ecdisteróides não foram detectados em calos não

organogênicos, enquanto que brotos e raízes foram capazes de acumular vários ecdisteróides *in vitro*, o que segundo Tomás et al., (1992), está relacionado à diferenciação dos tecidos. Em *P. tuberosa*, a presença de β -ecdisona nos calos está possivelmente associada à presença de brotações, uma vez que é na parte aérea que este composto ocorre em maior concentração nas plantas *in vivo* (Figura 4).

Além do efeito da citodiferenciação, a produção de fitoecdisteróides *in vitro* é influenciada pelo tipo de órgão cultivado, pela adição de fitoreguladores no meio de cultura, bem como pelo tempo de cultivo (Tomás et al., 1993; Dinan, 2001). O efeito dos fitoreguladores na biossíntese de metabólitos secundários vem sendo constatado em várias espécies (Vieira et al., 1995; Luczkiewicz et al., 2002; Karam et al., 2003; Toker et al., 2003). Neste contexto, o maior acúmulo de β -ecdisona observado nos calos cultivados com 10 μ M de 2,4-D também pode ser atribuído ao efeito desta auxina. Em *Ajuga*, a produção de ecdisteróides *in vitro* é estimulada pela adição de auxinas no meio de cultivo (Tomás et al., 1993).

O teor de β -ecdisona encontrado na parte aérea da planta (0,3%) e nos calos organogênicos induzidos com 10 μ M de 2,4-D (0,51%) representam um grande acúmulo deste metabólito quando comparado às concentrações (0,001-0,1%) encontradas na maioria das espécies (Lafont, 1998; Dinan, 2001). Diante disso, ressalta-se a grande potencialidade da *Pfaffia tuberosa* para estudos químicos, metabólicos e farmacológicos. Este estudo é pioneiro para o gênero *Pfaffia* e viabilizou com sucesso o estabelecimento de calos friáveis organogênicos a partir de segmentos nodais de *Pfaffia tuberosa*, fornecendo subsídios para a produção de diferentes clones através da organogênese indireta e estudos referentes à produção de ecdisteróides *in vitro*.

CONCLUSÕES

O presença de BAP no meio reduz o crescimento de calos e inibe a regeneração de brotos axilares e de raízes adventícias.

Brotos adventícios são regenerados com 1-20 μ M de 2,4-D, bem como na presença 1 μ M de 2,4-D e BAP.

A produção de β -ecdisona é influenciada pela presença de brotações nos calos e pela concentração de 2,4-D adicionada ao meio nutritivo.

REFERÊNCIAS

- ANZIDEI, M. et al. *In vitro* culture of *Foeniculum vulgare*: callus characteristics in relation to morphogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 45, p. 263-268, 1996.
- ARAUJO, W. L. de. **Citocininas no crescimento e desenvolvimento de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amarantheceae) cultivadas *in vitro***. 2001. 38 f. Monografia (Especialização em Biologia) – Curso de Especialização em Biologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2001.
- BENNICI, A. et al. Studies on callus growth and morphogenesis in several species and lines of *Amaranthus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 49, p. 29-33, 1997.
- CROTEAU, R. et al. Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAM, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Eds.). **Biochemistry & molecular biology of plants**. Rockville: Courier Companies, 2000. p. 1250-1318.
- DINAN, L. Phytoecdysteroids: biological aspects. **Phytochemistry**, v. 57, p. 325-339, 2001.
- FIGUEIREDO, L. S. et al. Comportamento de acessos de *Pfaffia glomerata* nas condições de campos de Goytacazes-RJ. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 7, p. 67-72, 2004.
- FLORES, R.; MALDANER, J.; NICOLOSO, F. T. I. Otimização da micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Ciência Rural**, v. 36, p. 845-851, 2006a.
- FLORES, R.; NICOLOSO, F. T.; MALDANER, J. Propagação clonal rápida de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken utilizando Thidiazuron. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, 2006b (no prelo)
- FLORES, R.; NICOLOSO, F. T.; VASCONCELLOS, N. J. S. Indução de calos e Aspectos Morfogênicos de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, 2006c (no prelo).
- HENRY, Y. V.; BUYSER, J. D. Genetic analysis of *in vitro* plant tissue culture responses and regeneration capacities. **Euphytica**, v. 79, p.45-58, 1994.
- HIKINO, H.; JIN, H.; TAKEMOTO, T. Occurrence of insect-moulting substance ecdysterone and inokosterone in callus tissue of *Achyranthes*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 198, p 438-439, 1971.
- HOWELL, S. H., LALL, S.; CHE, P. Cytokinins and shoot development. **Trends in Plant Science**, v. 8, p. 453-459, 2003.
- KARAM, N. S. et al. Growth and rosmarinic acid accumulation in callus, cell suspension, and root cultures of wild *Salvia fruticulosa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 73, p.117-121, 2003.
- KAUR, P.; KOTHARI, S. L. *In vitro* culture of Kodo millet: Influence of 2,4-D and picloram in combination with kinetin on callus initiation and regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 77, p. 73-79, 2004
- KRISHNAVENI, K.S.; RAO, J. V. S. A new triterpene from callus of *Pterocarpus santalinus*. **Fitoterapia**, v. 71, p. 10-13, 2000
- LAFONT, R. Phytoecdysteroids in world flora: diversity, distribution, biosynthesis and evolution. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 45, p. 276-295, 1998.

- LAMEIRA, O. A. et al. Efeito do thidiazuron na indução e manutenção de calos de erva baleeira (*Cordia verbenacea* L.). **Ciência Rural**, v. 27, p. 47-49, 1997.
- LUCZKIEWICZ, M. et al. Production of pulchelin E in hairy roots, callus and suspension cultures of *Rudbeckia hirta* L. **Plant Science**, v. 163, p. 91-100, 2002.
- MAGALHÃES, P. M. de. Agrotecnologia para el cultivo de fáfia o ginseng brasileiro. In: MARTINEZ, J.V. et al. **Fundamentos de agrotecnología de cultivo de plantas medicinales iberoamericanas**. Santafé de Bogotá: Convênio Andrés Bello/CYTED, 2000. p. 323-332.
- MARQUES, L.C. et al. Psychopharmacological assessment of *Pfaffia glomerata* roots (extract BNT-08) in rodents. **Phytotherapy Research**, v. 18, p. 566-572, 2004
- MERCIER, H. et al. Tissue culture and plant propagation of *Gomphrena officinalis* - a Brazilian medicinal plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 28, p. 249-254, 1992.
- MISHIBA, K., OKAMOTO, T.; MII, M. Increasing ploidy level in cell suspension cultures of *Doritaenopsis* by exogenous applications of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Physiologia Plantarum**, v. 112, p. 142-148, 2001.
- MONTANARI, I., MAGALHÃES, P. M.; QUEIROGA, C. L. Influence of plantation density and cultivation cycle in root productivity and tenors of beta ecdisone in *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Acta Horticulturae**, v. 3, p. 125-129, 1999.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NISHIMOTO, N. et al. Ecdisterone from *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 1, p.188-191, 1986.
- OKSMAN-CALDENTEY, K.; INZÉ, D. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 433-440, 2004.
- RAVISHANKAR, G. A.; MEHTA, A. R. Control of ecdysterone biogenesis and tissue cultures of *Trianthema postulacastrum*. **Journal of Natural Products**, v. 42, p. 152-158, 1979.
- REIXACH, N. et al. Biosynthesis of ecdysteroids *in vitro* prothalli cultures of *Polypodium vulgare*. **Phytochemistry**, v. 43, p. 597-602, 1996.
- RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.
- SHIOBARA, Y., INOUE, S.; KATO, K. A nortriterpenoid, triterpenoid and ecdysteroids from *Pfaffia glomerata*. **Phytochemistry**, v. 32, p. 1527-1530, 1993.
- SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. **Flora ilustrada catarinense - Amarantáceas**. Herbário Barbosa Rodrigues: Itajaí, 1972.
- STOJAKOWSKA, A.; KISIEL, W. Secondary metabolites from a callus of *Scutellaria columnae*. **Fitoterapia**, v. 70, p. 324-325, 1999.
- SVATOS, A.; MACEK, T. The rate of ecdysteroid production in suspension cultured cells of the fern *Pteridium aquilinum*. **Phytochemistry**, v. 35, p. 651-654, 1994.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Artmed: Porto Alegre, 2004.
- TASCETTO, O. M.; PAGLIARINI, M. S. Occurrence of 2n and jumbo pollen in the brasilian ginseng (*Paffia glomerata* e *P. tuberosa*). **Euphytica**, v. 133, p. 139-145, 2003.

- THAO, N. T. P., OZAKI, Y.; OKUBO, H. Callus induction and plantlet regeneration in ornamental *Alocasia micholitziana*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 73, p. 285-289, 2003.
- TOKER, G. et al. Callus formation and cucurbitacin B accumulation in *Ecballium elaterium* callus cultures. **Fitoterapia**, v. 74, p. 618-623, 2003.
- TOMÁS, J. et al. Composition and location of phytoecdysteroids in *Ajuga reptans* *in vivo* and *in vitro* cultures. **Phytochemistry**, v. 31, p. 1585-1591, 1992.
- TOMÁS, J. et al. Phytoecdysteroid production by *Ajuga reptans* tissue culture. **Phytochemistry**, v. 32, p. 317-324, 1993.
- VANEK, T. Production of ecdysteroids by plant cell culture of *Pteridium aquilinum*. **Biotechnology Letters**, v. 12, p. 727-730, 1990.
- VIEIRA, C. C. J., BRAGA, M. R.; FIGUEREDO-RIBEIRO, R. C. L. Fructans in callus of *Gomphrena macrocephala* St.-Hil. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 42, p. 233-238, 1995.
- VIGO, C. L.S; NARITA, E.; MARQUES, L.C. Validação da metodologia de quantificação espectrofotométrica das saponinas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen - Amaranthaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 46-49, 2003.
- ZIMMER, A. R. et al. HPLC method for the determination of ecdysterone in extractive solution from *Pfaffia glomerata*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, p. 450-453, 2006.

2.3 Calogênese, morfogênese e produção de β -ecdisona em *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, acesso BRA

RESUMO: *Pfaffia glomerata* é conhecida como ginseng brasileiro devido as suas propriedades adaptógenas e antiestresse. Segmentos nodais foram cultivados em meio Murashige e Skoog (MS) suplementado com diferentes concentrações de BAP, ANA ou 2,4-D. Houve proliferação de calos em todas as combinações hormonais estudadas. Os calos variaram em consistência e potencial organogênico dependendo das concentrações de BAP, ANA ou 2,4-D adicionados ao meio nutritivo. O acúmulo de β -ecdisona nos calos parece estar associado à friabilidade e à presença de brotações. Os maiores teores de β -ecdisona foram detectados em calos friáveis organogênicos cultivados em meio acrescido de 10 μ M de BAP juntamente com 5 μ M de ANA (0,28%) ou 0,5 μ M de 2,4-D (0,21%). Estes teores foram superiores ao encontrado nas raízes (0,19%), porém inferiores ao detectado na parte aérea (0,33%) das plantas *in vivo*.

Palavras-chave: ginseng-brasileiro; calogênese, morfogênese, ecdisteróides, HPLC

Callogenesis, organogenesis and β -ecdysone production of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen

ABSTRACT: *Pfaffia glomerata* is known as Brazilian Ginseng due to its adaptogens and antistress properties. Nodal segments were cultivated on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with different concentrations of 6-benzylaminopurine (BA), naphthaleneacetic acid (NAA) or 2,4-diclorofenoxiacético acid (2,4-D). There was proliferation of calli with all the hormonal combinations studied. The calli varied in consistency and organogenic potential depending on the concentrations of BA, NAA or 2,4-D added to the nutritive medium. The accumulation of β -ecdysone on the calli appears to be associated with friability and the presence of shoots. The highest β -ecdysone content were found in organogenic friable calli cultivated with 10 μ M of BA together with 5 μ M of NAA (0,28%) or 0.5 μ M of 2,4-D (0,21%). These calli produced higher concentrations of β -ecdysone than found in the roots (0,19), but lower than detected in the aerial part (0,33%) of the *in vivo* plants.

Key words: Brazilian ginseng, callogenesis, organogenesis, ecdysteroids, HPLC

INTRODUÇÃO

Dentre os países da América do Sul, o Brasil destaca-se como o mais importante centro de distribuição do gênero *Pfaffia* (Amaranthaceae), cujas plantas apresentam importantes atividades farmacológicas. A espécie de maior importância medicinal e comercial é a *Pfaffia glomerata*, conhecida como ginseng brasileiro devido a suas propriedades tônicas, afrodisíacas, adaptógenas e anti-estresse (Magalhães, 2000). Os principais constituintes químicos isolados das raízes de *P. glomerata* são as saponinas triterpênicas e os fitoecdisteróides (Shiobara et al., 1993). Os efeitos adaptógenos e anti-estresse do ginseng brasileiro são atribuídos à β -ecdisona, o ecdisteróide encontrado em maior quantidade nesta espécie (Magalhães, 2000).

Os fitoecdisteróides são compostos esteroidais polihidroxilados análogos aos hormônios esteroidais (ecdisteróides) dos artrópodes (Dinan, 2001), os quais atuam em várias fases do desenvolvimento destes animais, em especial no controle da ecdise. Nas plantas, a presença dos ecdisteróides parece ser um importante mecanismo na proteção contra insetos e outros artrópodes não adaptados (Klein, 2004). Desde 1966, quando estes metabólitos foram descobertos em plantas, os fitoecdisteróides vêm sendo estudados em relação às suas propriedades farmacológicas, dentre as quais destacam-se os efeitos anabólicos, adaptógenos e imunoestimulantes (Dinan, 2001; Klein, 2004). Diante destas importantes propriedades medicinais dos ecdisteróides, vários fitoterápicos e suplementos alimentares são produzidos com as raízes da *P. glomerata*, sendo o controle da qualidade efetuado através do doseamento de β -ecdisona (Brasil, 2004). Contudo, a demanda de raízes de *P. glomerata* para a indústria nacional e internacional é maior que a capacidade produtiva, sendo que a maior parte das raízes destinadas ao mercado farmacêutico é coletada por extrativismo (Magalhães, 2000; Figueiredo et al., 2004). A propagação de *P. glomerata* pode ser realizada através de sementes ou estacas, entretanto estes métodos ainda são ineficientes para a propagação de plantas em escala comercial (Nicoloso et al., 2001). Neste sentido, a cultura de tecidos vegetais é uma alternativa aos métodos convencionais de produção de biomassa e metabólitos secundários (Oksman-Caldentey et al., 2004) e várias pesquisas indicam a possibilidade de acumular ecdisteróides *in vitro* (Tomás et al., 1992; 1993; Svatos & Macek, 1994; Reixach et al., 1996; Anufrieva et al., 1998). Os primeiros relatos sobre a ocorrência de ecdisteróides *in vitro* foram feitos em calos de *Achyranthes* (Amaranthaceae) (Hikino et al., 1971) e *Trianthema* (Ravishankar & Metha, 1979). A indução e a caracterização de calos têm sido estudados em outras amarantáceas do gênero *Gomphrena* (Mercier et al., 1992) e *Amaranthus* (Bennici et al., 1997), tendo em vista o estudo e a otimização da produção de metabólitos secundários. Entretanto, em *P. glomerata*, poucos trabalhos têm sido feitos no sentido de estudar a indução de calos e não há estudos referentes à produção de β -ecdisona *in vitro*. Além disso, o cultivo de calos organogênicos, cujos tecidos são mais diferenciados, tem sido uma alternativa para aumentar a produção de compostos de interesse (Oksman-Caldentey et al., 2004).

Diante da importância medicinal e comercial de *P. glomerata* e da necessidade de se ampliar os estudos químicos e fisiológicos nesta espécie, este ensaio teve como objetivo verificar os efeitos de diferentes concentrações de 2,4-D, ANA e BAP na calogênese e morfogênese, visando a produção de biomassa capaz de acumular β -ecdisona *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

O material utilizado constou de plantas de *Pfaffia glomerata*, pertencentes ao acesso BRA, as quais foram coletadas no município de Querência do Norte, PR. Este acesso faz parte do Banco de Germoplasma da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília, DF. As plantas, cedidas pelo Cenargen, foram micropropagadas conforme metodologia de Nicoloso et al. (2001) e Skrebsky et al. (2004) e plantadas a campo no município de São Pedro do Sul, RS.

Indução de calos in vitro

Plantas de *Pfaffia glomerata* (acesso BRA) foram multiplicadas *in vitro* a partir de segmentos nodais, em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose e de 6 g L⁻¹ agar, conforme metodologia proposta por Nicoloso et al. (2001). O pH do meio foi ajustado para 5,9 e autoclavado a 120°C e 1,0 atm de pressão, durante 20 minutos. Plantas homogêneas *in vitro* foram utilizadas como fonte de explantes para a indução de calos.

Para o ensaio de calogênese e morfogênese, segmentos nodais (Flores et al., 2004) foram cultivados no mesmo meio de cultura descrito para a multiplicação das plantas, porém suplementado com três concentrações (1, 5 e 10 µM) de 6-benzilaminopurina (BAP) combinadas com quatro concentrações (0,5, 1, 5 e 10 µM) de 2,4-D ou ANA, conforme arranjo trifatorial 3x4x2. Os explantes foram cultivados em frascos (100 mL) contendo 20 mL de meio, nos quais foram inoculados cinco explantes, com cerca de 1 cm e com 2 gemas axilares. Os explantes foram inoculados em posição horizontal. Posteriormente, o material foi incubado no escuro, em sala de crescimento, com temperatura de 25±2°C, durante uma semana. Após, foram expostos a uma intensidade luminosa de 35 µmol m⁻²s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas.

As avaliações foram realizadas após 30 dias de cultivo, considerando-se as seguintes variáveis: a) *calogênese*: percentagem de formação de calo, percentagem de calos friáveis e compactos; b) *morfogênese*: percentagem de regeneração de brotos axilares e de raízes adventícias.

O delineamento experimental utilizado foi o completamente ao acaso com cinco repetições, sendo cada repetição composta de um frasco com cinco explantes. Os dados foram submetidos a análise da variância e as médias analisados pelo teste de Duncan, em nível de 1% de probabilidade de erro.

Doseamento de β -ecdisona

Calos formados em meio acrescido de várias combinações de 2,4-D e BAP ou ANA e BAP (Tabela 1), bem como as raízes e a parte aérea das plantas micropropagadas, após dois anos do plantio no solo, foram analisados em relação à produção de β -ecdisona.

Extração das amostras – As amostras (raízes, parte aérea e calos) foram secas em estufa a 50°C e triturados em gral com o auxílio de um pistilo. O procedimento de extração foi realizado conforme metodologia de Tomás et al. (1993), com algumas modificações. As amostras (200 mg) foram extraídas com metanol, grau HPLC (2x, 5 mL) em banho ultrassônico, durante 20 minutos. O sobrenadante foi removido após centrifugação a 1000 g durante 10 minutos e os extratos obtidos das duas extrações foram combinados (10 mL). Os extratos foram tratados com carvão ativo (20 mg) durante cerca de três horas e após filtrados duas vezes em holder com membrana de 14 μ m. Posteriormente, as soluções foram novamente filtradas empregando-se uma membrana de 0,45 μ m (Millipore, Bedford, USA) e injetadas no sistema cromatográfico.

Reagentes e solventes utilizados no sistema cromatográfico - O padrão β -ecdisona foi adquirido da ChromaDex Inc. (Califórnia, USA). O metanol, grau HPLC, foi obtido da Vetec (São Paulo, Brasil). O metanol foi degaseificado em banho de ultra-som antes de ser utilizado no sistema cromatográfico.

Condições cromatográficas - As condições cromatográficas utilizadas neste estudo foram adaptadas da metodologia proposta por Magalhães (2000) e Figueiredo et al. (2004). As análises foram realizadas em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/HPLC) (Perkin-Elmer, Série 200) acoplado com detector UV-vis e coluna analítica Spheri 5 RP 18 (Perkin-Elmer, 220 x 4,6 mm, partículas de 5 μ m) protegida por uma pré-coluna Spheri 5 RP18. A fase móvel empregada consistiu de metanol (100%), grau HPLC, sendo a eluição conduzida de forma isocrática, utilizando fluxo constante de 1 mL min⁻¹, a temperatura ambiente. A injeção das amostras (20 μ L) foi efetuada manualmente e a detecção dos picos ocorreu a 245 nm.

Preparo do padrão de β -ecdisona - Soluções do padrão de β -ecdisona foram preparadas a partir da diluição da amostra original (1 mg em 10 mL de metanol, grau HPLC), obtendo-se uma solução estoque com concentração inicial de 100 μ g mL⁻¹. A partir desta solução foram realizadas diluições sucessivas para a obtenção de soluções de trabalho contendo 5, 10, 15,

20 e 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de β -ecdisona, conforme proposto por Ribani et al. (2004) e Zimmer et al. (2006).

Curva analítica e quantificação - A curva analítica foi construída através de um gráfico de regressão que relaciona a área dos picos com as concentrações do padrão de β -ecdisona (Ribani et al., 2004; Magalhães, 2000; Figueiredo et al., 2004; Zimmer et al., 2006). A linearidade do método foi verificada através do coeficiente de determinação (R^2) da curva obtida na análise de regressão (Ribani et al., 2004). Considerou-se a média de três injeções em cada concentração (Zimmer et al., 2006). A quantificação foi realizada pelo método do padrão externo, onde a área do pico correspondente à β -ecdisona presente na amostra é calculada a partir da equação da reta da curva analítica construída com concentrações conhecidas do padrão (Ribani et al., 2004). A identificação do analito nas amostras foi baseada no tempo de retenção e na co-cromatografia das amostras com padrão de β -ecdisona.

Análise dos dados - Os resultados representaram a média de três extrações e três injeções. O teor de β -ecdisona foi determinado em relação à 100 g de massa seca (%). Os dados foram submetidos à análise da variância, seguido pelo teste de Duncan, em nível de 1% de probabilidade de erro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A proliferação de calos foi observada na primeira semana de cultivo em todas as combinações hormonais testadas. Contudo, verificou-se que a consistência e a organogênese dos calos foi influenciada significativamente pelo tipo e concentrações dos fitoreguladores (Tabela 1). O melhor resultado em relação à indução e proliferação de calos friáveis (98%) foi obtido em meio suplementado com 0,5 μM de 2,4-D e 1 μM de BAP (Tabela 1). A maior percentagem média de calos friáveis (80%) em meio acrescido de ANA foi registrada utilizando-se 10 μM desta auxina e 1 μM de BAP, cujo resultado foi estatisticamente inferior ao melhor resultado observado como 2,4-D (Tabela 1). Ao contrário, o aumento da concentração de 2,4-D e a redução da concentração de ANA favoreceram a formação de calos compactos (Tabela 1). Em meios suplementados com o 2,4-D, melhores resultados quanto à formação de calos com consistência compacta foram obtidos utilizando-se 10 μM de 2,4-D e 10 μM de BAP, em que se obteve uma percentagem média de 65% de calos compactos (Tabela 1). Na presença do ANA, uma maior percentagem média de calos compactos (70%) foi registrada utilizando-se 0,5 μM de ANA e 5 - 10 μM de BAP (Tabela 1).

Os resultados referentes à consistência dos calos estão de acordo com os relatos de Flores et al. (2004) que, trabalhando com *P. glomerata*, verificaram que calos mais desenvolvidos e friáveis formaram-se a partir de segmentos nodais cultivados em meio com concentrações reduzidas de 2,4-D e BAP, enquanto que calos compactos são favorecidos em meio contendo concentrações mais elevadas destes fitoreguladores. O efeito de concentrações de 2,4-D na consistência de calos também foi estudado em plantas ornamentais da espécie *Alocasia micholitziana* (Araceae), onde concentrações reduzidas (0,1 a 0,5 μM) de 2,4-D formaram calos friáveis, enquanto que concentrações mais elevadas (5 μM) induziram calos compactos (Thao et al., 2003). Além do tipo e concentração dos fitoreguladores adicionados ao meio nutritivo, a consistência dos calos depende do explante e do genótipo (Mercier et al., 1992; Vieira et al., 1995).

O desenvolvimento de brotos axilares a partir das gemas presentes nos segmentos nodais foi observado desde a primeira semana de cultivo. O efeito das concentrações de ANA ou de 2,4-D na percentagem de segmentos nodais que desenvolveram brotos axilares pode ser observado na Tabela 1. Verificou-se que o aumento da concentração de 2,4-D inibiu drasticamente a formação de brotações. Por outro lado, em meio acrescido de ANA, todos os segmentos nodais desenvolveram brotações axilares, independente da concentração utilizada (Tabela 1). Em geral, meios acrescidos de BAP e ANA potencializam a indução e o crescimento de brotos (Mercier et al., 1992). Ao contrário, o 2,4-D é uma auxina muito eficaz na indução de calos (Davies, 1990), porém possui efeito inibitório na organogênese (Anzidei et al., 1996). Flores et al. (2004), trabalhando com morfogênese em *Pfaffia glomerata*, verificaram que o 2,4-D, quando utilizado na concentração de 10 μM , inibiu completamente a formação de brotos axilares.

A formação de raízes foi influenciada pelas combinações de fitoreguladores utilizadas (Tabela 1). O aumento da concentração de BAP e 2,4-D afetou negativamente a regeneração de raízes, sendo que os melhores resultados foram obtidos em meio suplementado com 1 μM de BAP e 5 ou 10 μM de ANA, em que 100% dos calos foram rizogênicos (Tabela 1). Os resultados referentes aos efeitos negativos do BAP na formação de raízes a partir dos calos estão de acordo com os relatos de George (1996).

As análises cromatográficas dos extratos metanólicos da planta *in vivo* mostraram que uma maior concentração de β -ecdisona ocorre na parte aérea (0,33%) em relação às raízes (0,19%) da planta (Figura 1). De fato, apesar das pesquisas químicas e farmacológicas serem conduzidas apenas com o sistema radicular de *P. glomerata*, outros estudos químicos conduzidos com esta espécie também demonstraram um maior acúmulo de β -ecdisona na parte aérea da planta. Segundo Dinan (2001), a expressão dos genes

necessários para a biossíntese e acúmulo dos ecdisteróides em diferentes partes das plantas está relacionado ao efeito destes metabólitos na proteção contra insetos.

Alguns calos formados a partir de segmentos nodais em meio contendo diferentes concentrações de BAP, 2,4-D e ANA foram analisados quanto à presença e conteúdo de β -ecdisona. De modo geral, constatou-se que o acúmulo de β -ecdisona nos calos parece estar associado à friabilidade e à presença de brotações (Tabela 1). Além disso, observou-se que a formação de raízes adventícias nos calos não favoreceu o acúmulo de β -ecdisona, sendo os maiores teores detectados em calos isentos de raízes (Tabela 1).

Em meio suplementado com o 2,4-D, a β -ecdisona foi detectada apenas nos calos cultivados com as menores concentrações desta auxina (0,5 e 1 μ M), em que a frequência de calos friáveis e com brotações foi maior em relação às concentrações superiores de 2,4-D (Tabela 1; Figura 2A, 2B, 2C). Desta forma, o fato da β -ecdisona não ter sido detectada nos calos cultivados nas concentrações mais elevadas de 2,4-D (5 e 10 μ M) pode estar relacionado com o efeito desta auxina na inibição da organogênese (Figura 2D, 2E, 2F).

Nos calos, com consistência predominante compacta e cultivados com 0,5 e 1 μ M de ANA a β -ecdisona não foi detectada (Figura 2G, 2H, 2I). Por outro lado, o metabólito foi detectado nos calos cultivados em concentrações mais elevadas de ANA (5 e 10 μ M), onde houve uma maior frequência de calos friáveis (Figura 2J, 2L, 2M). Independente da concentração de ANA e BAP, 100% dos calos analisados apresentavam brotações (Tabela 1).

Além disso, verificou-se um maior teor de β -ecdisona nos calos cultivados com concentrações mais elevadas de BAP. Nos meios acrescidos de 0,5 μ M de 2,4-D, o aumento na concentração do BAP de 1 μ M (0,16%) para 10 μ M (0,21%), aumentou consideravelmente o teor de β -ecdisona nos calos (Tabela 1; Figura 2A, 2B). Da mesma forma, o teor de β -ecdisona detectado nos calos cultivados com 5 μ M de ANA, juntamente com 1 μ M de BAP ou 10 μ M de BAP foi de 0,09% e 0,28%, respectivamente (Tabela 1; Figura 2J, 2L).

Tabela 1 - Frequência de calos friáveis e compactos e percentagem de regeneração de brotos e raízes em segmentos nodais de *Pfaffia glomerata*, após 30 dias de cultivo em meio MS acrescido de BAP, 2,4-D ou ANA, em diferentes concentrações (expressas em μM). Santa Maria – RS, 2006.

BAP	2,4-D	ANA	Calo friável (%)	Calo compacto (%)	Brotos (%)	Raízes (%)	β -ecdisona (%)
1	0,5	-	98 a*	2 j*	100 a*	50 d*	0,16 cd*
1	1,0	-	85 b	15 i	100 a	50 d	-
1	5,0	-	40 fg	60 c	0 d	8 f	n.d.
1	10,0	-	50 de	55 d	0 d	4 g	-
1	-	0,5	45 ef	55 d	100 a	90 c	n.d.
1	-	1,0	50 de	50 e	100 a	95 b	-
1	-	5,0	50 de	50 e	100 a	100 a	0,09 f
1	-	10,0	80 b	20 h	100 a	100 a	-
5	0,5	-	85 b	15 i	100 a	0 h	-
5	1,0	-	80 b	20 h	85 b	0 h	0,17 c
5	5,0	-	40 fg	60 c	10 c	0 h	-
5	10,0	-	38 fgh	62 bc	0 d	0 h	n.d.
5	-	0,5	30 h	70 a	100 a	0 h	-
5	-	1,0	35 gh	65 b	100 a	14 e	n.d.
5	-	5,0	40 fg	60 c	100 a	8 f	-
5	-	10,0	50 de	50 e	100 a	8 f	0,14 de
10	0,5	-	60 c	40 g	100 a	0 h	0,21 b
10	1,0	-	50 de	50 e	85 b	0 h	-
10	5,0	-	50 de	50 e	0 d	0 h	n.d.
10	10,0	-	35 gh	65 b	0 d	0 h	-
10	-	0,5	30 h	70 a	100 a	0 h	n.d.
10	-	1,0	50 de	50 e	100 a	0 h	-
10	-	5,0	55 cd	45 f	100 a	0 h	0,28 a
10	-	10,0	55 cd	45 f	100 a	0 h	-

*Médias seguidas de mesma letras não diferem entre si, pelo teste de Duncan, em nível de 1% de probabilidade de erro.

n.d.: não detectado

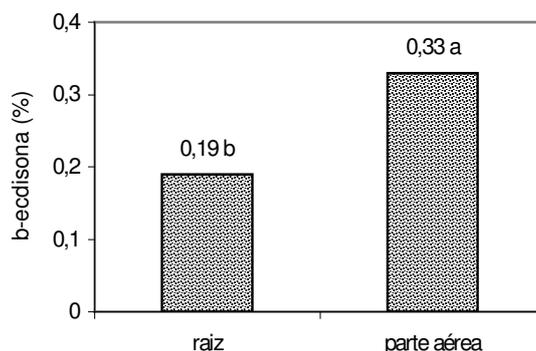


Figura 1 - Teor de β -ecdisona (% por massa seca) nas raízes e parte aérea de *Pfaffia glomerata*, acesso BRA. Médias seguidas de mesma letras não diferem entre si, pelo teste de Duncan, em nível de 1% de probabilidade de erro.

Os maiores teores de β -ecdisona *in vitro* ocorreram nos calos cultivados na presença de 10 μ M de BAP juntamente com 5 μ M de ANA (0,28%) ou 0,5 μ M de 2,4-D (0,21%), cujas concentrações foram superiores à encontrada nas raízes (0,19%), mas inferiores à concentração detectada na parte aérea da planta (0,33%) *in vivo* (Tabela 1, Figura 1). Estes teores, encontrados na planta *in vivo* e nos calos *in vitro* de *P. glomerata*, representam um grande acúmulo de β -ecdisona quando comparado à concentração total de ecdisteróides usualmente encontrada nas plantas (inferior a 0,1% da massa seca) (Dinan, 2001).

Os locais onde os ecdisteróides são biossintetizados nas plantas são pouco conhecidos, mas sabe-se que a concentração destes metabólitos é órgão-específica. Dependendo da espécie, os fitoecdisteróides podem ser encontrados em maiores concentrações nas raízes (Tomás et al., 1992), folhas (Grebenok et al., 1993), caules (Bandara et al., 1989), sementes (Savchenko et al., 1998), além de flores e frutos (Tomás et al., 1993). Contudo, estes dados não permitem nenhuma conclusão a respeito dos principais tecidos/órgãos nos quais os ecdisteróides sejam sintetizados. Em *Pfaffia glomerata*, estudos referentes à biossíntese dos ecdisteróides são inexistentes, contudo os resultados obtidos neste trabalho mostraram um maior acúmulo de β -ecdisona na parte aérea da planta *in vivo*, bem como em calos que apresentaram brotações. Apesar dos ecdisteróides serem biossintetizados, transportados e acumulados em diferentes órgãos das plantas (Dinan et al., 2001; Tomás et al., 1992), os resultados obtidos neste estudo sugerem a possibilidade da parte aérea de *P. glomerata* ser um dos principais locais de biossíntese dos ecdisteróides.

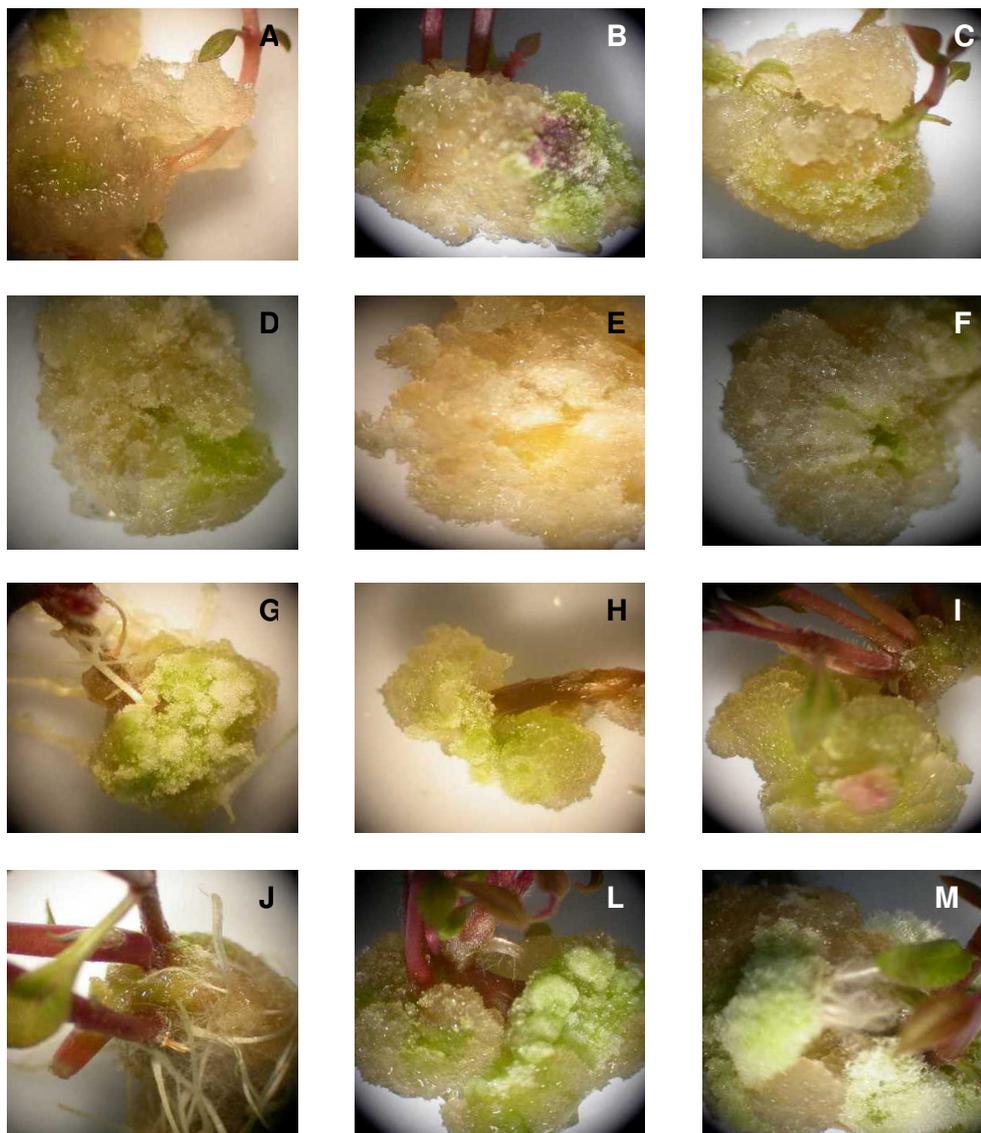


Figura 2 - Calos formados a partir de segmentos nodais de *Pfaffia glomerata*, em meio MS suplementado com concentrações de 2,4-D, ANA e BAP, após 30 dias de cultivo. **(A)** Parte de um calo friável obtido em meio contendo 0,5 μ M de 2,4-D e 1 μ M de BAP (4,0X); **(B)** Calo cultivado em meio acrescido de 0,5 μ M de 2,4-D e 10 μ M de BAP (2,5X); **(C)** Calo proliferando em meio acrescido de 1 μ M de 2,4-D e 5 μ M de BAP (2,5X); **(D)** Calo compacto induzido em meio suplementado com 5 μ M de 2,4-D e 1 μ M de BAP (2,8X); **(E)** Calos com consistência mista cultivado em meio acrescido de 5 μ M de 2,4-D e 10 μ M de BAP (3,5X); **(F)** Calo cultivado em meio contendo 10 μ M de 2,4-D e 5 μ M de BAP (4,0X); **(G)** Calo compacto induzidos em meio suplementado com 0,5 μ M de ANA e 1 μ M de BAP (2,0X); **(H)** Calo compacto cultivado em meio acrescido de 0,5 μ M de ANA e 10 μ M de BAP (3,0X); **(I)** Calo compacto proliferando em meio acrescido de 1 μ M de ANA e 5 μ M de BAP (3,5X); **(J)** Calo com consistência mista induzido em meio suplementado com 5 μ M de ANA e 1 μ M de BAP (2,3X); **(L)** Calo induzido em meio suplementado com 5 μ M de ANA e 10 μ M de BAP (2,3X); **(M)** Calo induzidos em meio suplementado com 10 μ M de ANA e 5 μ M de BAP (2,3X).

As plantas sintetizam ecdisteróides a partir do acetil-Coa (rota do mevalonato) que ocorre no citosol (Klein, 2004) e, possivelmente, a partir da rota do metileritritolfosfato (rota do MEP), onde a formação de precursores (dimetilalildifosfato, DMAPP) ocorre nos cloroplastos (Croteau et al., 2000). Neste contexto, a diferenciação de brotos e a formação de cloroplastos nos calos pode ser fundamental para a expressão destas rotas metabólicas e justificar o fato dos ecdisteróides terem sido detectados apenas nos calos com brotações (Tabela 1) em *P. glomerata*. Da mesma forma, em *Ajuga reptans*, os ecdisteróides não foram detectados em calos isentos de tecidos diferenciados, sendo a regeneração de órgãos essencial para a produção de ecdisteróides *in vitro* (Tomás et al., 1992). Por outro lado, a produção de fitoecdisteróides em células em suspensão de *Pteridium* foi superior ao encontrado na planta matriz (Svatos & Macek, 1994), demonstrando que a necessidade de tecidos diferenciados para a produção de ecdisteróides depende da espécie estudada. Apesar dos calos compactos serem histologicamente mais diferenciados e com maior pigmentação quando comparados aos friáveis, as condições que induziram estes tipos de calos em *P. glomerata* não favoreceram o acúmulo de β -ecdisona (Tabela 1).

Poucos estudos foram conduzidos em relação aos fatores que afetam a produção de fitoecdisteróides. Segundo Dinan (2001), a produção de fitoecdisteróides *in vitro* é influenciada pelo tipo de órgão cultivado, pela adição de fitoreguladores no meio de cultura, bem como pelo tempo de cultivo. Em *P. glomerata*, este estudo mostrou que o acúmulo de β -ecdisona é influenciado pela consistência dos calos e pela presença de brotações, as quais são determinadas pelas concentrações de fitoreguladores adicionados ao meio de cultura. Além dos ecdisteróides, *Pfaffia glomerata* contém outros metabólitos de importância medicinal, como as saponinas triterpênicas (Shiobara et al., 1993), cuja produção *in vitro* ainda não foi explorada.

CONCLUSÕES

Calos induzidos a partir de segmentos nodais de *P. glomerata* podem variar em consistência, potencial organogênico e teor de β -ecdisona dependendo das concentrações de BAP, ANA ou 2,4-D adicionadas ao meio nutritivo. Um maior acúmulo de β -ecdisona é detectado em calos friáveis e com brotações induzidos na presença de 10 μ M de BAP juntamente com 5 μ M de ANA ou 0,5 μ M de 2,4-D.

REFERÊNCIAS

- ANUFRIEVA, E. N. et al. The content and composition of ecdysteroids in plant and tissue culture of *Serratula coronata*. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 45, p. 326-332, 1998.
- ANZIDEI, M. et al. *In vitro* culture of *Foeniculum vulgare*: callus characteristics in relation to morphogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 45, p. 263-268, 1996.
- BANDARA, B. M. R.; JAYASINGHE, L.; KARUNARATNE, V. Ecdysterone from stem of *Diploclisia glaucescens*. **Phytochemistry**, v. 28, p.1073-1075, 1989.
- BENNICI, A. et al. Studies on callus growth and morphogenesis in several species and lines of *Amaranthus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 49, p. 29-33, 1997.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 48 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Ministério da Saúde, Brasil, 2004. [Http://www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)
- CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N.G. Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Eds.). **Biochemistry & molecular biology of plants**. Rockville: Courier Companies, 2000. p. 1250-1318.
- DAVIES, P. J. **Plant hormones: and their role in plant growth and development**. New York: Kluwer Academic Publishers, 1990.
- DINAN, L. Phytoecdysteroids: biological aspects. **Phytochemistry**, v. 57, p. 325-339, 2001.
- FIGUEIREDO, L. S. et al. Comportamento de acessos de *Pfaffia glomerata* nas condições de campos de Goytacazes-RJ. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 7, p. 67-72, 2004.
- FLORES, R.; MALDANER, J.; NICOLOSO, F. T. Indução de calos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. In: ENCONTRO ESTADUAL DE BOTÂNICOS, 12., 2004, Canoas. **Anais...Canoas: ULBRA**, 2004. 1 CD- ROM.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Somerset: Exegetics, 1996. 758 p.
- GREBENOK, R. J. et al. Ecdysteroid biosynthesis during ontogeny of spinach leaves. **Phytochemistry**, v. 33, p. 341-347, 1993.
- HIKINO, H.; JIN, H.; TAKEMOTO, T. Occurrence of insect-moulting substance ecdysterone and inokosterone in callus tissue of *Achyranthes*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 198, p. 438-439, 1971.
- HOWELL, S. H., LALL, S.; CHE, P. Cytokinins and shoot development. **Trends in Plant Science**, v. 8, p. 453-459, 2003.
- KLEIN, R. Phytoecdysteroids. **Journal of the American Herbalist Guild**, v. 7, p.10-20, 2004.
- MAGALHÃES, P. M. de. Agrotecnologia para el cultivo de fáfia o ginseng brasileiro. In: MARTINEZ, J.V. et al. **Fundamentos de agrotecnología de cultivo de plantas medicinales iberoamericanas**. Santafé de Bogotá: Convênio Andrés Bello/CYTED, 2000. p. 323-332.
- MERCIER, H., VIEIRA, C.C.J.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Tissue culture and plant propagation of *Gomphrena officinalis* - a Brazilian medicinal plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 28, p. 249-254, 1992.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

- NICOLOSO, F.T. et al. Micropropagação do Ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Petersen). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 3, p. 11-18, 2001.
- OKSMAN-CALDENTY, K.; INZÉ, D. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 433-440, 2004.
- RAVISHANKAR, G. A.; MEHTA, A. R. Control of ecdysterone biogenesis and tissue cultures of *Trianthema postulacastrum*. **Journal of Natural Products**, v. 42, p. 152-158, 1979.
- REIXACH, N. et al. Biosynthesis of ecdysteroids *in vitro* prothalli cultures of *Polypodium vulgare*. **Phytochemistry**, v. 43, p. 597-602, 1996.
- RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.
- SAVCHENKO, T. et al. Distribution and identity of phytoecdysteroids in *Gomphrena* spp. (Amaranthaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 26, p. 337-346, 1998.
- SHIOBARA, Y., INOUE, S.; KATO, K. A norriterpenoid, triterpenoid and ecdysteroids from *Pfaffia glomerata*. **Phytochemistry**, v. 32, p. 1527-1530, 1993.
- SKREBSKY, E. C.; NICOLOSO, F. T.; FERRÃO, G. da E. Sacarose e período de cultivo *in vitro* na aclimatização *ex vitro* de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Ciência Rural**, v. 34, p.1471-1477, 2004.
- SVATOS, A.; MACEK, T. The rate of ecdysteroid production in suspension cultured cells of the fern *Pteridium aquilinum*. **Phytochemistry**, v. 35, n. 3, p. 651-654, 1994.
- THAO, N. T. P., OZAKI, Y.; OKUBO, H. Callus induction and plantlet regeneration in ornamental *Alocasia micholitziana*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 73, p. 285-289, 2003.
- TOMÁS, J. et al. Composition and location of phytoecdysteroids in *Ajuga reptans* *in vivo* and *in vitro* cultures. **Phytochemistry**, v. 31, p. 1585-1591, 1992.
- TOMÁS, J. et al. Phytoecdysteroid production by *Ajuga reptans* tissue culture. **Phytochemistry**, v. 32, p. 317-324, 1993.
- VIEIRA, C. C. J., BRAGA, M. R.; FIGUEREDO-RIBEIRO, R. C. L. Fructans in callus of *Gomphrena macrocephala* St.-Hil. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 42, p. 233-238, 1995.
- ZIMMER, A.R. et al. HPLC method for the determination of ecdysterone in extractive solution from *Pfaffia glomerata*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, p. 450-453, 2006.

CAPÍTULO 3

**Regeneração de plantas a partir de calos de *Pfaffia tuberosa* e
*Pfaffia glomerata***

3.1 Aspectos morfogênicos de plantas de *Pfaffia tuberosa* (Spreng). Hicken regeneradas por organogênese indireta

RESUMO: Segmentos nodais de *Pfaffia tuberosa* foram cultivados em meio contendo concentrações de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e benzilaminopurina (BAP) para a indução de calos organogênicos. Os brotos foram isolados dos calos, identificados e cultivados em meio desprovido de fitoreguladores para multiplicação das plantas. A regeneração de brotos via organogênese indireta foi observada nos meios contendo 1, 5, 10 e 20 μM de 2,4-D e em meio suplementado com 1 μM de 2,4-D e 1 μM de BAP. Após cinco subcultivos, verificou-se que as plantas regeneradas a partir dos calos não apresentaram diferenças quanto à produção de brotos e raízes, porém diferiram em relação ao número de segmentos nodais e comprimento. Algumas alterações morfológicas foram observadas nas plantas, porém foram restritas ao início da fase de multiplicação. Esta metodologia de regeneração é pioneira para a espécie e poderá ser útil para a produção de somaclones.

Palavras-chave: ginseng brasileiro, regeneração de plantas, fitoreguladores

Morphogenic aspects of *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken plants regenerated using indirect organogenesis

ABSTRACT: This work aimed to studied the morphogenic of plants of *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. Nodal segments were cultivated on Murashige and Skoog (MS) medium containing various levels of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and benzylaminopurine (BA) for calli induction and plant regeneration. In order to obtain multiplication of plants, shoots explants developing on calli were isolated, identified and grown in MS medium without growth regulators. Shoot regeneration by indirect organogenesis was observed on media containing 1, 5, 10, and 20 μM 2,4-D and with 1 μM 2,4-D + 1 μM BAP. After five subcultures, plants did not show any difference regarding shoot and root production, but differed in relation to nodal segments number and length. Some morphological alterations were observed on the plants, but it happened at the onset of the multiplication phase. This regeneration methodology is novel for *P. tuberosa* and may be useful to produce somaclones.

Key words: Brazilian ginseng, plant regeneration, growth regulators

INTRODUÇÃO

O gênero *Pfaffia* (Amaranthaceae) compreende espécies conhecidas como ginseng brasileiro, as quais são utilizadas como rejuvenescedoras e revitalizantes, ajudando a combater problemas relacionados ao cansaço físico e mental, favorecendo a aprendizagem e a memória (Magalhães, 2000; Marques et al., 2004). *Pfaffia tuberosa* (Spreng). Hicken é uma erva nativa do Brasil e de países vizinhos (Smith & Downs, 1972) cujas raízes acumulam substâncias com propriedades medicinais, destacando-se o ácido oleanólico e a ecdisterona (Nishimoto et al., 1986).

Entre as diversas técnicas da cultura de tecidos vegetais destaca-se a regeneração de brotações adventícias a partir de calos, o que pode resultar em plantas com variações genéticas. Variação somaclonal foi o termo introduzido por Larkin & Scowcroft (1981) para

descrever as variações genéticas herdáveis observadas entre os tecidos propagados *in vitro*. Conforme salienta De Klerk (1990), alterações ao acaso, estáveis e que são transmitidas através da meiose caracterizam a variação somaclonal. A obtenção de plantas variantes a partir do cultivo de calos desperta o interesse dos melhoristas como uma nova fonte de variabilidade genética (Tabares et al., 1991), fornecendo perspectivas de seleção *in vitro* ou *in vivo* de genótipos superiores. Neste sentido, a variação somaclonal tem sido utilizada, com sucesso na obtenção de novas variedades de cana-de-açúcar, fumo, alho, morangueiro, sorgo, tomate, trigo, arroz, pimentão, plantas ornamentais (Mantell et al., 1994; Nehra et al., 1992; Karp, 1995; Anu et al., 2004) dentre outras. Em plantas medicinais, o cultivo de calos e a produção de somaclones possibilitam maximizar a produção de metabólitos *in vitro*, além da possibilidade de biotransformar qualitativamente ou quantitativamente os compostos de interesse medicinal (Serafini et al., 2001; Kagiki et al., 2004). Recentemente, algumas pesquisas vêm sendo conduzidas no sentido de verificar o comportamento de clones e acessos de *Pfaffia*, visando a produção de matrizes altamente produtivas para o cultivo comercial (Montanari et al., 1999; Figueiredo et al., 2004).

Em função disso, o presente estudo teve como propósito estudar aspectos morfogênicos de brotações regeneradas a partir de calos de *P. tuberosa* tendo em vista o estabelecimento de um protocolo para a obtenção de somaclones na espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil. O material vegetal consistiu de plantas de *P. tuberosa* (Spreng). Hicken existentes no campus da UFSM, sendo uma exsicata depositada no Herbário do Departamento de Biologia (SMDB 9840).

Visando o uso de material vegetal homogêneo, utilizaram-se como explantes segmentos nodais provenientes de uma planta clonada *in vitro* (planta matriz) em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose e de 6 g L⁻¹ ágar (Martins & Nicoloso, 2004; Flores et al., 2006a). O pH foi ajustado para 5,9.

Para a indução de calogênese e morfogênese, segmentos nodais (1 cm e contendo duas gemas axilares) da planta matriz foram cultivados no meio MS suplementado com quatro concentrações (1, 5, 10 e 20 µM) de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) combinadas com três concentrações (0, 1 e 10 µM) de benzilaminopurina (BAP) (Flores et al., 2006b). Os explantes foram inoculados na posição horizontal, em frascos contendo 20 mL de meio, nos quais foram colocados cinco explantes/frasco. Após, o material foi incubado no escuro, em sala de crescimento, com temperatura de 25±2°C, durante dez dias. Posteriormente, foram

expostos a condições de luminosidade fornecida por lâmpadas brancas frias, com intensidade de $35 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas. Ao mesmo tempo, segmentos nodais foram cultivados em meio MS isento de reguladores de crescimento, visando a propagação clonal da planta matriz (Martins & Nicoloso, 2004; Flores et al., 2006).

Após 55 dias de cultivo, as brotações regeneradas nos calos foram individualizadas e transferidas para tubos de ensaio contendo 10 mL de meio MS. Cada broto, isolado dos calos, foi identificado pelo número do tratamento seguido por letras alfabéticas, conforme metodologia proposta por Oliveira et al. (1999) e Flores et al. (1999). Após 30 dias do isolamento, os brotos foram avaliados quanto a percentagem de sobrevivência e aspectos morfológicos.

Posteriormente, as brotações foram micropropagadas em meio MS através de sucessivos subcultivos das gemas laterais (Flores et al., 2006a) a fim de aumentar o número de plantas. Foram realizados cinco subcultivos em intervalos de 30 dias. Este processo foi realizado sob as mesmas condições de luz, temperatura e fotoperíodo descritas anteriormente.

As avaliações foram realizadas ao final do quinto subcultivo através das variáveis: número médio de brotos, número de segmentos nodais, comprimento médio dos brotos, número médio de raízes e aspectos morfológicos. A planta matriz (denominada PM), cultivada em meio MS desprovido de fitoreguladores (Flores et al., 2006a), foi multiplicada e avaliada em condições idênticas aos demais clones obtidos a partir dos calos.

O delineamento utilizado foi o completamente ao acaso com cinco repetições, sendo cada repetição formada por quatro a oito plantas. Os dados foram submetidos à análise da variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan, $\alpha=0,01$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve formação de calos totalmente friáveis, organogênicos ou não, em todas as combinações de fitoreguladores testadas. A regeneração de brotos a partir dos calos foi observada aos 35 dias de cultivo em todas as concentrações de 2,4-D e após 55 dias em meio suplementado com $1 \mu\text{M}$ de 2,4-D e $1 \mu\text{M}$ de BAP. Esta foi a única combinação hormonal que favoreceu a organogênese na presença do BAP. Entretanto, na maioria das espécies, a indução de calo e a regeneração de brotos é maximizada na presença de uma baixa relação auxina/citocinina. Neste sentido, baixas concentrações de 2,4-D e elevadas concentrações de BAP foram utilizadas para a regeneração de somaclones de macieira (Morales et al., 1999) e morangueiro (Nehra et al., 1992). Ao contrário do observado neste trabalho, nessas espécies, o BAP foi essencial para a indução de brotos a partir dos calos (Nehra et al., 1992; Morales et al., 1999).

Em geral, os calos de *P. tuberosa* formaram uma ou duas brotações muito pequenas ($\pm 2\text{mm}$), o que dificultou o isolamento e o estabelecimento das plantas. Brotos de morangueiro regenerados via calos também apresentaram tamanho reduzido, sendo o posterior desenvolvimento dos mesmos variável em função do meio de regeneração e características genéticas de cada clone (Flores et al., 1999).

Após 30 dias do isolamento dos brotos, observou-se que a percentagem de sobrevivência variou entre os meios de indução de calogênese/morfogênese. Todos os brotos isolados dos calos cultivados com $5\ \mu\text{M}$ de 2,4-D formaram brotos axilares e raízes, já nas demais concentrações de 2,4-D, apenas 66,6% dos brotos se desenvolveram. Além do maior tempo necessário para a regeneração dos brotos, o meio suplementado com 2,4-D e BAP apresentou o menor índice de sobrevivência dos brotos (33,3%) após o isolamento dos calos (Tabela 1). Estes valores estão de acordo com Oliveira et al. (1999) e Flores et al. (1999), em que a percentagem de sobrevivência de brotos regenerados via organogênese indireta variou de 30 a 75%. Os tratamentos com as respectivas plantas sobreviventes podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1 – Percentagem de sobrevivência e denominação de plantas de *Pfaffia tuberosa* regeneradas a partir de calos induzidos na presença de diferentes concentrações de 2,4-D e BAP. Santa Maria – RS, 2006.

Meio de cultura	Sobrevivência (%)	Plantas sobreviventes
1 μM de 2,4-D	66,6	T1A, T1B
5 μM de 2,4-D	100	T4A, T4B, T4C
10 μM de 2,4-D	66,6	T7A, T7B
20 μM de 2,4-D	66,6	T10B, T10C
1 μM de 2,4-D + 1 μM de BAP	33,3	T2B

Os principais fatores que limitaram o estabelecimento das plantas foram a ausência de crescimento seguido de senescência nas brotações T1C, T2A e T2C e a formação de parte aérea com filotaxia anormal, como a ausência de gemas no broto T10A e a presença de folhas unidas e necrose na planta T7C (Figura 1a). Estes dois últimos brotos cresceram após o isolamento, porém falharam no desenvolvimento de gemas e na proliferação de novas brotações axilares.

Em outras espécies submetidas ao processo de regeneração indireta, a perda da morfogênese está, em geral, relacionada a alterações no cariótipo. Kumar & Mathur (2004) relataram a existência de uma forte correlação entre aneuploidia e poliploidia com o potencial organogênico dos calos, havendo uma tendência à seleção de células com genótipos normais para regenerar novas plantas. Mishiba et al. (2001) verificaram que o 2,4-

D induziu alterações cromossômicas em *Doritaenopsis*. Estes autores juntamente com Henry & Buyser (1994) suportam a idéia de que a freqüência de regeneração está associada às alterações genéticas das células.

Alterações na disposição das gemas no caule e na coloração das folhas foram observadas nas plantas T7B e T4C respectivamente. Na T7B, as gemas apresentaram filotaxia alternada, diferente da disposição oposta característica da espécie. Por outro lado, na T4C as folhas apresentaram uma pigmentação verde mais clara que as demais plantas. Porém, em ambas as plantas, essas alterações não afetaram a taxa de multiplicação e foram transientes. A presença de alterações na coloração das plantas pode ser devido ao tempo de cultivo do calo (Nehra et al., 1992).

As demais brotações de *P. tuberosa* isoladas dos calos formaram plantas morfológicamente normais, com parte aérea e sistema radicular bem desenvolvidos o que corrobora os resultados obtidos por Thao et al. (2003), que obtiveram plantas completas a partir de calos de *Alocasia micholitziana*.

Após os subcultivos das brotações em meio MS, não foi observada diferença entre o número médio de brotos e raízes produzidos/planta. Desta forma, todas as plantas desenvolveram uma média de 1,3 brotos e 4,8 raízes/planta, não diferindo significativamente da planta matriz. Por outro lado, as plantas regeneradas a partir dos calos diferiram entre si e em relação à planta matriz no que diz respeito ao número médio de segmentos nodais e comprimento (Figura 1b, 1c). Um maior número de segmentos nodais foi observado na planta T1A (5), seguindo-se a T4A (4,8), as quais apresentaram resultados superiores aos da planta matriz *in vitro*, que apresentou 4 segmentos nodais por planta. As demais plantas apresentaram resultados inferiores, porém de modo geral, todos os brotos demonstraram bom potencial para a multiplicação através de gemas axilares (Figura 1b). Em geral, os brotos apresentaram um menor crescimento quando comparados à planta matriz *in vitro*, que apresentou, em média, 5 cm. Plantas com maior comprimento foram aquelas provenientes dos brotos T4C (4,9 cm), T4A (4,3 cm) e T2B (4,1 cm), as quais não diferiram significativamente da planta matriz (Figura 1c). Resultados inferiores quanto ao crescimento e produção de segmentos nodais foram observadas nas plantas T10B (Figura 1b, 1c), o que pode ser devido ao efeito da alta concentração de 2,4-D utilizada na indução dos brotos.

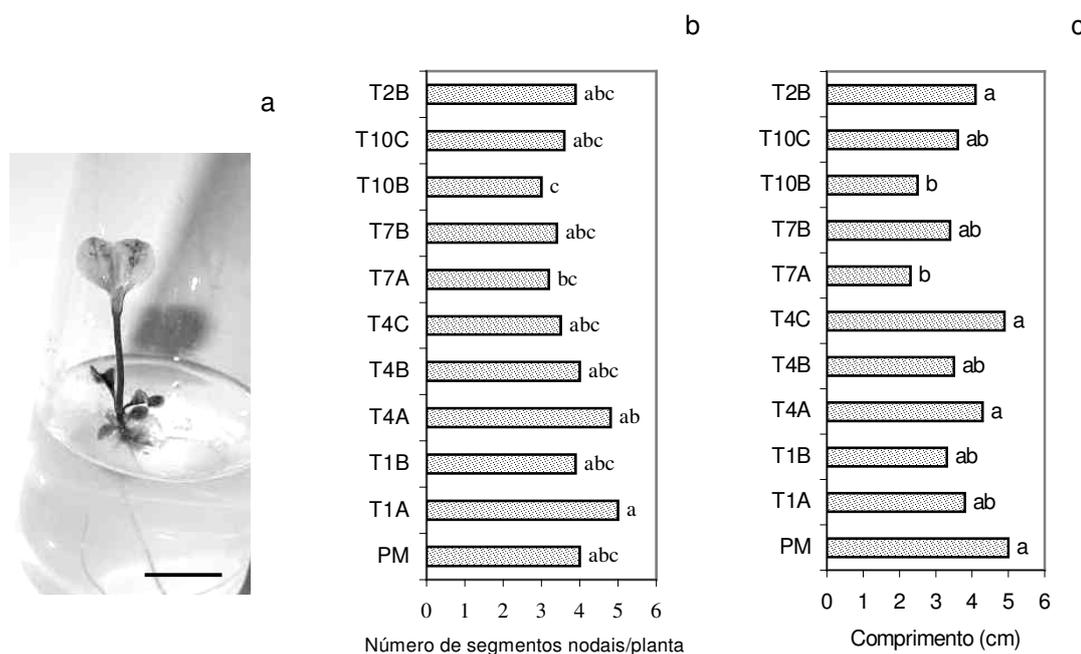


Figura 1 – Aspectos morfogênicos de plantas de *Pfaffia tuberosa* regeneradas em meio MS suplementado com concentrações de 2,4-D e BAP. a) Aspecto morfológico da planta T7C, 30 dias após o isolamento do calo; b) Número de segmentos nodais produzido por plantas regeneradas a partir de calos friáveis e pela planta matriz (PM); c) Comprimento médio de plantas (cm) regeneradas via organogênese indireta e da planta matriz (PM). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan, α 0,01. Barra = 1cm

Além de alterações morfológicas que são sanadas no decorrer do cultivo *in vitro*, as plantas regeneradas via calos, em geral, apresentam características morfológicas contrastantes (Oliveira et al., 1999; Anu et al., 2004). Em *Gomphrena officinalis* (Amaranthaceae), foi verificado que 10% dos brotos regenerados de calos apresentaram anormalidades na morfologia das folhas (Mercier et al., 1992). Plantas com fenótipos variantes também foram regenerados em várias cultivares de morangueiro quando os calos foram cultivados na presença de 2,4-D e BAP (Nehra et al., 1992; Flores et al., 1999).

Os resultados demonstraram que, quando cultivada na presença do 2,4-D e do BAP, a *P. tuberosa* apresenta respostas morfogênicas diferentes das obtidas para a maioria das espécies, nas quais o 2,4-D possui efeitos inibitórios na organogênese, enquanto que o BAP mostra-se essencial para a regeneração de brotações adventícias (Denchev & Conger, 1995; Anzidei et al., 1996; Thao et al., 2003; Sriskandarajah & Serek, 2004; Liu et al., 2004). Neste estudo, constatou-se que concentrações entre 1 e 20 μ M de 2,4-D podem ser utilizadas para a indução de calos organogênicos em *P. tuberosa*, mesmo na ausência de citocinina. Este aspecto é importante, pois permite a regeneração rápida de brotos, não

sendo necessário sucessivos subcultivos dos calos em meio de regeneração suplementado com citocininas. Ebrahimie et al. (2003) também descreveram um protocolo para *Cuminum cyminum*, no qual onde ocorreu a formação simultânea de calos e brotos adventícios.

A não sobrevivência de algumas plantas após o isolamento dos calos, como também as alterações morfológicas observadas na fase de isolamento nos brotos T7B e T4C, devem-se provavelmente à permanência do 2,4-D no meio de cultivo. Isto foi confirmado pelo fato de que o subcultivo das plantas em meio básico, desprovido de fitoreguladores, favoreceu o crescimento de brotos com filotaxia e coloração normal. Assim, os dados mostraram, que em *P. tuberosa*, a presença do 2,4-D favorece o processo de indução dos brotos, porém o desenvolvimento dos mesmos foi prejudicado na presença desta auxina. Similarmente, Flores et al. (1999), estudando o potencial morfogênico de somaclones de morangueiro, verificaram a presença de folhas com clorose e/ou forma anormal, sintomas que foram minimizados no decorrer dos subcultivos *in vitro* em meio desprovido de 2,4-D. Estas alterações instáveis caracterizam os efeitos epigenéticos induzidos *in vitro*. Variações epigenéticas, as quais interferem na expressão dos genes, são muito freqüentes *in vitro*, porém ao contrário da variação somaclonal, são transientes e não herdáveis geneticamente (Skirvin et al., 1993). Conforme Anu et al. (2004), o principal problema na busca por genótipos superiores mediante a variação somaclonal é a possibilidade de regeneração de plantas geneticamente instáveis, aneuplóides, e/ou com caracteres indesejáveis.

Em espécies poliplóides como a *P. tuberosa* ($2n=4x=68$) (Taschetto & Pagliarini, 2003), geralmente há um maior índice de variação somaclonal quando comparado às diplóides ou haplóides (Karp, 1995). Alterações genéticas e cromossômicas também são favorecidas na presença do 2,4-D, uma vez que este composto induz falhas no fuso acromático durante a divisão celular (Mantell et al., 1994). Mishiba et al. (2001) constataram que o nível de ploidia de *Doritaenopsis* aumentou gradualmente com o tempo de cultivo das células na presença do 2,4-D. Kumar & Mathur (2004) verificaram que o aumento na concentração de auxina aumentou a freqüência de alterações tanto no número quanto na estrutura dos cromossomos. Além disso, o 2,4-D pode agir como mutagênico indiretamente, uma vez que, este fitoregulador estimula a divisão celular (Koens et al., 1995). Neste trabalho, os calos de *P. tuberosa*, induzidos na presença de 2,4-D, caracterizaram-se como totalmente friáveis, os quais possuem uma alta taxa de divisão celular. Conforme Skirvin et al. (1993), a quantidade de variações encontradas está correlacionada com a taxa de multiplicação *in vitro*, o que concorda com De Klerk (1990), de que os calos friáveis são geneticamente mais instáveis que os compactos.

Além das avaliações morfológicas e citológicas, somaclones de plantas medicinais podem ser detectados através de alterações bioquímicas e moleculares (Karp, 1995; De Klerk, 1990) que resultem em uma maior produção dos metabólitos de interesse. Neste

sentido, estudos subseqüentes deverão ser conduzidos com o objetivo de investigar a produção de ecdisteróides e/ou saponinas nas diferentes plantas obtidas, tendo em vista a possibilidade de viabilizar esta metodologia como uma alternativa de melhoramento para esta espécie de ginseng brasileiro. Cabe ainda ressaltar que a obtenção e a propagação em larga escala de linhagens superiores quanto à produção de compostos de interesse medicinal é de grande valor para a indústria farmacêutica, bem como para a preservação dos genótipos silvestres de *P. tuberosa*.

CONCLUSÕES

Segmentos nodais cultivados em meio suplementado com 1 a 20 μM de 2,4-D ou a combinação de 1 μM de 2,4-D e 1 μM de BAP formam calos friáveis com potencial para a regeneração de brotos adventícios.

Após vários subcultivos em meio isento de fitoreguladores, as plantas regeneradas a partir dos calos apresentam morfologia normal, contudo diferem entre si e em relação à planta matriz quanto ao comprimento e produção de segmentos nodais.

REFERÊNCIAS

- ANU, A. et al. Variations among somaclones and its seedling progeny in *Capsicum annum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 76, p. 261-267, 2004.
- ANZIDEI, M. et al. *In vitro* culture of *Foeniculum vulgare*: callus characteristics in relation to morphogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 45, p. 263-268, 1996.
- DE KLERK, G. J. How to measure somaclonal variation. **Acta Botanica Neerlandica**, v. 38, n.2, p.129-144, 1990.
- DENCHEV, P. D.; CONGER, B. V. *In vitro* culture of switchgrass: influence of 2,4-D and picloram in combination with benzyladenine on callus initiation and regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 40, p. 43-48, 1995.
- EBRAHIMIE, E. et al. A rapid and efficient method for regeneration of plantlets from embryo explants of cumin (*Cuminum cyminum*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 75, p. 19-25, 2003.
- FIGUEIREDO, L. S. et al. Comportamento de acessos de *Pfaffia glomerata* nas condições de campos de Goytacazes-RJ. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 7, n.1, p. 67-72, 2004.
- FLORES, R. et al. Potencial morfogênético de clones de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch) cv. Vila Nova, obtidos *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 21, n. 3, p. 274-278, 1999.
- FLORES, R.; MALDANER, J.; NICOLOSO, F. T. Otimização da micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Ciência Rural**, v. 36, n. 3, p. 845-851, 2006a.
- FLORES, R. et al. Indução de calos e aspectos morfogênicos de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, 2006b. (no prelo)
- HENRY, Y. V.; BUYSER, J. D. Genetic analysis of *in vitro* plant tissue culture responses and regeneration capacities. **Euphytica**, v. 79, p. 45-58, 1994.

- KAGIKI, F. O. et al. Indução de calos e produção de saponinas totais em *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 7, n.1, p. 43-50, 2004.
- KARP, A. Somaclonal variation as a tool for crop improvement, **Euphytica**, v. 85, p. 295-302, 1995.
- KOENS, K. B. et al. Auxin starvation results in G2-arrest in suspension-cultured tobacco cells. **Journal of Plant Physiology**, v. 147, p. 391-396, 1995.
- KUMAR, P. S.; MATHUR, V. L. Chromosomal instability in callus culture of *Pisum sativum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 78, p. 267-271, 2004.
- LARKIN, P. J.; SCOWCROFT, W. R. Somaclonal variation a novel of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 60, p. 197-214, 1981.
- LIU, G. S. et al. Factors affecting plant regeneration from tissue cultures of Chinese leymus (*Leymus chinensis*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 76, p. 175-178, 2004.
- MAGALHÃES, P. M. de. Agrotecnologia para el cultivo de fáfia o ginseng brasileiro. In: MARTINEZ, J.V. et al. **Fundamentos de agrotecnología de cultivo de plantas medicinales iberoamericanas**. Santafé de Bogotá: Convênio Andrés Bello/CYTED, 2000. p. 323-332.
- MANTELL, S.H. et al. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto: SBG, 1994. Cap. 5. p. 101-158.
- MARQUES, L.C. et al. Psychopharmacological assessment of *Pfaffia glomerata* roots (extract BNT-08) in rodents. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 7, p. 566-572, 2004.
- MARTINS, C.F; NICOLOSO, F.T. Micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, n. 3, p. 53-61, 2004.
- MERCIER, H. et al. Tissue culture and plant propagation of *Gomphrena officinalis* - a Brazilian medicinal plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 28, p. 249-254, 1992.
- MISHIBA, K. et al. Increasing ploidy level in cell suspension cultures of *Doritaenopsis* by exogenous applications of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Physiologia Plantarum**, v. 112, p. 142-148, 2001.
- MONTANARI, I. et al. Influence of plantation density and cultivation cycle in root productivity and tenors of β -ecdisonone in *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Acta horticulturae**, v. 3, n. 502, p. 125-129, 1999.
- MORALES, C. F. G. et al. Efeito do BAP e TDZ na calogênese e organogênese em internódios de macieira cv. Gala RW1. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 5, n. 3, p. 174-177, 1999.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NEHRA, N. S. et al. The influence of plant growth regulator concentrations and callus age on somaclonal variation in callus culture regenerants of strawberry. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 29, p. 257-268, 1992.
- NISHIMOTO, N. et al. Ecdisterone from *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.1, n. 2, p. 188-191, 1986.
- OLIVEIRA, M. F. et al. Organogênese de clones de macieira provenientes de diferentes meios com picloram e alumínio. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 5, n. 1, p. 31-43, 1999.
- SERAFINI, L. A. et al. **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, 2001.

- SKIRVIN, R. M. et al. Sources and frequency of somaclonal variation. **HortScience**, v. 29, n. 11, p. 1232-1237, 1993.
- SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. **Flora ilustrada catarinense**: Amarantáceas. Itajaí, 1972. 110 p.
- SRISKANDARAJAH, S.; SEREK, M. Regeneration from phylloclade explants and callus cultures of *Schlumbergera* and *Rhipsalidopsis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 78, p. 75-81, 2004.
- TABARES, E. et al. Variación somaclonal y su aplicación al mejoramiento de cultivos. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (Eds.) **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: CIAT, 1991. Cap. 14. p. 339-360.
- TASCHETTO, O. M.; PAGLIARINI, M. S. Occurrence of 2n and jumbo pollen in the Brazilian ginseng (*Paffia glomerata* e *P. tuberosa*). **Euphytica**, v. 133, p. 139-145, 2003.
- THAO, N. T. P. et al. Callus induction and plantlet regeneration in ornamental *Alocasia micholitziana*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 73, p. 285-289, 2003.

3.2 Regeneração de plantas a partir de calos e produção de β -ecdisona em *Pfaffia glomerata*

RESUMO: Segmentos nodais de dois acessos (BRA e JB-UFSM) de *Pfaffia glomerata* foram cultivados em meio Murashige e Skoog (MS), acrescido de 0,5 μ M de ácido naftaleno acético (ANA) e 5 μ M de benzilaminopurina (BAP) para a indução de calos. Após, os calos foram transferidos para meios de regeneração, nos quais testaram-se concentrações (10, 20, 30 e 40 μ M) de BAP ou thidiazuron (TDZ). Os brotos regenerados a partir dos calos foram multiplicados e enraizados em meio MS. O acesso JB-UFSM apresentou uma maior percentagem de calos regenerativos quando comparado ao BRA. Uma maior regeneração de brotos foi registrada nos calos cultivados na presença de 10 μ M de BAP ou de TDZ. As plantas regeneradas foram aclimatizadas com sucesso e diferiram em relação ao teor de β -ecdisona.

Palavras-chave: Amaranthaceae; cultivo *in vitro*; citocinina, ecdisteróides; HPLC

Plant regeneration from callus cultures and β -ecdysone production in *Pfaffia glomerata*

Abstract: Plantlet formation through shoot regeneration from callus of the important medicinal species *Pfaffia glomerata* is described. Nodal segments of two accessions (BRA and JB-UFSM) of *P. glomerata* were cultured on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 0.5 μ M naphthaleneacetic acid (NAA) and 5 μ M 6-benzylaminopurine (BA) for calli induction. After this, the calli were transferred to regeneration media, where concentrations (10, 20, 30 and 40 μ M) of BA or thidiazuron (TDZ) were tested. The callus-derived shoots were multiplied and rooted on hormone free MS medium. The JB-UFSM accession presented a greater percentage of regenerative calli when compared to BRA. The highest regeneration of shoots from calli was obtained on MS medium supplemented with 10 μ M of BAP or TDZ. The regenerated plants were successfully acclimatized and differed in relation to the β -ecdysone content.

Key-words: Amaranthaceae; *in vitro* culture, cytokinin, β -ecdysone, HPLC

INTRODUÇÃO

Pfaffia glomerata (Spreng.) Pedersen é uma erva nativa da Região Centro-Oeste do Brasil conhecida como ginseng brasileiro, cujas raízes são utilizadas para a produção de medicamentos fitoterápicos ou suplementos vitamínicos (Magalhães, 2000; Figueiredo et al., 2004). A planta apresenta várias propriedades medicinais, sendo indicada para aliviar cansaço e estresse, para combater o diabetes e como antitumoral (Magalhães, 2000). Vários compostos foram isolados e identificados em *Pfaffia glomerata*, como as saponinas triterpênicas e os fitoecdisteróides (Shiobara et al., 1993). O fitoecdisteróide β -ecdisona vem sendo utilizado como marcador químico da qualidade das raízes e medicamentos produzidos com o ginseng brasileiro (Brasil, 2004; Zimmer et al., 2006).

Diante da grande importância medicinal da *P. glomerata*, buscam-se estratégias de propagação e melhoramento desta espécie. A regeneração de plantas *in vitro* a partir de calos pode resultar em plantas com novas características (Tabares et al., 1991), fornecendo perspectivas de seleção de somaclones mais produtivos. Mantell et al. (1994), relatam que em espécies de fumo, o cultivo de calos auxiliou no desenvolvimento de genótipos superiores em relação ao conteúdo de alcalóides, além de produzir alterações morfológicas. Neste sentido, a definição de uma metodologia eficiente para a proliferação de calos e regeneração de somaclones de *Pfaffia glomerata* poderá contribuir, no futuro, para o melhoramento desta espécie. A manipulação dos fitoreguladores no meio de cultura é um dos procedimentos mais utilizados para maximizar a regeneração indireta *in vitro*. As citocininas thidiazuron (TDZ) e 6-benzilaminopurina (BAP) vêm sendo utilizadas para a indução de brotações a partir de calos na maioria das espécies (Howell et al., 2003; Thao et al., 2003; Wang et al., 2003; Liu et al., 2004; Ledbetter & Preece, 2004). Em *P. glomerata*, Flores et al. (2004) verificaram que tanto o TDZ quanto o BAP podem ser utilizados para potencializar a formação de brotações. Este trabalho teve como objetivo estudar o efeito de concentrações de BAP ou TDZ na regeneração de plantas a partir de calos de dois acessos de *P. glomerata*, visando desenvolver uma metodologia para a produção de somaclones na espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultivo in vitro

Dois acessos de *Pfaffia glomerata* (BRA e JB-UFSM) foram utilizados neste ensaio. O acesso BRA foi coletado no município de Querência do Norte (PR) e faz parte do Banco de Germoplasma da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília, DF. O acesso JB-UFSM encontra-se no Jardim Botânico da UFSM, Santa Maria, RS. Uma exsicata desta espécie foi depositada no Herbário do Departamento de Biologia da UFSM (SMDB 7606).

As plantas foram micropropagadas conforme metodologia previamente descrita por Nicoloso et al. (2001) e Skrebsky et al. (2004). Os segmentos nodais foram desinfestados e multiplicados em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com sacarose (30 g L⁻¹), mio-inositol (100 mg L⁻¹) e ágar (6 g L⁻¹). O pH foi ajustado para 5,9 antes da adição do agar e da autoclavagem. As plantas foram cultivadas em sala de crescimento com temperatura de 25±2°C, 16 horas de fotoperíodo e 35 µM m⁻² s⁻¹ de luminosidade.

Para a indução de calos, segmentos nodais (1 cm) de plantas homogêneas foram cultivados no mesmo meio descrito para a multiplicação das plantas, porém suplementado com 0,5 µM de ácido naftalenoacético (ANA) e 5 µM de 6-benzilaminopurina (BAP). O

material foi incubado no escuro, em sala de crescimento, com temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante uma semana. Posteriormente, os calos foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz e $35\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de irradiância.

Após quatro semanas do início do cultivo, calos de ambos os acessos foram divididos em porções com cerca de $0,5\ \text{cm}^2$ (peso fresco médio de 200 mg) e transferidos para meios de regeneração, sendo testados quatro concentrações (10, 20, 30 e $40\ \mu\text{M}$) de BAP ou de TDZ. A cultura foi mantida em sala de crescimento nas mesmas condições de fotoperíodo, luz e temperatura descritas anteriormente.

As avaliações foram realizadas, após 60 dias, através da percentagem de calos que regeneraram brotações. Posteriormente, os brotos foram isolados dos calos, transferidos individualmente para tubos de ensaio e micropropagados conforme Nicoloso et al. (2001) e Skrebsky et al. (2004). As brotações foram identificadas de acordo com o tratamento (Tabela 1) e subcultivadas, a cada 30 dias, através de segmentos nodais, totalizando três subcultivos.

Aos 30 dias do isolamento dos calos, os brotos foram avaliados quanto à sobrevivência e ao término dos três subcultivos, as plantas foram avaliadas em relação ao comprimento médio dos brotos (cm), número médio de brotos, número médio de segmentos nodais e percentagem de enraizamento. Plantas completas foram transferidas para recipientes contendo o substrato Plantmax[®] hortaliças e aclimatizadas conforme metodologia descrita por Skrebsky et al. (2004). Após 30 dias do transplante, as plantas foram avaliadas em relação à percentagem de sobrevivência.

O delineamento experimental foi o completamente ao acaso com cinco repetições, sendo cada repetição composta por cinco a dez explantes. Os dados foram submetidos à análise da variância e analisados pelo teste de Duncan, em nível de 1 ou 5% de probabilidade de erro.

Doseamento de β -ecdisona nas plantas regeneradas

Após 30 dias do plantio, as plantas foram analisadas em relação ao conteúdo de β -ecdisona. Plantas inteiras foram secas em estufa a 50°C e trituradas em gral com o auxílio de um pistilo.

O procedimento de extração foi realizado conforme metodologia de Tomás et al. (1993), com algumas modificações. As amostras [(plantas inteiras) (200 mg)] foram extraídas com metanol, grau HPLC (2x, 5 mL) em banho ultra-sônico, durante 20 minutos. O sobrenadante foi removido após centrifugação a 1000 g durante 10 minutos e os extratos obtidos das duas extrações foram combinados (10 mL). Os extratos foram tratados com carvão ativo (20 mg) durante cerca de três horas e após, filtrados duas vezes em holder com

membrana de 14 μm . Posteriormente, as soluções foram novamente filtradas empregando-se uma membrana de 0,45 μm (Millipore, Bedford, USA) e injetadas no sistema cromatográfico.

As condições cromatográficas utilizadas neste estudo foram adaptadas da metodologia proposta por Magalhães (2000) e Figueiredo et al. (2004). As análises foram realizadas em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/HPLC) (Perkin-Elmer, Série 200) acoplado com detector UV-vis e coluna analítica Spheri 5 RP 18 (Perkin-Elmer, 220 x 4,6 mm, partículas de 5 μm) protegida por uma pré-coluna Spheri 5 RP18. A fase móvel empregada consistiu de metanol (100%), grau HPLC, sendo a eluição conduzida de forma isocrática, utilizando fluxo constante de 1 mL min⁻¹, a temperatura ambiente. A injeção das amostras (20 μL) foi efetuada manualmente e a detecção dos picos ocorreu a 245 nm. O metanol foi degaseificado em banho de ultra-som antes de ser utilizado no sistema cromatográfico.

A quantificação foi realizada pelo método do padrão externo, utilizando padrão autêntico de β -ecdisona, adquirido da ChromaDex Inc. (Califórnia, U.S.A.). A identificação do analito nas amostras foi baseada no tempo de retenção e na co-cromatografia das amostras com padrão de β -ecdisona.

Os resultados representaram a média de três extrações e três injeções. O teor de β -ecdisona foi determinado em relação à 100 g de massa seca (%). Os dados foram submetidos à análise da variância, seguido pelo teste de Duncan, em nível de 1% de probabilidade de erro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os segmentos nodais formaram calos verdes, com consistência compacta e textura irregular. Após 30 dias de cultivo em meio de regeneração contendo diferentes concentrações de BAP ou TDZ, áreas com coloração verde escuro tornaram-se visíveis em alguns calos. Vinte dias mais tarde, pequenos brotos começaram a emergir da superfície dos calos. Contudo, uma baixa percentagem de calos organogênicos foi registrada em ambos os acessos de *P. glomerata* estudados (Figura 1A). O acesso JB-UFSM apresentou uma maior frequência de calos regenerativos quando comparado ao acesso BRA (Figura 1A). Estas diferenças quanto à regeneração são atribuídas a variações intraespecíficas, indicando que cada acesso de *P. glomerata* pode se comportar de maneira diferente *in vitro*, e portanto, requer protocolo específico de regeneração. O efeito do genótipo na organogênese vem sendo constatado em muitas espécies (Singh et al., 2003). Anzidei et al. (1996) verificaram que a indução de calo e as respostas morfogênicas de várias espécies de *Foeniculum* foram determinadas pelo genótipo e tratamentos hormonais. Em várias espécies

e linhagens de *Amaranthus*, Bennici et al. (1997) ressaltaram uma grande influência genotípica na calogênese e organogênese.

Não houve diferença estatística significativa entre o BAP e o TDZ na porcentagem de calos regenerativos, entretanto as concentrações das citocininas diferiram entre si (Figura 1B). As maiores frequências de regeneração foram observadas nos calos cultivados na presença de 10 e 20 μM de BAP ou TDZ, os quais formaram uma média de 2,5 brotos por calo. Os meios nutritivos acrescidos de concentrações superiores a 20 μM de BAP ou TDZ não favoreceram a regeneração (Figura 1B).

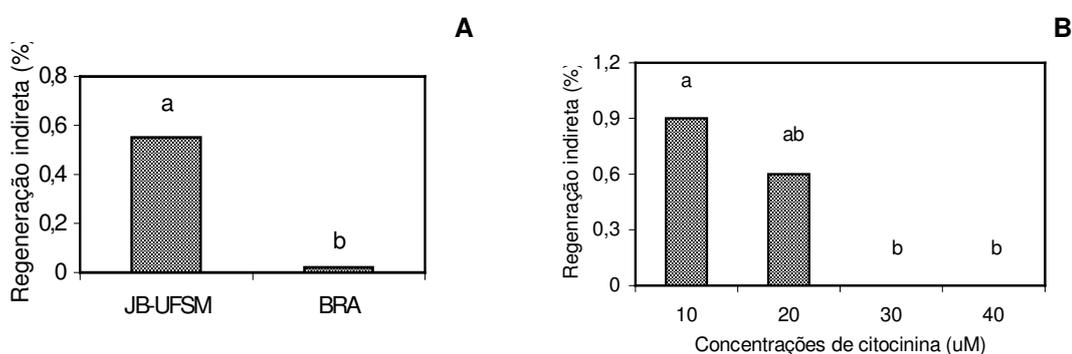


Figura 1 – Regeneração de brotações a partir de calos de dois acessos de *P. glomerata* em meio MS acrescido de BAP ou TDZ. A) Percentagem média de regeneração indireta nos acessos JB-UFSM e BRA; B) Efeito de concentrações das citocininas BAP e TDZ na percentagem média de regeneração a partir dos calos de *P. glomerata*. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo Teste de Duncan, em nível de 1% de probabilidade de erro.

Em outras espécies de amarantáceas, concentrações variadas de BAP têm sido utilizadas para promover a regeneração de brotos a partir de calos (Mercier et al., 1992; Bennici et al., 1997). Em *Gomphrena officinalis*, uma combinação de 22,2 ou 44,4 μM de BAP e 0,5 μM de ANA foram eficazes para estimular a organogênese indireta (Mercier et al., 1992). Já em *Amaranthus cruentus*, Bennici et al. (1997) constataram que a melhor combinação hormonal para estimular a produção de brotos em calo foi 4,4 μM BAP e 2,7 μM de ANA, nas quais obtiveram 54% de calos regenerativos. A BAP foi a citocinina mais eficiente para a regeneração de brotos a partir de calos de *Alocasia* (Thao et al., 2003) e *Leymus chinensis* (Liu et al., 2004). Por outro lado, o TDZ estimulou a regeneração em *Hydrangea quercifolia* (Ledbetter & Preece, 2004), *Schlumbergera* e *Rhipsalidopsis* (Sriskandarajah & Serek, 2004). O BAP e o TDZ vem sendo utilizados para a regeneração de brotações a partir de calos de *Areca catechu* (Wang et al., 2003).

Em *P. glomerata*, tanto o BAP como o TDZ induziram a formação de brotações a partir dos calos, contudo em baixa frequência (menos que 1% de calos regenerativos) (Figura 1A). Desta forma, para que esta rota de regeneração seja viável nesta espécie, faz-se necessário um ajuste da metodologia de calogênese/organogênese para cada acesso estudado. Neste estudo, um dos fatores que provavelmente prejudicaram a regeneração foi o uso de concentrações muito elevadas de BAP e TDZ, embora, em outras amarantáceas, altas concentrações de BAP tenham sido utilizadas com sucesso (Mercier et al., 1992). O subcultivo dos calos durante vários meses é uma outra alternativa que, em geral, aumenta a formação de gemas e brotos (Denchev & Conger, 1995; Anzidei et al., 1996), bem como, a adição de auxina juntamente com uma citocinina no meio de cultivo (Anzidei et al., 1996; Kaur & Kothari, 2004).

Os brotos regenerados foram isolados dos calos, transferidos para meio de cultura MS e identificados conforme a Tabela 1. Dos sete brotos isolados, apenas aqueles provenientes da população JB-UFSM, os quais foram regenerados em meio contendo 10 μ M de BAP (T9A e T9B) e 10 μ M de TDZ (T13A), se desenvolveram e multiplicaram *in vitro*. Os demais brotos sofreram senescência (Tabela 1).

Tabela 1 - Percentagem de sobrevivência de brotos isolados a partir de calos de dois acessos de *Pfaffia glomerata*, após 30 dias em meio MS. Santa Maria – RS, 2006.

Meio de regeneração	Acesso	Brotos isolados dos calos	Sobrevivência <i>in vitro</i> (%)
20 μ M de TDZ	BRA	T6	0
10 μ M de BAP	JB-UFSM	T9A	100
		T9B	100
10 μ M de TDZ	JB-UFSM	T13A	100
		T13B	0
20 μ M de BAP	JB-UFSM	T14A	0
		T14B	0

Após três subcultivos, os brotos T9A, T9B e T13A apresentavam sistema radicular e parte aérea bem desenvolvidos, aparentemente sem alterações morfológicas. Porém, verificou-se que os brotos do clone T9A apresentaram um menor comprimento quando comparado às demais plantas. Por outro lado, as plantas não diferiram entre si no que diz respeito ao número de brotações, número de segmentos nodais e percentagem de enraizamento (Tabela 2). As plantas obtidas neste trabalho não apresentaram alterações marcantes no padrão organogênico quando comparadas às plantas matrizes do acesso JB-UFSM cultivadas nas mesmas condições *in vitro* (Flores et al., 2004).

As plantas se adaptaram bem as condições *ex vitro* e não diferiram estatisticamente entre si no que diz respeito a percentagem média de sobrevivência (Tabela 2). Após 30 dias do plantio, as mudas já demonstravam ter retomado o crescimento vegetativo, apresentando brotações novas. Neste período, as plantas foram analisadas em relação ao conteúdo de β -ecdisona. O metabólito foi detectado em todas as plantas, contudo uma maior concentração foi observada nas plantas T9A (0,33%) e T9B (0,36%) quando comparada à planta T13 (0,28%).

Tabela 2 - Aspectos organogênicos de plantas de *Pfaffia glomerata* (acesso JB-UFSM) durante o cultivo *in vitro*, percentagem de sobrevivência e teor de β -ecdisona (% por massa seca) após 30 dias da transferência para condições *in vivo*. Santa Maria – RS, 2006.

Plantas	Comprimento (cm)	Número médio de brotos	Número médio de segmentos nodais	Enraizamento (%)	Sobrevivência <i>ex vitro</i> (%)	β -ecdisona (%)
T9A	5,5 b*	1,2 a	4,7 a	100 a	88 a	0,33 a
T9B	6,8 a	1,3 a	5,1 a	100 a	84 a	0,36 a
T13A	6,4 a	1,2 a	5,0 a	100 a	80 a	0,28 b

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo Teste de Duncan, em nível de 1% de probabilidade de erro.

As diferenças observadas em relação ao teor de β -ecdisona nas plantas mostrou que o método de regeneração utilizado neste estudo pode ter influenciado no metabolismo deste composto. Em plantas medicinais, a seleção de variantes somaclonais está baseada na identificação de plantas capazes de acumular um maior teor do metabólito de interesse (Rotgé, 1991). Contudo, é importante ressaltar que as diferenças observadas em relação ao teor de β -ecdisona entre as plantas de *P. glomerata* podem ser decorrentes de alterações epigenéticas que podem ser induzidas durante o cultivo *in vitro*. Desta forma, estudos subseqüentes devem ser conduzidos no sentido de avaliar a estabilidade da produção do fitoecdisteróide após a transferência das plantas para condições ambientais.

Apesar de, atualmente, a *P. glomerata* apresentar uma ampla variabilidade genética em condições naturais, a metodologia desenvolvida fornece informações a respeito de aspectos fisiológicos relacionados à organogênese, as quais poderão ser importantes para o desenvolvimento de técnicas alternativas de propagação e melhoramento desta importante espécie medicinal.

CONCLUSÕES

A regeneração indireta em *P. glomerata* é influenciada pelo genótipo e pelas concentrações de BAP e TDZ. O acesso JB-UFSM apresenta uma maior porcentagem de calos regenerativos quando comparado ao BRA. Uma maior taxa de regeneração de brotos é obtida na presença de 10 µM de BAP ou de TDZ. As plantas regeneradas a partir dos calos diferem em relação ao teor de β-ecdisona.

REFERÊNCIAS

- ANZIDEI, M. et al. *In vitro* culture of *Foeniculum vulgare*: callus characteristics in relation to morphogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 45, p. 263-268, 1996.
- BENNICI, A. et al. Studies on callus growth and morphogenesis in several species and lines of *Amaranthus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 49, p. 29-33, 1997.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 48 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Ministério da Saúde, Brasil, 2004. [Http://www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)
- DENCHEV, P. D.; CONGER, B. V. *In vitro* culture of switchgrass: Influence of 2,4-D and picloram in combination with benzyladenine on callus initiation and regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 40, p. 43-48, 1995.
- FIGUEIREDO, L. S. et al. Comportamento de acessos de *Pfaffia glomerata* nas condições de campos de Goytacazes-RJ. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 7, p. 67-72, 2004.
- FLORES, R. et al. Multiplicação *in vitro* de dois genótipos de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) em meio com BAP e TDZ. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 55., 2004, Viçosa. **Anais...Viçosa: NovoDisk Midia**, 2004. CD-ROM.
- FLORES, R. et al. Potencial morfogenético de clones de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch) cv. Vila Nova, obtidos *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 21, n. 3, p. 274-278, 1999.
- HOWELL, S. H., LALL, S.; CHE, P. Cytokinins and shoot development. **Trends in Plant Science**, v. 8, p. 453-459, 2003..
- KAUR, P.; KOTHARI, S. L. *In vitro* culture of Kodo millet: Influence of 2,4-D and picloram in combination with kinetin on callus initiation and regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 77, p. 73-79, 2004.
- LEDBETTER, D. I.; PREECE, J. E. Thidiazuron stimulates adventitious shoot production from *Hydrangea quercifolia* Bartr. leaf explants. **Scientia Horticulturae**, v. 101, p. 121-126, 2004.
- LIU, G. S.; LIU, J. S.; QI, D. M. Factors affecting plant regeneration from tissue cultures of Chinese leymus (*Leymus chinensis*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 76, p. 175-178, 2004.
- MAGALHÃES, P. M. de. Agrotecnologia para el cultivo de fáfia o ginseng brasileiro. In: MARTINEZ, J.V. et al. **Fundamentos de agrotecnología de cultivo de plantas medicinales iberoamericanas**. Santafé de Bogotá: Convênio Andrés Bello/CYTED, 2000. p. 323-332.
- MANTELL, S.H.; MATTHEWS, J. A.; McKEE, R. A. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto: SBG, 1994. Cap. 5. p101-158.

- MERCIER, H.; VIEIRA, C.C.J.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Tissue culture and plant propagation of *Gomphrena officinalis* - a Brazilian medicinal plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 28, p. 249-254, 1992.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NICOLOSO, F. T. et al. Micropropagação do Ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Petersen), **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 3, n. 2, p. 11-18, 2001.
- ROTGÉ, M. P. Cultivo de células y tejidos vegetales para la obtención de productos naturales. **Fruticultura Profesional**, v. 42, p. 81-87, 1991.
- SHIOBARA, Y.; INOUE, S.; KATO, K. A nortriterpenoid, triterpenoid and ecdysteroids from *Pfaffia glomerata*. **Phytochemistry**, v. 32, n. 6, p. 1527-1530, 1993.
- SINGH, N. D. et al. The effect of TDZ on organogenesis and somatic embryogenesis in pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp). **Plant Science**, v. 164, p. 341-347, 2003.
- SKREBSKY, E. C.; NICOLOSO, F. T.; FERRÃO, G. da E. Sacarose e período de cultivo *in vitro* na aclimatização *ex vitro* de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen), **Ciência Rural**, v. 34, n. 5, p. 1471-1477, 2004.
- SRISKANDARAJAH, S.; SEREK, M. Regeneration from phylloclade explants and callus cultures of *Schlumbergera* and *Rhipsalidopsis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 78, p. 75-81, 2004.
- TABARES, E.; PACHÓN, I.; ROCA, W. M. Variación somaclonal y su aplicación al mejoramiento de cultivos. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (Eds.) **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: CIAT, 1991. Cap. 14. p. 339-360.
- THAO, N. T. P., OZAKI, Y.; OKUBO, H. Callus induction and plantlet regeneration in ornamental *Alocasia micholitziana*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v 73, p. 285-289, 2003.
- TOMÁS, J. et al. Phytoecdysteroid production by *Ajuga reptans* tissue culture. **Phytochemistry**, v. 32, p. 317-324, 1993..
- WANG, H. C et al. Plant regeneration through shoot formation from callus of *Areca catechu*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 75, p. 95-98, 2003.
- ZIMMER, A. R. et al. HPLC method for the determination of ecdysterone in extractive solution from *Pfaffia glomerata*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v .40, p. 450-453, 2006.

CAPÍTULO 4

Embriogênese somática em *Pfaffia tuberosa*

4.1 Embriogênese somática em *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken

RESUMO: Tendo em vista a crescente demanda por biomassa de ginseng para a indústria farmacêutica, este trabalho teve como intuito avaliar o efeito de fitoreguladores na embriogênese somática de *Pfaffia tuberosa*. Explantes radiculares foram cultivados em meio Murashige e Skoog (MS) isento de fitoreguladores ou acrescido de concentrações de ácido naftalenoacético (ANA) ou 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) em combinação ou não com benzilaminopurina (BAP). Na etapa de maturação/germinação, agregados embriogênicos induzidos com ANA e BAP foram transferidos para novos meios suplementados com diferentes combinações de fitoreguladores: thidiazuron (TDZ) e ácido indolbutírico (AIB), TDZ e ANA, BAP, ácido giberélico (GA₃) ou para meio isento de fitoreguladores. A indução de embriogênese somática ocorreu em alta frequência em meio suplementado com 2,4-D ou com ANA (10 µM) juntamente com o BAP (1 µM). Os melhores resultados referentes a maturação/germinação foram obtidos em meio acrescido de GA₃ (10 µM).

Palavras-chave - auxina, citocinina, giberelina, planta medicinal, raiz, fitoreguladores.

Somatic embryogenesis of *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken

ABSTRACT: Considering the increasing demand for ginseng biomass due to pharmaceutical industrial purposes, this work aimed at evaluating the effect of growth regulators on somatic embryogenesis of *Pfaffia tuberosa*. Root explants were cultured on Murashige and Skoog (MS) medium without growth regulators or supplemented with α -naphthalene acetic acid (NAA) or 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) combined with or without 6-benzylaminopurine (BAP). During the maturation/germination phase, embryogenic clusters induced with NAA and BAP were transferred to new media supplemented with five different treatments: 1-phenyl-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)-urea (TDZ) + indole-3-butyric acid (IBA), TDZ + NAA, BAP, gibberellic acid (GA₃), and without growth regulators. High frequency of somatic embryogenesis induction occurred on medium supplemented with 2,4-D or NAA (10 µM) together with BAP (1µM). The best results during maturation/germination phase were obtained on medium supplemented with GA₃ (10 µM) or without growth regulators.

Key words: auxin, cytokinin, gibberellin, medicinal plant, root, growth regulators.

INTRODUÇÃO

Pfaffia tuberosa (Spreng.) Hicken, distribuída desde Goiás até o Rio Grande do Sul, é uma espécie de ginseng brasileiro, cujas raízes vem sendo utilizadas, popularmente, como estimulante sexual e para aumentar a fertilidade (Smith & Downs, 1972; Taschetto & Pagliarini, 2003). A investigação química das raízes dessa espécie conduziu ao isolamento do ácido oleanólico e a ecdisterona (Nishimoto et al., 1986), compostos com importantes atividades farmacológicas. Neste contexto, torna-se necessário o desenvolvimento de um método eficiente para a propagação de *P. tuberosa*, tendo em vista a produção de plantas homogêneas e de qualidade para a indústria de fitoterápicos.

Dentre as diferentes técnicas de cultivo *in vitro*, a embriogênese somática representa uma importante ferramenta para a propagação clonal em larga escala, além de ser um método importante para a transformação genética, produção de sementes sintéticas e

estudos básicos de embriogênese (Merkle et al., 1995, Jiménez, 2005). A produção de uma planta completa a partir do embrião formado *in vitro*, a alta fidelidade genética das plantas e a elevada taxa de multiplicação tornam este modelo morfogenético superior ao processo de regeneração via organogênese (Parrot et al., 1991).

Ensaio preliminar conduzido com vários explantes de *P. tuberosa* evidenciou que segmentos de raízes apresentam alta competência para a rota embriogenética. Dentre os explantes mais indicados para a indução de embriões somáticos, os segmentos radiculares vem se destacando em espécies como o ginseng coreano (*Panax ginseng*) (Chang & Hsiang, 1980) e, mais recentemente, em *Oncidium* 'Gower Ramsey' (Wu et al., 2004), *Medicago truncatula* (Iantcheva et al., 2005) e *Eleutherococcus koreanum* (Park et al., 2005). Tendo em vista o estabelecimento de uma metodologia para a propagação clonal desta espécie, este trabalho teve por objetivo investigar o efeito de fitoreguladores na embriogênese somática em *P. tuberosa*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e estabelecimento *in vitro*

Plantas jovens de *P. tuberosa* coletadas no Campus da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil, foram cultivadas em recipientes contendo solo e mantidas casa de vegetação. Uma exsicata da planta foi depositada no Herbário do Departamento de Biologia (SMDB 9840). Brotações jovens foram tratadas com Benomyl (0,1%) antes da desinfestação dos explantes. Os tratamentos de desinfestação consistiram de lavagem em água com detergente comercial (2,0%) durante dois minutos, imersão em solução de álcool 70% por 10 segundos e em solução de Hipoclorito de sódio a 1% acrescido de detergente neutro (2,0%), durante 10 minutos. Após, os segmentos caulinares foram lavados três vezes em água destilada e autoclavada e imersos em solução de Cloreto de mercúrio (0,1%) durante 5 min e, então, lavados seis vezes em água destilada e autoclavada (Flores et al., 2006). Subseqüentemente, os segmentos nodais (1 cm) foram cultivados em tubos de ensaio (150 x 25 mm) contendo 10 mL de meio MS (Murashigue and Skoog, 1962), 3% de sacarose, 0,01% de mio-inositol e 0,6% de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,9 antes da esterilização em autoclave a 121°C durante 20 min. O material foi mantido em sala de cultivo com temperatura de 25±2°C, 16 h de fotoperíodo e 35 µmol m⁻² s⁻¹ de intensidade luminosa. As plantas foram subcultivadas a partir de segmentos nodais a cada 4 semanas.

Indução de embriões somáticos

Segmentos radiculares (1 cm) das plantas estabelecidas *in vitro*, com 30 dias de idade, foram utilizados como explantes. Os explantes foram cultivados no mesmo meio utilizado para a propagação das plantas, porém suplementado com as seguintes combinações hormonais: a) meio isento de fitoregulador; b) 10 μM de ANA; c) 10 μM de ANA e 1 μM de BAP; d) 10 μM de 2,4-D; e) 10 μM de 2,4-D e 1 μM de BAP e f) 1 μM de BAP. O pH do meio foi ajustado para 5,9 antes da autoclavagem. O cultivo foi feito em frascos (100 mL) contendo 20 mL de meio, onde foram inoculados dez explantes, com cerca de um cm, na posição horizontal. Após a inoculação, o material foi mantido no escuro, em sala de crescimento, com temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$, durante um período de dez dias. Posteriormente, foram expostos a uma intensidade luminosa de $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 h.

As culturas foram avaliadas após 60 dias de cultivo quanto à formação de calos (%) e frequência de embriogênese e/ou organogênese (%).

Estudos histológicos

Com o intuito de confirmar a expressão embriogenética, após 60 dias de cultivo no meio de indução, o material foi fixado em glutaraldeído 2% durante 24 horas. Após, as amostras foram submetidas a três lavagens (10 minutos cada) em solução tampão fosfato 0,1M (pH 7,2). A desidratação foi feita em série alcoólica-etílica (10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70%) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, foram imersas em solução alcoólica a 70, 96 e 100% durante duas horas em cada concentração a temperatura ambiente. A pré-infiltração foi feita com etanol 100% e resina líquida [(2-hidroxietil) metacrilato] na proporção de 1:1, mantida a temperatura ambiente, durante 15 horas. A infiltração foi realizada com resina líquida (50 mL) e ativador (1 g) durante um período de 24 horas. Para o emblocamento foram utilizados resina líquida e endurecedor, conforme as recomendações do Kit de resina Technovit 7100. Cortes com 5 μm de espessura foram feitos em micrótomo rotativo. As lâminas foram coradas com azul de toluidina (solução aquosa 0,1%) ou carmim acético (2%) durante dois minutos. Após a secagem, as lâminas foram montadas com permount.

Lâminas histológicas também foram preparadas com embriões destacados dos calos, utilizando o método "squash". Os registros fotográficos foram feitos em microscópio óptico acoplado com micrômetro ocular MA280 e câmera digital Nikon.

Maturação e germinação dos embriões somáticos

Segmentos radiculares (1 cm) das plantas estabelecidas *in vitro* foram cultivados em frascos (100 mL) contendo 20 mL de meio MS suplementado com 10 μM de ANA e 1 μM de BAP para a indução de embriões somáticos. O material foi mantido em sala de cultivo nas mesmas condições descritas para a fase de indução. Após 35 dias de cultivo, os agregados embriogênicos foram seccionados (0,5 cm^2) e transferidos para o meio MS acrescido das seguintes combinações de fitoreguladores: a) 0,5 μM de AIB e 1 μM de TDZ; b) 0,5 μM de ANA e 1 μM de TDZ; c) 10 μM de GA_3 ; d) 1 μM de BAP; e) meio MS isento de fitoreguladores. O pH foi ajustado para 5,9. A cultura foi mantida em sala de crescimento sob intensidade luminosa de 35 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas.

As avaliações foram realizadas após 45 dias da transferência do material para os meios de regeneração, considerando-se a percentagem de regeneração de raízes e/ou parte aérea.

Análise dos dados

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente ao acaso com cinco repetições, sendo cada repetição formada por um frasco contendo dez explantes (totalizando 50 explantes por tratamento). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan, em nível de 1% de probabilidade de erro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Indução de embriogênese somática

Houve proliferação de calos a partir dos segmentos radiculares cultivados em meio suplementado com 10 μM de ANA ou 2,4-D na presença ou não de 1 μM BAP (Tabela 1). Calos friáveis embriogênicos e embriões somáticos foram induzidos em alta frequência (100%) nos segmentos radiculares cultivados na presença do BAP juntamente com o 2,4-D ou com o ANA (Tabela 1, Figura 1A). Conforme Jiménez (2005), o 2,4-D e o ANA são as auxinas mais utilizadas na indução de embriões somáticos, cuja eficiência depende das concentrações utilizadas, tipo de explante, condições de cultivo e genótipo.

Neste estudo, tanto o 2,4-D quanto o ANA mostraram-se efetivos na formação de calos embriogênicos desde que em conjunto com o BAP, o que corrobora dados de Raemakers et al. (1995) de que, em várias espécies, a combinação entre auxina e citocinina é favorável para indução células embriogênicas.

A análise histológica confirmou a rota embriogenética e mostrou a formação de vários embriões somáticos ao longo dos explantes. Adicionalmente, constatou-se que a formação dos embriões ocorreu a partir dos tecidos do explante, ou seja, via embriogênese direta (Figura 1B). As células dos embriões, bem como as células dos calos embriogênicos caracterizaram-se pela forma isodiamétrica, forte reação ao corante carmim acético, citoplasma denso, núcleo grande, nucléolos muito evidentes (Figuras 1C, 1D) e tamanho médio de 19,1 μm . Estas características morfológicas juntamente com o fato das células serem reativas ao carmim acético indicam alta atividade metabólica e intensa atividade mitótica. De fato, observou-se que várias células encontravam-se em divisão celular (Figuras 1E, 1F, 1G, 1H, 1I). Células embriogenéticas características apresentam alta afinidade pelo carmim acético, sendo que em estudos citoquímicos, este corante é utilizado para detectar glicoproteínas, nucleoproteínas e ácidos nucléicos (Gupta & Durzan, 1987), macromoléculas características de células metabolicamente ativas como as embriogenéticas. Por outro lado, as células não embriogênicas apresentaram baixa afinidade ao carmim, núcleo pequeno e maior tamanho (média de 70,5 μm) em relação às embriogenéticas (Figura 1J). Na maioria das células calosas, o núcleo não foi visível, devido à sua localização próxima a membrana plasmática e à fraca coloração (Figura 1J). Estas características também foram relatadas por Thorpe (1994) e Zimmerman (1993). Os relatos obtidos demonstram a importância da análise histológica dos calos tendo em vista a caracterização das células, pois segundo Jiménez (2005), muitas vezes, calos compostos por células embriogenéticas são considerados como não embriogênicos.

No presente trabalho, as secções longitudinais dos embriões mostraram que os mesmos encontravam-se, possivelmente, em estágio cordiforme (Figura 1B, 1L). Constatou-se que alguns embriões encontravam-se em estádios de desenvolvimento mais avançados, os quais apresentavam ápice caulinar e radicular (Figura 1M). Estes embriões eram facilmente destacados do explante, o que sugere a ausência de conexão vascular entre o explante e embriões. Contudo, não foi possível estudar todo o processo de desenvolvimento dos embriões, bem como, determinar a origem uni ou multicelular dos mesmos. A análise histológica mostrou ainda embriões mais desenvolvidos e em maior número nos explantes cultivados em meio suplementado com 10 μM de ANA e 1 μM de BAP em relação ao meio contendo a mesma concentração de 2,4-D.

Adicionalmente, constatou-se que os calos induzidos apenas com auxinas apresentaram alta competência para regenerar raízes via organogênese direta (Tabela 1; Figura 1N). Este aspecto é importante, uma vez que, o cultivo de calos rizogênicos têm sido utilizados para a produção de metabólitos *in vitro* (Kollávorá et al., 2004). Não foram observadas alterações referentes à proliferação celular e/ou morfogênese nos explantes

cultivados em meio não suplementado com fitoreguladores. Contudo, os cultivados em meio contendo apenas o BAP formaram raízes laterais alongadas (Tabela 1).

Desta forma, verificou-se que o 2,4-D e o ANA foram essenciais para a indução de calos a partir de raízes de *Pfaffia tuberosa*, cuja morfogênese, ou seja, a expressão da rota embriogênética ou organogênética, foi altamente influenciada pela presença do BAP. Assim, meios suplementados apenas com o 2,4-D ou ANA induziram calos rizogênicos, enquanto que a ação conjunta das auxinas com o BAP favoreceu a embriogênese.

Tabela 1 - Efeito de combinações de ANA, 2,4-D e do BAP na formação de calos, percentagem de calos embriogênicos e percentagem de calos rizogênicos formados a partir de explantes radiculares de *Pfaffia tuberosa*. Santa Maria – RS, 2006.

Fitoreguladores (μM)			Calogênese (%)	Calos embriogênicos (%)	Calos rizogênicos (%)
ANA	2,4-D	BAP			
-	-	-	0 b*	0 b	0 c
10	-	-	100 a	0 b	100 a
10	-	1	100 a	100 a	0 c
-	10	-	100 a	0 b	100 a
-	10	1	100 a	100 a	0 c
-	-	1	0 b	0 b	20 b

*Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Duncan, em nível de 1% de probabilidade de erro.

O BAP também foi determinante na formação de embriões somáticos em *Corydalys yanhusuo* (Sagare et al., 2000) e *Bombax ceiba* (Vyas & Bansal, 2004). Conforme De Jong et al. (1993) o efeito das citocininas adicionadas ao meio nutritivo não é só estimular a mitose, mas também promover alterações no plano de divisão celular, o primeiro passo para a indução da embriogênese.

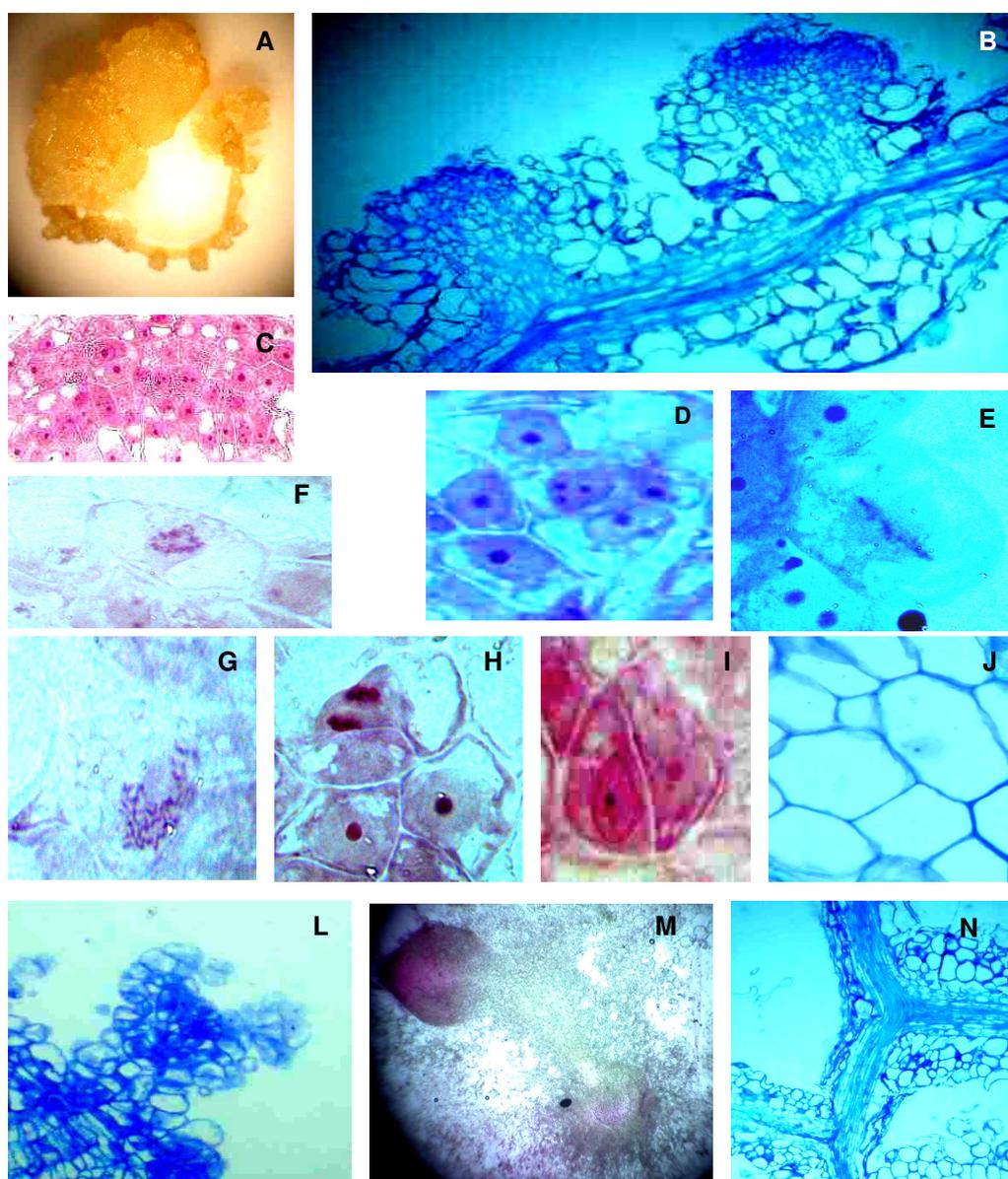


Figura 1 – A) Raiz cultivada com ANA e BAP, apresentando embriões somáticos em sua superfície e calo friável nas extremidades (10X); B) Secção longitudinal do explante observado em A, mostrando a formação de vários embriões somáticos via embriogênese direta (40X); C) Células embriogênicas do calo observado em A apresentando forte afinidade ao carmim acético (400X); D) Células embriogênicas do calo observado em A apresentando núcleos grandes e nucléolos visíveis (1000X). (E) Célula em metáfase (1000X); (F) Célula em anáfase inicial (1000X); G) Célula com cromossomos dispersos (1000X); H) Célula em telófase (1000X); I) Formação de duas células após citocinese (1000X); J) Células calosas não embriogênicas (400X); L) Secção longitudinal de embriões somáticos iniciando o desenvolvimento dos cotilédones, fase característica do estágio cordiforme (100X). M) Embrião somático em estágio bipolar destacado do explante, corado com carmim acético 1% (40X); N) Regeneração de raízes laterais a partir do explante quando cultivado em meio com 10 μ M de ANA, sendo circundadas por células de calo (40X).

Maturação e germinação dos embriões somáticos

Os tratamentos contendo TDZ juntamente com o AIB ou ANA induziram à formação de calos, em detrimento da maturação e da germinação dos embriões somáticos, o que pode ser devido ao uso de concentrações muito elevadas desses fitoreguladores. O TDZ induz à formação de calos mesmo em baixas concentrações. Em função disso, atualmente, existem poucos relatos sobre o efeito do TDZ na embriogênese somática (Huetteman & Preece, 1993; Jiménez, 2005). Contudo, em algumas espécies, como no arroz, uma alta frequência de regeneração foi obtida quando calos embriogênicos foram transferidos para meios acrescidos de altas concentrações de TDZ (Gairi & Rashid, 2004). O TDZ também foi eficaz na embriogênese somática de *Cajanus cajan* (Singh et al., 2003).

Por outro lado, em meio suplementado com BAP, GA₃ ou em meio não acrescido de fitoreguladores, os agregados embriogênicos cresceram, principalmente ao longo do eixo apical-basal. A formação de raízes foi observada em 100% dos agregados embriogênicos cultivados em meio isento de fitoreguladores ou na presença do GA₃. Não foi constatada formação de raízes nos embriões cultivados em meio suplementado com BAP. Contudo, independente da combinação hormonal, os embriões não desenvolveram parte aérea.

Na maioria dos genótipos, o desenvolvimento e a germinação dos embriões somáticos são favorecidos em meio desprovido de fitoreguladores (Parrot et al., 1991; Merkle et al., 1995), com baixas concentrações de auxinas e/ou citocininas (Vyas & Bansal, 2004; Urbanek et al., 2004) e/ou suplementado com GA₃ (Merkle et al., 1995, Sagare et al., 2000). Tanto as citocininas como as giberelinas melhoram a germinação dos embriões (Vyas & Bansal, 2004). Contudo, na maioria das espécies, as principais limitações da embriogênese somática para a propagação clonal e comercial são as baixas frequências de conversão dos embriões em plantas (Jiménez, 2005). Neste estudo, os melhores resultados referentes à germinação foram obtidos em meio acrescido de GA₃ ou isento de fitoreguladores, nos quais os embriões cresceram e desenvolveram sistema radicular, contudo falharam na formação da parte aérea. Neste estudo, as prováveis causas para a baixa frequência de formação de plantas completas podem ser atribuídas a uma série de fatores como a falhas na formação de tecidos, carência de substâncias de reserva e ao efeito residual do ANA ocasionado pelo tempo de permanência dos explantes no meio de indução. Wetztein & Baker (1993) relataram o desenvolvimento anormal de meristemas como o principal fator responsável pela baixa taxa de conversão dos embriões somáticos. Semelhante ao observado em *P. tuberosa*, falhas no desenvolvimento da parte aérea dos embriões foram observadas em *Theobroma cacao* (Alemanno et al., 1997), sendo em geral, associadas a malformações no meristema apical. Além da histogênese normal, durante a fase de maturação, os embriões somáticos devem armazenar substâncias de reserva como proteínas, lipídios e carboidratos. O acúmulo de substâncias de reserva incrementa a biomassa dos embriões e está

relacionado com o vigor e com a capacidade de germinação e conversão (Merkle et al., 1995). Em geral, a presença de ácido abscísico (ABA) e/ou agentes osmorreguladores no meio de cultura estimulam a acumulação de substâncias de reserva, previnem a germinação precoce e aumentam a frequência de plantas normais (Häggman et al., 1999, Sagare et al., 2000). Meios de cultura suplementados com polietilenoglicol (PEG) e ABA melhoraram a maturação e a regeneração de plantas em embriões somáticos de *Panax ginseng* (Langhansova & Konradova, 2004) e *Corydalis yanhusuo* (Sagare et al., 2000). Além disso, Zimmerman (1993) e Gairi & Rashid (2004) reforçaram que o período de tempo em que os explantes permanecem em meio com auxina influencia no desenvolvimento dos embriões. Para Parrot et al. (1991) e Merkle et al. (1995), o efeito residual das auxinas pode ser uma das causas da falha na conversão dos embriões somáticos.

Observou-se, portanto, que a determinação de um protocolo eficiente para a propagação clonal via embriogênese somática é um procedimento complexo que envolve a elucidação dos fatores que afetam as várias fases do desenvolvimento embrionário. Este estudo com *Pfaffia tuberosa* apresentou excelentes respostas quanto à indução de células embriogênicas e embriões somáticos cultivando-se raízes em meio acrescido de BAP juntamente com o ANA ou 2,4-D. Porém, as condições de cultivo adotadas na fase de maturação/conversão dos embriões não favoreceram o desenvolvimento de plantas completas. Neste sentido, estudos subsequentes serão necessários para investigar outras composições de meio nutritivo nas etapas de maturação e germinação tendo em vista a regeneração de plantas. Além disso, análises histológicas serão necessárias para verificar a histogênese dos embriões e constatar a presença de substâncias de reserva, tendo em vista o esclarecimento das possíveis causas da falta de conversão dos embriões somáticos em plantas.

CONCLUSÕES

As raízes de *P. tuberosa* apresentam alta competência embriogênica em meio suplementado com BAP combinado com o 2,4-D ou ANA. No entanto, estudos posteriores serão necessários em relação à maturação dos embriões somáticos e regeneração de plantas, viabilizando a embriogênese somática como um método de propagação clonal para essa espécie.

REFERÊNCIAS

- ALEMANNO L., BERTHOLY, M.; MICHAUX-FERRIERE, N. A comparison between *Theobroma cacao* L. zygotic embryogenesis and somatic embryogenesis from floral explants. ***In vitro Cell Developmental Biology***, v. 33, p. 163-172, 1997.
- CHANG, W. C.; HSIANG, Y. I. Plant regeneration through somatic embryogenesis in root derived callus of ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). **Theoretical and Applied Genetic**, v. 43, p. 133-135, 1980.
- DE JONG, A. J. et al. Early events in higher-plant embryogenesis. **Plant Molecular Biology**, v. 22, p. 367-377, 1993.
- FLORES, R.; MALDANER, J.; NICOLOSO, F. T. I. Otimização da micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Ciência Rural**, v. 36, n. 3, p. 845-851, 2006.
- GAIRI, A.; RASHID, A. TDZ-induced somatic embryogenesis in non-responsive caryopses of rice using a short treatment with 2,4-D. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 76, p. 29-33, 2004.
- GUPTA, P. K. DURZAN, D. J. Biotechnology of somatic polyembryogenesis and plantlet regeneration in lobolly pine. **Biotechnology**, v. 5, p. 147-151, 1987.
- HÄGGMAN, H. et al. Somatic embryogenesis of Scot pine: cold treatment and characteristics of explant affeting induction. **Journal Experimental Botany**, v. 50, p. 1769-1778, 1999.
- HUETTEMAN, C. A.; PREECE, J. E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 33, p.105-119, 1993.
- IANTCHEVA, A. et al. Embryo induction and regeneration from root explants of *Medicago truncatula*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 81, p. 37-43, 2005.
- JIMÉNEZ, V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulation**, v. 47, p. 91-110, 2005.
- KOLLÁVORÁ, K. et al. Effect of auxins on *Karrwinskia humboldtiana* root cultures. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 79, p. 213-221, 2004.
- LANGHANSOVA. L.; KONRADOVA, H. Polyethylene glycol and abscisic acid improve maturation and regeneration of *Panax ginseng* somatic embryogenesis. **Plant Cell Report**, v. 22, p. 725-730, 2004.
- MERKLE, A. S. et al.. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: THORPE, T. A. (Ed.). ***In vitro Embryogenesis in plants***. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p 155-203.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NISHIMOTO, N. et al. Ecdisterone from *Pfaffia tuberosa* (Spreng,) Hicken. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 1, p. 188-191, 1986.
- PARK, S. Y. et al. Mass production of *Eleutherococcus koreanum* plantlets via somatic embryogenesis from root cultures and accumulation of eleutherosides in regenerants. **Plant Science**, v. 168, p. 1221-1225, 2005.
- PARROT, W. A.; MERKLE, A. S.; WILLIAMS, E. G. Somatic embryogenesis: potencial for use in propagation and gene transfer systems. In: MURRAY, D. R. (Eds) **Advanced methods in plant breeding and biotechnology**. Redwood: Melkham, 1991. p. 158-200.

- RAEMAKERS, C. J. J. M. et al. Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. **Euphytica**, v. 81, p. 93-107, 1995.
- SAGARE, A. P. et al. Cytokinin-induced somatic embryogenesis and plant regeneration in *Corydalis yanhusuo* (Fumariaceae) – a medicinal plant. **Plant Science**, v. 160, p. 139-147, 2000
- SINGH, N. D. et al. The effect of TDZ on organogenesis and somatic embryogenesis in pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp). **Plant Science**, v. 164, p. 341-347, 2003.
- SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. **Flora ilustrada catarinense – Amarantáceas**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1972. 110 p.
- TASCETTO, O. M.; PAGLIARINI, M. S. Occurrence of 2n and jumbo pollen in the Brazilian ginseng (*Paffia glomerata* e *P. tuberosa*). **Euphytica**, v. 133, p. 139-145, 2003.
- THORPE, T. A. *In vitro* organogenesis and somatic embryogenesis: physiological and biochemical aspects. In: ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K. A.; TRAN THANK VAN, K (Eds.). **Morphogenesis in plant**. New York: Plenum Press, 1994. p. 19-38.
- URBANEK, A.; ZECHMANN, B.; MULLER, R. Plant regeneration via somatic embryogenesis in Styrian pumpkin: cytologicas and biochemical investigations. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 79, p. 329-340, 2004.
- VYAS, M.; BANSAL, Y. K.. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in semul (*Bombax ceiba*). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 79, p. 115-118, 2004
- WETZSTEIN, H. Y.; BAKER, C. M. The relationship between somatic embryo morphology and conversion in peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Plant Science**, v. 92, p. 81-89, 1993.
- WU, I. F.; CHEN, J. T.; CHANG, W. C. Effects of auxins and cytokinins on embryo formation from root-derived callus of *Oncidium* 'Gower Ramsey'. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 77, p. 107-109, 2004.
- ZIMMERMAN, J. L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **The Plant Cell**, v. 5, p. 1411-1423, 1993.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As técnicas de cultivo *in vitro* adotadas neste estudo contribuíram para o esclarecimento dos principais fatores que modulam as respostas morfogênicas em *Pfaffia glomerata* e *Pfaffia tuberosa*.

A propagação clonal *in vitro* de *P. glomerata* mostrou ser um método adequado para a obtenção de matéria-prima uniforme, na quantidade e qualidade necessária para o processamento industrial, reduzindo o impacto sobre as populações naturais da espécie. Adicionalmente, a variabilidade encontrada em relação à taxa de propagação *in vitro* e produção de β -ecdisona em diferentes acessos de *P. glomerata* pode ser explorada em programas de melhoramento.

Os resultados obtidos com a *P. tuberosa* demonstram o grande potencial da espécie para estudos fisiológicos, químicos e farmacológicos. Apesar de suas raízes apresentarem um menor teor de β -ecdisona quando comparada à *P. glomerata*, a parte aérea da planta apresentou quantidades consideráveis deste ecdisteróide. As investigações em relação à produção de β -ecdisona na parte aérea de *P. glomerata* e *P. tuberosa* são pioneiras e revelam a necessidade de se ampliar os estudos químicos, biológicos e farmacológicos nestas espécies.

A manipulação dos fitoreguladores no meio de cultura mostrou ser uma valiosa ferramenta para correlacionar a produção de compostos bioativos *in vitro* com o grau de diferenciação dos tecidos. Em ambas as espécies de *Pfaffia* estudadas, maiores teores de β -ecdisona *in vitro* foram obtidos nas combinações hormonais que favoreceram a formação de calos friáveis organogênicos. Além de estudos metabólicos, o cultivo de calos de *P. glomerata* e *P. tuberosa* poderá ser explorado como uma alternativa para a regeneração de plantas. Em *P. glomerata*, plantas regeneradas a partir de calos apresentaram variações em relação à produção de β -ecdisona, podendo ser úteis como fonte de germoplasma em programas de melhoramento.

Baseado nestas observações, verificou-se que as técnicas de cultivo *in vitro* adotadas em *Pfaffia glomerata* e *Pfaffia tuberosa* juntamente com o doseamento de β -ecdisona poderão ser exploradas de diferentes maneiras. Primeiro, na produção de mudas de qualidade através da micropropagação. Segundo, a possibilidade de produzir β -ecdisona a partir de calos e/ou órgãos cultivados *in vitro* fornece subsídios para estudos biossintéticos

de vários metabólitos de importância econômica e farmacológica encontrados nestas espécies, como os fitoesteróis, os fitoecdisteróides, as saponinas triterpênicas e as betalaínas. Terceiro, a regeneração de plantas a partir de calos fornece perspectivas para a seleção de somaclones com características superiores em relação a aspectos agrônômicos e/ou fitoquímicos.

REFERÊNCIAS

- ACKEL, C.R.; DANUCALOV, M.A.D.; NOUAILHETAS, V.L. Effect of *Pfaffia glomerata* on the ventilatory responses to exercise in humans aged between 50-75 years-old. **Medicine and Science in Sport and Exercise**, v. 31, n. 5, p. 386-386, 1999.
- AHMAD, V.U. et al. An antimicrobial ecdysone from *Asparagus dumosus*. **Fitoterapia**, v. 67, p. 88-91, 1996.
- ALEMANNI, L.; BERTHOLY, M.; MICHAUX-FERRIERE, N. A comparison between *Theobroma cacao* L. zygotic embryogenesis and somatic embryogenesis from floral explants. **In Vitro Cell Developmental Biology**, v. 33, p. 163-172, 1997.
- ANDRE, A. C. G. M. et al. Estudo comparativo da produção de metabólitos secundários em cultura de células e na planta in natura de *Gomphrena globosa* (Amaranthaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 22-24, 2003.
- ANU, A.; BABU, K. N.; PETER, K. V. Variations among somaclones and its seedling progeny in *Capsicum annuum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 76, p. 261-267, 2004.
- ANUFRIEVA, E. N. et al. The content and composition of ecdysteroids in plant and tissue culture of *Serratula coronata*. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 45, p. 326-332, 1998.
- ARAUJO, W. L. de. **Citocininas no crescimento e desenvolvimento de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amarantheceae) cultivadas in vitro**. 2001. 38 f. Monografia (Especialização em Biologia) – Curso de Especialização em Biologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2001.
- ARIKAT, N. A. et al. Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticulosa* Mill.). **Scientia Horticulturae**, v. 100, p. 193-202, 2004.
- BAKER, C. M.; WETZSTEIN, H. Y. Repetitive somatic embryogenesis in peanut cotyledon cultures by continual exposure to 2,4-D. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 40, p. 249-254, 1995.
- BARENDSE, G. W. M.; PEETERS, T. J. M. Multiple hormonal control in plants. **Acta Botanica Neerlandica**, v. 44, n. 1, p. 03-17, 1995.
- BARRUETO CID, L. P. B. A cultura de células vegetais em meio líquido. **ABCTP Notícias**, n. 18, p. 02-07, 1992.
- BENNICI, A. et al. Studies on callus growth and morphogenesis in several species and lines of *Amaranthus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 49, p. 29-33, 1997.
- BENSADDEK, L. et al. The effect of nitrate and ammonium concentrations on growth and alkaloid accumulation of *Atropa belladonna* hairy roots. **Journal of Biotechnology**, v. 85, p. 35-40, 2001.
- BERED, F. Avaliação da embriogênese somática em cultivares de aveia (*Avena sativa* L.). **Ciência Rural**, v. 26, n. 3, p. 371-375, 1996.

- BERUTO, M. LANTERI, L. PORTOLAGO, C. Micropropagation of tree peony (*Palonia suffurticosa*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 79, p. 249-255, 2004.
- BHOJWANI, S.S.; RADZDAN, M.K. **Tissue culture media**. NewYork: Eslevier, 1983.
- BOTTA, B. et al. Cultura de tecidos vegetais: doze anos de experiência. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Chapecó: Argos, 2001. p. 354-379.
- BOUHARMONT, J. Application of somaclonal variation and *in vitro* selection to plant improvement. **Acta Horticulturae**, v. 355, p. 213-218, 1994.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 48 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Ministério da Saúde, Brasil, 2004. [Http://www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)
- BROWN, J. T.; CHARLWOOD, B. V. Organogenesis in callus culture. In: POLLARD, J. W.; WALKER, J. M. **Plant cell and tissue culture**. New Jersey: Humana Press, 1990. cap. 7. p. 65-70.
- CAI, Y.; SUN, M.; CORKE, H. Characterization and application of betalain pigments from plants of the Amaranthaceae. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, p. 370-376, 2005.
- CALDAS, L. S. HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI, 1998, v.1. p. 87-132.
- CAMPS, F. et al. Ecdysteroid production in tissue culture of *Polipodium vulgare*. **Phytochemistry**, v. 29, p. 3819-3821, 1990.
- CANGAHUALA-INOCENTE, G. C. **Embriogênese somática e sementes sintéticas em *Feijoa sellowiana*: sistema referência e aspectos fisiológicos e morfo-histológicos**. 2002. 38 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Programa de Pós-em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal do Paraná, Florianópolis, 2002.
- CARRIER, D. J. et al. Sucrose requirements and lipid utilization during germination of interior spruce (*Picea glauca engelmannii*) somatic embryos. **Plant Cell Reports**, v. 16, p. 550-554, 1997.
- CASSELS, A. C. MORRISH, F. Variation in adventitious regenerants of *Begonia rex* Putz. "Luccille Closon" as a consequence of cell ontogeny, callus ageing and frequency of callus subculture. **Scientia Horticulturae**, v. 32, p. 135-143, 1987.
- CASTILLO, B.; SMITH, M. A. L. Direct somatic embryogenesis from *Begonia gracilis* explants. **Plant Cell Report**, v. 16, p. 385-388, 1997.
- CHANG, W. C.; HSIANG, Y. I. Plant regeneration through somatic embryogenesis in root derived callus of ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). **Theoretical and Applied Genetic**, v. 43, p. 133-135, 1980.
- CHEE, R. P.; CANTLIFFE, D. J. Somatic embryos in sweetpotato. In: HILL, W. A.; BONSI, C. K.; LORETAN, P. A. (Eds.) **Sweetpotato technology for the 21th century**. Tuskegee, 1992. p. 39-46.
- CHRISTIANSON, M. L.; WARNICK, D. A. Competence and determination in the process of *in vitro* shoot organogenesis. **Development Biology**, v. 35, p. 288-293, 1983.
- COENEN, C.; LOMAX, T. L. Auxin-cytokinin interations in higher plants: old problems and new tools. **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 9, p. 351-356, 1997.

- COHEN, D. The culture medium. **Acta horticulturae**, n. 393, p. 15-24, 1995.
- CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981.
- CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N.G. Natural products (secondary metabolites). In: Buchanam, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Eds.). **Biochemistry & molecular biology of plants**. Rockville: Courier Companies, 2000. p. 1250-1318.
- DANIEL, J. F. DE S. et al. Free radical scavenging activity of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). **Indian Journal Pharmacology**, v. 37, p. 174-178, 2005.
- DAVIES, P. J. **Plant hormones: and their role in plant growth and development**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1990. 679p.
- DE KLERK, G. J. How to measure somaclonal variation. **Acta Botanica Neerlandica**, v. 38, n.2, p.129-144, 1990.
- DEBERGH, P. C.; READ, P. E. Micropropagation. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation: technology and application**. London: Kluwer Academic, 1991. p. 1-13.
- DELBECQUE, J. P. et al. *In vitro* incorporation of radiolabelled cholesterol and mevalonic acid ecdysteroids by hairy root cultures of a plant, *Serratula tinctoria*. **European Journal of Entomology**, v. 92, p. 301-307, 1995.
- DEVARENNE, T. P.; SEM-MICHAEL, B.; ADLER, J. H. Biosynthesis of ecdysteroid in *Zea mays*. **Phytochemistry**, v. 40, p. 1125-1131, 1995.
- DINAN, L. Phytoecdysteroids: biological aspects. **Phytochemistry**, v. 57, p. 325-339, 2001.
- DINAN, L.; SAVCHENCHO, T.; WRITING, P. Phytoecdysteroids in the genus *Asparagus* (Asparagaceae). **Phytochemistry**, v. 56, p. 569-576, 2001.
- DUTTA GUPTA, S. et al. Direct somatic embryogenesis and plantlet regeneration from seedling leaves of winged bean, *Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC. **Plant Cell Report**, v. 16, p. 628-631, 1997.
- ECHEVERRIGARAY, S. et al. Cultura de tecidos e micropropagação de plantas aromáticas e medicinais. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M. de; AZEVEDO, J. L. **Biotechnology na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, 2001, cap. 7. p. 257-278.
- EINSET, J. W.; ALEXANDER, J. H. Multiplication of *Syringa* varieties and species in tissue culture. **Proc Intl Plant Propagation Society**, v. 34, p. 628-636, 1984.
- ELANGOMATHAVAN, R. et al. High frequency *in vitro* propagation of kidney tea plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 72, p. 83-86, 2003.
- EMONS, A. M. C. Somatic embryogenesis: cell biological aspects. **Acta Botanica Neerlandica**, v. 43, n. 1, p. 1-4, 1994.
- FAKHAI, H. K.; FAKHAI, F. Hormones control of growth and development. In: POLLARD, J. W.; WALKER, J. M. (Eds.) **Plant cell and tissue culture**. New Jersey: Humana Press, 1990. cap. 5. p. 49-56.
- FARIA, J. T. C. **Calogênese e morfogênese em porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido (*Malus prunifolia* Willd., Borkh)**. 1996. 51 f. Dissertação (Mestrado em Fitomelhoramento) – Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1996.

- FAURE, O. et al. Mannitol and thidiazuron improve *in vitro* shoot regeneration from spearmint and peppermint leaf disks. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 52, p. 209-212, 1998.
- FIGUEIREDO, L. S. et al. Comportamento de acessos de *Pfaffia glomerata* nas condições de campos de Goytacazes-RJ. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 7, n.1, p. 67-72, 2004.
- FLORES, R. et al. Efeito de concentrações de 2,4-D, picloram e BAP na indução de calos e regeneração de plantas de morangueiro cv. Vila Nova. **Revista Científica Rural**, v.8, n.2, p. 87-91, 2003.
- FLORES, R. et al. Efeito do BAP na calogênese e morfogênese *in vitro* de entrenós e segmentos de folhas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 55., 2004, Viçosa. **Anais...Viçosa: SBB**, 2004. 1CD-ROM
- FLORES, R.; MALDANER, J.; NICOLOSO, F. T. I. Otimização da micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Ciência Rural**, v. 36, n. 3, p.845-851, 2006.
- FOWLER, M. W. Products from plant cells. In: BULLOCK, J.; KRISTINASEN, B. **Basic biotechnology**. London: Academic Press, 1987, p. 525-545.
- FRANÇA, S de C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2001. p. 105-124.
- FREITAS, C. S. et al. Actions of crude hydroalcoholic extract of *Pfaffia* sp. on gastrointestinal tract. **Brazilian Archives of Biology na Technology**, v. 46, n. 3, 2003.
- FREITAS, C.S. et al. Involvement of nitric oxide in the gastroprotective effects of na aqueous extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, Amaranthaceae, in rats. **Life Sciences**, v. 74, p. 1167-1179, 2004.
- FURUYA, T. et al. Formation of plantlets from callus cultures o ginseng (*Panax ginseng*). **Experientia**, v. 42, p. 193-194, 1986.
- GARIN, E.; GRENIER, E.; GRRNIER-DE MARCH, G. Somatic embryogenesis in wild cherry (*Prunus avium*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 48, p. 83-91, 1997.
- GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture**. Eversley: Exegetics Limited, 1984.
- GEORGE, E. **Plant propagation by tissue culture – the tecnologia**. Eversley: Exegetics Limited, 1993. v. 1.
- GIACOMETTI, D. C. Impacto atual da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.; **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPQ, 1990. p. 19-28.
- GIL, E. S.; ORLANDO, R. M.; MATIAS, R.; SERRANO, S. H. P. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**. 1. ed. Campo Grande: UNIDERP, 2005. 438 p.
- GREBENOK, R. J. et al. Biosynthesis of ecdysone and ecdysone phosphates in spinach. **Phytochemistry**, v. 35, p. 1399-1408, 1994.
- GREBENOK, R. J. et al. Ecdysone 20-monooxygenase, a cytochrome P450 enzyme from spinach, *Spinacia olearcea*. **Phytochemistry**, v. 42, p. 927-933, 1996.

- GREY, D. J.; PUROHIT, A. Somatic embryogenesis and development of synthetic seed technology. **Critical Review in Plant Science**, v. 10, n.1, p. 33-61, 1991.
- GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Técnicas e aplicações da biologia celular e molecular em plantas**. Brasília: Embrapa/CNPq, 1999. p. 533-568.
- GUERRA, M. P. et al. Embriogênese somática e micropropagação do palmitheiro (*Euterpe edulis* M. – Arecaceae) na Floresta Ombrófila Densa. **Sellowia**, n. 2, 49-52, p. 150-152, 2000.
- GUPTA, P. K.; DURZAN, D. J. Biotechnology of somatic polyembryogenesis and plantlet regeneration in lobolly pine. **Biotechnology**, v. 5, p. 147-151, 1987.
- HABERER, G.; KIEBER, J.J. Cytokinins. New insights into a classic phytohormone. **Plant Physiology**, v. 128, p. 354-362, 2002.
- HÄGGMAN, H. et al. Somatic embryogenesis of Scot pine: cold treatment and characteristics of explant affeting induction. **Journal of Experimental Botany**, v. 50, n. 341, p. 1769-1778, 1999.
- HAMMATT, N.; GRANT, N. J. Shoot regeneration from leaves of *Prunus serotina* Ehrh. (black cherry) and *P. avium* L. (wild cherry). **Plant Cell Report**, v. 17, p. 526-530, 1998.
- HAMMERSCHLAG, F. A.; LITZ, R. E. **Biotechnology of perennial fruit crops**. California: CAB International, 1992.
- HERATH, S.P.; SUSUKI, T.; HATTORI, K. Multiple shoot regeneration form young shoots of kenaf (*Hibiscus cannabinus*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 77, p. 49-53, 2004.
- HICKS, G. S. Shoot incuption and organogenesis *in vitro*: a development perspective. **In vitro cell Developmental Biology**, v. 30, p. 10-15, 1994.
- HIKINO, H.; JIN, H. & TAKEMOTO, T. Occurrence of insect-moulting substance ecdysterone and inokosterone in callus tissue of *Achyranthes*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 198, p. 438-439, 1971..
- HIRAI, G.; KASAI, N.; HARADA, T. Somatic embryogenesis in mature zygotic embryo culture of *Glehnia littoralis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 48, p. 175-180, 1997.
- HOSOKAWA, K. et al. Adventitious shoot regeneration from leaf, stem and root explants of commercial cultivaris of *Gentiana*. **Plant Cell Report**, v. 15, p. 578-581, 1996.
- HOSTERRMAN, K.; QUEIROS, E.F.; VIEIRA, P.C. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: EDUFSCAR, 2003. 152p.
- HOU, S.W.; JIA, J.F. High frequency plant regeneration from *Astragalus melilotoides* hypocoty and stem explants via somatic embryogenesis and organogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 79, p. 95-100, 2004.
- HOWELL, S. H., LALL, S. & CHE, P. Cytokinins and shoot development. **Trends in Plant Science**, v. 8, p. 453-459, 2003.
- HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D. A. et al. (Eds.) **Handbook of plant cell culture**. New York: Macmillan Publishing Company, 1983. p. 117-227.
- HUETTEMAN, C. A.; PREECE, J. E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 33, n. 2, p. 105-119, 1993.

- HUSSEY, G. Problems and prospects in the *in vitro* propagation of herbaceous plants. In: WITHERS, L. A.; ALDERSON, P. G. **Plant tissue culture and its agriculture applications**. London: Butterworths, 1986. p. 69-84.
- IANTCHEVA, A.; SLAVOV, S.; PRINSEN, E. Embryo induction and regeneration from root explants of *Medicago truncatula* after osmotic pre-treatment. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 81, p. 37-43, 2005.
- JIMÉNEZ, V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulation**, v. 47, p. 91-110, 2005.
- JIMÉNEZ, V. M. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 13, p. 196-223, 2001.
- JOSE NOBRE, J. *In vitro* cloning and micropropagation of *Lavandula stoechas* from field-grown plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 46, p. 151-155, 1996.
- KAGIKI, F.O. et al. Indução de calos e produção de saponinas totais em *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 7, n.1, p. 43-50, 2004.
- KARAM, N. S. et al. Growth and rosmarinic acid accumulation in callus, cell suspension, and root cultures of wild *Salvia fruticulosa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 73, p. 117-121, 2003.
- KARP, A. Somaclonal variation as a tool for crop improvement, **Euphytica**, v. 85, p. 295-302, 1995.
- KARP, A. The role of growth regulators in somaclonal variation. **British Society for Plant Growth Regulation Annual Bulletin**, n. 2, 1992. p. 1-9.
- KENDE, H.; ZEEVAART, J.A.A.; The five classical plant hormones. **The Plant Cell**, v. 9, p. 1197-1210, 1997.
- KHAWAR, K. M. et al. Effect of thidiazuron on shoot regeneration from different explants of lentil (*Lens culinaris* Medik.) via organogenesis. **Turk Journal Botany**, v. 28, p. 421-426, 2004.
- KLEIN, R. Phytoecdysteroids. **Journal of the american herbalist guild**, v. 7, p. 10-20, 2004.
- KOLLÁVORÁ, K. et al. Effect of auxins on *Karrwinskia humboldtiana* root cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 79, p. 213-221, 2004.
- KRISHNAVENI, K.S.; RAO, J. V. S. A new triterpene from callus of *Pterocarpus santalinus*. **Fitoterapia**, v. 71, p. 10-13, 2000.
- KRÓLICKA, A.; STANISZEWSKA, I.; BIELAWSKI, K. Establishment of hairy roots cultures of *Ammi majus*. **Plant Science**, v. 160, p. 259-264, 2001.
- KUHLEMEIER, C.; REINHARDT, D. Auxin and phyllotaxis. **Trends in Plant Science**, v. 6, n. 5, p. 187-189, 2001.
- KUMAR, P. S.; MATHUR, V. L. Chromosomal instability in callus culture of *Pisum sativum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 78, p. 267-271, 2004.
- KUSAKARI, K.; YOKOYAMA, M.; INOMATA, S. Enhanced production of saikosaponins by root culture of *Bupleurum falcatum* L. using two-step control of sugar concentration. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 1115-1120, 2000.
- KUZOVKINA, I.; AL'TERMAN, I.; SCHNEIDER, B. Specific accumulation and revised structures of acridone alkaloid glucosides in the tips of transformed roots of *Ruta graveolens*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 1095-1100, 2004.

- LAFONT, R. Phytoecdysteroids in world flora: diversity, distribution, biosynthesis and evolution. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 45, p. 276-295, 1998.
- LAMB, C. R. C. et al. Embriogênese somática e regeneração de plantas a partir de embrião maduro de aveia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 2, p. 123-130, 2002.
- LAMEIRA, O. A. et al. Efeito do thidiazuron na indução e manutenção de calos de erva baleeira (*Cordia verbenacea* L.). **Ciência Rural**, v. 27, n.1, p. 47-49, 1997.
- LARKIN, P. J.; SCOWCROFT, W. R. Somaclonal variation a novel of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 60, p. 197-214, 1981.
- LEDBETTER, D. I.; PREECE, J. E. Thidiazuron stimulates adventitious shoot production from *Hydrangea quercifolia* Bartr. leaf explants. **Scientia Horticulturae**, v. 101, p. 121-126, 2004.
- LEE, M. et al. Enhanced triterpene and phytosterol biosynthesis in *Panax ginseng* overexpressing squalene synthase gene. **Plant and cell Physiology**, v. 48, n. 8, p. 976-984, 2004.
- LEYSER, O. Regulation of shoot branching by auxin. **Trends in Plant Science**, v. 8, n. 1, p. 541-545, 2003.
- LITZ, R. E.; GRAY, D. J. Organogenesis and somatic embryogenesis. In: HAMMERSCHLAG, F. A.; LITZ, R. E. (Eds) **Biotechnology of perennial fruit crops**. California: CAB International, 1992. cap 1. p. 3-34.
- LITZ, R. E.; JARRET, R. L. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (Eds.) **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: CIAT, 1991. cap. 7. p. 143-172.
- LIU, G. S.; LIU, J. S.; QI, D. M. Factors affecting plant regeneration from tissue cultures of Chinese leymus (*Leymus chinensis*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 76, p. 175-178, 2004.
- LOE, N.H. et al. Micropropagation of zedoary (*Curcuma zedoaria* Roscoe) – a valuable medicinal plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 81, p. 81-119, 2005.
- LU, C. Y. The use of thidiazuron in tissue culture. **In vitro Cell Developmental Biology**, v. 29, p. 92-96, 1993.
- LUCZKIEWIEZ, M.; ZÁRATE, R.; DEMBINSKA-MIGAS, W. M. Production of pulchelin E in hairy roots, callus and suspension cultures of *Rudbeckia hirta* L. **Plant Science**, v. 163, p. 91-100, 2002.
- LYNDON, R. F. **Plant development: the cellular basis**. London: Unwin Hyman, 1990.
- MACIEL, A. L. de R. et al. Embriogênese somática indireta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. cv. Obatã. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 1, p. 107-116, 2003.
- MAGALHÃES, P. M. de. Agrotecnologia para el cultivo de fáfia o ginseng brasileiro. In: MARTINEZ, J.V. et al. **Fundamentos de agrotecnología de cultivo de plantas medicinales iberoamericanas**. Santafé de Bogotá: Convênio Andrés Bello/CYTED, 2000. p. 323-332.
- MAGIOLI, C. et al. Efficient shoot organogenesis of eggplant (*Solanum melongena* L.) induced by thidiazuron. **Plant Cell Report**, v. 17, p. 661-663, 1998.
- MALABADI, R. B.; MULGUND, G. S.; NATARAJA, K. Efficient regeneration of *Vanda coerulea*, na endangered orchid using thidiazuron. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 76, p.289-293, 2004.

- MANDAL, A. K. A.; CHATTERJI, A. K.; DUTTA GUPTA, S. Direct somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cotyledonary leaves of safflower. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 43, p. 287-289, 1995.
- MANSUR, E. et al. Cultura *in vitro* de *Pfaffia paniculata* (Martius) Kuntke, 1994. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 45, 1994, São Leopoldo, RS. **Anais...**São Leopoldo: SBB, 1994. p. 207.
- MANTELL, S.H. et al. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto : SBG, 1994. 344p.
- MARION-POLL, F. DESCOINS, C. Taste detection of phytoecdysteroids in larvae of *Bombyx mori*, *Spodoptera littoralis* and *Ostrinia nubilalis*. **Journal of Insect Physiology**, v. 48, p. 467-476, 2002.
- MARQUES, L.C. **Avaliação da ação adaptógena das raízes de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen - Amaranthaceae**. São Paulo, 1998. 145 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, 1998.
- MARQUES, L.C. et al. Psychopharmacological assessment of *Pfaffia glomerata* roots (extract BNT-08) in rodents. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 7, p. 566-572, 2004.
- MARTINS, C.F; NICOLOSO, F.T. Micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, n. 3, p. 53-61, 2004.
- MARTINUSSEN, I.; NELSEN, G.; SVENSON, L. *In vitro* propagation of choudbery (*Rubus chamaemorus*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 78, p. 43-49, 2004.
- MAY, R. A.; TRIGIANO, R. N. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Dendranthema grandiflora*. **Jounal American Society Horticulturae Science**, v. 116, n. 2, p. 366-371, 1991.
- MERCIER, H.; VIEIRA, C.C.J.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Tissue culture and plant propagation of *Gomphrena officinalis* - a Brazilian medicinal plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 28, p. 249-254, 1992.
- MERKLE, A.S; PARROT, W.A.; FLINN, B.S. **Morphogenic aspects of somatic embryogenesis**. In: THORPE, T. A (Ed.). *In vitro* Embryogenesis in plants. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 155-203.
- MISHIBA, K.; OKAMOTO, T.; MII, M. Increasing ploidy level in cell suspension cultures of *Doritaenopsis* by exogenous applications of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Physiologia Plantarum**, v. 112, p. 142-148, 2001.
- MOK, M C. et al. Cytokinin activity of N-phenyl-N'-1,2,3,-thiadiazol-5-ylurea (thidiazuron). **Phytochemistry**, v. 21, p. 1509-1511, 1982.
- MOK, M C.; MOK, D. W. S. The metabolism of (¹⁴C) thidiazuron in callus tissue of *Phaseolus lunatus*. **Physiologia Plantarum**, v. 65, p. 427-432, 1985.
- MOK, M. C. et al. Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivates in tissue culture systems. **HortScience**, v. 22, n. 6, p. 1194-1197, 1987.
- MONDAL, T. K. et al. Micropropagation of tea (*Camellia sinensis* L. O. Kuntke) using thidiazuron. **Plant growth Regulation**, v. 26, p. 57-61, 1998.

- MONTANARI, J. I.; MAGALHÃES, P. M.; QUEIROGA, C. L. Influence of plantation density and cultivation cycle in root productivity and tenors of beta ecdisone in *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Acta horticulturae**, v. 3, n. 502, p. 125-129, 1999.
- MONTEIRO, M. et al. Plant regeneration from protoplasts of alfafa (*Medicago sativa*) via somatic embryogenesis. **Scientia Agricola**, v. 60, n. 4, p. 683-689, 2003.
- MORALES, C. F. G. et al. Efeito do BAP e TDZ na calogênese e organogênese em internódios de maceira cv. Gala RW1. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 5, n. 3, p. 174-177, 1999.
- MROGINSKI, L. A.; ROCA, W. M. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (Eds.) **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: CIAT, 1991. cap. 2. p. 19-40.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NAJMUTDINOVA, D.K., SAATOV, Z. Lung local defense in experimental Diabetes mellitus and the effect of 11,20-dihydroxyecdysone in combination with maninil. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 41, p. 144-147, 1999.
- NAKANISHI, C. et al. Insect hormones, the structure of ponasterone A, an insect molting hormone from the leaves of *Podocarpus nakaii*. **Journal of Chemical Society**, p. 915-917, 1966.
- NETO, A. G.; COSTA, J.M.L.C.; BELATI, C. Analgesic and anti-inflammatory activity of a crude root extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 87-91, 2005.
- NETO, A. G. et al. Evaluation of the trypanocidal and leishmanicidal *in vitro* activity of the crude hydroalcoholic extract of *Pfaffia glomerata* (Amaranthaceae) roots. **Phytomedicine**, v. 11, p. 662-665, 2004.
- NICOLOSO, F. T. et al. Efeito de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) cultivadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 1, p. 84-90, 2003.
- NICOLOSO, F. T.; ERIG, A. C. Efeito do tipo de segmento nodal e tamanho do recipiente no crescimento de plantas de *Pfaffia glomerata in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Edição especial, p. 1499-1506, 2002.
- NICOLOSO, F.T. et al. Micropropagação do Ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Petersen), **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 3, n. 2, p. 11-18, 2001.
- NICOLOSO, F.T.; FORTUNATO, R.P.; M. A. FOGAÇA. Influência da posição da estaca no ramo sobre o enraizamento de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen em dois substratos. **Ciência Rural**, v.29, n. 2, p. 277-283, 1999.
- NISHIMOTO, N. et al. Ecdysterone from *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 1, n. 2, p. 188-191, 1986.
- NISHIMOTO, N. et al. Ecdysteroids from *Pfaffia iresinoides* and reassignment of some ¹³CNMR chemical shifts. **Phytochemistry**, v. 26, n. 9, p. 2505-2507, 1987.
- OKSMAN-CALDENTEY, K.; INZÉ, D. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 9, p. 433-440, 2004.

- OKUZUMI, K. et al. Biosynthesis of phytoecdysteroids in *Ajuga* hairy roots: clerosterol as a precursor of cyasterone, isocyasterone and 29-norcyasterone. **Tetrahedron Letters**, v. 44, p. 323-326, 2003.
- PARAMAGEETHAM, C. BABU, G. P.; RAO, J.V.S. Somatic embryogenesis in *Centella asiatica* L. na important medicinal and neutraceutical plant of India. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 79, p. 19-24, 2004.
- PARK, S.Y.et al. Mass production of *Eleutherococcus koreanum* plantlets via somatic embryogenesis from root cultures and accumulation of eleutherosides in regenerants. **Plant Science**, v. 168, n. 5, p. 1221-1225, 2005.
- PARROT, W. A.; MERKLE, S. A.; WILLIAMS, E. G. Somatic embryogenesis: potencial for use in propagation and gene transfer systems. In: MURRAY, D. R. **Advanced methods in plant breeding and biotechnology**. Melkham: Redwood, 1991. p.158-200.
- PLETSCH, M. Compostos naturais biologicamente ativos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 4, 1998.
- RAEMAKERS, C. J. J. M.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. G. F. Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. **Euphytica**, v. 81, p. 93-107, 1995.
- RAMAROSANDRATANA, A. V.; VAN STADEN, J. Tissue position, explant orientation and naphthaleneacetic acid (NAA) affect initiation of somatic embryos and callus proliferation in Norway spruce (*Picea abies*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 74, p. 249-255, 2003.
- RAO, S.; RAVISHANKAR, G. A. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 101-153, 2002.
- RATES, S. M.K.; GOSMANN, G. Gênero *Pfaffia*: aspectos químicos, farmacológicos e implicações para o seu emprego terapêutico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 2, p. 85-93, 2002.
- RAVISHANKAR, G. A.; MEHTA, A. R. Control of ecdysterone biogenesis and tissue cultures of *Trianthema postulacastrum*. **Journal of Natural Products**, v. 42, p. 152-158, 1979..
- RECH, S. B. et al. Cell cultures of *Rauwolfia sllovii*: growth and alkaloid production. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 54, p. 61-63, 1998.
- REINERT, J. Morphogenese und ihre controlle an geweberkulturen aus karotten. **Naturwissenschaften**, n. 54, p. 344, 1958.
- REIXACH, N. et al. Biosynthesis of ecdysteroids *in vitro* prothalli cultures of *Polypodium vulgare*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 3, p. 597-602, 1996.
- RIBAS, L. L. F. **Morfogênese *in vitro* e micropropagação de *Aspidosperma polyneuron* (Peroba-rosa)**. 1999. 175 f. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) – Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1999.
- ROTGÉ, M. P. Cultivos de células y tejidos vegetales para la obtención de productos naturales, **Fruticultura Profesional**, v. 42, p. 81-87, 1991.
- ROUT, G. R.; DAS, P. Somatic embryogenesis in *Simarouba glauca*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 37, p. 79-81, 1994.
- RUFFONI, B. et al. Organogenesis and embryogenesis in *Lisianthus russellianus* Hook. **Acta Horticulturae**, v. 280, p. 83-87, 1990.

- SALGADO, S. M. de L. et al. Efeito da utilização de TDZ e benomyl na micropropagação do crisântemo (*Dendranthema morifolium*). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 2, p. 274-280, 2001.
- SANAGO, M. H. M.; SHATTUCK, V. I.; STROMMER, J. Rapid plant regeneration of pea using thidiazuron. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 45, p. 165-168, 1996.
- SANCHES et al. Avaliação da atividade anti-hiperglicemiante da *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 2, p. 613-617, 2001.
- SANTOS, R. I Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2001, cap. 16. p. 333-364.
- SARWAR, M.; SKIRVIN, R. M. Effect of thidiazuron and 6-benzylaminopurine on adventitious shoot regeneration from leaves of three strain of "McIntosh" apple (*Malus x domestica* Borkh.) *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v. 68, p. 95-100, 1997.
- SAVCHENKO, T. et al. Distribution and identity of phytoecdysteroids in *Gomphrena* spp. (Amaranthaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 26, p. 337-346, 1998.
- SAVCHENKO, T. et al. Phytoecdysteroids from *Lamium* spp: identification and distribution within plants. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, p. 891-900, 2001.
- SHIOBARA, Y. et al. Iresinoside, a yellow pigment from *Pfaffia iresinoides*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 3, p. 953-956, 1992a.
- SHIOBARA, Y. et al. Pfaffane-type nortriterpenoids from *Pfaffia pulverulenta*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 5, p. 1737-1740, 1992b.
- SHIOBARA, Y.; INOUE, S.; KATO, K. A nortriterpenoid, triterpenoid and ecdysteroids from *Pfaffia glomerata*. **Phytochemistry**, v. 32, n. 6, p. 1527-1530, 1993a.
- SHIOBARA, Y.; INOUE, S.; KATO, K. Pfaffane-type nortriterpenoids from *Pfaffia pulverulenta*. **Phytochemistry**, v. 33, n. 4, p. 897-899, 1993b.
- SIMÕES, C. M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2001. 833 p.
- SKIRVIN, R. M.; MCPHEETER, K. D.; NORTON, M. Sources and frequency of somaclonal variation. **HortScience**, v. 29, n. 11, p. 1232-1237, 1993.
- SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. **Symposium of the Society for Experimental Biology**, v. 11, p. 118-131, 1957.
- SKREBSKY, E. C.; NICOLOSO, F. T.; FERRÃO, G. da E. Sacarose e período de cultivo *in vitro* na aclimatização *ex vitro* de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen). **Ciência Rural**, v. 34, n. 5, p. 1471-1477, 2004.
- SLÁMA, K. et al. Insect hormones in vertebrates: anabolic effects of 20-hydroxyecdysone in Japanese quail. **Experientia**, v. 52, p. 702-706, 1996.
- SLÁMA, K., LAFONT, R., Insect hormones: ecdysteroids: their presence and actions in vertebrates. **European Journal of Entomology**, v. 92, p. 355-377, 1995.
- SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. **Flora ilustrada catarinense - Amarantáceas**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1972. 110 p.

- SORVARI, S. et al. Preculture medium promotes direct shoot regeneration from micropropagated strawberry leaf disks. **HortScience**, v. 28, n. 1, p. 55-57, 1993.
- STEFANELLO, S. et al. Cultura *in vitro* de segmentos nodais de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*). **Revista Científica Rural**, v. 8, n.2, p. 09-17, 2003.
- STEWART, F. C.; MAPES, M.O.; MEARS, K. Growth and organized development of cultured cells. **American Journal Botany**, v. 45, p. 705-708, 1958.
- STOJAKOWSKA, A.; KISIEL, W. Secondary metabolites from a callus of *Scutellaria columnae*. **Fitoterapia**, v. 70, p. 324-325, 1999.
- SUN, Y. et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration in wild cotton (*Gossypium klotzschianum*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 75, p. 247-253, 2003.
- SVATOS, A. & MACEK, T. The rate of ecdysteroid production in suspension cultured cells of the fern *Pteridium aquilinum*. **Phytochemistry**, v. 35, n. 3, p. 651-654, 1994.
- TABARES, E.; PACHÓN, I.; ROCA, W. M. Variación somaclonal y su aplicación al mejoramiento de cultivos. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (Eds.) **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: CIAT, 1991. Cap. 14. p. 339-360.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- TAKASAKI, M. et al. Cancer chemopreventative agents (antitumor-promoters) from *Ajuga decumbens*. **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 972-975, 1999.
- TAKEMOTO et al. Studies on the constituents of *Achyranthis radix*, **Yakugaku Zasshi**, v. 87, p. 1463-1468, 1967.
- TANIGUCHI et al. Effect of *Pfaffia iresinoides* on the experimental inflammatory process in rats. **Phytoterapy Research**, v. 11, n. 8, p. 568-571, 1998.
- TASCHETTO, O. M.; PAGLIARINI, M. S. Occurrence of 2n and jumbo pollen in the Brazilian ginseng (*Paffia glomerata* e *P. tuberosa*). **Euphytica**, v. 133, p. 139-145, 2003.
- TEIXEIRA, B. J.; MARBACH, P. A. S. Otimização do processo de embriogênese somática em cacau (*Theobroma cacao* L.). **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 29, p. 100-103, 2003.
- THEILER-HEDTRICH, C.; THEILER-HEDTRICH, R. Influence of TDZ and BAP on adventitious shoot regeneration from apple leaves. **Acta Horticulturae**, v. 280, p. 195-199, 1990.
- THORPE, T. A.; HARRY, I. S.; KUMAR, P. P. Application of micropropagation to forestry. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrech: Kluwer Academic, 1991. p.331-336.
- THORPE, T. A. **In vitro Embryogenesis in plants**. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, 1995.
- THORPE, T. A. *In vitro* organogenesis and somatic embryogenesis: physiological and biochemical aspects. In: ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K. A.; TRAN THANK VAN, K. (Eds.) **Morphogenesis in plant**. New York: Plenum Press, 1994. p.19-38.
- TIWARI, V.; TIWARI, K. N.; SINGH, B. D. Comparative studies of cytokinin on *in vitro* propagation of *Bacopa monniera*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 66, p. 9-16, 2001.
- TOKER, G. et al. Callus formation and cucurbitacin B accumulation in *Ecballium elaterium* callus cultures. **Fitoterapia**, v. 74, p. 618-623, 2003.

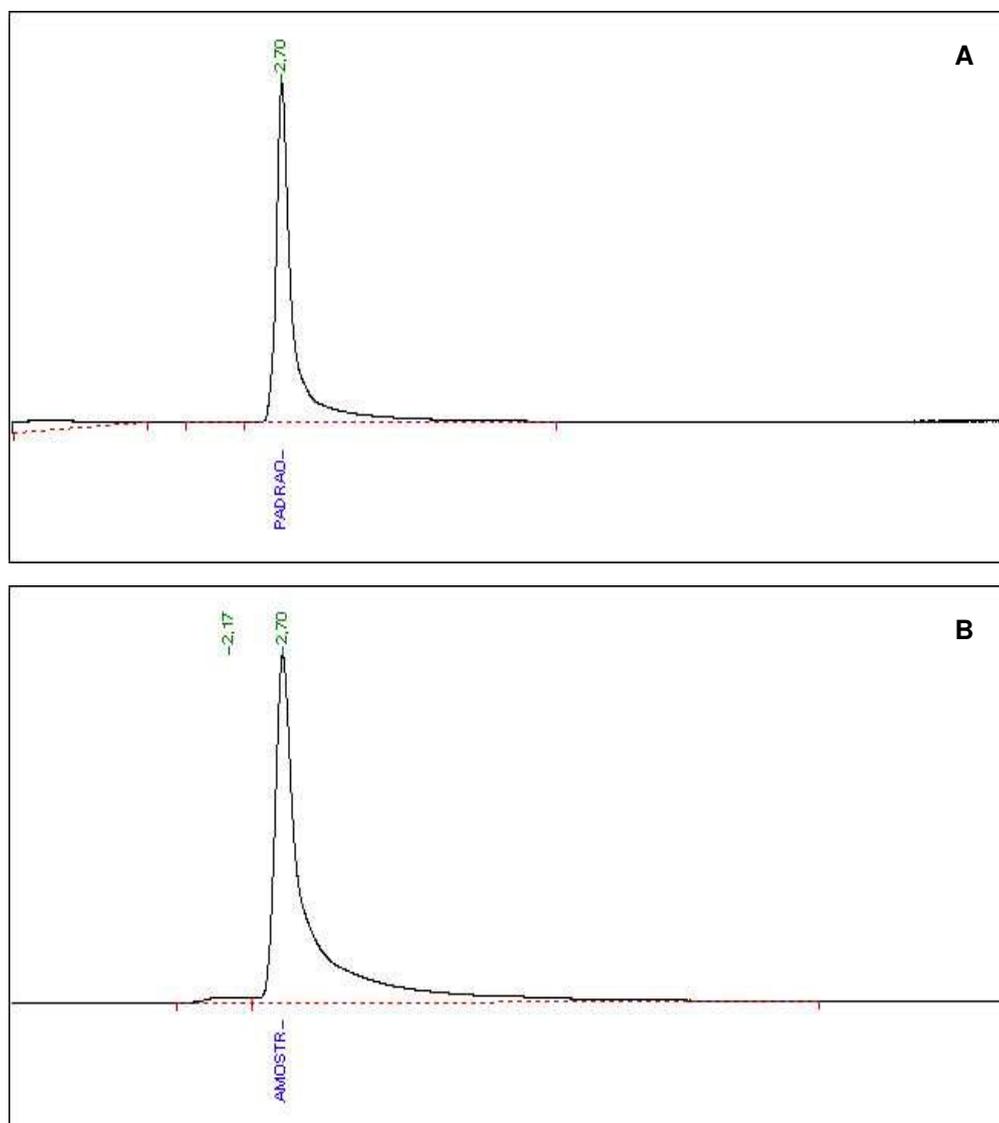
- TOMÁS, J. et al. Composition and location of phytoecdysteroids in *Ajuga reptans* *in vivo* and *in vitro* cultures **Phytochemistry**, v. 31, n. 5, p. 1585-1591, 1992.
- TOMÁS, J. et al. Phytoecdysteroid production by *Ajuga reptans* tissue culture. **Phytochemistry**, v. 32, n. 2, p. 317-324, 1993.
- TREWAVAS, A. Growth substance sensitivity: the limiting factor in plant development. **Physiologia Plantarum**, v. 55, p. 60-72, 1982.
- TREWAVAS, A. How do plant growth substance work? II. **Plant, Cell and Environment**, v. 14, p. 1-12, 1991.
- VAN DER VALK, P. et al. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic-derived callus cultures of three *Allium* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 39, p. 181-191, 1992.
- VAN NIEUWKERK, J. P.; ZIMMERMAN, R. H. FORDDHAN, I. Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation *in vitro*. **HortScience**, v. 21, p. 516-518, 1986.
- VANEK, T. et al. Production of ecdysteroids by plant cell culture of *Pteridium aquilinum*. **Biotechnology Letters**, v. 12, p. 727-730, 1990.
- VARGA, A.; THOMAS, L. H.; BRUINSMA, J. Effects of auxins on epigenetic instability of callus-propagated *Lalanchoe blossfeldiana* Poelln. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 15, p. 223-231, 1998.
- VASIL, I. K. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cereal and grasses. In: FUJIWARA, A. **Plant Tissue Culture**. Tokyo: Maruzen, 1982. p. 101-103.
- VENKATAIAH, P.; CHRISTOPHER, T.; SUBHASH, K. Thidiazuron induced high frequency adventitious shoot formation and plant regeneration in *Capsicum annum* L. **Journal of Plant Biotechnology**, v. 5, n. 4, p.245-250, 2003
- VERPOORTE, R.; MARASCHIN, M. Engenharia do metabolismo de plantas medicinais. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Chapecó: Argos, 2001. p. 381-432.
- VIEIRA, C. C. J.; BRAGA, M. R.; FIGUEREDO-RIBEIRO, R. C. L. Fructans in callus of *Gomphrena macrocephala* St.-Hil. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 42, p. 233-238, 1995.
- VIGO, C. L.S.; NARITA, E.; MARQUES, L.C. Validação da metodologia de quantificação espectrofotométrica das saponinas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen - Amaranthaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 2, p. 46-49, 2003.
- VIGO, C.L.S. et al. Caracterização farmacognóstica comparativa de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Hebanthe paniculata* Martius - Amaranthaceae Kuntze. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.6, n.2, p.7-19, 2004a.
- VIGO, C.L.S. et al. Influências da variação sazonal e tipos de secagem nas características da droga vegetal – raízes de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.14, n.2, p.137-144, 2004b.
- VYAS, M.; BANSAL, Y.K. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in semul (*Bombax ceiba*). **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v. 79, p.115-118, 2004.

- WILLIAMS, E. G.; MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, v. 57, p. 443-462, 1986.
- WU, I.F.; CHEN, J.T.; CHANG, W.C. Effects of auxins and cytokinins on embryo formation from root-derived callus of *Oncidium* 'Gower Ramsey'. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 77, p. 107-109, 2004.
- YU, K. et al. Ginsenoside production by hairy root cultures of *Panax ginseng*: influence of temperature and light quality. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, p. 53-56, 2005.
- YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química industrial**. Chapecó: Argos, 2001. 500 p.
- ZAERR, J. B.; MAPES, M. O. Action of growth regulators. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. (Eds.) **Tissue culture in forestry**. Dordrech: Martinus Nijhoff, 1985. p. 231-255.
- ZHANG, W.; CURTIN, C.; FRANCO, C. Towards manipulation of post-biosynthetic events in secondary metabolism of plant cell cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 688-696, 2002.
- ZIMMER, A.R. et al. HPLC method for the determination of ecdysterone in extractive solution from *Pfaffia glomerata*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, p. 450-453, 2006.
- ZIMMERMAN, J. L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **The Plant Cell**, v. 5, p. 1411-1423, 1993.
- ZIV, M. *In vitro* hardening and acclimatization of tissue culture plants. In: WITHERS, L. A.; ALDERSON, P. G. **Plant tissue culture and its agriculture applications**. London: Butterwoths, 1986. p.167-196.

APÊNDICE A – Artigos elaborados

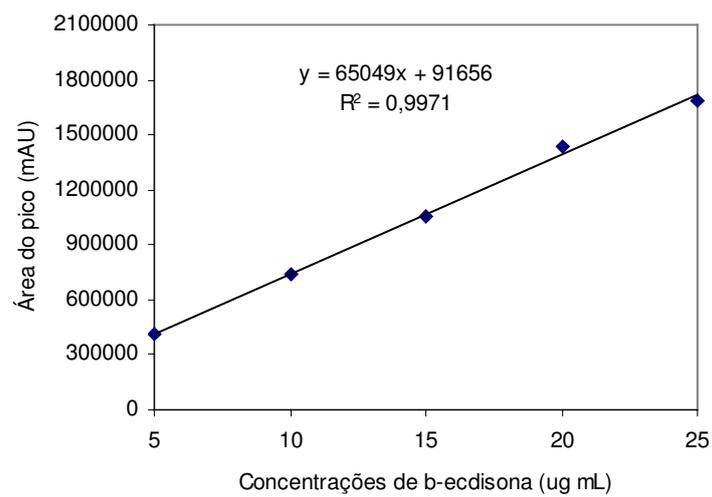
- 1 **Título:** Otimização da micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken
Periódico: Ciência Rural
Situação: publicado (v. 36, n. 3, p. 845-851, 2006)
- 2 **Título:** Propagação clonal rápida de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken, utilizando Thidiazuron
Periódico: Revista Brasileira de Plantas medicinais
Situação: no prelo
- 3 **Título:** Indução de calos e aspectos morfogênicos de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken
Periódico: Revista Brasileira de Plantas medicinais
Situação: no prelo
- 4 **Título:** Embriogênese somática em *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken – uma espécie de ginseng brasileiro
Periódico: Revista Brasileira de Botânica
Situação: em tramitação

APÊNDICE B - Co-cromatografia



A - Padrão β -ecdisona

B - Padrão β -ecdisona e amostra das raízes de *Pfaffia glomarata* (acesso JB-UFSM)

APÊNDICE C – Curva analítica do padrão β -ecdisona

APÊNDICE D – Produtos e Fabricantes

β-ecdisona	CromaDex
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	Merck
Ácido giberélico	Sigma
Ácido indolilacético	Vetec
Ácido naftalenoacético	BDH
Ágar	Merck
Álcool etílico	Vetec
Azul de Toluidina	Sigma
Benomyl	Dupont do Brasil SA
Benzilaminopurina	Sigma
Cloreto de Mercúrio	Quimbras Indústrias Químicas Ltda
Carmim	Nuclear
Carvão Ativo	Sigma
CLAE/HPLC	Perkim-Elmer
Coluna Analítica RP18	Perkin-Elmer
Detergente neutro	Friboi
Glutaraldeído	Nuclear
Hipoclorito de Sódio	Girando Sol
Resina Technovit 7100	Heraeus Kulzer
Membrana de 0,45μ m	Millipore
Membrana de 14μ m	Jprolab Comércio de Produtos Ltda
Metanol, grau HPLC	Vetec
Mio-Inositol	Vetec
Plantmax® Hortaliças	Eucatex Química e Mineral Ltda, São José dos Campos. Fabricado em: 11/11/2005
Pré- coluna RP18	Perkin-Elmer
Resina Líquida (2-hidroxietilMetacrilato)	Heraeus Kulzer
Sacarose	Synth
Thidiazuron	Sigma